



**HAL**  
open science

# Recherche du rôle des MSL dans les poils racinaires lors de la mise en place de la symbiose fixatrice d'azote chez *Medicago truncatula*

Marjorie Guichard

► **To cite this version:**

Marjorie Guichard. Recherche du rôle des MSL dans les poils racinaires lors de la mise en place de la symbiose fixatrice d'azote chez *Medicago truncatula*. Organisation et fonctions cellulaires [q-bio.SC]. Université Paris Saclay (COMUE), 2017. Français. NNT: 2017SACLS143 . tel-01611129

**HAL Id: tel-01611129**

**<https://theses.hal.science/tel-01611129>**

Submitted on 5 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.

NNT: 2017SACLS143

THÈSE DE DOCTORAT  
DE  
L'UNIVERSITÉ PARIS-SACLAY  
PRÉPARÉE À  
L'UNIVERSITÉ PARIS SUD

ECOLE DOCTORALE N° 567  
Sciences du végétal : du gène à l'écosystème (SDV)

Spécialité de doctorat : Biologie

Par

**M<sup>me</sup> Marjorie Guichard**

Recherche du rôle des MSL dans les poils racinaires lors de la mise en place de la symbiose fixatrice d'azote chez *Medicago truncatula*

**Thèse présentée et soutenue à Gif sur Yvette, le 21 juin 2017**

**Composition du Jury :**

M. Höfte Herman	Directeur de recherche, INRA	Président du jury
M. Bouteau François	Maître de conférences, Université Paris Diderot	Rapporteur
M <sup>me</sup> Gough Clare	Directrice de recherche, CNRS	Rapporteur
M. Allain Jean-Marc	Maître de conférences, École polytechnique	Examineur
M. Sentenac Hervé	Directeur de recherche, INRA	Examineur
M. Frachisse Jean-Marie	Chargé de recherche, CNRS	Directeur de thèse







# Remerciements

Mes remerciements vont tout d'abord à Hélène Barbier-Brygoo, directrice de l'ISV, pour m'avoir ouvert les portes de son institut au commencement de ma thèse. Mes quatre années passées dans le campus du CNRS de Gif-sur-Yvette ont aussi été témoins d'un changement collectif majeur. Je remercie donc également Thierry Meinnel, directeur de l'I2BC de m'avoir à son tour accueillie dans ce tout jeune institut.

Je tiens également à remercier Anne-Aliénor Véry, Sandra Bensmihen et Pascal Ratet d'avoir pris le temps de me conseiller pendant mes différents comités de thèse.

**☺ Viens ensuite l'équipe des Minions. Accrochez-vous les copains, parce qu'il y a du monde!**

Tout d'abord, merci Sébastien Thomine, le minion en chef, de m'avoir accueillie au sein de ton équipe de recherche. J'ai apprécié ton ouverture d'esprit aux propositions de chacun des membres de l'équipe et tes resserrages de vis bien gérés.

A Jean-Marie Frachisse, mon directeur de thèse, je décerne la médaille de la patience, de la compréhension et du café à l'alcool de prune maison quand vient la saison. J'ai apprécié mon voyage avec toi dans l'univers de l'électrophysiologie que tu m'as fait découvrir. J'espère seulement que mes disparitions intempestives vers la fac, mes hauts, mes bas, ma rédaction vitesse moteur diesel (sans particules) ne t'ont pas fait avoir trop de sueurs froides. Je ne te dirai donc jamais assez merci!

Merci à Lydia, la vraie pionnière des MSL de Medicago et ma co-épileuse (de racines, soyons clair, hein!). Je te souhaite de te plaire dans ce que tu fais maintenant. Daniel, tu as été mon deuxième mentor de patch. Si je dois retenir une chose, c'est que pour utiliser ce

## Remerciements

---

genre de technique, il faut rester coooooooooo! J'espère pouvoir te recroiser au détour d'un couloir de labo (ou d'une rivière de kayak). Merci aussi à Tiffanie. Je ne t'ai croisée que pendant un court laps de temps dans l'équipe MSL, mais j'ai apprécié tes conseils pendant mes débuts sur le sujet. Enfin Mamitiana, je voudrais te remercier à mon tour car tu m'as beaucoup aidée sur le plan technique. Tu as aussi inconsciemment participé à ma formation d'apprenti encadrante, ce qui est loin d'être négligeable, je pense, quand on connaît mon caractère farfelu 😊

Prenons les Minions CLC maintenant. Sophie, j'ai particulièrement aimé ton savoir-faire pour dire aux gens ce qu'il faut, le bon comme le mauvais, sans les blesser, mais aussi pour ton réconfort. Merci Christelle de prendre soin de l'organisation technique du labo et de notre sécurité. Je suis témoin, en tant que voisine de bureau, de la chronophagie de cette tâche. Mais je suis impressionnée de voir avec quel talent tu es capable de concilier cela avec ta vie de famille. Chapeau! Merci aussi à Alexis pour ta tolérance envers les gens qui aiment les pâtes (bien) fondantes. Enfin, merci à mes collègues *Totally Thésardes* Elsa et Julie. On était le trio de choc de l'équipe, digne d'une série télévisée! Toi Elsa, la rouquine au vélo d'acier, toi Julie la blondinette dompteuse de lapins, et moi, la brunette et sa carafe d'eau d'abondance. On aura bien rigolé!

Voilà le tour des Minions métaleux. Merci Sylvain, le fan des "bananaaaaa" pour tes conseils et remarques scientifiques toujours précis et justifiés. Merci aussi à Jérôme, le maître des longs périple cyclistes. Merci Michele, l'italien facétieux du groupe, maître de la pagaie. Merci à Catherine, la maîtresse du yoga. Vanesa, toujours énergique, toujours efficace, toujours de bonne humeur, toujours compatissante, toujours sincère... ¡Quiero estar como tu cuando sea mayor! Merci à Dubiel et son bon rhum cubain. Merci à Joni, l'ensorceleuse qui ressuscite les plantes. Merci à Viviane, le lynx des polices de caractère. Merci à Mathieu, le

maître de la bétonnière. J'espère aussi que mes remerciements réussiront à vous atteindre à l'autre bout de la terre, Astrid et Eiri.

N'oublions pas bien sur tous les stagiaires: N' Diaye, Adrien, Guillaume, Louise, Florian, Marianne, François, Sophia, Thierry, Jade, Olivier, Fadhi, Cindy, Nicolas, Erwan (j'espère n'oublier personne): Vous avez tous participé à la vie et à l'animation de l'équipe!

En bref, MERCI A TOUS LES MINIONS! Vous étiez tous une part de pizza sans croûte!

🌀 **Maintenant, passons aux autres compagnons de galère: les thésards et postdoc des autres équipes!**

J'ai aussi apprécié passer du temps avec une personne qui ronronne, qui chantonne et dont le copain vient de la ville des trois garces (pardons... des trois grâces). Je veux bien sûr parler d'Amanda! Merci aussi à Sara une autre grande collègue thésarde: je te souhaite de bien rouler ta bosse à Barcelone. Merci aussi Natali, par ta compassion d'ex doctorante-enseignante. Alvaro, j'ai rarement vu quelqu'un apprendre le français aussi vite que toi. Bravo! Je ne peux non plus faire l'impasse sur mes collègues de promo déjà docteurs Arthur et Guillaume: merci aussi à tous les deux les inséparables! I would like also to thank Emma, for her help for my english summary correction for this manuscript. Enfin, les thésards des autres équipes, départements ou instituts : Laurine, Maëlle, Florian, Mahnaz, Fathi, Camille, Théophile, Stéphane... Il y en a tellement!

🌀 **The before last, but not least**

N'oublions pas Anne l'ananas, le coach sportif à toute épreuve, tous les gens de la plateforme de microscopie, qui ont bien répondu à mes "dumb questions", tous mes collègues enseignants... Encore une fois j'en oublie encore, aussi je m'en excuse.

## Remerciements

---

### ✿ Et pour finir...

Enfin, je voudrais bien sûre remercier ma petite famille de région parisienne, d'Auvergne, du Jura, de Berlin, de Mayenne, les présents comme les absents, pour tout le soutien qu'ils m'ont apporté tout au long de mes études, en particulier mes parents. Vous avez tout fait pour rendre ce chemin le moins contraignant possible: MERCI!

# Avant-propos

La mission principale du chercheur n'est pas seulement de produire et développer des connaissances scientifiques pour comprendre ce qui l'entoure mais aussi de diffuser son travail, par exemple au cours de séminaires ou dans des articles de vulgarisation scientifiques. Cela implique donc de savoir faire comprendre ce travail au public concerné. Dans cette démarche, des notes en bas de page et certaines figures, présentes dans les chapitres de thèse ou dans les annexes, ont été ajoutées. Elles tentent d'expliquer de manière claire certaines notions pouvant faciliter la compréhension du sujet à un public de scientifiques allant des biologistes aux physiciens. En effet, ce travail de thèse bien que profondément ancré dans la biologie, flirt aussi par certains de ses aspects avec la biophysique.

L'autre aspect du travail de chercheur concerne le travail en équipe. Plusieurs personnes ont donc significativement contribué au travail présenté dans cette thèse. Lydia Alloul, stagiaire en licence professionnelle, a initié ce projet en participant au clonage des séquences codantes de certains candidats (*MtMSL2.4* et *MtMSL2.5*). Elle a également participé aux premières caractérisations de la présence des transcrits des *MtMSL* dans les poils racinaires. Daniel Tran, post-doctorant dans le cadre du projet ANR CAROLS (ChAnnels et Reactive Oxygen species in Legume root hair: role in Symbiosis with Rhizobium), a notamment réalisé les mesures électrophysiologiques du courant généré par *MtMSL2.4* dans le quintuple mutant *AtmslΔ5*. Enfin, Mamitiana Ranoelison, stagiaire en licence professionnel, a également participé à la réalisation de différentes constructions plasmidiques.



# Table des matières

<b>Liste des figures .....</b>	<b>13</b>
<b>Liste des tableaux.....</b>	<b>17</b>
<b>Liste des abréviations.....</b>	<b>19</b>
<b>Chapitre I. Introduction bibliographique .....</b>	<b>21</b>
I.1. Focus sur les interactions symbiotiques précoces chez les Légumineuses.....	22
I.1.1. La symbiose: quels acteurs, quels lieux et pourquoi faire? .....	22
I.1.2. Bases moléculaires des interactions précoces.....	23
I.1.3. L'entrée des artistes modifie les poils racinaires et les cellules du rhizoderme.....	28
I.2. Toucher du doigt les interactions biotiques .....	42
I.2.1. Les stimuli mécaniques à l'échelle de l'organe lors des interactions plantes / pathogènes ou ravageurs.....	42
I.2.2. Des stimuli mécaniques localisés induisent des modifications cellulaires .....	44
I.2.3. Rôle des stimuli mécaniques dans les interactions symbiotiques.....	45
I.3. Une cellule, des mécanosenseurs.....	47
I.4. Les différentes familles de canaux MS .....	48
I.4.1. Piezo: l'inconnu de la bande .....	48
I.4.2. OSCA: canal MS? .....	49
I.4.3. MCA: de bons candidats .....	50
I.4.4. Les MSL: de bons candidats déjà éprouvés .....	51
I.5. Objectifs de la thèse .....	64
<b>Chapitre II. Recherche de <i>MtMSL</i> candidats par des analyses <i>in silico</i> .....</b>	<b>67</b>
II.1. Recherche des <i>MtMSL</i> dans le génome de <i>M. truncatula</i> .....	67
II.2. Classification des <i>MtMSL</i> .....	69
II.3. Structure de <i>MtMSL</i> .....	72
II.4. Conclusion.....	74
<b>Chapitre III. Les <i>MtMSL</i> de la classe II: quelques généralités sur leur expression .....</b>	<b>75</b>
III.1. Analyses <i>in silico</i> de données transcriptomiques: vers une première vue d'ensemble de l'expression des <i>MtMSL</i> .....	75
III.2. La fusion transcriptionnelle: vers une analyse tissulaire de l'expression des <i>MtMSL</i> .	78
III.2.1. Localisation de l'expression de certains <i>MtMSL</i> dans les tissus racinaires .....	78
III.2.2. Localisation de l'expression de certains <i>MtMSL</i> dans les nodules .....	82

III.3. Conclusion et discussion.....	82
<b>Chapitre IV. Les <i>MtMSL</i>: s'expriment-ils dans les poils racinaires lors des étapes précoces de la symbiose et sont-ils localisés à la membrane plasmique? .....</b>	<b>85</b>
IV.1. Les <i>MtMSL</i> s'expriment-ils dans les poils racinaires lors des étapes précoces de la symbiose?.....	85
IV.1.1. Quantifications des ARNm des <i>MtMSL</i> dans les poils racinaires .....	86
IV.1.2. Influence des NFs sur la transcription des <i>MtMSL</i> dans les poils racinaires.....	90
IV.2. <i>MtMSL2.1</i> et <i>2.4</i> sont-ils adressés à la membrane plasmique? .....	92
IV.3. Conclusion et discussion .....	97
<b>Chapitre V. Analyses électrophysiologiques des activités MS du poil racinaire et de <i>MtMSL2.4</i> 101</b>	
V.1. <i>MtMSL2.4</i> induit-il des courants mécanosensibles? .....	101
V.2. Existe-t-il un canal MS dans les poils racinaires de <i>M. truncatula</i> ?.....	104
V.3. Conclusion et discussion .....	106
<b>Chapitre VI. <i>MtMSL2.4</i>: à quoi sers-tu dans la racine et dans les poils racinaires de <i>M. truncatula</i> ?!?......</b>	<b>109</b>
VI.1. <i>MtMSL2.4</i> a-t-il un rôle à différentes étapes de la mise en place de la symbiose? ..	111
VI.1.1. Effet de <i>MtMSL2.4</i> sur l'infection des poils racinaires par les rhizobia .....	111
VI.1.2. Effet de <i>MtMSL2.4</i> sur le développement des nodules .....	112
VI.2. <i>MtMSL2.4</i> modifie-t-il la croissance des poils racinaires?.....	114
VI.2.1. Mise en place d'un système semi-automatique de mesure des poils racinaires	114
VI.2.2. Effet de <i>MtMSL2.4</i> sur la croissance des poils racinaires et sur les zones de division et d'élongation racinaire.....	128
VI.3. <i>MtMSL2.4</i> modifie-t-il la croissance de la racine principale et l'émergence des racines secondaires?.....	133
VI.4. Conclusion et discussion .....	136
<b>Chapitre VII. Conclusion générale et discussion .....</b>	<b>139</b>
VII.1. Résultats principaux .....	140
VII.2. Discussion et perspectives à court et moyen terme.....	143
VII.2.1. Approfondir l'analyse des propriétés électrophysiologiques de <i>MtMSL2.4</i> .....	143
VII.2.2. Tirer profit des mutants d'insertion Tnt1 générés .....	144
VII.3. Discussion et perspectives à long terme.....	146
VII.3.1. Rôle des <i>MtMSL</i> dans la symbiose: et après? .....	146
VII.3.2. Tirer profit des différences entre <i>MtMSL2.4</i> et <i>AtMSL10</i> pour mettre en relation la structure à la fonction moléculaire de ces canaux .....	147
VII.3.3. Pourquoi pas un rôle des MSL dans la résistance aux pathogènes et à l'herbivorie? .....	148
<b>Chapitre VIII. Matériels et méthodes .....</b>	<b>151</b>

VIII.1. Recherche, classification et analyse des transcrits des gènes candidats.....	151
VIII.1.1. Recherche des <i>MSL</i> dans le génome de différentes espèces.....	151
VIII.1.2. Classification et prédiction des structures des candidats .....	153
VIII.2. Construction des vecteurs pour les fusions transcriptionnelles, traductionnelles et l'extinction de gènes par microARN artificiel .....	153
VIII.2.1. Vecteurs pour les fusions transcriptionnelles .....	153
VIII.2.2. Vecteurs pour les fusions traductionnelles .....	161
VIII.2.3. Vecteurs pour l'extinction de gènes par microARN artificiel .....	164
VIII.3. Matériel biologique .....	170
VIII.3.1. Lignées sauvages de <i>M. truncatula</i> .....	170
VIII.3.2. Lignées mutantes de <i>M. truncatula</i> .....	170
VIII.3.3. Microbiologie: souches de bactéries et culture .....	176
VIII.4. Culture et traitements divers .....	180
VIII.4.1. Conditions de culture pour l'extraction des poils racinaires, la mesure de la taille des poils et le traitement des racines aux NFs.....	181
VIII.4.2. Production de racines génétiquement modifiées par hairy root.....	183
VIII.4.3. Inoculation des plantes pour le comptage des nodules.....	185
VIII.4.4. Etude de la croissance racinaire et de l'émergence des racines secondaires...	187
VIII.4.5. Condition de croissance des plantes poussant en serre .....	187
VIII.5. Analyses de l'expression des <i>MtMSL</i> .....	188
VIII.5.1. Analyse des transcrits de poils racinaires par qPCR ou RNAseq.....	188
VIII.5.2. Analyse des données de transcriptomique .....	193
VIII.5.3. Analyse des transcrits par coloration GUS.....	193
VIII.6. Observations microscopiques et macroscopiques.....	194
VIII.6.1. Observations en microscopie confocale.....	194
VIII.6.2. Observation en microscopie et macroscopie à éclairage diascopique .....	195
VIII.7. Etudes électrophysiologiques.....	196
VIII.7.1. Extraction des protoplastes .....	196
VIII.7.2. Enregistrements électrophysiologiques .....	199
VIII.7.3. Quantification de l'amplitude des courants unitaires .....	203
<b>Bibliographie.....</b>	<b>207</b>
<b>Annexes</b>	<b>217</b>
<b>Articles</b>	<b>223</b>
Article 1. Nod Factor Effects on Root Hair - specific Transcriptome of <i>Medicago truncatula</i> : Focus on Plasma Membrane Transport Systems and Reactive Oxygen Species Networks	223
Article 2. Mechanosensitive MSL10 channels mediate oscillatory perception in plant..	267



# Liste des figures

Figure 1. Structures des facteurs Nod et Myc .....	23
Figure 2. Cascades de signalisation induites chez la plante par les facteurs Nod et Myc .....	25
Figure 3. Mécanismes de développement des poils racinaires .....	29
Figure 4. Mécanismes de développement des poils racinaires lors d'une infection par des rhizobia .....	35
Figure 5. Modèle expliquant la déformation du poil racinaire en réponse aux NFs .....	37
Figure 6. Mécanismes d'infection du rhizoderme lors d'une symbiose à AMs.....	40
Figure 7. Modèle de propagation du signal entraînant la synthèse de JA en réponse à une blessure .....	43
Figure 8. Crosses de berger de <i>M. truncatula</i> chez des plantes sauvages ou mutantes <i>dmi2</i>	46
Figure 9. Acteurs moléculaires de la mécanoperception cellulaire chez les plantes.....	47
Figure 10. <i>EcMcsS</i> s'ouvre à de plus faibles tensions mécaniques qu' <i>EcMscL</i> .....	52
Figure 11. Cristallisation de <i>EcMscS</i> : vers une meilleure compréhension de son fonctionnement.....	53
Figure 12. <i>EcMscS</i> : des domaines et des fonctions.....	54
Figure 13. Modèles pouvant expliquer le mécanisme de mécanoperception des canaux MS	55
Figure 14. <i>AtMSL2</i> : des résidus et des fonctions dans la régulation de la structure du chloroplaste .....	59
Figure 15. <i>AtMSL8</i> : des résidus et des fonctions dans la germination du grain de pollen ....	61
Figure 16. <i>AtMSL10</i> : un canal, des fonctions indépendantes ? .....	63
Figure 17. Relations phylogénétiques de la famille des MSL .....	70
Figure 18. Structure des MSL chez <i>Medicago</i> .....	72
Figure 19. Conservation des acides aminés chez les <i>MtMSLs</i> .....	73
Figure 20. Etudes <i>in silico</i> de l'expression des <i>MtMSL</i> dans différents organes et lors d'un stress hydrique .....	77
Figure 21. Profils d'expression de <i>MtMSL2.3</i> , <i>2.4</i> et <i>2.5</i> , révélés par coloration histochimique GUS dans les racines.....	81
Figure 22. Profils d'expression de <i>MtMSL2.3</i> , <i>2.4</i> et <i>2.5</i> , révélés par coloration histochimique GUS, dans les nodules .....	83
Figure 23. Contrôle de la contamination des échantillons de poils racinaire par d'autres tissus .....	87
Figure 24. Expression des <i>MtMSL</i> dans les poils racinaires .....	88

## Liste des figures

---

Figure 25. Expression des <i>MtMSL</i> et de <i>MtENOD11</i> dans les poils racinaires en réponse au NF .....	89
Figure 26. Etudes in silico de l'expression des <i>MtMSL</i> dans la racine, le rhizoderme et les poils racinaire en réponse au NF.....	91
Figure 27. Localisation subcellulaire de <i>MtMSL2.4</i> fusionné à une GFP surexprimé dans la racine.....	94
Figure 28. Localisation subcellulaire de <i>MtMSL2.4</i> fusionné à une GFP exprimé dans la racine sous le contrôle du promoteur <i>pMtMSL2.4</i> .....	96
Figure 29. <i>MtMSL2.4</i> exprimé dans le fond silencieux <i>AtmslΔ5</i> présente une activité canal MS .....	102
Figure 30. Conductance de <i>MtMSL2.4</i> exprimée en protoplaste <i>mslΔ5</i> d'Arabidopsis et amplitude du courant MS des poils racinaires de Medicago.....	104
Figure 31. Activité de <i>MtMSL2.4</i> observée en patch excisé .....	105
Figure 32. Une activité canal mécanosensible est observée dans les protoplastes de poils racinaires de Medicago .....	106
Figure 33. Effet du facteur Nod sur la déformation des poils racinaires chez les mutants <i>Mtmsl2.4</i> .....	111
Figure 34. Développement des nodules après inoculation de racines de mutants <i>Mtmsl2.4</i> par la bactérie symbiotique <i>S. medicae</i> .....	113
Figure 35. Protocole semi-automatique de préparation des photos de racines pour la mesure des poils racinaires.....	117
Figure 36. Protocole de mesure automatique de la longueur des poils racinaires.....	120
Figure 37. Méthodes d'ajustement des données obtenues par mesure automatique de la longueur des poils racinaires .....	122
Figure 38. Effet du facteur Nod et de l'auxine sur la taille des poils racinaires de Medicago .....	125
Figure 39. Effet de <i>MtMSL2.4</i> sur la croissance des poils racinaires .....	129
Figure 40. Effet de <i>MtMSL2.4</i> sur la croissance des poils racinaires en réponse au facteur Nod .....	130
Figure 41. Effet de <i>MtMSL2.4</i> sur la croissance des poils racinaires en réponse à l'auxine..	132
Figure 42. Croissance de la racine principale et des racines latérales chez les mutants <i>Mtmsl2.4</i> .....	134
Figure 43. Cartes des vecteurs utilisés pour réaliser des fusions traductionnelles ou transcriptionnelles avec les promoteurs ou les CDS des <i>MtMSL</i> .....	154
Figure 44. Sites d'hybridation des amorces utilisées pour le clonage des promoteurs .....	155
Figure 45. Sites d'hybridation des amorces utilisées pour le clonage du CDS de <i>MtMSL2.4</i>	162
Figure 46. Principe général simplifié de l'extinction de l'expression d'un gène par les petits ARN non codants et détournement de ce mécanisme pour éteindre artificiellement l'expression d'un gène .....	165
Figure 47. Principe du protocole d'obtention des amiARN .....	166

Figure 48. Sites ciblés par les amiARN sélectionnés .....	168
Figure 49. Principe de l'obtention de la collection de mutants Tnt1 chez <i>M. truncatula</i> .....	171
Figure 50. Localisation des produits de PCR de géotypage sur les lignées Tnt1.....	172
Figure 51. Matériel biologique, utilisé ou généré, basé sur les mutants d'insertion Tnt1 ....	175
Figure 52. Présentation des plantes cultivées dans des conditions in vitro. ....	182
Figure 53. Présentation des plantes transformées par la méthode du hairy root. ....	184
Figure 54. Présentation de la culture pour le phénotypage du nombre de nodules chez les mutants Tnt1 .....	186
Figure 55. Croissance de <i>M. truncatula</i> en serre .....	188
Figure 56. Sites d'hybridation des amorces utilisées pour la qPCR sur les ADNc des MtMSL191	
Figure 57. Focus sur certaines étapes de l'obtention de protoplastes de poils racinaires de <i>M. truncatula</i> .....	197
Figure 58. Les différentes configurations du patch-clamp et leurs profils électriques .....	202
Figure 59. Méthode de mesures des amplitudes de courants unitaires .....	204



# Liste des tableaux

Tableau 1. Récapitulatif des séquences obtenues par analyse <i>in silico</i> .....	68
Tableau 2. Bilan des profils d'expression de <i>MtMSL2.3</i> , <i>2.4</i> et <i>2.5</i> , révélés par coloration histochemique GUS: observation en vue latérale de racines transformées.....	80
Tableau 3. Bilan des profils d'expression de <i>MtMSL2.3</i> , <i>2.4</i> et <i>2.5</i> , révélés par coloration histochemique GUS: observation en coupe transversale de racines transformées .....	80
Tableau 4. Synthèse des profils d'expression de <i>MtMSL2.3</i> , <i>2.4</i> et <i>2.5</i> , révélés par coloration histochemique GUS: observation de nodules en vue latérale et en coupe.....	83
Tableau 5. Accessions des protéines utilisées dans l'arbre phylogénétique .....	152
Tableau 6. Liste des amorces utilisées au cours de ce travail .....	156
Tableau 7. Description des lignées Tnt1 utilisées et génotypes disponibles au locus d'intérêt .....	173
Tableau 8. Bilan sur les croisements réalisés - 1ère série.....	178
Tableau 9. Bilan sur les croisements réalisés - 2ème série.....	179
Tableau 10. Sondes révélant l'expression des MtMSL de la classe II grâce aux puces Affymetrix Medicago Gene Chip ® .....	193
Tableau 11. Conditions ioniques utilisées pour la mesure du courant MS dans les protoplastes du mutant <i>Atms/Δ5</i> et dans les protoplastes de poils racinaires de Medicago201	



# Liste des abréviations

**ADN:** Acide Désoxyribose Nucléique

**ADNg:** ADN génomique

**APH:** All-Point Histogram

**AMF:** Arbuscular Mycorrhiza Fungi (champignons mycorhiziens arbusculaires)

**APP:** Appareil de pré-pénétration

**ARNm:** ARN messenger

**At(Nom de gène):** gène présent chez *Arabopsis thaliana*

**CCamK:** Calcium and Calmodulin dependent serine-threonine Kinase

**CDS:** Coding DNA sequence.

**CHO:** cellules d'ovaire de hamster (Chinese Hamster Ovary)

**Ec(Nom de gène):** gène présent chez *Escherichia coli*

**CNGC15:** Cyclic Nucleotide – Gated Channel 15

**DMI1/2/3:** Does Not Make Infection 1/2/3

**GFP:** Green Fluorescent Protein

**GUS:** gène codant pour la  $\beta$ -glucuronidase

**IPD3:** Interacting Protein of DMI3

**JA:** Acide jasmonique

**LYK3:** LysM receptor Kinase 3

**MCA8:** *M. truncatula* Calcium ATPase

**MF:** Myc Factor (facteur Myc)

**MS:** Mécano-Sensible

**Mt(Nom de gène):** gène présent chez *Medicago truncatula*

**NF:** Nod Factor (facteur Nod)

**NFP:** Nod Factor Perception

**NFR1/5:** Nod Factor Receptor 1/5

**NIN:** Nodule INception

**NSP1/2:** Nodulation Signalling Pathway 1/2

**PCR:** Polymerase Chain Reaction (réaction de polymérisation en chaîne)

**qPCR:** PCR quantitative

**RAM1/2:** Required for Arbuscular Mycorrhization 1/2

**SYMRK:** SYMBiosis Receptor-like Kinase

**RE:** Réticulum endoplasmique

**ROS:** Reactive Oxygen Species (espèces réactives de l'oxygène)



# Chapitre I.

## Introduction bibliographique

Du point de vue d'un animal, les plantes semblent être des organismes simples ou des proies aisées du fait de leur caractère sessile. Elles ont pourtant des physiologies, des stratégies de reproduction et des systèmes de défense, certes différents de ceux des métazoaires et protozoaires, mais tout aussi complexes. La coordination de l'ensemble de ces paramètres nécessite donc des systèmes de détection. Ils permettront en effet à la plante d'évaluer son environnement et d'autoévaluer son statut physiologique ou développemental. A terme, elle pourra ainsi s'adapter pour permettre sa survie ou celle de ses descendants. Cependant, comme les paramètres à évaluer sont de natures très variées, il est logique de penser que les systèmes de détection soient eux mêmes tout aussi variés. De manière générale, on peut les regrouper en deux catégories: les systèmes permettant de détecter les stimuli de nature chimique et ceux permettant de détecter les stimuli de nature physique. Dans le cadre de ma thèse, je me suis intéressée à un membre de cette dernière catégorie.

Afin d'étudier les fonctions de tels capteurs, deux modèles originaux pour ce contexte peuvent être utilisés: le poil racinaire et le rhizoderme d'une plante de la famille des Légumineuses. Ces plantes sont capables d'entrer en symbiose avec des microorganismes du sol. Pour mieux comprendre l'intérêt d'un tel modèle d'étude dans ce contexte, il est nécessaire de connaître les différents phénomènes précoces permettant d'aboutir à ces interactions.

### I.1. Focus sur les interactions symbiotiques précoces chez les Légumineuses

#### I.1.1. La symbiose: quels acteurs, quels lieux et pourquoi faire?

Les Légumineuses, nom commun de la famille des *Fabaceae*, regroupent des plantes telles que le pois, le soja, la luzerne ou le trèfle. Elles sont capables d'entrer en interaction symbiotique avec deux types de microorganismes du sol: les champignons mycorhiziens arbusculaires (AMF) et les bactéries fixatrices d'azote. Les premiers sont des champignons issus du phylum des *Glomeromycota*, tandis que les deuxièmes appartiennent aux familles des *Rhizobiaceae* (en excluant les bactéries *Frankia sp.*), des *Bradirhizobiaceae* et des *Phyllobacteriaceae* (Oldroyd, 2013; Gopalakrishnan *et al.*, 2015). Bien que ce terme fasse référence à une plus large variété de familles, ces bactéries fixatrices d'azotes seront désormais nommées sous le nom de rhizobia.

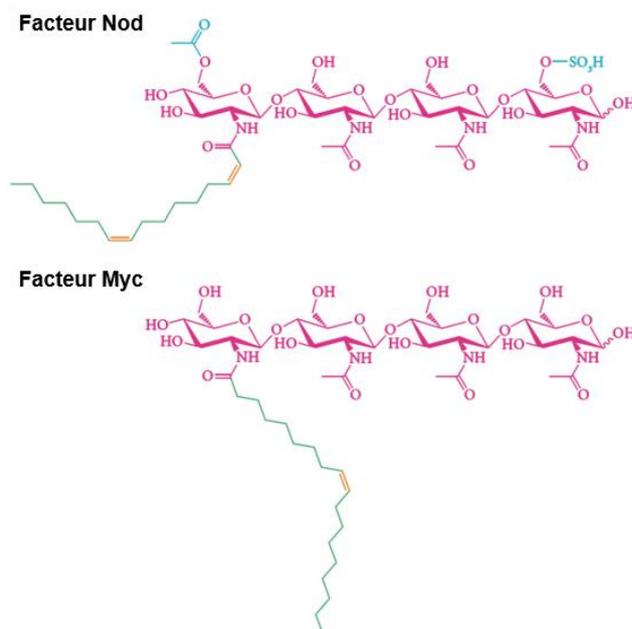
La plupart de ces microorganismes interagissent avec les Légumineuses au niveau de leurs racines grâce à différentes structures. Dans le cas des AMF, ceux-ci produisent des hyphes qui se développent dans la paroi cellulaire de la plante hôte. Au contraire, dans le cas de l'interaction avec les rhizobia, c'est la plante qui développe un organe spécialisé pour les accueillir: les nodules. Grâce à ces structures qui permettent de les lier étroitement, ces deux espèces vont pouvoir obtenir un bénéfice réciproque, définition même de la symbiose.

Dans les deux situations, la plante va fournir à ses hôtes des éléments carbonés issus de la photosynthèse. Du côté des AMF, ceux-ci vont permettre à la plante d'augmenter leur efficacité dans le prélèvement de l'eau et des minéraux du sol. Les rhizobia vont eux réduire l'azote atmosphérique en ammoniac assimilable par la plante. Cette dernière particularité permet à cette famille de plantes de pousser sur des sols faiblement pourvus en azote minéral. Comprendre ces interactions représente donc des intérêts agronomiques et écologiques non négligeables pour limiter les besoins en eau ou en engrais dans les cultures.

On peut néanmoins remarquer que, dans le cas de la symbiose fixatrice d'azote, le développement des nodules et le processus de réduction de l'azote atmosphérique sont coûteux en énergie (Dixon et Kahn, 2004). L'initiation de la symbiose est donc un phénomène qui doit être finement régulé.

### I.1.2. Bases moléculaires des interactions précoces

La reconnaissance mutuelle des deux partenaires commence par un dialogue moléculaire. Dans un premier temps, la plante synthétise et émet dans le sol des signaux moléculaires spécifiques qui seront reconnus par les microorganismes. Ces molécules sont, dans le cas de la symbiose fixatrice d'azote, des flavonoïdes et dans le cas d'une symbiose à AMF, des Strigolactones (Oldroyd, 2013). Ces signaux, une fois perçus par les microorganismes



**Figure 1. Structures des facteurs Nod et Myc**  
Schémas comparatif de la structure d'un facteur Nod de *Sinorhizobium meliloti* et d'un facteur Myc de *Glomus intraradices*. Ces deux molécules sont les formes majeures de NF et MF produites par ces deux espèces. Elles sont caractérisées par une chaîne chitinique (en rose), décorée de différents résidus spécifiques (en bleu) et d'une chaîne lipidique (en vert) comportant différents niveaux de saturation (en orange). Ainsi, d'autres formes de facteurs Nod et Myc peuvent exister, selon la taille de la chaîne chitinique et le type de résidus la décorant, mais aussi selon la taille de la chaîne lipidique et son niveau de saturation (adapté de Oldroyd, 2013).

ciblés, vont déclencher chez eux la synthèse de nouveaux signaux moléculaires: respectivement les facteurs de nodulation (ou facteurs Nod) (NFs) et les facteurs de mycorhization (ou facteurs Myc) (MFs).

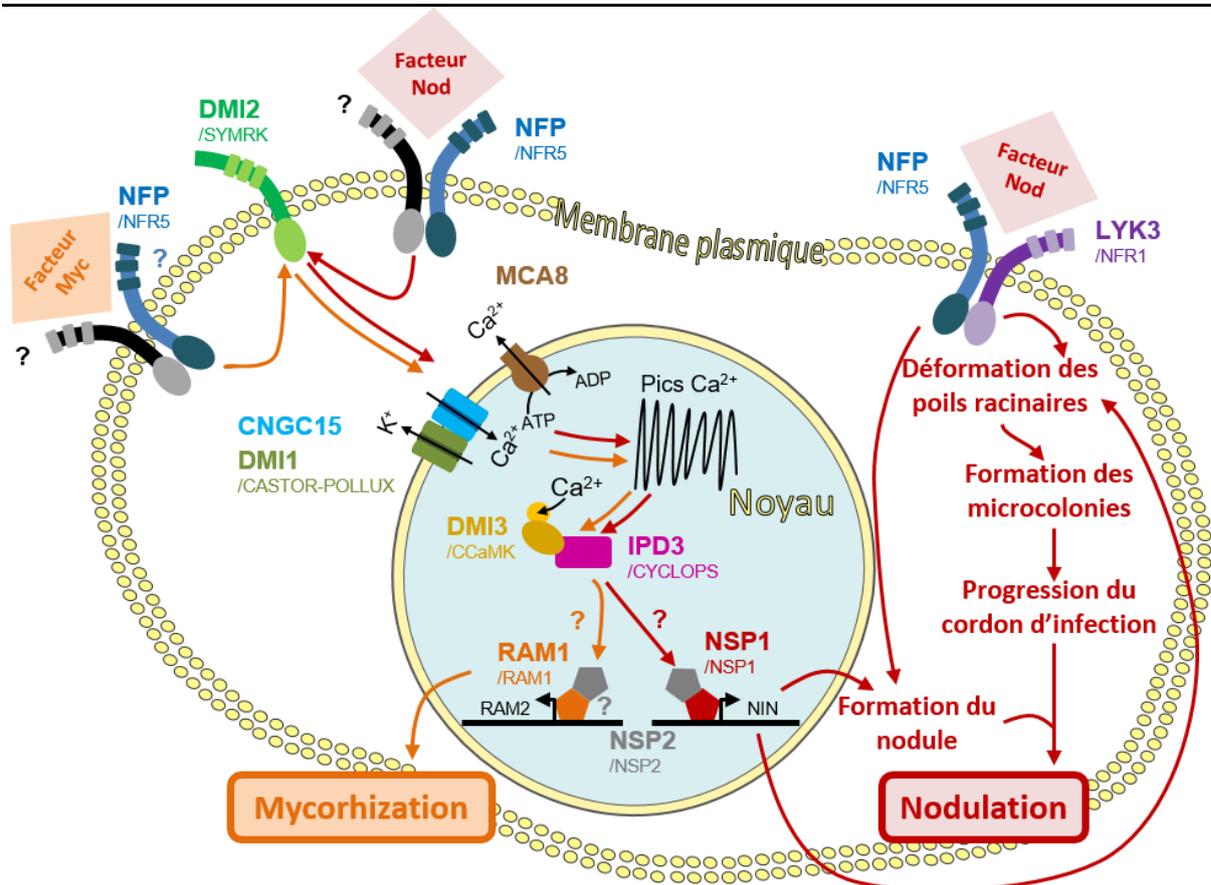
Ces deux molécules, bien qu'issues d'organismes différents, présentent des similitudes: ce sont dans les deux cas des lipochitooligosaccharides (Fig. 1). Elles sont constituées d'un squelette chitinique, composé généralement d'une chaîne de quatre ou cinq formes de résidus glucosés (N-

acetylglucosamine). A l'extrémité de ce squelette vient s'attacher, par une mono-N-acylation, une chaîne lipidique. Les modifications de cette base moléculaire, par l'ajout de différents résidus sur le squelette chitinique ou par le niveau de saturation de la chaîne lipidique, constituent autant de variantes de ces facteurs (Oldroyd, 2013).

La reconnaissance des MFs et des NFs par la plante hôte déclenche chez elle une cascade de signalisation. Dans les deux cas, cette cascade peut emprunter des voies différentes ou similaires, certainement dues à la reconnaissance de motifs spécifiques ou similaires à ces deux formes de facteurs. Ces voies de signalisation ont été présentées de manière approfondie dans les revues rédigées par Gough et Cullimore (2011) et Oldroyd (2013), dont l'essentiel est résumé ci-après et illustré dans la figure 2. Certains points non abordés dans ces revues ont cependant été ajoutés à ce résumé.

### – La voie commune à la signalisation aux NFs et MFs

Chez la Légumineuse modèle *Lotus japonicus*, il a été montré que la protéine membranaire NFR5 (Nod Factor Receptor 5) était capable de lier avec une haute affinité les NFs. De plus, elle a aussi été montrée comme nécessaire à la réalisation de la symbiose fixatrice d'azote. On peut également remarquer qu'un orthologue de NFR5, NFP (Nod Factor Perception), a été identifié chez *Medicago truncatula*, une autre Légumineuse modèle. Cet orthologue est aussi nécessaire à la mise en place de la symbiose avec les rhizobia. Enfin, NFP a aussi été suggéré comme ayant un rôle dans la signalisation en réponse aux AMF, bien que le phénotype  $\text{Myc}^-$  (c.à.d. ne répondant pas aux AMF) des mutants *nfp* soit dépendant de la concentration en MFs à laquelle ils sont exposés (Maillet *et al.*, 2011). L'ensemble de ces



**Figure 2. Cascades de signalisation induites chez la plante par les facteurs Nod et Myc**

Ce schéma montre les différentes voies communes ou indépendantes déclenchées chez les Légumineuses après la perception des facteurs Nod ou Myc. Les voies induites par ces facteurs sont présentées par des flèches rouges et oranges respectivement. Le nom des différentes protéines impliquées dans ces voies sont indiquées en gras pour celles identifiées chez *Medicago truncatula*, et en léger pour celles identifiées chez *Lotus japonicus*. (Adaptation de Gough et Cullimore, 2011; Oldroyd, 2013; Charpentier *et al.*, 2016).

données tend donc à faire considérer NFP et NFR5 comme des récepteurs aux NFs et MFs, dans une voie de signalisation commune aux deux types de symbiose. Ces deux protéines ont été identifiées comme des kinases\* à domaine LysM. Un autre couple de protéines de cette nature a été identifié comme étant nécessaire à la voie commune de la signalisation symbiotique: DMI2 (Does Not Make Infection 2) et SYMRK (SYMBiosis Receptor-like Kinase) chez *M. truncatula* et *L. japonicus* respectivement. Etant données les connaissances obtenues avec NFP/NFR5 et bien que la fonction exacte de DMI2/SYMRK ne soit pas encore connue, on peut émettre l'hypothèse que cette dernière agit comme co-récepteur avec NFP/NFR5.

\* Les kinases sont des enzymes catalysant, à partir d'ATP, l'ajout d'un groupement phosphate sur leurs protéines cibles. Selon la protéine ciblée, la phosphorylation modifiera de manière différente leurs activités (activation, répression, signal de dégradation...).

Felle *et al.* (1998) ont montré que dans les 5 minutes suivant l'application de NFs sur des racines de *M. sativa*, on pouvait observer au niveau des poils racinaires un influx d'ion  $\text{Ca}^{2+}$ , suivi d'un efflux d'ions  $\text{Cl}^-$  et  $\text{K}^+$ . Ces mouvements ioniques s'accompagnent d'une rapide dépolarisation de la membrane, ainsi que d'une alcalinisation du pH externe à proximité des poils racinaires. Toutefois, aucune étude à ce jour ne permet de montrer quels acteurs moléculaires sont responsables de ces différents flux.

Un autre type de flux d'ions a plus largement été étudié dans ce contexte. Une dizaine de minutes après l'application de NF sur des racines de *M. sativa*, des pics de concentration calciques ont pu être observés autour des noyaux des poils racinaires (Ehrhardt *et al.*, 1996). Ces oscillations calciques ont aussi été observées dans le cadre de la symbiose à AMF. Elles ont été attribuées au canal nucléaire CNGC15 (Cyclic Nucleotide – Gated Channel) chez *M. truncatula* (Charpentier *et al.*, 2016). Ce canal a été identifié comme étant perméable au calcium, permettant ainsi l'influx de cet ion dans le noyau. Il a également été montré que le canal DMI1 (Does Not Make Infections 1) chez *M. truncatula* interagissait avec CNGC15. Ce canal, orthologue des canaux CASTOR et POLLUX chez *L. japonicus*, est perméable au potassium et provoque un efflux de cet ion vers l'extérieur du noyau. L'action conjointe de ces deux canaux permet ainsi d'équilibrer les charges de part et d'autre de la membrane nucléaire. Afin de rééquilibrer le contenu en calcium, il a aussi été montré que la pompe calcium ATPase MCA8 (*M. truncatula* Calcium ATPase) pouvait agir parallèlement à DMI1 et CNGC15.

Les oscillations calciques générées par CNGC15/DMI1/MCA8 sont ensuite décodées par le complexe nucléaire DMI3/IPD3 chez *M. truncatula* (Does Not Make Infections 3 / Interacting Protein of DMI3), ou le complexe CCamK/CYCLOPS chez *L. japonicus* (Calcium and Calmodulin dependent serine-threonine Kinase). DMI3 et CCamK sont des kinases qui s'auto-activent selon la concentration nucléaire en calcium, puis phosphorylent IPD3 et CYCLOPS

respectivement.

A partir de ce stade, la voie commune se sépare en deux selon le type de symbiose. Dans le cas de la signalisation aux NFs, après décodage de l'influx calcique, le complexe NSP2/NSP1 (Nodulation Signalling Pathway) s'associe aux promoteurs\* de gènes dont la transcription est induite par les NFs. Le gène codant pour le facteur de transcription† NIN (Nodule INception) en est un exemple. Ce facteur de transcription est nécessaire pour différents stades de la progression de l'infection, tels que la déformation du poil racinaire et la formation du nodule par division cellulaire (le déroulement de ces stades sera détaillé plus tard). Dans le cas de la symbiose à AMF, le même principe pourrait être suggéré avec le complexe NSP2/RAM1 (Required for Arbuscular Mycorrhization 1). En effet, il a été montré d'une part une interaction entre NSP2 et RAM1, et d'autre part l'implication de RAM1 dans la régulation de l'expression de RAM2, un gène répondant à un traitement aux MFs. Cependant, le lien de cause à effet entre ces deux observations reste à démontrer.

– *La voie parallèle de signalisation aux NFs*

Comme présenté au début de la voie de signalisation commune aux deux symbioses, les NFs se lient au récepteur NFR5 chez *L. japonicus*. Cependant, il a aussi été montré dans le même modèle qu'une autre protéine membranaire de la même famille pouvait lier les NFs avec affinité: NFR1. Les mutants de l'orthologue de cette protéine LYK3 (LysM receptor Kinase 3) chez *M. truncatula* ne sont pas capables d'induire correctement la déformation des poils

---

\* Un promoteur est l'un des éléments formant un gène. Il s'agit du site de fixation de la machinerie permettant la synthèse (ou transcription) d'ARN messagers (ARNm), recopié à partir de la séquence d'ADN génomique généralement située en aval du promoteur. Selon sa séquence, différentes protéines régulatrices s'associeront avec lui. C'est la combinaison de ces protéines qui déterminera le profil de synthèse des ARNm, qui à leur tour seront utilisés pour la synthèse des protéines (ou traduction). Ces étapes aboutissant à la synthèse de protéines sont résumées dans l'annexe 1.

† Un facteur de transcription est une des protéines régulatrices pouvant se fixer directement ou non sur le promoteur de différents gènes. Ces protéines induisent la transcription des ARNm, à la différence des répresseurs qui l'inhibent.

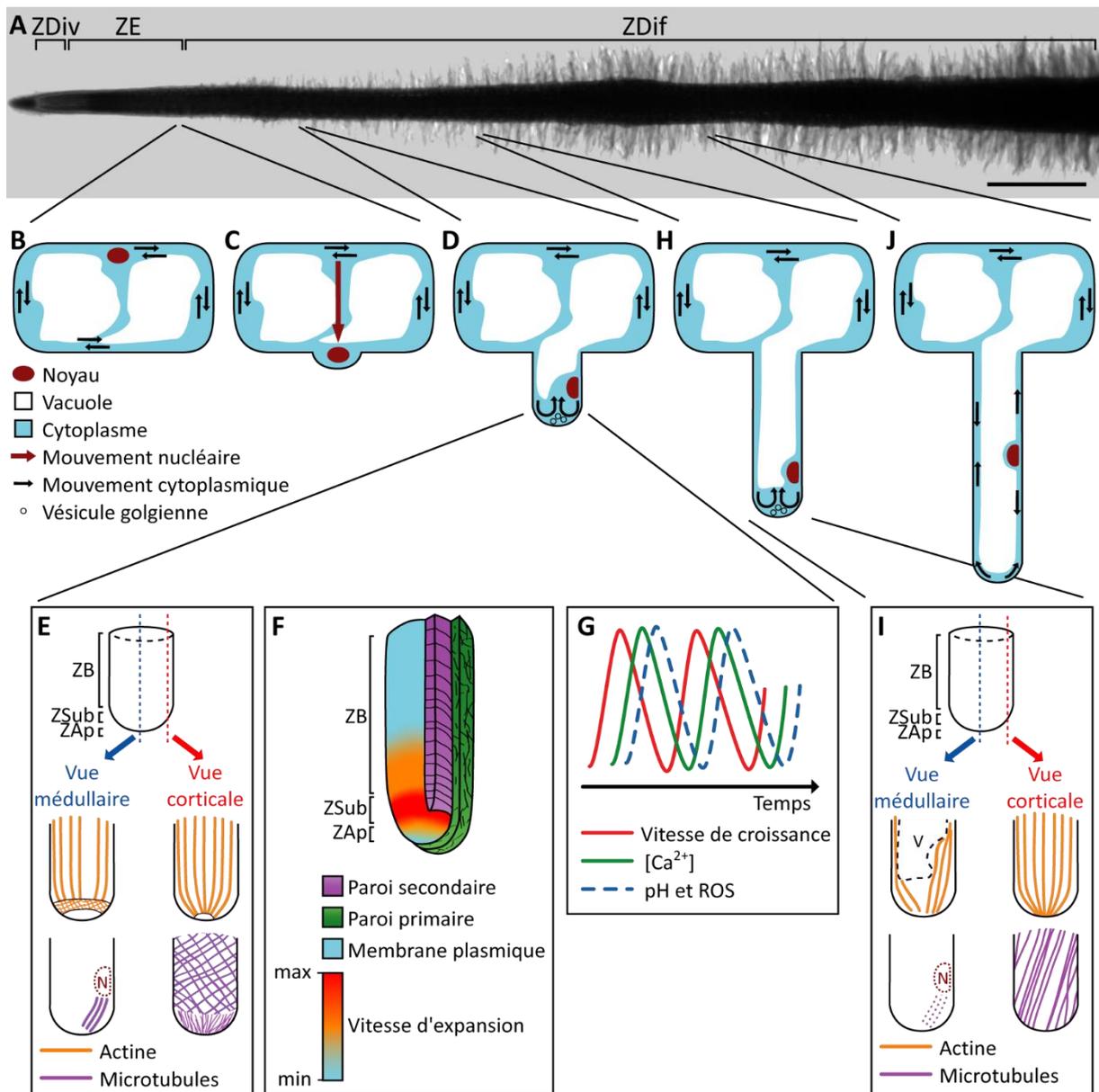
racinaires et la formation de nodules. Toutefois, ils sont toujours capables d'induire des oscillations calciques en réponse aux NFs. Aussi, il a été proposé qu'une voie parallèle existait, pour réguler la symbiose rhizobia/Légumineuse. Cette voie aurait alors un rôle à différents stades de la mise en place de cette symbiose, essentiellement lors de la déformation des poils racinaires et de la progression du cordon d'infection.

Enfin, il a été montré chez *L. japonicus* que les deux protéines kinases à domaine LysM NFR1 et NFR5 forment un hétérocomplexe, mais que NFR5, contrairement à NFR1, ne présentait pas d'activité kinase. Cette activité chez NFR1 est nécessaire à l'établissement de la symbiose. Aussi, il a été proposé par homologie qu'un autre récepteur de type LysM à domaine kinase actif puisse s'associer au récepteur NFP dans le cadre de la signalisation commune à la symbiose rhizobia/Légumineuses et AMF/Légumineuses.

L'ensemble de ces voies induisent à terme des modifications cellulaires et développementales au sein des racines des Légumineuses. Ces modifications ont lieu au niveau du rhizoderme ou des poils racinaires pour permettre l'entrée des microorganismes dans la racine. Concernant la symbiose fixatrice d'azote, elles ont également lieu plus en profondeur dans les couches cellulaires de la racine. Elles permettront la formation du nodule où aura lieu à terme la fixation de l'azote atmosphérique par les rhizobia. Dans le cadre de cette présentation, seules les modifications du rhizoderme et des poils racinaires seront développées.

### **I.1.3. L'entrée des artistes modifie les poils racinaires et les cellules du rhizoderme**

Les symbioses engendrent au niveau du rhizoderme ou des poils racinaires des modifications cellulaires notables. Cependant, notamment pour la symbiose fixatrice d'azote, tous les poils racinaires ne sont pas capables de répondre de la même manière aux NFs ou aux



**Figure 3. Mécanismes de développement des poils racinaires**

Ce schéma récapitulatif décrit les différents stades de développement des poils racinaires à différentes échelles. **A.** Photo d'une vue générale de racine de *M. truncatula* acquise au microscope optique à éclairage diascopique. On peut distinguer les trois zones de développement caractéristiques: la zone de division cellulaire (ZDiv), la zone d'élongation cellulaire (ZE) et la zone de différenciation (ZDif) où se développent les poils racinaires. La localisation des différents stades de développement des poils racinaires sont reportés sur cette photo. Echelle: 1mm. **B-C** Schémas illustrant la phase d'initiation de la croissance des poils racinaires. **D.** Schéma illustrant la phase de croissance des poils racinaires. **E.** Schémas illustrant l'organisation des réseaux d'actine et de microtubules à la pointe d'un poil en cours de croissance. Ces réseaux sont observés au niveau de coupes longitudinales d'un poil faites sur un plan médullaire (c'est-à-dire endoplasmique) ou cortical. La position du noyau est indiquée par un pointillé rouge le cas échéant. **F.** Schéma illustrant la répartition en coupe des parois celluliques primaire et secondaire présentes dans les poils racinaires en cours de croissance. La répartition de la vitesse d'expansion dans les différentes zones du poil est également représentée par un gradient coloré. **G.** Model présentant la corrélation au cours du temps entre les oscillations de croissance du poil et les concentrations en calcium intracellulaire ([Ca<sup>2+</sup>]), en ROS extracellulaire ou la valeur du pH extracellulaire (Model extrait de Cárdenas, 2009). **H.** Schéma illustrant la phase de terminaison de croissance des poils racinaires. **I.** Schémas illustrant l'organisation des réseaux d'actine et de microtubules à la pointe d'un poil terminant sa croissance. Ces réseaux sont observés au niveau de coupes longitudinales d'un poil faites sur un plan médullaire ou cortical. La position du noyau et de la vacuole est indiquée respectivement par un pointillé rouge ou un pointillé noir le cas échéant. **J.** Schéma illustrant la phase où les poils ont totalement terminé leur croissance. ZB: zone basale, Zsub: zone subapicale, Zap: zone apicale, N: noyau, V: vacuole.

rhizobia pour permettre leur entrée dans la racine (Sieberer et Emons, 2000). Aussi, afin de comprendre quel est le stade de développement du poil racinaire le plus favorable pour l'entrée en symbiose, une description de ce développement est nécessaire.

### I.1.3.a. Structure générale du poil racinaire

Les poils racinaires émergent au niveau de la zone de différenciation de la racine, après que les cellules aient fini leur élongation (Fig. 3A). Chaque poil racinaire se développe à partir d'une cellule du rhizoderme se trouvant à la surface de la racine : ceux-ci se forment par une élongation cellulaire transversale par rapport à l'axe de croissance de la racine. Les cellules de rhizoderme développant un poil sont alors qualifiées de trichoblastes. La densité de trichoblastes dépend du groupe d'espèces étudié (Kim *et al.*, 2006). En effet, la moitié des ordres contenus dans le groupe des Eudicotylédones présente des trichoblastes organisés en un profil "strié" (trichoblastes se développant sur une même rangée cellulaire le long de l'axe de croissance de la racine, une rangée sur deux ne présentant pas de trichoblastes). Parmi les ordres concernés, on retrouve par exemple celui de la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. Pour tous les autres ordres, toutes les cellules du rhizoderme de la zone de différenciation sont au contraire capables de devenir des trichoblastes. C'est par exemple le cas de l'ordre des Fabales, où l'on retrouve la plante modèle *M. truncatula*.

Chez *M. truncatula*, quatre phases de croissance ont été décrites (Sieberer et Emons, 2000). Le gradient de différenciation évolue depuis la pointe racinaire vers la base de la partie aérienne de la plante. Plusieurs caractéristiques permettent de distinguer les phases de croissance ici décrites (les mouvements nucléaires, les mouvements cytoplasmiques et l'orientation du cytosquelette\*).

---

\* Le cytosquelette est une structure intra-cellulaire organisée en réseau. Il existe un réseau d'actine et un réseau de microtubules qui sont organisés différemment dans le modèle animal et le modèle végétal. Dans le modèle animal, le réseau d'actine est essentiellement situé dans la région corticale de cellules, tandis que le réseau de

### – Phase 1: initiation de la croissance du poil racinaire

Lors de cette phase de croissance, le noyau migre vers le centre de la face interne de la cellule de rhizoderme (Fig. 3B) (Sieberer et Emons, 2000). Suite à cette migration nucléaire, un renflement se forme alors sur la face externe de la cellule du rhizoderme, à la verticale de la position du noyau. De manière concomitante, le noyau migre en direction du renflement (Fig. 3C) (Sieberer et Emons, 2000). A ce stade, le renflement est rempli de cytoplasme présentant des mouvements circulaires.

### – Phase 2: croissance du poil racinaire

Pendant cette phase d'allongement, la pointe est en permanence remplie de cytoplasme, qui cette fois imprime un mouvement de fontaine inversé (Fig. 3D) (Sieberer et Emons, 2000). Ce mouvement entraîne un apport permanent de vésicules à la pointe racinaire, qui peut être corrélé à l'organisation du réseau d'actine observé dans les poils racinaires de *Vicia sativa* (Miller *et al.*, 1999). En effet, dans la zone endoplasmique\* basale du poil racinaire, ce réseau s'organise parallèlement à son axe de croissance (Fig. 3E). Dans la zone endoplasmique subapicale, ces filaments s'affinent et perdent leur organisation. On peut noter que l'expansion du poil racinaire est maximale à cet endroit (Fig. 3F) (Shaw *et al.*, 2000). Enfin, aucun filament d'actine endoplasmique ne peut être trouvé dans la région médullaire apicale de la pointe racinaire (Fig. 3E) (Miller *et al.*, 1999). Le réseau d'actine cortical reste lui organisé de manière longitudinale sur tout le long du poil, excepté au niveau de la pointe où il est absent. L'ensemble de la zone dépourvue d'actine correspond à la zone enrichie en

---

microtubules est localisé dans la région endoplasmique. Dans le modèle végétal ces localisations sont cependant inversées. Dans les deux cas, ces réseaux jouent entre autres un rôle dans le transport de différents constituants cellulaires.

\* Une zone endoplasmique est située au centre d'une cellule. Cela fait opposition à une zone corticale.

vésicules golgiennes\*. On peut alors supposer que celles-ci sont amenées par le réseau d'actine vers la pointe du poil où, par exocytose, elles apporteront tous les éléments nécessaires à sa croissance (lipides, protéines membranaires, éléments de synthèse de la paroi...).

En parallèle, le noyau migre vers la pointe du poil racinaire en même temps que celui-ci s'allonge. Ce mouvement nucléaire peut être corrélé au réseau de microtubules médullaires qui relie le noyau à la pointe du poil chez *M. truncatula* (Fig. 3E) (Weerasinghe *et al.*, 2003; Perrine-Walker *et al.*, 2014). Cette migration nucléaire pourrait être expliquée par la nécessité d'avoir une synthèse d'ARN messagers, codant pour les protéines nécessaires à l'élongation, à proximité du site d'élongation afin d'améliorer son efficacité. Les microtubules corticaux prennent eux des tailles variables avec des orientations différentes tout le long du poil, excepté à la pointe où ce réseau apparaît désorganisé (Fig. 3E) (Weerasinghe *et al.*, 2003; Perrine-Walker *et al.*, 2014). On peut alors faire le parallèle entre cette organisation et celle de la paroi des poils racinaires. En effet, au niveau de la pointe du poil on observe la présence d'une paroi primaire, composée de microfibrilles de cellulose désorganisées. Au contraire sur les flancs du poil racinaire, on observe une paroi secondaire néosynthétisée entre la paroi primaire et la membrane plasmique. La déposition de cellulose dans cette deuxième paroi prend une forme plus organisée et hélicoïdale, consolidant ainsi la structure du poil racinaire (Fig. 3F) (Akkerman *et al.*, 2012).

Pour résumer le rôle du cytosquelette dans cette phase de croissance, il a été démontré chez *A. thaliana* que l'actine corticale régule l'épaisseur du poil, tandis que la croissance en longueur est régulée par l'actine de la région endoplasmique subapicale (Ketelaar *et al.*, 2003).

---

\* Les vésicules golgiennes sont issues de l'appareil de Golgi. C'est un organite cellulaire jouant un rôle dans la maturation des protéines et des lipides. Les vésicules lipidiques qu'il produit peuvent contenir des protéines qui seront soit excrétées dans le milieu extracellulaire, soit insérées dans la membrane où elles sont adressées.

Les microtubules vont quant à eux déterminer le sens de croissance des poils absorbants, comme montré chez *A. thaliana* et *V. faba* (Miller *et al.*, 1999; Ketelaar *et al.*, 2003).

Pendant ce stade de croissance, les poils de *M. truncatula* présentent une vitesse de croissance régulière, estimée entre 0,8 et 1,4  $\mu\text{m}/\text{min}$  (Sieberer et Emons, 2000). Cependant, à une échelle de temps plus petite, on constate chez *A. thaliana* que les poils présentent une alternance de phases de croissance et de phases de repos d'une période estimée à environ 18s pour chaque phase (Monshausen *et al.*, 2007; Monshausen *et al.*, 2008). Les phases de croissance sont concomitantes à une faible quantité d'espèces réactives de l'oxygène extracellulaire (ROS)\* à la pointe du poil, à un pH extracellulaire acide et à une faible concentration en calcium intracellulaire. A l'inverse, pendant les phases de repos, des ROS extracellulaires sont présents à la pointe du poil, tandis que le pH devient basique et que la concentration en calcium augmente (Fig. 3G). Monshausen *et al.* ont alors émis l'hypothèse que la phase de repos est causée par une rigidification de la paroi de la pointe, induite par l'action de certain ROS tel que le  $\text{H}_2\text{O}_2$ . A l'inverse, pendant la phase de croissance, la quantité de ROS étant réduite, la paroi n'est plus rigidifiée et son relâchement est accentué par le pH cellulaire acide. Le calcium pourrait lui aussi avoir un rôle dans la rigidification de la paroi, ou bien induire un signal pour préparer les éléments cellulaires nécessaires à la phase de croissance suivante. L'action conjuguée du calcium, des ROS et du pH est donc également essentielle pour la croissance des poils racinaires.

### – Phase 3: Terminaison de la croissance du poil racinaire

Au cours de cette phase, la vacuole commence à envahir la pointe du poil, mais les flux cytoplasmiques restent toujours sous la forme d'une fontaine inversée (Fig. 3H) (Sieberer et

---

\* Les ROS sont des espèces chimiques très réactives dérivées de l'oxygène, comme le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ou l'ion superoxyde ( $\text{O}_2^-$ ). Elles sont soit issues d'un dysfonctionnement mineur du métabolisme de l'oxygène, soit produites pour réaliser un rôle précis dans la cellule. Selon les cas de figure, ces ROS peuvent donc avoir un rôle bénéfique ou toxique pour les organismes.

Emons, 2000). Cependant, le réseau d'actine cortical, toujours organisé de manière longitudinale, rejoint cette fois la pointe du poil. Au niveau du réseau d'actine médullaire, la zone subapicale se réduit et se rapproche de plus en plus de la pointe du poil (Fig. 3I) (Miller *et al.*, 1999). Les microtubules médullaires reliant le noyau à la pointe disparaissent peu à peu, et les microtubules corticaux prennent progressivement une orientation longitudinale par rapport à l'axe du poil (Perrine-Walker *et al.*, 2014). Il a été montré que les microtubules pouvaient servir de guide pour l'avancée de la cellulose synthase (Paredes *et al.*, 2006). Aussi, étant données l'orientation des microtubules corticaux dans le poil en fin de croissance, on peut supposer que la cellulose sera synthétisée selon la même orientation. Cette orientation pourrait ainsi rendre la paroi plus rigide et ralentir sa croissance.

#### – Phase 4: Poil ayant terminé sa croissance

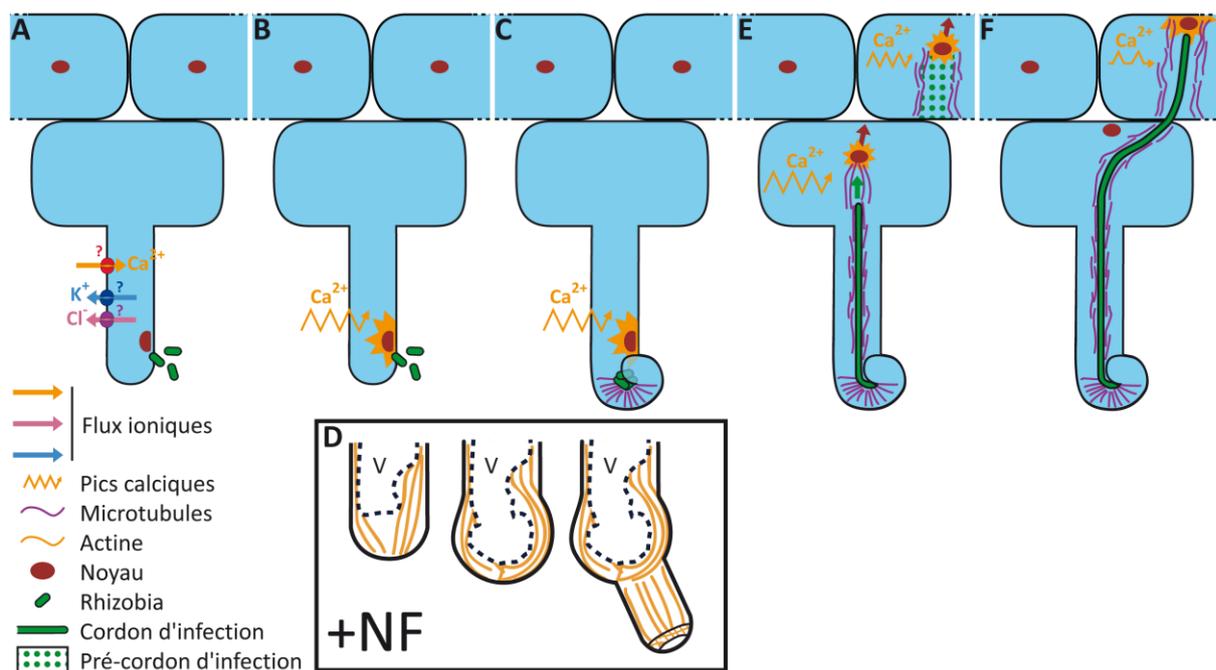
Pendant cette phase, la vacuole occupe totalement le poil racinaire, le cytoplasme a repris un mouvement circulaire et le noyau commence progressivement à redescendre dans le poil (Fig. 3J) (Sieberer et Emons, 2000).

Sur l'ensemble des poils présents sur une racine de Légumineuse, seuls ceux dans la phase 3 de croissance sont capables de répondre efficacement à un traitement aux NFs et d'être colonisés par des rhizobia. La raison de cette restriction n'est pas encore connue. Cependant, on peut émettre l'hypothèse que dans le cas des poils ayant terminé leur croissance, leur paroi secondaire rend les cellules trop rigides pour pouvoir modifier leurs formes. Concernant les poils en cours de croissance, il est possible que leur statut de croissance hautement polarisée les empêche de répondre efficacement à une stimulation symbiotique (Gage, 2004). Au contraire, les poils en train de terminer leur croissance n'ont plus cette prédominance de croissance polarisée. De plus, leur paroi secondaire ne doit pas encore être totalement formée. Enfin, le noyau reste encore à proximité de la pointe, ce qui

lui permettrait encore, comme nous le verrons plus tard, de guider la progression de l'entrée des rhizobia à l'intérieur du poil.

### I.1.3.b. Les poils racinaires: porte d'entrée des rhizobia

Comme présenté précédemment, la perception des NFs, et plus largement des rhizobia, entraîne dans les poils racinaires un influx d'ion  $\text{Ca}^{2+}$ , suivi d'un efflux d'ions  $\text{Cl}^-$  et  $\text{K}^+$  (Fig. 4A) (Felle *et al.*, 1998). Dans un second temps, des oscillations calciques nucléaires se mettent en place dans le poil racinaire (Fig. 4B) (Ehrhardt *et al.*, 1996). Les premières modifications consécutives au décodage de ces oscillations consistent en une série de divisions cellulaires dans le cortex racinaire (Timmers *et al.*, 1999). La description de ces divisions, ayant pour but de former à terme le nodule, ne sera pas abordée dans cette présentation.



**Figure 4. Mécanismes de développement des poils racinaires lors d'une infection par des rhizobia**

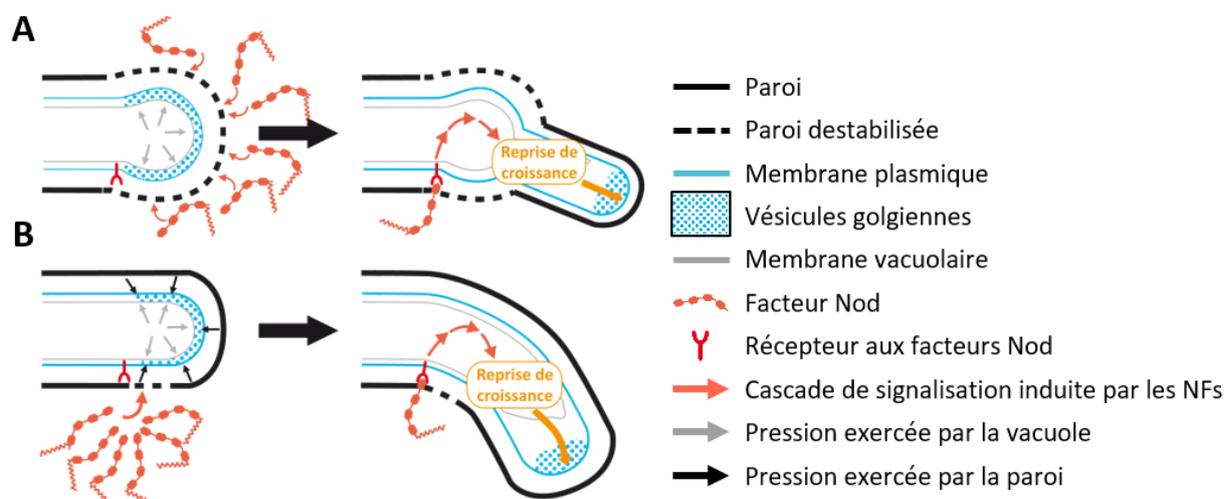
Ce schéma récapitulatif décrit les différents stades du processus d'infection des poils racinaires par les rhizobia. **A.** Déclenchement de divers flux ioniques dans les poils racinaires en présence de rhizobia. Les acteurs moléculaires responsables de ces flux sont encore inconnus. **B.** Déclenchement d'oscillations calciques dans les poils racinaires. La cascade de signalisation aboutissant à ces oscillations est présentée dans la figure 2. **C.** Phase de déformation du poil racinaire en croce de berger. **D.** Un traitement aux NFs entraîne une déformation partielle et une reprise de croissance polarisée du poil racinaire. V: vacuole. **E.** Phase de progression du cordon d'infection dans le poil racinaire et de mise en place du pré-cordon d'infection dans une cellule corticale adjacente. **F.** Phase de progression du cordon d'infection dans le pré-cordon d'infection de la cellule corticale adjacente au poil racinaire infecté.

### – Phase de courbure du poil racinaire

Dans la phase suivante, le poil racinaire va se déformer en un crochet, nommé crosse de berger, afin d'entourer une micro colonie de rhizobia, la séparant ainsi du milieu externe. Le réseau de microtubules rayonne alors tout autour de ce point de courbure (Fig. 4C) (Timmers *et al.*, 1999; Perrine-Walker *et al.*, 2014). Un traitement aux NFs seul permet également de déformer le poil racinaire. Néanmoins, cette déformation se limite à un gonflement de la pointe du poil, accompagnée d'un gonflement vacuolaire, puis à une reprise de croissance dans une direction polarisée (Sieberer et Emons, 2000). Pendant un tel traitement, le réseau d'actine garde dans un premier temps une organisation non polarisée, comme dans un poil racinaire terminant sa croissance (Fig. 4D) (Miller *et al.*, 1999). Peu après, ce réseau retrouve une configuration polarisée, avec une zone apicale dépourvue d'actine et une zone subapicale formée de fins filaments d'actine désorganisés. Cette polarité coïncide avec la zone de reprise de croissance du poil (Fig. 4D) (Miller *et al.*, 1999; Zepeda *et al.*, 2014). On peut donc supposer que les NFs réactivent le processus de croissance du poil. A l'inverse, une exposition localisée de NFs sur le poil entraîne une courbure de celui-ci du côté de cette exposition, sans gonflement de la pointe (Esseling *et al.*, 2003). Par analogie, on pourrait donc penser que c'est une synthèse localisée de NFs par les rhizobia qui provoque la courbure du poil.

Pour expliquer la différence de réponse des poils racinaires en fonction du mode d'application des NFs, on peut émettre l'hypothèse d'une action directe de ceux-ci sur la structure de la paroi. En effet, il a été montré chez *A. thaliana* qu'une accumulation de N-Acetylglucosamine affecte la structure de sa paroi cellulaire (Vanholme *et al.*, 2014). Celle-ci étant constituée de différents composés carbohydrates interagissant entre eux, les auteurs ont émis l'hypothèse que les N-Acetylglucosamine pouvaient entrer en compétition avec ces interactions, déstabilisant ainsi la structure de la paroi. Les NFs étant en partie formés de N-Acetylglucosamine, on pourrait donc penser qu'ils puissent directement déstabiliser la paroi,

indépendamment d'un processus de signalisation induit par une perception de ceux-ci par des récepteurs membranaires. Ainsi, dans le cas d'une exposition homogène aux NFs, la paroi cellulaire pourrait être globalement affectée et ne plus résister à la pression exercée par la vacuole, notamment à la pointe du poil où la paroi est plus restreinte. De plus, le réseau d'actine étant encore non polarisé, les vésicules golgiennes fusionneraient alors de manière homogène avec la membrane plasmique (Fig 5A). Il en résulterait ainsi un gonflement de la pointe du poil. Dans un deuxième temps, probablement en réponse à la cascade de signalisation induite par les NFs, la réorganisation du réseau d'actine permettrait la reprise de croissance polarisée du poil (Fig 5A). A l'inverse, une exposition localisée de NFs entrainerait seulement une déstabilisation locale de la paroi, qui pourrait alors toujours résister à la pression vacuolaire (Fig 5B). Dans un deuxième temps, la reprise de croissance du poil entrainerait la courbure du poil autour de la zone fragilisée de la paroi (Fig 5B).



**Figure 5. Modèle expliquant la déformation du poil racinaire en réponse aux NFs**

Schémas présentant un modèle pouvant expliquer en partie la déformation des poils racinaires induite par les NFs. Ce modèle se base sur l'hypothèse que la chaîne chitinique des NFs pourrait déstabiliser la structure de la paroi du poil racinaire. Par la suite une cascade de signalisation, induite grâce à la perception des NFs par leurs récepteurs, réactive les processus de croissance du poil racinaire. **A.** Cas d'un traitement global aux NFs. **B.** Cas d'un traitement localisé aux NFs.

– Phase de progression du cordon d'infection

Une fois la crosse de berger formée, les rhizobia commencent leur progression vers l'intérieur de la racine par divisions cellulaires successives. Cette progression se fait au sein

d'une nouvelle structure cellulaire, formée d'une invagination de la membrane plasmique du poil racinaire: le cordon d'infection. Les divisions bactériennes et l'augmentation de volume résultant de leur nombre croissant ne sont pas responsables de la progression de ce cordon. En effet, il a été montré que le front d'avancement des rhizobia n'était pas directement en contact avec le front d'avancement du cordon d'infection (Fournier *et al.*, 2008). Tout comme le poil absorbant qui possède une élongation polarisée, il a été constaté que l'avancée du cordon d'infection oscillait entre des phases d'élongation et des phases de repos (Fournier *et al.*, 2008). De manière globale, la vitesse de croissance du cordon d'infection est en moyenne de 4 à 5  $\mu\text{m}/\text{h}$ . Celui-ci est connecté, par un réseau de microtubules, au noyau qui guide sa progression, tout comme lors de la croissance du poil racinaire (Fig. 4E) (Timmers *et al.*, 1999). Ces deux analogies, entre croissance du cordon d'infection et croissance du poil racinaire, nous permettent d'émettre l'hypothèse d'une implication additionnelle de l'actine et du mouvement des vésicules golgiennes dans la progression du cordon d'infection.

Parallèlement à la progression du cordon d'infection, une cellule du cortex racinaire, directement en contact avec le trichoblaste infecté, subit également des modifications cellulaires. Le noyau de cette cellule migre en direction de la paroi orientée vers la partie médullaire de la racine. Cette migration forme derrière le noyau une colonne cytoplasmique entourée d'un réseau de microtubules reliant les deux faces de la cellule (Fig. 4E) (Timmers *et al.*, 1999). Cette nouvelle structure est appelée pré-cordon d'infection. Il est intéressant de noter que la cellule, où se développe cette structure, produit des pics calciques nucléaires à une fréquence aussi élevée que ceux induits dans un trichoblaste traité avec des NFs (de l'ordre d'environ un pic toutes les minutes). Cela montre encore le rôle fondamental de ce phénomène dans le processus de signalisation lié à la mise en place de la symbiose (Fig. 4E) (Sieberer *et al.*, 2012).

– *Et après ...*

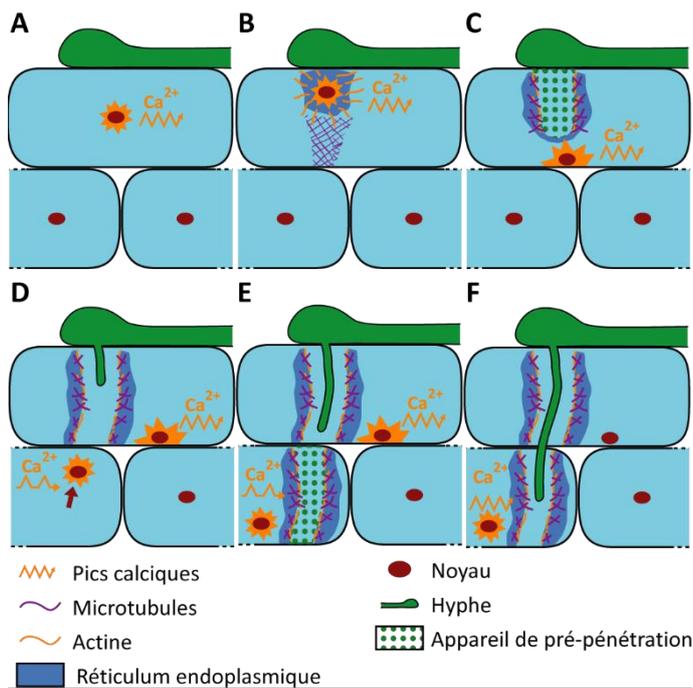
Une fois que le cordon d'infection a rejoint la base du trichoblaste, celui-ci va traverser la paroi le séparant de la cellule où s'est développé le pré-cordon d'infection, où il va s'engager (Fig. 4F) (Timmers *et al.*, 1999). Les pics calciques sont maintenus dans cette cellule, mais leur fréquence diminue peu à peu (Sieberer *et al.*, 2012). Ces deux dernières phases vont alors se répéter pour toutes les cellules corticales sur le chemin du cordon d'infection, jusqu'à ce que celui-ci ait rejoint le nodule en formation.

Bien que le symbionte soit différent, nous allons maintenant constater que les modifications cellulaires induites par la symbiose à AMs sont très similaires à celles observées lors de la symbiose avec des rhizobia.

#### **I.1.3.c. Le rhizoderme: porte d'entrée des champignons mycorhiziens**

Dans le cas de la symbiose à AMs, les échanges ne se font pas dans un nouvel organe créé par la plante, mais au sein même des cellules racinaires corticales. En effet les AMs vont développer des arbuscules terminaux dans ces cellules, qui serviront, grâce à leur extrême ramification, de lieu d'échange entre les deux partenaires (Gutjahr et Parniske, 2013). Le développement des arbuscules dans les cellules corticales profondes de la racine ne sera pas abordé, puisque celui-ci dépend du couple symbiotique étudié (Genre *et al.*, 2008).

Au tout début de l'infection, les structures colonisant la racine sont les hyphes germant à partir des spores des symbiontes. En s'allongeant, ces hyphes vont explorer la surface racinaire, jusqu'à former un renflement nommé hyphopodium (Gutjahr et Parniske, 2013). C'est à partir de cet hyphopodium que l'hyphe va pénétrer dans la racine, via une cellule du rhizoderme. Avant la pénétration de l'hyphe, la cellule du rhizoderme cible génère des pics calciques à haute fréquence (environ un pic toutes les 1 à 2min) (Fig. 6A) (Sieberer *et al.*, 2012). Les modifications cellulaires de la première phase sont marquées par la migration du noyau



**Figure 6. Mécanismes d'infection du rhizoderme lors d'une symbiose à AMs**

Ce schéma récapitulatif décrit les premiers stades du processus d'infection du rhizoderme lors d'une symbiose à AMs. Pour simplifier la visualisation, la cellule rhizodermique a été représentée sans poil racinaire. **A.** Arrivée de l'hyphe d'un champignon symbiotique à la surface d'une cellule de rhizoderme et formation d'un hyphopodium. **B.** Phase de migration du noyau vers le point de contact de l'hyphopodium. **C.** Phase de formation de l'appareil de pré-pénétration dans la cellule rhizodermique. **D.** Phase de pénétration du champignon dans la cellule rhizodermique. **E.** Phase préparation de l'appareil de pré-pénétration dans une cellule corticale en contact avec la cellule de rhizoderme infectée. **F.** Entrée de l'hyphe dans l'appareil de pré-pénétration de la cellule corticale.

vers le point de contact de l'appressorium sur le rhizoderme. Quand le noyau a rejoint ce point de contact, le réseau d'actine s'organise radialement autour de celui-ci. De plus, une structure conique formée de microtubules va se former entre le noyau et la face à l'opposé du point de contact de l'appressorium. Enfin, le réticulum endoplasmique (RE)\* va se localiser entre le noyau et ce point de contact, ainsi que tout autour du noyau (Fig. 6B) (Genre *et al.*, 2005).

Dans un second temps, le noyau va se relocaliser vers la face opposée du point de contact de

l'appressorium, formant ainsi sur son trajet une structure nommée "appareil de pré-pénétration" (APP). Celui-ci est formé d'une colonne de cytoplasme entourée d'un réseau d'actine organisé parallèlement, ainsi que de denses réseaux de microtubules et de RE (Fig. 6C) (Genre *et al.*, 2005). Une fois cet APP formé, l'hyphe du champignon à AMs va pénétrer dans la cellule et s'allonger en direction de la face interne de la cellule, à une vitesse d'environ

\* Le réticulum endoplasmique est un organite cellulaire qui peut être recouvert ou non de ribosomes (machinerie de la synthèse des protéines à partir des ARNm). Lorsqu'il est recouvert de ribosomes, c'est entre autres le lieu de synthèse et de maturation des protéines. Lorsqu'il n'est pas recouvert de ribosomes, il a entre autres un rôle dans la synthèse des lipides et dans le métabolisme des sucres. Les éléments qu'il synthétise peuvent être par la suite adressés à l'appareil de Golgi.

---

20  $\mu\text{m}/\text{h}$  (Fig. 6D) (Genre *et al.*, 2005).

En parallèle de l'élongation de l'hyphe, la cellule du rhizoderme génère toujours des oscillations calciques de haute fréquence. De plus, parmi les cellules corticales adjacentes, on constate que certaines génèrent également des pics calciques de plus faible fréquence (environ un pic toutes les 5min). Leurs noyaux vont alors migrer en direction du futur point de pénétration de l'hyphe à l'intérieur de ces cellules (Fig. 6D) (Sieberer *et al.*, 2012). En redescendant vers la face interne de la cellule, ces noyaux vont former un nouvel APP entouré d'un dense réseau de RE (Fig. 6E) (Genre *et al.*, 2008). Bien que cela n'ait pas encore été démontré, on peut émettre l'hypothèse que ce nouvel appareil présentera les mêmes caractéristiques structurales que le premier.

En entrant dans la cellule corticale où le nouvel APP s'est formé, les champignons à AMs vont induire dans celle-ci des oscillations calciques de plus haute fréquence (environ un pic toutes les 1 à 2min). A l'inverse, ces oscillations vont cesser dans les cellules de rhizoderme infectées (Fig. 6F) (Sieberer *et al.*, 2012). On constate également que l'APP va perdre sa structure une fois que l'hyphe est sorti de ces cellules (Genre *et al.*, 2008).

On observe donc ici de fortes similitudes entre l'APP et le pré-cordon d'infection des symbioses à AMs ou à rhizobia respectivement. Le profil des oscillations calciques évolue également de manière similaire dans ces deux cas de figure. Cela conforte donc l'hypothèse évoquée précédemment d'une voie de signalisation commune à ces deux symbioses. Nous avons enfin vu que la perception des NFs et MFs stimulait de manière non négligeable la mise en place de la symbiose. Pourtant, plusieurs indices tendent à faire penser que la perception de stimuli mécaniques peut aussi, dans une moindre mesure, influencer la mise en place des symbioses (Jayaraman *et al.*, 2014).

### I.2. Toucher du doigt les interactions biotiques

#### I.2.1. Les stimuli mécaniques à l'échelle de l'organe lors des interactions plantes / pathogènes ou ravageurs

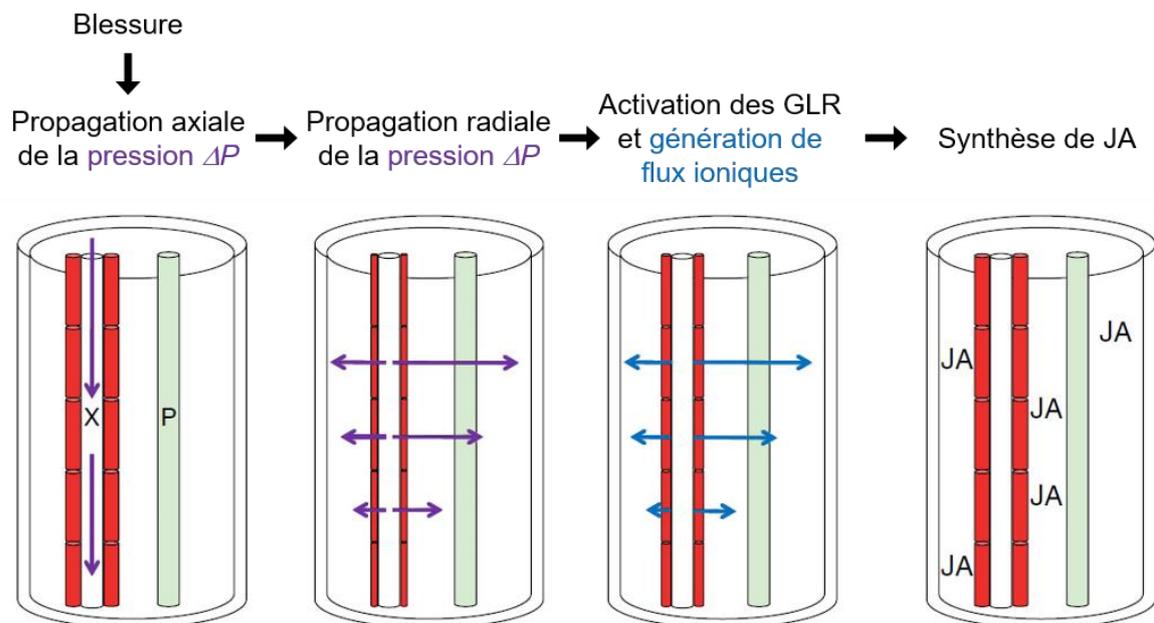
De manière générale, les plantes dans leur environnement naturel sont soumises à divers sollicitations mécaniques (vent, obstacles du sol...). En réponse à ces stimulations répétées, elles développent une réponse dite de thigmomorphogénèse, se traduisant par une augmentation de la croissance radiale, mais une diminution de la croissance longitudinale de la tige (Jaffe, 1973; Crook et Ennos, 1996; Telewski, 2006; Martin *et al.*, 2010). Cette réponse représente un processus d'acclimatation permettant à la plante de mieux résister aux futures agressions mécaniques.

Il a été montré par ailleurs qu'une stimulation mécanique (par un léger écrasement de feuilles entre le pouce et l'index) pouvait favoriser la résistance d'*A. thaliana* face au pathogène nécrotrophe\* *B. cinerea* (Chehab *et al.*, 2012; Benikhlef *et al.*, 2013). Cette résistance a été attribuée à une accumulation d'acide jasmonique (JA) dans les plantes stimulées (Chehab *et al.*, 2012). Cette hormone végétale est en effet connue pour induire la résistance des plantes exposées aux pathogènes nécrotrophes. Il est également intéressant de noter que les JA font aussi partie des voies de signalisation responsables de la résistance aux herbivores (Browse, 2009). Or, il a aussi été montré que les stimuli mécaniques favorisaient la résistance d'*A. thaliana* aux larves de *Trichoplusia ni* (Chehab *et al.*, 2012).

La mastication des tissus végétaux par les larves d'insectes ou l'écrasement des feuilles génèrent des stimuli mécaniques à l'échelle macroscopique. Dans ce cas, la synthèse de JA, dans les tissus éloignés du site de blessure, est induite en réponse à la propagation sur une longue distance d'une variation de potentiel électrique. Ce signal a en partie été attribué à la

---

\* Les pathogènes nécrotrophes ne se développent que sur des structures mortes des organismes qu'ils infectent.



**Figure 7. Modèle de propagation du signal entraînant la synthèse de JA en réponse à une blessure**  
Schéma présentant un modèle expliquant les mécanismes de signalisation aboutissant à la synthèse de JA chez des plantes blessées (adapté de Farmer *et al.*, 2014). En rouge sont représentés les cellules en contact avec les vaisseaux xylémiens. P: phloème.

présence du canal GLR (GLutamate Receptor-like) (Mousavi *et al.*, 2013). Il a alors été proposé que les stimuli macroscopiques génèrent des modifications de pression dans les tissus vasculaires xylémiens\* (Fig. 7) (Farmer *et al.*, 2014). Ces modifications seraient alors transmises rapidement le long de ce système vasculaire, entraînant sur leur passage des contraintes mécaniques radiales appuyant sur les cellules en contact avec le xylème. De manière directe ou indirecte, cette contrainte entraînerait l'activation des canaux GLR, générant ainsi un flux d'ions dont la perception aboutirait à la synthèse de JA.

Ce modèle élaboré à l'échelle de l'organe propose donc une chaîne d'événements liant la stimulation mécanique à la production d'une hormone (JA). De nombreux acteurs moléculaires intervenant dans cette chaîne restent à découvrir. Ainsi des mécanosenseurs pourraient être de bons relais entre la variation de pression et l'activation des canaux GLR. Bien qu'adapté à l'échelle de l'organe, ce modèle, dans le cadre de notre thématique, peut

\* Le tissu vasculaire xylémien, constitué entre autres de xylème, est responsable du transport de la sève brute depuis le sol jusque vers les organes photosynthétiques comme les feuilles. Cette sève est essentiellement constituée d'eau et de minéraux.

nous suggérer des candidats moléculaires, voir des mécanismes, à condition de le repenser dans un contexte cellulaire.

### **I.2.2. Des stimuli mécaniques localisés induisent des modifications cellulaires**

Nous avons vu précédemment que les interactions avec des microorganismes symbiotiques entraînent des modifications cellulaires caractéristiques. Or, il est intéressant de noter que des contraintes mécaniques seules peuvent aussi induire ce genre de modifications. En effet, le contact d'une micro-aiguille sur des cellules épidermiques de cotylédons\* d'*A. thaliana* entraîne une convergence du RE et des réseaux de microtubules ou d'actine en direction de la micro-aiguille (Hardham *et al.*, 2008). Avec le même protocole, on constate également une relocalisation nucléaire vers ce point de contact dans les cellules rhizodermiques de *M. truncatula* (Genre *et al.*, 2009). De manière intéressante, ce repositionnement nucléaire dépend de l'épaisseur de l'aiguille ayant servi à délivrer la stimulation mécanique. En effet, le repositionnement nucléaire a lieu pour des aiguilles de plus de 2  $\mu\text{m}$  d'épaisseur, mais pas pour celles de 1  $\mu\text{m}$  d'épaisseur (Genre *et al.*, 2009). De plus, ces auteurs ont également constaté que les différents champignons (pathogènes ou non) induisant des relocalisations nucléaires chez *M. truncatula*, avaient des hyphes d'un diamètre supérieur à 2  $\mu\text{m}$ . A l'inverse, *Oidiodendron maius* possédant des hyphes d'un diamètre inférieur à 2  $\mu\text{m}$ , n'induit pas de relocalisation nucléaire.

Les cellules végétales seraient donc capables de percevoir des contraintes mécaniques locales, jusqu'à une certaine limite. Cette perception se traduit par des modifications cellulaires semblables à celles observées lors d'une interaction symbiotique. Cependant, comme constaté précédemment, ces modifications ont aussi lieu dans le cas d'interactions

---

\* Les cotylédons sont des structures de réserve dans la graine de certaines plantes. Lorsque ces graines germent, les cotylédons prennent une forme semblable aux feuilles afin d'assurer le processus de photosynthèse jusqu'au développement des premières vraies feuilles.

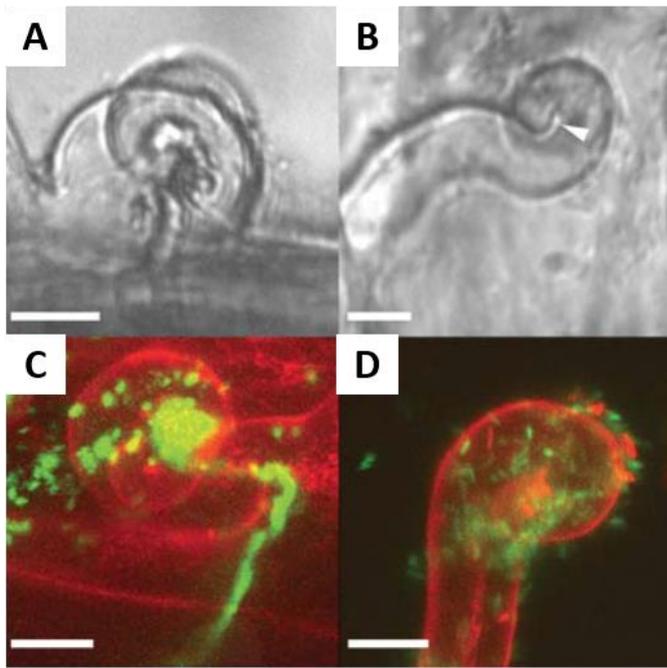
avec des pathogènes. Comme argument supplémentaire à cette similitude, il a également été observé une convergence du RE et des réseaux de microtubules ou d'actine vers le point d'entrée d'oomycètes\* pathogènes chez *A. thaliana* (Takemoto *et al.*, 2003). De manière générale, il apparaît donc nécessaire de mieux comprendre comment la plante perçoit les stimuli mécaniques lors de son interaction avec les microorganismes afin de préciser le rôle de la "mécano-signalisation" au cours de l'établissement de la symbiose.

### **I.2.3. Rôle des stimuli mécaniques dans les interactions symbiotiques**

L'implication de contraintes mécaniques, dans la régulation de la mise en place de la symbiose, est mise en évidence par l'étude de mutants incapables d'être infectés correctement par les rhizobia. En effet les mutants *dmi3*, impacté dans le décodage des oscillations calciques (Fig. 2), est plus sensible aux stimulations mécaniques générées par une micro-aiguille (Genre *et al.*, 2009). Cette sensibilité se traduit par une rapide perturbation du RE, qui n'est pas observée chez les plantes sauvages. De même les mutants *dmi2*, impliqué dans la perception des NFs, est lui aussi plus sensible aux contraintes mécaniques (Esseling *et al.*, 2004). Cela a été mis en évidence grâce à l'étude des mouvements cytoplasmiques du poil racinaire, au cours d'un dessèchement brusque suivi d'un réapprovisionnement brusque de milieu de culture liquide. En effet, dans de telles conditions, les racines de *M. truncatula* sauvages présentent une baisse du nombre de poils présentant des mouvements cytoplasmiques typiques de poils en croissance. Cependant, les mutants *dmi2* présentent une baisse significativement plus accrue de ce nombre de poils comparé au sauvage. Ce même phénotype a été observé chez *M. sativa* et *L. japonicus* pour des mutants inactivés dans les gènes orthologues à *DMI2*. De plus, une stimulation avec une micro-aiguille induit aussi ce même genre de phénotype chez les mutants *dmi2*. Enfin, les poils racinaires de *dmi2* sont

---

\* Microorganisme fongiforme autrefois classé parmi les champignons.



**Figure 8. Crosses de berger de *M. truncatula* chez des plantes sauvages ou mutantes *dmi2***

Des racines de plantes sauvages (A et C) ou mutantes *dmi2* (B et D) ont été inoculées avec *Sinorhizobium meliloti* 2011-GFP. Des crosses de berger ont ensuite été observées au microscope à éclairage diascopique (A et B) ou au microscope confocal (C et D). La flèche blanche indique la courbure incomplète de la crosse de berger chez le mutant *dmi2*. La fluorescence de la paroi marquée à l'iodure de propidium est affichée en rouge. La fluorescence des bactéries est affichée en vert. En C les bactéries ont été enfermées au sein d'une poche et le cordon d'infection s'est développé. En D les bactéries n'ont pas été enfermées dans une poche et restent à l'extérieur du poil racinaire. Images extraites de Esseling *et al.*, 2004.

capables de se recourber en réponse à une inoculation avec des rhizobia, mais dès que la pointe du poil touche son propre flanc, cette courbure cesse (Fig. 8). L'arrêt de courbure de *dmi2* pourrait donc être expliqué par un arrêt de croissance induit à cause de la sensibilité accrue de ce mutant aux stimulations mécaniques.

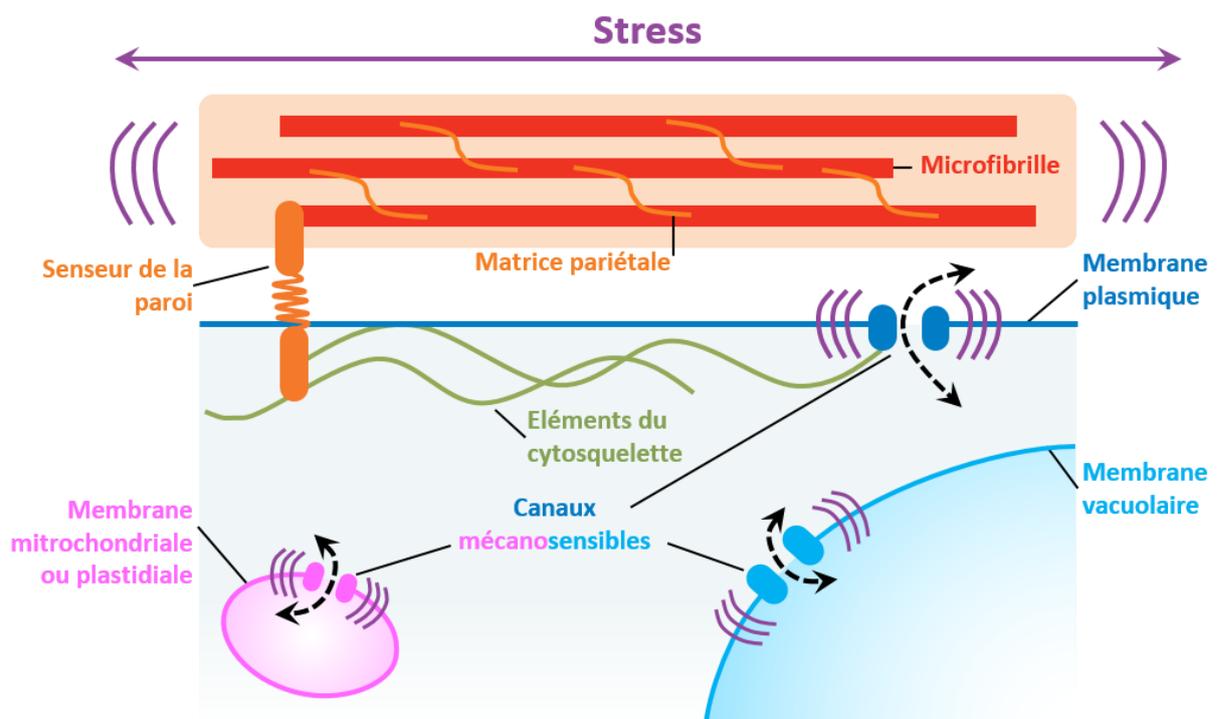
Le réseau de microtubules peut nous donner des indices sur les zones soumises à de fortes contraintes mécaniques dans la crosse de berger. En effet, il a été montré que ce réseau s'organisait dans la même direction

que les forces mécaniques dans les cellules épidermiques d'*A. thaliana* (Sampathkumar *et al.*, 2014). Ainsi, puisque chez les Légumineuses les microtubules s'organisent radialement au centre de la crosse de berger, les contraintes majeures devraient se localiser à cet endroit (Fig. 4C) (Timmers *et al.*, 1999; Perrine-Walker *et al.*, 2014). Dans le cas des symbioses à AMs, les forces devraient se localiser autour du point d'entrée de l'hyphe. En effet, les appressoria de champignons sont capables de générer d'énormes forces pour pouvoir pénétrer dans les cellules. Par exemple il a été mesuré que *Colletotrichum graminicola*, responsable de l'antracnose des céréales, pouvait exercer une pression de 5.35 MPa, soit environ trois fois la pression maximale acceptée par la machine à vapeur d'une locomotive (Bechinger *et al.*, 1999). Tous ces constats montrent donc la nécessité de la présence de senseurs de contraintes

mécaniques, afin de permettre le bon déroulement de l'interaction entre les plantes et des microorganismes symbiotiques ou non.

### I.3. Une cellule, des mécanosenseurs

A l'échelle cellulaire, plusieurs mécanosenseurs de différentes natures ont été mis en évidence chez les plantes. On peut notamment distinguer des protéines membranaires associées à la paroi, comme par exemple les Wall Associated Kinases (WAK), ou certaines Receptor Like Kinases (RLK). Celles-ci pourraient percevoir les déformations de la paroi (Fig. 9) (Mirabet *et al.*, 2011). Les éléments du cytosquelette pourraient également avoir un rôle dans la perception des contraintes mécaniques, en plus de leur rôle dans la transduction de celles-ci à l'intérieur de la cellule (Fig. 9) (Mirabet *et al.*, 2011). Enfin, les canaux mécanosensibles sont aussi d'excellents candidats, capables de percevoir et de transformer rapidement en une



**Figure 9. Acteurs moléculaires de la mécanoperception cellulaire chez les plantes**

Ce schéma donne un aperçu des différents types d'acteurs moléculaires pouvant avoir un rôle dans la mécanoperception chez les plantes. On distingue notamment des protéines liées à la paroi (par exemple: les WAK ou les RLK), percevant les contraintes mécaniques appliquées sur celle-ci. Certains canaux ioniques sont également capables de percevoir les contraintes des membranes dans lesquelles ils sont insérés (par exemple: les MSL ou les MCA). Les éléments du cytosquelette (par exemple: l'actine ou les microtubules) pourraient également avoir un rôle dans la perception ou dans la transduction de ces contraintes (schéma adapté de Mirabet *et al.*, 2011).

autre variable physique les tensions appliquées dans le plan de la membrane dans laquelle ils sont insérés.

Les canaux mécanosensibles sont des canaux ioniques capables de s'ouvrir en réponse à une tension mécanique subie par la membrane dans laquelle ils sont insérés. L'activité de tels canaux a été décrite pour la première fois il y a plus de 30 ans sur des muscles squelettiques de poulet (Guharay et Sachs, 1984). De telles activités ioniques ont été qualifiées de mécanosensibles (MS). Depuis plusieurs profils d'activité MS ont pu être mis en évidence, et ce également chez les plantes (Haswell, 2007). Les acteurs moléculaires responsables de ces activités sont en train d'être progressivement identifiés. Ceux-ci sont localisés dans les membranes de différents compartiments cellulaires (Fig. 9) (Hamilton *et al.*, 2015). Les canaux potassiques TPK (Two-Pore K<sup>+</sup> channel) ont par exemple été identifiés dans la membrane vacuolaire. Ces derniers, bien que présentant une activité MS résiduelle en condition de faible tension de membrane, sont activés lors d'un choc osmotique augmentant la tension de membrane (Maathuis, 2011). Dans les plastes et les mitochondries on peut retrouver des canaux de la famille des MSL de la classe I (MscS-Like). Enfin, les familles Piezo, OSCA, MCA et MSL de la classe II ont été supposées ou avérées former des canaux MS de la membrane plasmique.

Lors des étapes précoces des symbioses à AMs ou avec des rhizobia, la membrane plasmique végétale est la deuxième structure cellulaire majeure, rencontrée par les symbiontes, après la paroi. La suite de cette introduction va donc se focaliser sur les canaux MS de la membrane plasmique, et plus particulièrement sur les canaux de la famille des MSL.

### **I.4. Les différentes familles de canaux MS**

#### **I.4.1. Piezo: l'inconnu de la bande**

Cette petite famille de canaux composée de deux membres (Piezo 1 et 2) a été identifiée

comme un composant des canaux MS perméables aux cations chez les mammifères (Coste *et al.*, 2010). Il s'agit d'une grande protéine homotrimérique d'environ 0,9MDa, dont chaque unité est constituée de 30 à 40 segments transmembranaires (Xu, 2016). Chez les larves de drosophile, ce canal est impliqué dans la perception de la douleur (Coste, 2012). Bien qu'un et deux homologues de ces canaux existent respectivement chez *A. thaliana* et *M. truncatula*, aucune étude à ce jour n'a été réalisée pour élucider leurs rôles chez les plantes (Coste *et al.*, 2010; Damiani *et al.*, 2016 (cf. Article 1, Figure S16)).

### I.4.2. OSCA: canal MS?

Les OSCA (reduced hyperosmolality-induced  $[Ca^{2+}]_i$  increase 1), aussi appelés CSC (Calcium permeable Stress-gated cation Channel 1), ont été deux fois identifiés indépendamment chez les plantes grâce à des stratégies de criblage différentes. Dans la première, un système hétérologue a été utilisé pour surexprimer des protéines membranaires candidates, afin d'identifier celles induisant une augmentation de calcium cytosolique en réponse à un choc hyperosmotique (Hou *et al.*, 2014). Le second criblage recherchait des mutants d'*A. thaliana* présentant une diminution de calcium cytosolique en réponse à un choc hyperosmotique (Yuan *et al.*, 2014). On retrouve des homologues de cette protéine chez presque tous les eucaryotes. Chez *A. thaliana*, cette famille est composée de 15 membres, tandis que 13 d'entre eux ont été identifiés chez *M. truncatula* (Hou *et al.*, 2014; Damiani *et al.*, 2016 (cf. Article 1, Figure S16)). Enfin, par des études électrophysiologiques, il a été démontré que cette protéine est un canal, s'ouvrant en réponse à un traitement hyperosmotique, sélectif pour les cations mono et divalents (Hou *et al.*, 2014; Yuan *et al.*, 2014). Cependant, bien qu'on puisse admettre que des variations osmotiques engendrent des contraintes mécaniques sur les membranes, aucun lien direct entre la tension de membrane et l'activation de OSCA n'a été démontré à ce jour.

### I.4.3. MCA: de bons candidats

Identifiées lors d'un criblage utilisant un système hétérologue, les MCA (*mid1*-Complementing Activity) ont la capacité de compléter le phénotype léthal du mutant *mid1* de *Saccharomyces cerevisiae* (Nakagawa *et al.*, 2007; Yamanaka *et al.*, 2010). Leurs séquences protéiques présentent 10% d'homologies avec ScMid1. Cette famille de protéines est composée de deux membres chez *A. thaliana* et *M. truncatula* et des homologues sont retrouvés chez les autres plantes terrestres, les mousses et les fougères, mais pas chez les animaux, les algues ou les champignons (Kurusu *et al.*, 2013; Damiani *et al.*, 2016 (cf. Article 1, Figure S16)). Cette répartition suggère un rôle majeur chez les plantes terrestres. Quand il est exprimé dans des cellules d'ovaire de hamster (CHO), AtMCA1 induit une augmentation de la concentration en Ca<sup>2+</sup> cytosolique en réponse à un choc hypoosmotique ou à une tension appliquée directement sur ces cellules (Nakagawa *et al.*, 2007). Cette augmentation dans de telles conditions est également observée lorsque ce gène est surexprimé chez *A. thaliana* (Nakagawa *et al.*, 2007). De plus, des mesures électrophysiologiques, utilisant le système d'expression hétérologue des ovocytes de Xénopes, ont montré que AtMCA1 induit un courant K<sup>+</sup> lors d'un choc hypoosmotique et que AtMCA1 et 2 induisent ces mêmes courants en réponse à une tension de membrane (Furuichi *et al.*, 2012). Ces résultats suggèrent donc que les MCA sont des canaux MS, probablement perméables au K<sup>+</sup> et au Ca<sup>2+</sup>. Cependant, des études plus poussées sur leur sélectivité n'ont pas encore été publiées. Cette mécanosensibilité à l'échelle cellulaire se retrouve également à l'échelle macroscopique. En effet, la racine principale du mutant *atmca1* est incapable de pénétrer dans des milieux durs. Ce phénotype évoque donc une sensibilité accrue au touché de ce mutant. Dans la recherche des senseurs de contraintes mécaniques, les MCAs semblent donc être de bons candidats pour assurer ces fonctions.

#### I.4.4. Les MSL: de bons candidats déjà éprouvés

Le premier des canaux MS identifié au niveau moléculaire est issu de la bactérie *Escherichia coli*. Celui-ci a été nommé en référence à sa forte conductance\*: MechanoSensitive Channel, Large conductance (MscL) (Sukharev *et al.*, 1994). Le simple mutant  $\Delta mscL$  ne présente pas de phénotype particulier. Par contre, le double mutant  $\Delta mscL \Delta mscS$  présente une sensibilité accrue aux chocs osmotiques (Levina *et al.*, 1999). Le gène *EcMscS* (MechanoSensitive Channel, Small conductance) code pour un canal MS préférentiellement anionique, de plus faible conductance que MscL. C'est en utilisant la séquence de ce canal que des canaux MS homologues ont pu être identifiés chez les plantes (Pivetti *et al.*, 2003; Haswell, 2007). Chez *A. thaliana*, ceux-ci sont au nombre de dix et ont été nommés AtMSL (Mechanosensitive channel, Small conductance – Like). On remarque également que cette famille de canaux est présente chez les bactéries, les plantes, les algues, les mousses et certains clades de champignons. Il semblerait donc qu'elle ait un rôle notable chez les organismes munis d'une paroi cellulaire.

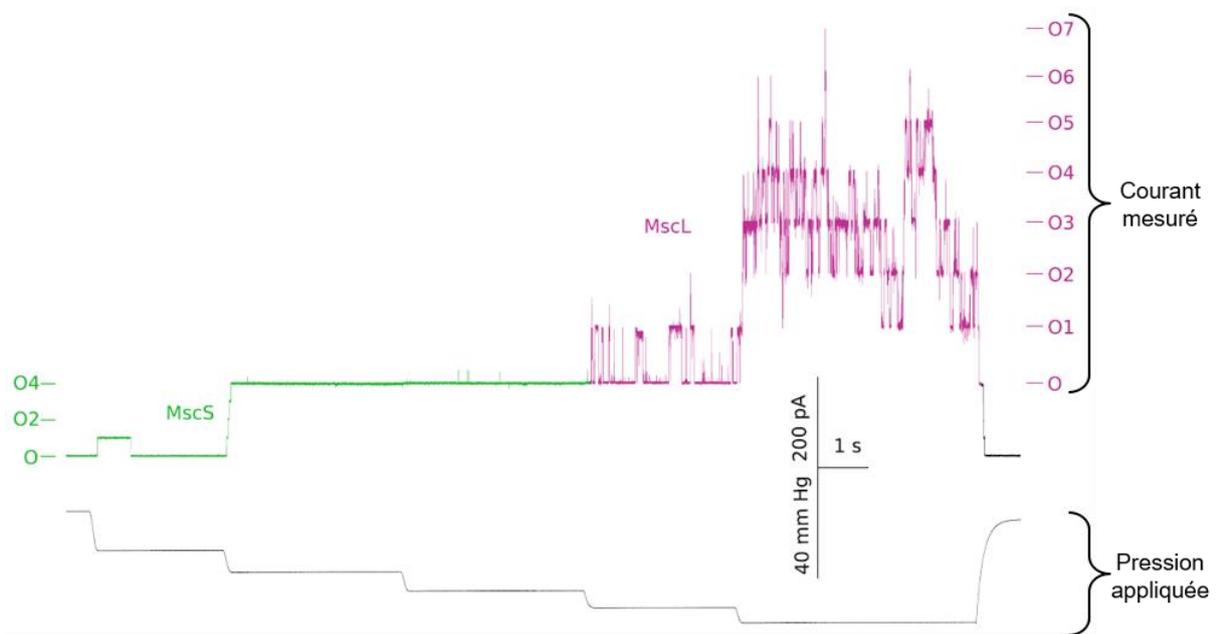
##### I.4.4.a. Structure et rôles de MscS chez les bactéries

*EcMscS* est un canal ayant une sélectivité préférentielle pour les anions (Sukharev *et al.*, 1993). Bien que qualifiée de faible, la conductance générée par ce canal reste élevée comparée à d'autres canaux (~900pS pour *EcMscS* contre ~25pS pour le canal R-type chez *A. thaliana*) (Schroeder et Keller, 1992; Sukharev *et al.*, 1993). Cette particularité peut expliquer le rôle de ce canal chez *E. coli*. En effet, lors d'un choc hypoosmotique extrême, les cellules qui avaient accumulé des solutés, vont être soumises à un fort influx d'eau, ce qui a pour effet d'augmenter leur pression interne et par conséquent la tension appliquée à la membrane. En absence de mécanisme de régulation il y a un risque de rupture cellulaire. En s'ouvrant en

---

\* La conductance est l'inverse de la résistance (en terme électrique) et s'exprime en pSiemens ou nSiemens (pS ou nS). Elle traduit la facilité qu'ont les ions à passer à travers la membrane.

réponse à cette tension appliquée sur la membrane, la grande conductance de l'*EcMscS* permet aux ions excédentaires de s'échapper, protégeant ainsi la cellule. Enfin, il a été proposé que la réponse d'*E. coli* aux chocs osmotiques se fasse en deux temps. En effet, *EcMscS* s'ouvre en réponse à des tensions de membrane plus faibles que celles nécessaires pour induire l'ouverture de *EcMscL* (Fig. 10) (Battle *et al.*, 2009). Il est donc possible que *EcMscS* s'ouvre en premier, suivi de *EcMscL* si l'action du premier canal n'est pas suffisante pour le maintien de l'intégrité cellulaire (Perozo, 2006).



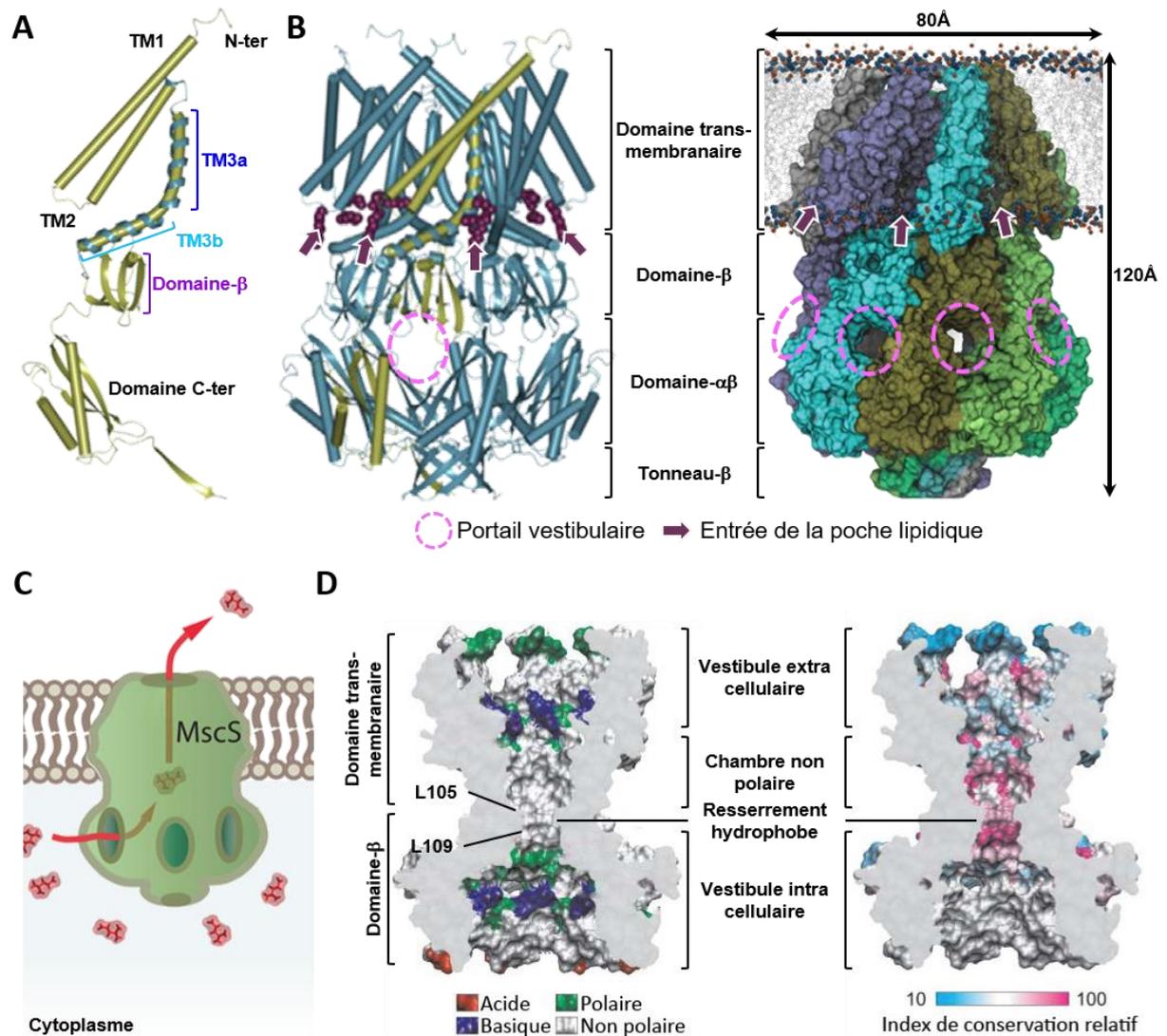
**Figure 10. *EcMscS* s'ouvre à de plus faibles tensions mécaniques qu'*EcMscL***

L'activité MS des liposomes, où ont été inclus *EcMscS* et *EcMscL*, a été analysée par la technique du patch clamp en configuration excisée. Le tracé vert indique les courants unitaires induits par l'ouvertures des canaux *EcMscS* alors que le tracé rose indique les courants unitaires induits par l'ouvertures des canaux *EcMscL*. Selon l'amplitudes des courants mesurés, le nombre de canaux ouverts simultanément a été spécifié à droite des lettres "O". Tracé extrait de Battle *et al.*, 2009.

### – Description du canal: vers une meilleure compréhension de sa fonction

La connaissance de la structure de ce canal peut permettre de comprendre comment cette mécanoperception et cette sélectivité opèrent. A ce jour, plusieurs données de cristallographie permettent de mettre en évidence cette structure (Bass *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2008). Ce canal est organisé en homoheptamère d'environ 80Å de largeur et 120Å de hauteur. Chaque monomère peut être divisé en deux régions distinctes (Fig. 11A). La

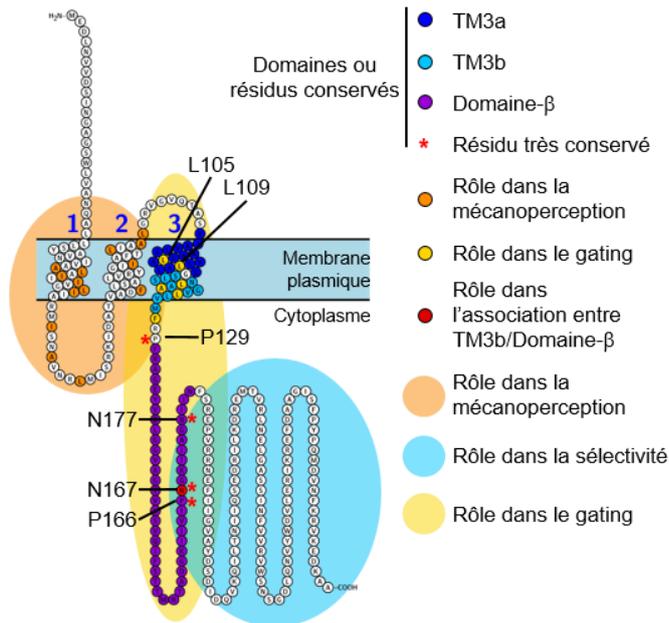
première, insérée dans la membrane, constituée de 3 segments transmembranaires. La seconde, cytoplasmique, est formée d'un domaine de feuillets  $\beta$  et d'une région C-terminale, dont l'extrémité forme un tonneau  $\beta$  avec les mêmes extrémités des autres monomères (Fig. 11B). Les séquences des homologues du *EcMscS* chez différentes espèces présentent une grande variabilité. Seul le troisième segment transmembranaire (TM3) et le domaine  $\beta$



**Figure 11. Crystallisation de *EcMscS*: vers une meilleure compréhension de son fonctionnement**

**A**. Modèle en ruban d'une sous-unité du *EcMscS*. Les domaines légendés en couleur présentent les régions les plus conservées chez les homologues de *EcMscS*. **B**. A gauche et à droite sont respectivement présentés un modèle en ruban et la surface moléculaire d'un homoheptamère formant le canal *EcMscS*. Dans le modèle en ruban, un monomère de *EcMscS* est représenté en jaune et les lipides, insérés dans des poches du canal, en violet. Dans le modèle de surface moléculaire, une couleur représente un monomère de *EcMscS*. **C**. Schéma représentant de manière simplifiée la structure générale du *EcMscS*. **D**. Présentation du pore du *EcMscS* par une coupe longitudinale au niveau du domaine transmembranaire et du domaine- $\beta$ . La coupe de gauche présente les caractéristiques du pH et de polarité des acides aminés bordant le pore. Les résidus Leucine 105 et 109 forment le rétrécissement du pore. La coupe de droite présente la conservation relative, à travers les espèces, des résidus formant le pore. Les images ont été tirées et adaptées de Anishkin et Sukharev, 2004; Gamini *et al.*, 2011; Pliotas et Naismith, 2017.

## EcMscS



**Figure 12. EcMscS: des domaines et des fonctions**

Schématisation de la chaîne polypeptidique de EcMscS et de ses domaines ou résidus conservés d'après l'analyse de Jensen et Haswell, 2012. Les rôles de certains résidus et domaines dans le fonctionnement de l'activité canal MS sont également représentés. Résidus ayant un rôle dans la mécanoperception: A34, L35, I37, L39, L42, I43, I48, A51, L55, F68, I78, L82, A85 et L86. Résidus ayant un rôle dans le gating du canal: L105, L109, L118, A120, L123 et F127. Résidus ayant un rôle dans l'association entre le TM3b et le domaine-β: N167.

semblent conservés (Fig. 12) (Pivetti *et al.*, 2003).

A l'échelle multimérique, on constate dans la région membranaire, la présence de poches où sont insérés des lipides vestibulaires (Fig 11B) (Pliotas et Naismith, 2017). Dans la région cytoplasmique, plusieurs types d'ouverture sont observés. Le premier est celui formant l'ouverture en tonneau β. Le second est constitué de sept ouvertures, nommées portails vestibulaires (Fig 11B et C) (Gamini *et*

*al.*, 2011). Enfin, le pore de ce canal peut se diviser en différentes parties (Fig. 11D) (Anishkin et Sukharev, 2004). La partie du pore dirigée vers le cytoplasme est formée d'un large vestibule intracellulaire. En remontant vers la région extracellulaire, on trouve un resserrement notable (3Å à 4Å) formé par les leucines 105 et 109 et d'autres résidus hydrophobes de chaque monomère. Le pore s'élargit ensuite pour former une chambre apolaire, puis s'élargit encore en un vestibule extracellulaire. La conservation des résidus dans l'évolution semble essentiellement se concentrer au niveau du resserrement hydrophobe (Fig. 11D).

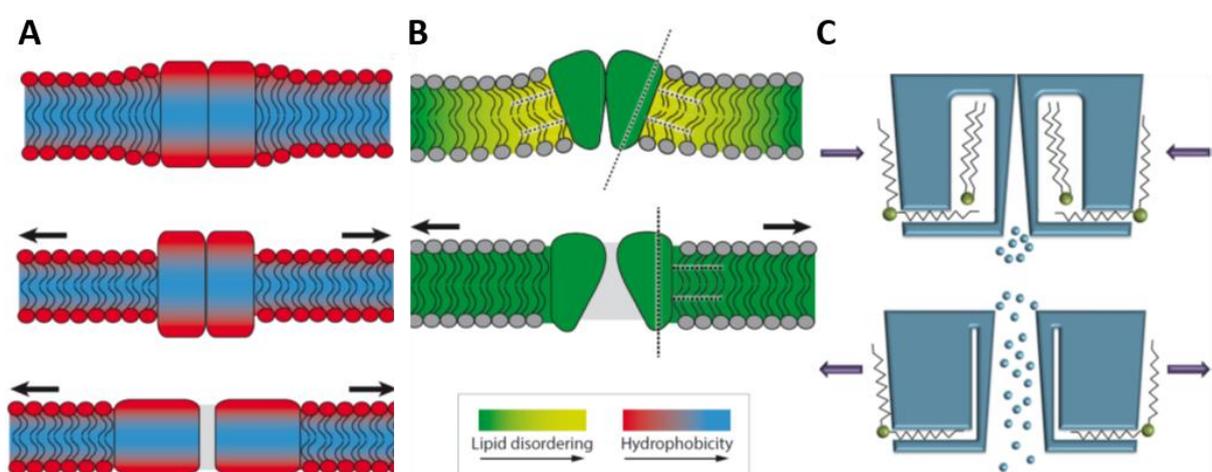
### – Comment EcMscS est-il un mécanosenseur?

La mécanoperception du EcMscS peut être attribuée à sa région N-terminale et à ses deux premiers segments transmembranaires. En effet, on constate dans ces derniers la présence de certains résidus hydrophobes nécessaires à ce type de perception (Fig. 12)

(Nomura *et al.*, 2006; Malcolm *et al.*, 2011; Shaikh *et al.*, 2014). Ces résidus sont localisés à l'interface avec la membrane plasmique. De plus, sur le bord supérieur du vestibule extracellulaire, il existe un anneau de résidus polaires qui pourraient également avoir un rôle dans la mécanoperception (Fig. 11D). Plusieurs modèles peuvent alors expliquer la mécanosensibilité de ce canal.

Le premier est un modèle qui se base sur l'hydrophobicité et la polarité des résidus de *EcMscS* (Fig. 13A) (Hamilton *et al.*, 2015). L'interaction entre les domaines polaires en surface du canal et les têtes polaires des lipides favoriserait la configuration fermée du canal. Lors d'une tension de membrane, la couche lipidique s'affine. Les domaines polaires du canal ne seraient donc plus en configuration favorable et les résidus hydrophobes se retrouveraient exposés. Le canal prendrait alors une configuration ouverte dans laquelle les domaines polaires pourraient interagir à nouveau avec les têtes lipidiques et où les résidus hydrophobes resteraient en interaction avec les queues hydrophobes des lipides.

Le deuxième modèle ferait plutôt intervenir une désorganisation des lipides (Fig.13B) (Hamilton *et al.*, 2015). A l'état de repos, la conformation du canal induirait la distorsion de la



**Figure 13. Modèles pouvant expliquer le mécanisme de mécanoperception des canaux MS**

**A-B.** Modèles proposés par Hamilton *et al.*, 2015. **A.** Le modèle d'hydrophobicité. **B.** Modèle des lipides désordonnés. Les flèches noires indiquent la tension de membrane. Le niveau d'hydrophobicité ou de polarité des lipides du panneau A est représenté respectivement par une échelle bleue à rouge. Le niveau de désorganisation des lipides du panneau B est représenté par une échelle de couleur verte à jaune. **C.** Modèle de la poche lipidique proposé par Pliotas et Naismith, 2017. Les forces appliquées sur la membrane sont indiquées par des flèches violettes.

membrane. Une tension membranaire permettrait alors le réarrangement des lipides. A la suite de ce réarrangement, la conformation ouverte du canal serait alors favorisée pour s'adapter à son nouvel environnement lipidique.

Le troisième modèle se base sur la présence de poches lipidiques dans la structure du canal, mais reste compatible avec le premier modèle et la présence de résidus hydrophobes essentiels à la mécanoperception (Fig. 11B et 13C) (Pliotas et Naismith, 2017). De ce point de vue, les lipides rempliraient la poche lipidique hydrophobe et le canal prendrait alors une configuration fermée. La force exercée sur la membrane pourrait retirer ces lipides de la poche. En réponse à ce vide, le canal adopterait alors une conformation ouverte. Dans ce type de modèle, une interaction spécifique entre les lipides et protéines n'est pas nécessaire. Cela pourrait donc expliquer le maintien de la MS chez les différents homologues de *EcMscS* identifiés dans d'autres espèces, malgré la grande variabilité de séquences observée dans ce domaine.

– *Comment EcMscS sélectionne-t-il ses ions?*

*EcMscS* est un canal anionique peu sélectif. Son domaine cytoplasmique apparaîtrait comme le cœur de ce processus de sélection. La composition des résidus entourant les portails vestibulaires pourrait suggérer le manque de sélectivité (Gamini *et al.*, 2011). A l'inverse, le tonneau- $\beta$  confère une sélectivité un peu plus poussée à ce canal. En effet, en remplaçant ce tonneau par celui d'un *MscS* homologue d'une autre bactérie (*Thermoanaerobacter tengcongensis*), il est possible d'inverser partiellement la sélectivité du canal (Zhang *et al.*, 2012). Il est également intéressant de noter que *TtMscS* possède une plus forte affinité pour l'ion  $\text{NO}_3^-$  et qu'il ne possède pas de portails vestibulaires. Ainsi, on peut émettre l'hypothèse que pour *EcMscS*, la faible sélectivité est permise par la présence du tonneau- $\beta$ , mais l'essentiel du manque de sélectivité est dû à la présence des portails vestibulaires.

---

– Comment *EcMscS* s'ouvre-t-il?

Le gating d'un canal se réfère au mécanisme d'ouverture, de fermeture et d'inactivation d'un canal en lui-même. Les leucines 105 et 109 du resserrement hydrophobe semblent avoir un rôle central dans le bon fonctionnement du gating (Wang *et al.*, 2008). Cependant, plusieurs autres résidus ont été identifiés comme pouvant également avoir un rôle dans ce mécanisme chez *EcMscS*, mais pas dans la mécanoperception ni la sélectivité de ce canal (Fig. 12) (Malcolm et Blount, 2015). La modification de tels résidus influence de manière générale la stabilité de l'état ouvert du canal. Ils ont en commun d'être localisés dans la région transmembranaire TM3b, en bordure du resserrement hydrophobe. L'interaction entre le TM3b et le domaine- $\beta$  semble aussi avoir un rôle dans ce gating. Cette interaction semble entre autres régulée par le résidu N167 (Rowe *et al.*, 2014).

Il est intéressant de noter que les domaines TM3b et  $\beta$ , ainsi que le resserrement hydrophobe appartiennent tous à des régions conservées (Fig. 12 et 11D). L'évolution aurait donc potentiellement favorisé la conservation du système de régulation du gating à la sélectivité du canal. Concernant la mécanoperception, d'après le modèle de (Pliotas et Naismith, 2017), il y aurait plus de souplesse pour la conservation de l'activité MS.

#### **1.4.4.b. Structure et rôles des MSL chez les plantes**

La découverte des MSL chez les plantes est plus récente (Haswell et Meyerowitz, 2006). Les informations disponibles sur ces canaux sont donc plus restreintes que chez son homologue bactérien. Sa structure cristallographique est par exemple inexistante à ce jour. De plus, la faible homologie avec *EcMscS* de la plupart des MSL rend la recherche de fonctions homologues plus compliquée. Cependant, des informations sur le mode de fonctionnement de certains MSL commencent de plus en plus à émerger.

Comme cité plus haut, ces protéines présentent une forte homologie avec *EcMscS* au

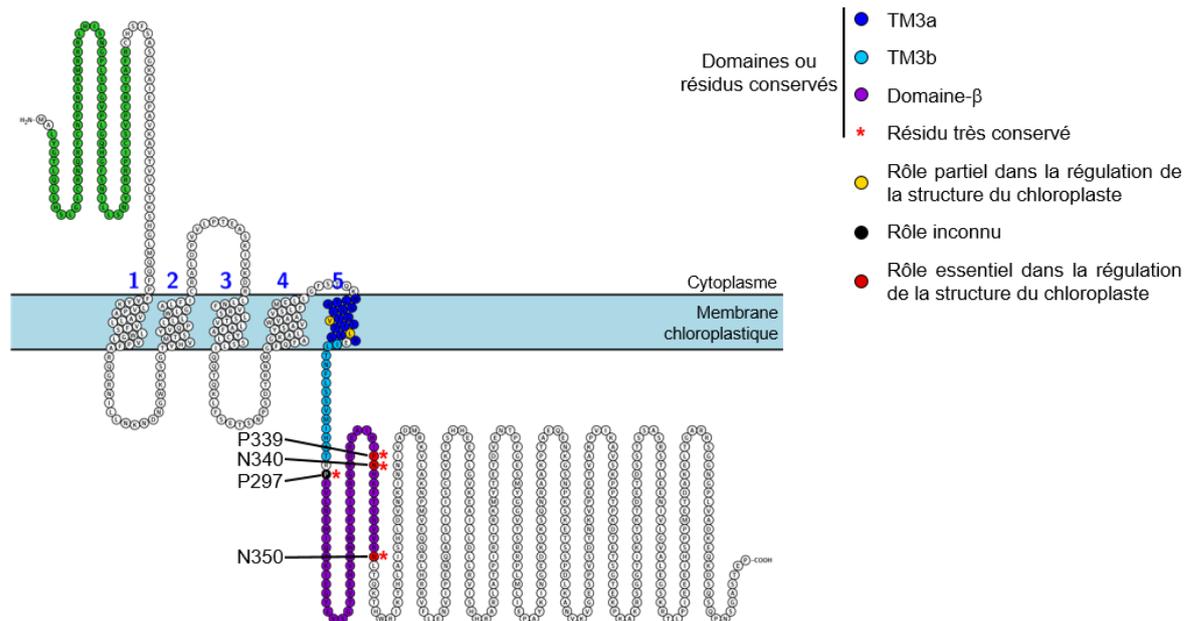
niveau du TM3 (Jensen et Haswell, 2012). Cependant, contrairement au *EcMscS*, les *AtMSLs* ont une séquence en acides aminés beaucoup plus grande (500 à 880 acides aminés contre 286 pour *EcMscS*) et présentent également un plus grand nombre de segments transmembranaires prédits (5 à 6 contre 3 pour *MscS*) (Haswell, 2007). Les *AtMSLs* peuvent enfin être répartis en deux classes distinguées selon leur degré d'homologie avec les *MscS* bactériens.

– *La classe I (AtMSL 1- 3):*

Elle présente le plus de similarités avec *EcMscS*. De plus, des prédictions bioinformatiques indiquent la présence de peptides signaux vers les plastes ou les mitochondries (Fig. 14) (Haswell, 2007).

La localisation chloroplastique d'*AtMSL2* et 3 chez *A. thaliana* a été confirmée par Haswell et Meyerowitz (2006). Le double mutant *Atmsl2;Atmsl3* possède des phénotypes très marqués: les feuilles présentent des zones chlorotiques, l'organisation tissulaire est perturbée et les chloroplastes sont géants (Haswell et Meyerowitz, 2006). De plus, *AtMSL2* et 3 sont capables de compléter des mutants d'*E. coli* inactivés dans leurs canaux MS, et donc incapables de résister à des chocs hypoosmotiques. Tout comme pour le *MscS* bactérien, on retrouve pour ces *AtMSL* un rôle dans la perception des modifications d'osmolarité du milieu de croissance (Veley *et al.*, 2012). Le gigantisme des chloroplastes a été attribué à un défaut de division de ceux-ci (Wilson *et al.*, 2011). En effet, on retrouve chez le double mutant *Atmsl2;Atmsl3* une augmentation du nombre d'une structure nommée "Z-ring" définissant le site de division du chloroplaste. Ce Z-ring jouerait un rôle dans le recrutement des différents éléments nécessaires à la division. Deux hypothèses ont été émises sur la nature du rôle d'*AtMSL2* et 3 dans ce phénomène. La première propose que ces canaux permettraient le relâchement des tensions membranaires pouvant exister lors de l'expansion des plastes.

## Classe I - AtMSL2



**Figure 14. AtMSL2 : des résidus et des fonctions dans la régulation de la structure du chloroplaste**

Schématisme de la chaîne polypeptidique de AtMSL2, un des trois membres des AtMSL de la classe I, et de ses domaines ou résidus conservés d'après l'analyse de Jensen et Haswell, 2012. Les rôles de certains résidus dans la régulation de la structure du chloroplaste sont également représentés. Résidus ayant un rôle partiel dans la structure du chloroplaste: V273 et L277. Résidus ayant un rôle majeur dans la structure du chloroplaste: P339, N340 et N350. Résidu très conservé dans les séquences des MSL mais ayant encore un rôle inconnu: P297.

L'absence de relâchement chez le double mutant perturberait donc le bon fonctionnement des protéines recrutées sur le Z-ring. L'autre hypothèse propose que AtMSL2 et 3 joueraient un rôle dans l'homéostasie des ions du chloroplaste. Un changement de cette homéostasie perturberait l'activité des protéines responsables de leur division.

En se basant sur les homologues de séquence du domaine TM3, des résidus, pouvant avoir les mêmes fonctions que ceux présents dans le resserrement hydrophobe chez *EcMscS*, ont été identifiés chez AtMSL2 (V273 et L277, Fig. 14) (Jensen et Haswell, 2012). Cependant, ceux-ci ne semblent avoir qu'un rôle partiel dans la régulation de la structure des chloroplastes. A l'inverse, les résidus très conservés du domaine-β (P339, N340 et N350) semblent eux avoir une fonction critique dans cette régulation. Enfin, l'absence du quatrième résidu très conservé de ce domaine ne semble pas affecter la fonctionnalité de AtMSL2, ce qui pose encore des questions sur la raison de la conservation de ce résidu. Par homologie de fonction, on peut donc supposer que le gating du canal a un rôle chez AtMSL2 pour réguler la

structure des chloroplastes. Aucune donnée électrophysiologique n'est cependant disponible pour conforter cette supposition.

Quelques données sont également disponibles pour le canal mitochondrial *AtMSL1*. Celui-ci servirait en effet à dissiper le potentiel de membrane des mitochondries pouvant augmenter lors de stress abiotiques (Lee *et al.*, 2016). Des études électrophysiologiques ont montré que ce canal est capable de s'ouvrir en réponse à une tension de membrane avec une conductance d'environ 1000pS. Cependant, il ne semble pas avoir un rôle dans la protection des mitochondries face à un choc hypoosmotique. Des études supplémentaires sont donc nécessaires pour identifier la fonction de ce canal.

– *La classe II (AtMSL4-10) :*

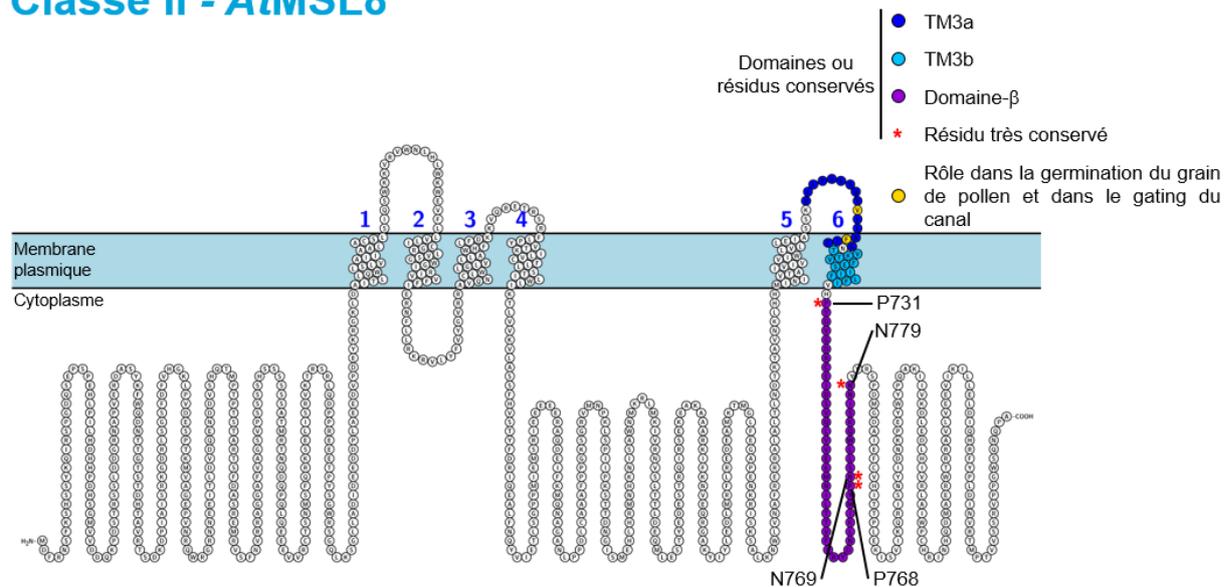
Ces *AtMSL* ne possèdent pas de peptide signal vers les plastes ou les mitochondries (Haswell, 2007). Trois canaux de cette classe ont pour l'instant été étudiés: *AtMSL8*, 9 et 10.

*AtMSL8* a été identifié comme étant localisé dans la membrane plasmique des tubes polliniques\*. Les grains de pollen des mutants *Atmsl8* ont une viabilité réduite pendant leur réhydratation. Cette baisse de viabilité se traduit par un éclatement des tubes polliniques (Hamilton *et al.*, 2015). On retrouve donc ici un rôle de ce canal dans la résistance à un choc hypoosmotique. Des analyses électrophysiologiques ont confirmé que cette protéine est un canal s'ouvrant en réponse à une tension de membrane. Il possède également une plus forte sélectivité pour les anions que pour les cations. Cependant, sa conductance est beaucoup plus faible que chez *EcMscS* ou *AtMSL1*. Elle est en effet d'environ 40pS. Enfin des résidus, homologues de ceux formant le pore hydrophobe chez *EcMscS*, ont été étudiés (Fig. 15) (Hamilton et Haswell, 2017). Ces études ont révélé que ces résidus avaient aussi un rôle dans

---

\* Avant son arrivée sur les pièces reproductrices femelles, le grain de pollen est déshydraté. La réhydratation de celui-ci sur le pistil entraîne leur germination sous forme d'un tube pollinique unicellulaire. A terme, l'allongement du tube pollinique permet la fécondation des ovules.

## Classe II - AtMSL8



**Figure 15. AtMSL8 : des résidus et des fonctions dans la germination du grain de pollen**

Schématisation de la chaîne polypeptidique de AtMSL8, un des sept membres des AtMSL de la classe II, et de ses domaines ou résidus conservés. Ces résidus ont été déduits par alignement de séquence en se basant sur les analyses de Jensen et Haswell, 2012. Le rôle de certains résidus dans la régulation de la germination du grain de pollen est également représenté (F720 et I711).

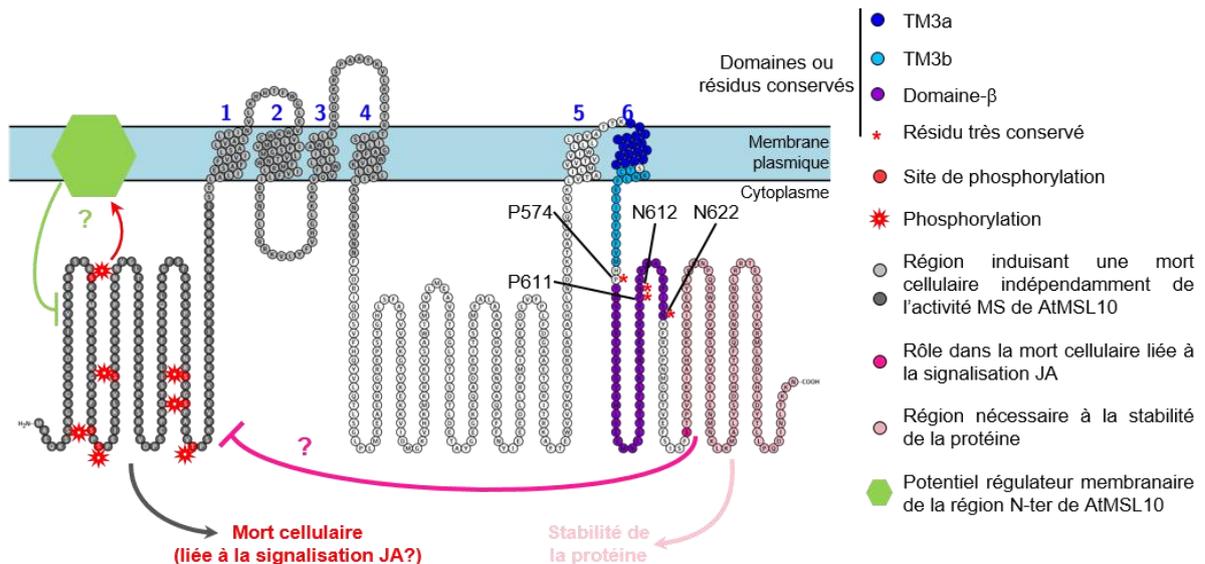
le gating de ces canaux, et que leur mutation affectait plus ou moins drastiquement leur fonction dans la germination du grain de pollen. L'homologie de séquence observée dans ce domaine correspond donc également à une homologie de fonction.

A la différence de AtMSL8, AtMSL9 et 10 sont préférentiellement localisés dans les pointes racinaires et les tissus vasculaires racinaires ou aériens (Haswell *et al.*, 2008). Ils présentent également un adressage à la membrane plasmique, mais aussi dans une moindre mesure à des endomembranes (Hamilton *et al.*, 2015). On peut enfin noter que dans la racine, cette localisation membranaire est accentuée sur la zone de division cellulaire. L'activité MS à la membrane plasmique est fortement diminuée chez le double mutant *Atmsl9;Atmsl10*. Chez le quintuple mutant *Atmsl4;Atmsl5;Atmsl6;Atmsl9;Atmsl10* (*AtmslΔ5*), cette activité est inexistante. AtMSL9 et 10 ont ainsi pu être identifiés en tant que canaux préférentiellement anioniques, avec une conductance respectivement d'environ 40 et 140pS (Haswell *et al.*, 2008; Maksaev et Haswell, 2012). Il a aussi été proposé que AtMSL9 et 10 puissent s'associer en hétéromère, produisant une activité MS avec une conductance intermédiaire (Peyronnet *et*

*al.*, 2008). Pendant longtemps, aucun phénotype n'a pu être attribué à l'absence de ces canaux chez *Atmsl15*. Cependant, un nouveau phénotype a récemment été attribué à celui-ci. En effet une stimulation mécanique, par agitation contrôlée de la hampe florale, n'est plus capable d'induire chez ce mutant l'expression de gènes répondant normalement à ce type de contrainte mécanique. Pour certains de ces gènes, la régulation de leur transcription serait liée à la présence de *AtMSL10* (Tran *et al.*, données non publiées. (cf. Article 2)).

A l'inverse de leur absence, la surabondance de MSL a mis en évidence d'autres rôles de ce canal. La surexpression de *AtMSL10*, fusionnée en C-ter à la protéine fluorescente GFP, conserve sa localisation et son activité MS. Cependant, la surexpression de cette protéine chimère entraîne de la mort cellulaire associée à une augmentation de ROS (Veley *et al.*, 2014). Cette mort cellulaire est supprimée si des résidus de la région N-ter sont constitutivement phosphorylés. De manière étonnante, la surexpression du domaine N-ter associé aux 4 premiers domaines transmembranaires, bien qu'incapable d'induire une activité MS, est toujours apte à induire une mort cellulaire régulée par une phosphorylation. Ainsi, *AtMSL10* pourrait avoir un rôle dans la régulation de la mort cellulaire indépendamment de son activité canal. Cependant, les auteurs de cet article ont fait ces observations en surexprimant cette région dans de l'épiderme de tabac. La possibilité d'interaction avec les MSL endogènes reste donc toujours concevable. De plus, le rôle inhibiteur de la phosphorylation dans le déclenchement de la mort cellulaire n'a lieu qu'en présence de ces 4 premiers TM. On peut donc supposer que la machinerie responsable de l'inhibition de la région N-ter, en réponse à la phosphorylation, soit associée à la membrane plasmique. Ainsi, en l'absence des TM la reliant à la membrane, la région N-ter de *AtMSL10* ne peut plus être inhibée par sa phosphorylation (Fig. 16).

## Classe II - AtMSL10



**Figure 16. AtMSL10 : un canal, des fonctions indépendantes ?**

Schématisme de la chaîne polypeptidique de AtMSL10, un des sept membres des AtMSL de la classe II, et de ses domaines ou résidus conservés d'après l'analyse de Jensen et Haswell, 2012. Les rôles de certains résidus ou domaine dans la régulation de la mort cellulaire liée à la signalisation des JAs sont également représentés. Résidus ayant un rôle dans la phosphorylation de la région N-ter du canal: S29, S46, S48, S57, S128, S131, T136. Résidu ayant un rôle dans la mort cellulaire liée à la signalisation JA: S640.

Pour compléter ces observations, un criblage de mutants ponctuels, afin de trouver un candidat régulant la signalisation des JA, a mis en évidence que le domaine C-ter de ce canal était aussi impliqué dans la régulation de la mort cellulaire (Zou *et al.*, 2016). En effet, la mutation ponctuelle d'un résidu de cette région induit une légère augmentation de l'expression de AtMSL10, accompagnée d'une mort cellulaire liée à une augmentation de la quantité en JA synthétisée. De plus, l'absence totale de la région C-ter diminue la stabilité de cette protéine. Les auteurs de ce travail ont montré que la GFP fusionnée en C-ter de AtMSL10, a pour conséquence de perturber le bon fonctionnement de cette protéine. Ils ont ainsi proposé l'hypothèse que la région C-ter stabilise la région N-ter pour empêcher l'induction d'une mort cellulaire programmée. Cette hypothèse va dans le sens de la présence à la membrane d'une machinerie responsable de l'inhibition de la région N-ter de AtMSL10. Cependant dans ce cas c'est AtMSL10 qui se régule par lui-même (Fig. 16).

### I.5. Objectifs de la thèse

Que ce soit les MSL de la classe I ou II, ces canaux conservent toujours un rôle, homologue à celui de *EcMscS*, dans la régulation de la résistance aux contraintes osmotiques. C'est par exemple le cas de *AtMSL2*, 3 et 8. Par contre, de nouvelles fonctions semblent avoir émergées, comme la dissipation du potentiel de membrane par *AtMSL1* ou l'induction de mécanismes liés à la réponse au touché ou à la signalisation des JAs par *AtMSL10*. Il serait donc intéressant de voir si ces canaux peuvent aussi avoir un rôle dans d'autres types d'interaction ou dans d'autres cellules. L'étude du poil racinaire de Légumineuses représente donc un autre modèle valable pour cet objectif. En effet, le poil étant constitué d'une seule cellule, il permet d'explorer le rôle des MSL notamment lors de son élongation cellulaire ou de sa résistance aux chocs hypoosmotiques. De plus, les Légumineuses ont la particularité d'entrer en symbiose avec des rhizobia ou des AMs. Il a été montré par ailleurs que les étapes précoces de telles interactions pouvaient être régulées par la perception de contraintes mécaniques. C'est donc dans ce contexte que s'est déroulée ma thèse, ayant pour objectif d'explorer et de révéler le:

"Rôle des MSL dans les poils racinaires de la plante modèle *M. truncatula*, lors des étapes précoces de la symbiose avec des rhizobia."

Pour ce faire j'ai défini différents sous-objectifs constituant des étapes préalables, mais nécessaires à franchir, afin d'amener des éléments de réponse à l'objectif ultime énoncé ci-dessus.

La famille des MSL chez *M. truncatula* n'a pour l'instant jamais été étudiée. Il a donc été nécessaire dans un premier temps de définir cette famille grâce à des analyses *in silico*. Cette étude a aussi permis de présélectionner des candidats pour nos recherches.

Dans un second temps, afin de réduire la liste des candidats, l'analyse de la transcription

de ces gènes dans les poils racinaires ou dans la racine entière a été faite. Celle-ci s'est faite de différentes manières, d'une part par des méthodes transcriptomiques et d'autre part à l'aide de fusions transcriptionnelles.

Identifier une protéine sur la base de son homologie avec d'autres protéines connues, ne signifie pas forcément que celle-ci aura les mêmes fonctions ou localisations subcellulaires. Aussi, afin de confirmer la nature des candidats sélectionnés précédemment, deux propriétés des canaux membranaires mécanosensibles ont été recherchées chez eux.

La première propriété testée concerne la localisation des canaux sur une membrane quelconque. Cette étude s'est faite à l'aide de la production de protéines chimères, composées de nos candidats fusionnés à la protéine fluorescente GFP. La localisation de ces chimères a ensuite été observée par microscopie confocale. Cette technique présente l'avantage de pouvoir identifier le compartiment cellulaire dans lequel sont adressées ces protéines, mais aussi de pouvoir observer leur potentiel changement de localisation en réponse à divers stimuli.

Les homologues des candidats retenus sont des canaux mécanosensibles. C'est donc l'activité de ce type de canal qui a été testée dans un deuxième temps pour confirmer la nature de nos protéines sélectionnées. La stratégie de complémentation fonctionnelle de protoplastes d'*A. thaliana* ayant des MSL inactivés, associée à des mesures électrophysiologiques, a ainsi été utilisée. En parallèle, la recherche de canaux MS dans les poils racinaires de *M. truncatula* a également été faite par des mesures électrophysiologiques. Enfin les rôles des *MtMSL*, lors du développement des poils racinaires, mais également lors de l'établissement de la symbiose avec les rhizobia chez *M. truncatula*, ont été étudiés. Pour cela, une approche de génétique inverse a été utilisée, par l'étude de mutants inactivés pour les gènes candidats retenus dans cette étude.



# Chapitre II.

## Recherche de *MtMSL* candidats par des analyses *in silico*

Le génome de *M. truncatula* est constitué d'un peu plus de 50 000 gènes (Tang *et al.*, 2014). Trouver des candidats parmi ceux-ci s'apparente donc à rechercher une aiguille dans une botte de foin. Cependant, les progrès de la bioinformatique ont rendu cette tâche aisée. Ces outils nous permettent en effet de prédire la fonction d'un gène par homologie de séquence avec des gènes connus. Enfin, d'autres équipes de recherche ont effectué des études de la transcription de l'ensemble de ces gènes dans des conditions précises. L'immense quantité de données issue de ces analyses est également partagée. Ce sont donc autant de sources d'informations pour commencer à se faire une idée du potentiel rôle d'une famille de gènes étudiée.

### II.1. Recherche des *MtMSL* dans le génome de *M. truncatula*

En utilisant la base de données du JCVI Medicago (<http://www.jcvi.org/medicago>), des *MtMSL* candidats ont été recherchés sur la base de l'annotation de la version Mt4.0 du génome de *M. truncatula* (Tang *et al.*, 2014). Cette annotation se base sur la recherche, dans la séquence traduite des gènes prédits, de domaines conservés définis dans d'autres bases de données. Afin de compléter cette recherche, les séquences protéiques de *EcMcsS*, *AtMSL2* et *AtMSL9* ont été utilisées pour réaliser un alignement de séquence avec toutes les protéines prédites de cette version du génome. Aucun gène supplémentaire n'a pu être mis en évidence

**Tableau 1. Récapitulatif des séquences obtenues par analyse *in silico***

Locus du gène dans la version Mt4.0	Nom du gène <sup>a</sup>	Taille prédite (a.a.)	Domaine MscS <sup>b</sup>	Nombre de domaines transmembranaires <sup>b</sup>	Présence d'un peptide signal <sup>c</sup>
Medtr3g100280	<i>MtMSL1.1</i>	716	Présent	5	C2
Medtr3g100320	<i>MtMSL1.2</i>	591	Présent	5	C5
Medtr5g032090	<i>MtMSL1.3</i>	705	Présent	5	C4
Medtr8g028760	<i>MtMSL1.4</i>	548	Présent	4	C4
Medtr1g113850	<i>MtMSL2.1</i>	926	Présent	6	C5
Medtr2g041220	<i>MtMSL2.2</i>	763	Présent	6	
Medtr3g104920	<i>MtMSL2.3</i>	749	Présent	6	
Medtr3g104940	<i>MtMSL2.4</i>	772	Présent	6	
Medtr3g104990	<i>MtMSL2.5</i>	771	Présent	6	
Medtr8g071250	<i>MtMSL2.6</i>	702	Présent	5	
Medtr4g081940		54	Absent	0	M3
Medtr8g030960		104	Présent	0	
Medtr8g031050		127	Présent	0	S1
Medtr8g031060		111	Présent	0	S1

a. Les noms de gènes ont été donnés uniquement pour les accessions présentant un domaine MscS et des domaines transmembranaires; b. Les prédictions ont été réalisées avec l'outil HMMER v2.7.3 (Finn *et al.*, 2015); c. Les prédictions ont été faites avec l'outil TargetP (Emanuelsson *et al.*, 2007). C : peptide d'adressage au chloroplaste, M : peptide d'adressage à la mitochondrie, S: peptide signal pour la voie de sécrétion, 1-5 : niveau de confiance de la prédiction attribué par TargetP, 1 étant le niveau le plus élevé.

par cette dernière analyse. Ainsi, il existe 14 gènes candidats (Tab. 1). Les protéines traduites à partir de ces accessions possèdent toute un domaine MscS en se basant sur la prédiction de l'outil HMMER, à part le locus Medtr4g081940. Cependant, comme les auteurs de l'annotation Mt4.0 se sont basés sur d'autres sources de prédictions, il est possible que la présence de ce domaine dans cette séquence ait été identifiée autrement.

*EcMscS*, *AtMSL2* et *AtMSL9* ont respectivement une taille de 286, 673 et 742 acides aminés. Les séquences traduites à partir de 4 de ces 14 loci ne sont donc pas de cet ordre de grandeur (Medtr8g071250, Medtr4g081940, Medtr8g030960, Medtr8g031050 et Medtr8g031060). Cela pourrait être dû à une mauvaise annotation du génome, comme par exemple un manque d'une partie du cadre de lecture. Afin d'écarter cette hypothèse, une analyse plus poussée a été effectuée. Dans un premier temps, les séquences génomiques situées 3kb en amont du codon d'initiation et 3kb en aval du codon stop des loci concernés ont été isolées. Les séquences obtenues ont ensuite été traduites dans les trois cadres de lectures et alignées avec les séquences annotées traduites du génome d'*A. thaliana* ou de

celles d'autres plantes séquencées (outil BLASTx sur la base de données du NCBI). Aucune similarité avec d'autres séquences annotées n'a pu être identifiée en procédant de cette manière (données non montrées). Il est donc possible que ces 4 loci soient des pseudogènes. Cela est d'autant plus probable qu'ils ne possèdent pas non plus de domaines transmembranaires prédits. 10 gènes *MtMSL* candidats existent donc dans le génome de *M. truncatula*.

## II.2. Classification des *MtMSL*

Comme précisé précédemment, les MSL sont regroupés en deux classes (Haswell, 2007). Afin de voir si cette répartition existe aussi chez les *MtMSL*, un alignement de séquences protéiques a été réalisé entre ces 10 candidats et les MSL de divers autres espèces, végétales ou non. Cet alignement a ensuite été utilisé pour construire un arbre phylogénétique (Fig. 17). La longueur cumulée des branches horizontales reliant deux protéines est proportionnelle à la similarité de séquence existant entre elles. Comme montré auparavant, deux classes de protéines peuvent ainsi être définies. La première contient les *MtMSL*1.1 à 4, proches du *EcMscS* et des *AtMSL*1, 2 et 3, localisés sur les plastes et les mitochondries. La deuxième contient les *MtMSL*2.1 à 6, proches des *AtMSL*9 et 10, localisés à la membrane plasmique. On constate également que des MSL de l'algue *C. reinhardtii* sont branchés à la base de chaque classe. L'apparition de ces deux classes doit donc être antérieure à la divergence entre les algues et les Embryophytes\*.

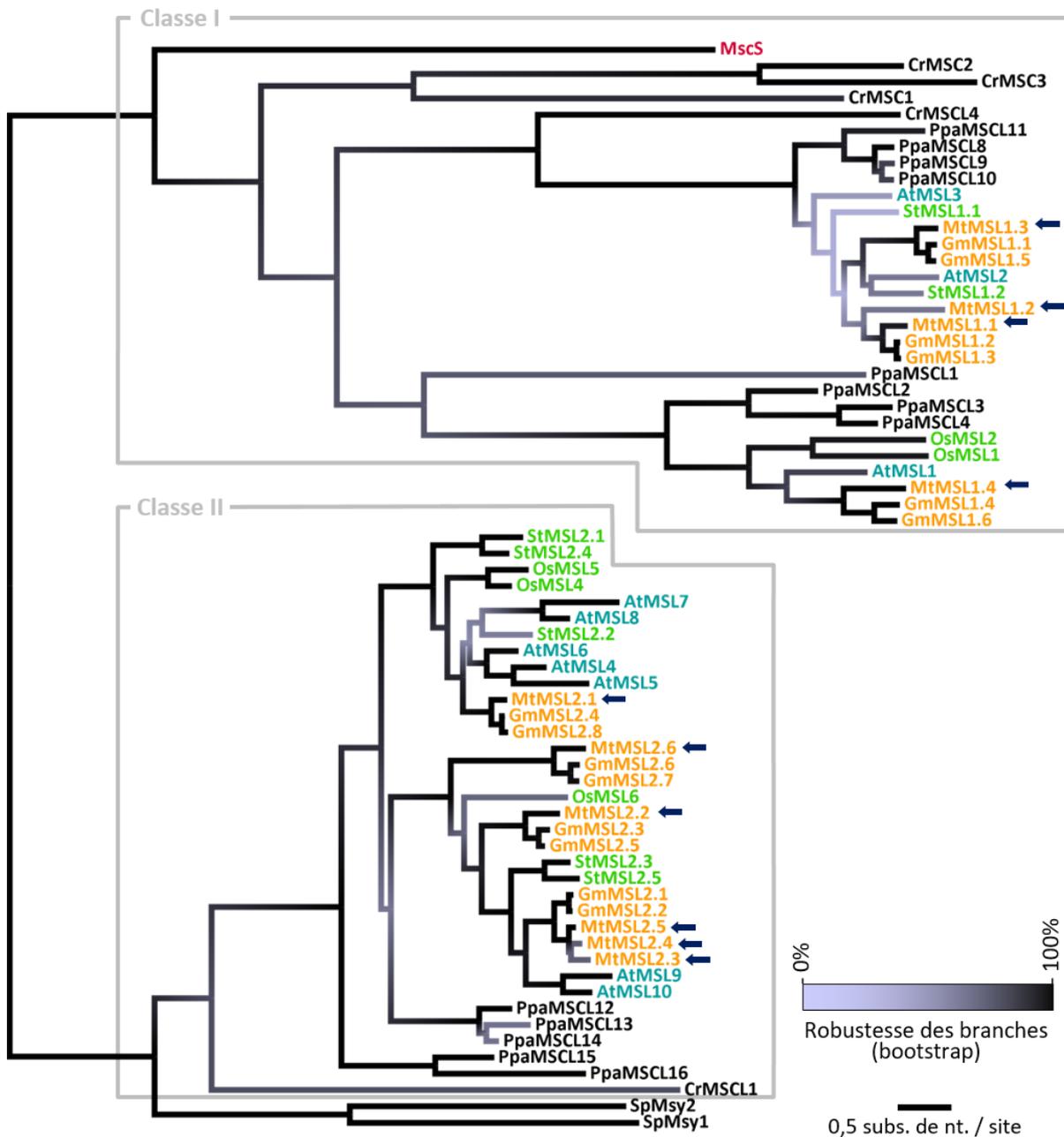
Au sein de la classe I, deux sous-groupes peuvent se distinguer: ceux proches de *AtMSL*1 et ceux proches de *AtMSL*2 et 3. Par homologie de fonction, on peut donc penser que la première sous-classe comporterait les MSL localisés dans les mitochondries. La deuxième

---

\* Les Embryophytes correspondent aux organismes de la lignée verte possédant entre autre un appareil végétatif organisé et formant un embryon par fécondation à un moment de son cycle de vie. Ce groupe contient par exemple les mousses, les fougères et les plantes à fleurs. Une présentation simplifiée de la classification de la lignée verte est présentée en annexe 2.

sous-classe comporterait au contraire les MSL localisés sur les plastides.

Au sein de la classe II, on observe également deux sous classes. La première comporte



**Figure 17. Relations phylogénétiques de la famille des MSL**

L'arbre phylogénétique a été construit selon le principe du maximum de vraisemblance à partir des séquences protéiques des MSL de différentes espèces. Les espèces utilisées sont *Arabidopsis thaliana* (At), *Chlamydomonas reinhardtii* (Cr), *Escherichia coli* (MscS), *Glycine max* (Gm ou soja), *Medicago truncatula* (Mt), *Oryza sativa* (Os ou riz), *Physcomitrella patens* (Ppa), *Schizosaccharomyces pombe* (Sp) and *Solanum tuberosum* (St ou pomme de terre). Les numéros d'accèsion des différentes protéines sont indiqués dans le tableau 5 des matériels et méthodes. Le MscS d'*E.coli* est mis en évidence en rouge, les MSL d'*A. thaliana* en bleu, ceux de la famille des *Fabaceae* en orange, ceux de *M. truncatula* par une flèche et ceux d'autres espèces d'Angiospermes en vert. Enfin, les MSL en noir appartiennent aux groupes des mousses, des champignons ou des algues. Les cadres gris indiquent les différentes classes de MSL. La longueur des branches est proportionnelle au nombre de substitutions de nucléotides par site. La robustesse de l'arbre a été testée par la méthode du bootstrap (1000 répétitions) et est indiquée par le niveau de gris des branches.

les MSL proches de *AtMSL8*, et la deuxième les MSL proches de *AtMSL9* et *10*. Par homologie de fonction, il est possible que les MSL de la première sous-classe aient un rôle dans la germination du grain de pollen. Les MSL de la deuxième sous-classe pourraient par contre avoir un rôle dans la régulation de la mort cellulaire liée à la signalisation des JA, ou dans la régulation de la transcription de gènes s'exprimant en réponse à une contrainte mécanique. A l'inverse des deux sous-classes observées dans la classe I, les MSL de la mousse *P. patens* ne se branchent qu'à la base de la sous-classe de *AtMSL10*. On peut donc penser que la sous-classe de *AtMSL8* est apparue après la divergence entre les mousses et les Spermatophytes\*. On retrouve donc ici un lien entre l'apparition du grain de pollen et la divergence d'une sous-classe de MSL ayant potentiellement un rôle dans la régulation de sa germination.

Quelle que soit la sous-classe observée, les MSL des Légumineuses sont globalement plus proches entre eux que les MSL d'autres Dicotylédones tels que *A. thaliana* ou *S. tuberosum*. De même, les MSL de Légumineuses sont globalement plus proches des autres Dicotylédones que de la Monocotylédone *O. sativa*. L'évolution de la séquence des MSL suit donc l'évolution des divers groupes d'Angiospermes. Cette organisation reflète ainsi la forte divergence de séquences existant en dehors du domaine MscS conservé (Pivetti *et al.*, 2003).

Enfin, il semble que la branche des MSL du champignon *S. pombe* se diversifie indépendamment des autres classes, comme cela a été montré précédemment pour les MSL d'autres espèces de champignons (Nakayama *et al.*, 2012). Par contre, il est intéressant de noter que tous les champignons ne possèdent pas d'homologues des MSL. C'est par exemple le cas pour la levure *Saccharomyces cerevisiae*. On peut donc penser que chez ces espèces d'autres mécanismes de perception de l'osmolarité ou de la mécanosensibilité existent.

---

\* Les Spermatophytes incluent les plantes avec une vraie graine. Ces plantes produisent également des grains de pollen et des ovules. On y retrouve le groupe des Gymnospermes (pins, taxus, Ginkgo...) et des Angiospermes (les plantes à fleur).

II.3. Structure de *MtMSL*

La classification en deux classes des *MtMSL* se retrouve dans leur structure prédite, comme observé pour les *AtMSL* (Haswell, 2007). En effet, les *MtMSL* de la classe I sont plutôt composés de 4 à 5 segments transmembranaires tandis que les *MtMSL* de la classe II possèdent de 5 à 6 segments transmembranaires (Fig. 18, 14-16 et Tab. 1). Les *MtMSL* de la classe II se distinguent aussi par la présence d'un large domaine cytosolique entre le 4<sup>ème</sup> et le 5<sup>ème</sup> segment transmembranaire. Enfin, les *MtMSL* de la classe I possèdent globalement un peptide signal prédit pour induire une localisation sur les plastes. On peut cependant noter pour *MtMSL1.4*, proche du MSL mitochondrial *AtMSL1*, qu'un peptide de localisation chloroplastique a été prédit au lieu d'un peptide de localisation mitochondriale. Ces observations contradictoires montrent donc que l'utilisation d'outils de prédiction ne dispense pas de vérifier leur véracité par d'autres méthodes. Cependant il s'agit, sans en douter, d'outils fort utiles pour sélectionner des protéines candidates.

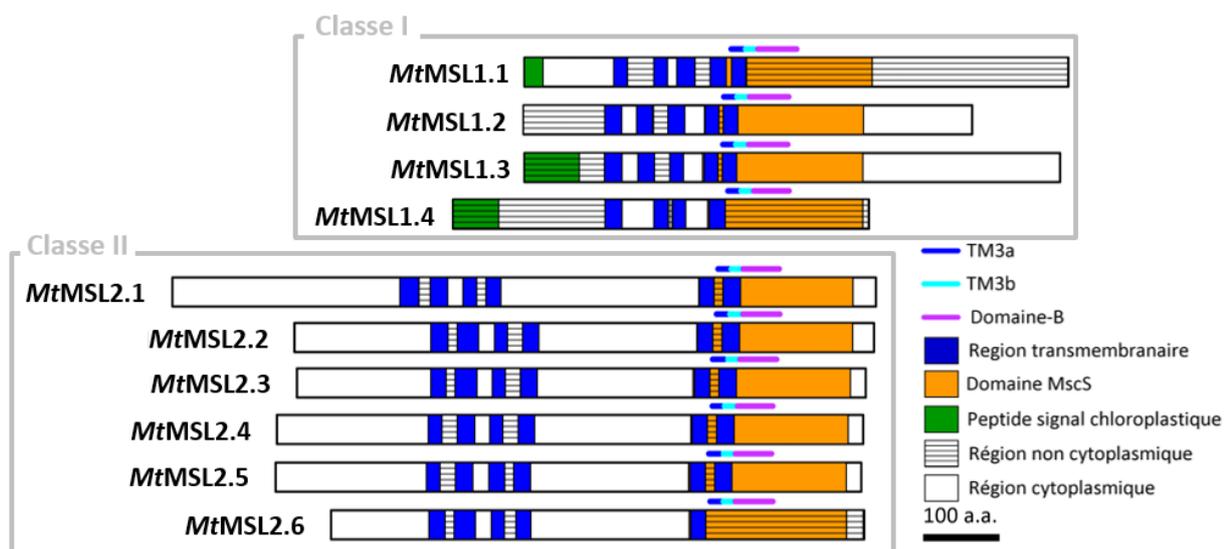
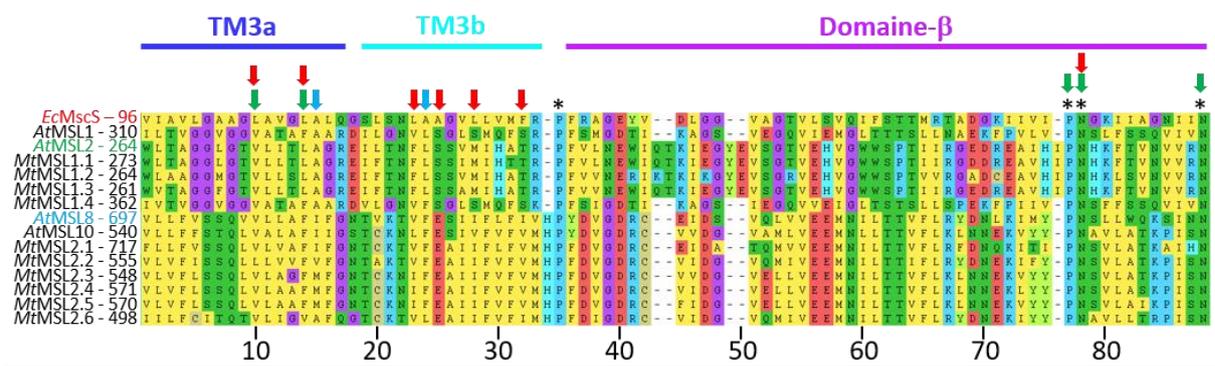


Figure 18. Structure des MSL chez *Medicago*

Les différents domaines prédits, présentés dans le tableau 1, sont schématisés avec une taille proportionnelle à leurs nombres d'acides aminés dans la protéine concernée. Les peptides de signalisation vers le chloroplaste n'ont été représentés que pour un niveau de confiance de prédiction attribué par TargetP compris entre 1 et 4. Le programme Phobius a été utilisé pour prédire l'orientation des différents domaines par rapport à la membrane (Käll *et al.*, 2004). A l'aide de l'alignement utilisé pour créer l'arbre présenté en figure 17, les régions fortement conservées de la famille des MSL (TM3a, TM3b et domaine-β) ont été identifiées et représentées par des lignes au-dessus de chaque schéma de protéines.



**Figure 19. Conservation des acides aminés chez les *MtMSLs***

L'alignement de séquence au niveau des domaines conservés défini par Jensen et Haswell (2012) est ici représenté pour les *MtMSLs*, *EcMscS*, *AtMSL1*, 2, 8 et 10. Les noms des protéines et la position dans leurs séquences des premiers acides aminés présentés ici sont précisés à gauche de l'alignement. Les astérisques indiquent les résidus conservés dans toutes les séquences présentées. Les flèches rouges indiquent les résidus s'alignant avec ceux ayant un rôle dans le gating du canal chez *EcMscS*. Les flèches vertes présentent les résidus s'alignant avec ceux ayant un rôle dans la structure des chloroplastes chez *AtMSL2*. Les flèches bleues indiquent les résidus s'alignant avec ceux ayant un rôle dans le gating du canal et la germination du tube pollinique chez *AtMSL8*. Les couleurs en arrière-plan se basent sur les propriétés biochimiques des résidus concernés. Afin de faciliter l'identification des différents résidus, une échelle relative au premier acide aminé du domaine conservé est présentée en bas.

La forte conservation de séquence au niveau du domaine MscS se retrouve également chez les *MtMSL* (Fig. 19). On retrouve par exemple une conservation des acides aminés hydrophobes aux positions 10 et 14 du domaine conservé, identifiés comme ayant un rôle dans le gating chez *E. coli* ou dans la régulation de la structure du chloroplaste chez *A. thaliana* (respectivement L105 et 109 du *EcMscS* et V273 et V277 du *AtMSL2* - Fig. 12, 14) (Wang *et al.*, 2008; Jensen et Haswell, 2012). Il en est de même pour les résidus hydrophobes 24 et 35 ayant un rôle dans la germination du grain de pollen chez *AtMSL8* (F720 et I711) (Fig. 15) (Hamilton et Haswell, 2017). La proline 35 du domaine est aussi conservée chez les *MtMSL*. La haute conservation de ce résidu reste donc encore une fois étonnante étant donné que la suppression de cette proline ne semble pas modifier la fonction du canal chez *AtMSL2* (Jensen et Haswell, 2012).

La forte similitude de structure, existant entre les différents MSL des classes I ou II chez *Medicago* et *Arabidopsis*, tend à faire suggérer que les *MtMSL1.1-4* seraient localisés dans les plastes et que les *MtMSL2.1-6* seraient localisés sur la membrane plasmique. Celle-ci est la deuxième barrière rencontrée, après la paroi, par les rhizobia ou les hyphes lors de la mise en

place des symbioses. C'est aussi, un des éléments sujets à subir les contraintes mécaniques potentiellement induites par la courbure du poil racinaire ou la pression provoquée par les hyphes de champignons. Les *MtMSL* de la classe II semblent donc de meilleurs candidats pour les objectifs de notre étude.

### II.4. Conclusion

Comme cela était prévisible, les *MtMSL* peuvent être répartis en deux classes distinctes. De par leur homologie de séquence avec des *AtMSL* spécifiques, on peut prédire que la première classe, contenant les *MtMSL*1.1 à 4, aurait un rôle au niveau des plastes et des mitochondries. De la même manière, les *MtMSL*2.1 à 6 pourraient avoir un rôle dans la perception des contraintes mécaniques au niveau des membranes plasmiques. Ces derniers semblent donc de meilleurs candidats à analyser dans le cadre d'une étude du rôle des *MSL* dans les poils racinaires, lors des étapes précoces de la symbiose avec les rhizobia.

# Chapitre III.

## Les *MtMSL* de la classe II: quelques généralités sur leur expression

Comme les MSL n'ont pour l'instant jamais été décrits chez la plante modèle *M. truncatula*, il peut être d'abord intéressant d'étudier leurs profils d'expression général pour émettre des hypothèses sur leurs fonctions. Une façon de faire est de mesurer, dans différents organes chez des plantes soumises à différentes conditions, la quantité d'ARNm codant pour ces protéines. En effet, la synthèse de protéines peut être directement proportionnelle à la quantité d'ARNm initiaux. L'accumulation, ou la diminution, du nombre de transcrits peut donc refléter la nécessité, ou non, de la présence d'une protéine dans certaines conditions. Au cours de ce chapitre, des études allant dans ce sens sont présentées afin d'avoir une vue d'ensemble du profil d'expression des *MtMSL* de la classe II.

### III.1. Analyses *in silico* de données transcriptomiques: vers une première vue d'ensemble de l'expression des *MtMSL*

Les progrès techniques permettent maintenant d'avoir accès aux niveaux d'expression de presque tous les gènes exprimés dans une condition donnée. L'ensemble de ces transcrits présents dans une de ces conditions est appelé le transcriptome. Plusieurs méthodes permettent d'y avoir accès. Le RNAseq en est une. Elle permet de séquencer\* la totalité des ARN d'un échantillon donné. Ainsi, le nombre de fois où les ARNm d'un gène seront séquencé

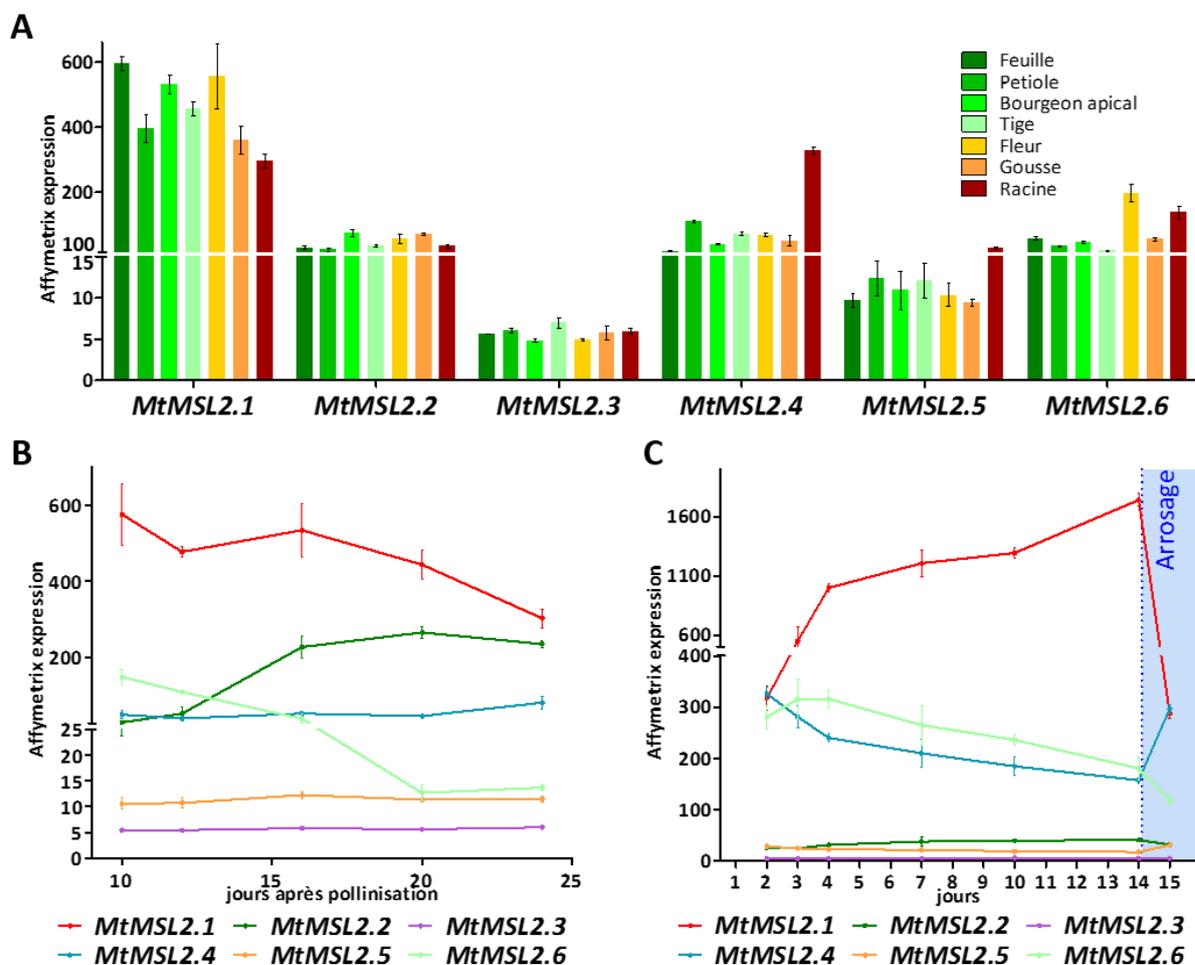
---

\* c.à.d. lire la séquence de nucléotides composant l'ADN

sera en théorie proportionnel au nombre de fois où ceux-ci auront été synthétisés lors de la transcription. Les puces à ARN représentent une autre technologie permettant d'obtenir le transcriptome d'un échantillon biologique à un instant t. Elle repose sur l'utilisation de sondes spécifiques de chaque gène. A la différence du RNAseq, cette technique demande donc en prérequis de connaître les différents gènes existant dans l'organisme testé. De plus, l'efficacité de détection des transcrits est dépendante de la nature des sondes utilisées. Il est donc difficile de comparer l'expression de deux gènes différents avec cette méthode. Cependant, il est tout à fait possible d'utiliser une même sonde pour comparer l'expression d'un gène dans deux échantillons obtenus de manière équivalente.

Les publications et les bases de données partagées collectant les résultats de ces analyses sont maintenant de plus en plus fournies. Afin d'avoir une première idée du profil d'expression des *MtMSL* candidats, quelques une de ces analyses sont ici présentées.

De manière générale, les *MtMSL* sont exprimés dans tous les types d'organes (Fig. 20A). On peut cependant noter que *MtMSL2.4* semble plutôt être exprimé préférentiellement dans les racines que les parties aériennes. Il en est de même pour *MtMSL2.5* dans une moindre mesure. *MtMSL2.6* aurait quant à lui un probable enrichissement de son expression au niveau des fleurs, des racines et des gousses par ordre décroissant. Concernant le développement des fruits après pollinisation, on constate de manière intéressante que les différents *MtMSL* ont des profils d'expression parfois opposés (Fig. 20B). Par exemple, *MtMSL2.1* et *MtMSL 2.6* semblent avoir une expression diminuant au cours de la période de développement du fruit, tandis que *MtMSL2.2* semble présenter une légère augmentation de sa transcription. *MtMSL2.4* présente quant à lui une expression plutôt stable au cours du temps. Il est possible que ces différents candidats aient des propriétés variées, notamment des seuils d'activation différents en réponse à une augmentation de la tension de membrane, ou bien une sélectivité



**Figure 20. Etudes *in silico* de l'expression des *MtMSL* dans différents organes et lors d'un stress hydrique**

**A.** Profil d'expression des *MtMSL* dans différents organes (Benedito *et al.*, 2008). **B.** Profil d'expression des *MtMSL* dans des gousses en développement différents jours après pollinisation (Benedito *et al.*, 2008). **C.** Profil d'expression des *MtMSL* dans la racine à différents temps en condition de sécheresse, et un jour après réhydratation de la racine suivant 14 jours de sécheresse (Zhang *et al.*, non publié - données disponibles dans la base de donnée MtGEA, Benedito *et al.*, 2008). Les profils d'expression sont issus de données de transcriptomique obtenues grâce à des puces à ARN spécifiques (Affymetrix Medicago Gene Chip<sup>®</sup>). Les références des sondes analysées sont précisées dans les matériels et méthodes. Les résultats présentés sont sous la forme de moyenne  $\pm$  écart-type de  $n=3$  échantillons.

variable. Ainsi ces *MtMSL* pourraient donc, selon leurs propriétés, être utiles à différents stades de développement du fruit. On pourrait faire la même remarque pour le développement des racines en conditions de sécheresse (Fig. 20C). Curieusement, alors que *MtMSL2.1* et *MtMSL2.6* ont des évolutions parallèles lors du développement des fruits, ils ont cependant des évolutions asymétriques dans les racines soumises à la sécheresse. En effet, dans ce cas *MtMSL2.1* semble avoir une expression favorisée par un temps d'exposition prolongé des racines à la sécheresse. A l'inverse, *MtMSL2.3*, *2.4* et *2.6* semblent plutôt être réprimés par de telles conditions. Ces tendances s'inversent drastiquement après la

réhydratation des racines pour *MtMSL2.1* et *2.4*. Cette réhydratation doit provoquer un choc hypoosmotique sur les racines. Ainsi, cet organe augmente peut-être l'expression de *MtMSL2.1* en prévision d'une prochaine réhydratation, afin de pouvoir résister à ce choc. Ce candidat doit donc avoir des propriétés similaires au *EcMscS*.

L'ensemble de ces données, bien qu'informatives, ne permet pas de savoir dans quels tissus sont spécifiquement exprimés les *MtMSL*. Aussi, une autre technique sera utilisée pour révéler cette expression.

### **III.2. La fusion transcriptionnelle: vers une analyse tissulaire de l'expression des *MtMSL***

Une autre façon de déterminer la localisation de la transcription d'un gène est de révéler indirectement l'activité transcriptionnelle de son promoteur. Pour cela, il est possible de créer une fusion transcriptionnelle, où le promoteur du gène d'intérêt régulera la transcription d'un ARNm codant pour une protéine marqueur, comme la  $\beta$ -glucuronidase. Cette enzyme est capable de catalyser l'hydrolyse de différents composés à base d'acide glucuronique. L'un d'eux, le X-gluc, produit un composé bleu une fois hydrolysé. Lors d'une coloration histochimique dite GUS, cette coloration révélera donc la présence de cette enzyme. On admet alors que la quantité formée de  $\beta$ -glucuronidase est proportionnelle, jusqu'à saturation du signal, à la quantité synthétisée d'ARNm qui la code. L'intensité de la coloration bleue est donc indirectement proportionnelle à l'activité du promoteur qui dirige la transcription du gène codant pour cette enzyme (ou gène GUS).

#### **III.2.1. Localisation de l'expression de certains *MtMSL* dans les tissus racinaires**

Dans le cadre de ce travail de recherche, les promoteurs des gènes *MtMSL2.3*, *2.4* et *2.5* (respectivement *pMtMSL2.3*, *2.4* et *2.5*) ont été utilisés pour créer plusieurs fusions transcriptionnelles avec le gène GUS. Le choix de ces promoteurs s'est fait au début de ce

travail, au moment où nous n'avions pas encore autant d'informations sur l'expression des *MtMSL* dans les poils racinaires. Cependant, cette sélection permet de comparer les profils d'expression de candidats exprimés ou non dans les poils racinaires. Ces constructions ont été utilisées pour modifier génétiquement des racines de *M. truncatula*. Les racines ont ensuite subi une coloration histochimique GUS. Le premier constat que l'on peut faire est que, quelques soient les conditions, les racines colorées n'ont pas toutes le même profil de coloration, que ce soit sur le plan de la localisation, ou de l'intensité de coloration. Ces différences peuvent être liées à la position de l'insertion dans le génome. En effet, les modifications locales de la structure de l'ADN peuvent influencer l'expression des gènes se trouvant dans ces régions, en rendant par exemple leurs promoteurs plus ou moins accessibles aux facteurs de transcription. Afin d'avoir une idée de la localisation majoritaire de l'activité de ces promoteurs, nous avons donc considéré la coloration de chaque tissu, indépendamment de la coloration du reste des tissus racinaires.

En vue longitudinale, les racines transformées avec la construction *pMtMSL2.3:GUS* présentent une coloration extrêmement faible, voire inexistante, essentiellement localisée dans le cylindre central (se référer à l'annexe 3 pour resituer l'histologie de la racine de *M. truncatula*) (Fig. 21F et Tab. 2). Les coupes transversales de ces racines ont révélé que cette coloration semble localisée à la pointe des pôles de xylème, mais également dans le parenchyme médullaire (Fig. 21N et Tab. 3). A l'inverse, les racines transformées avec la construction *pMtMSL2.4:GUS* ont une coloration nettement marquée à la pointe racinaire, dans le cylindre central et au point d'émergence des racines latérales (Fig. 21C, G, K et Tab. 2). Au niveau des tissus vasculaires, cette coloration est essentiellement concentrée au niveau de l'endoderme et à la pointe des pôles de xylème (Fig. 21O et Tab. 3). Ce profil de coloration est le même pour les racines transformées avec la construction *pMtMSL2.5:GUS* observées en vue longitudinale (Fig. 21D, H, L et Tab. 2). La vue en coupe transversale permet également de

voir une coloration dans l'endoderme, mais la coloration à la pointe des pôles de xylème est moins claire (Fig. 21P et Tab. 3).

Ces analyses révèlent donc que le promoteur de *MtMSL2.3* est très faiblement actif dans des tissus qui semblent correspondre aux pointes des pôles de xylème ou au parenchyme médullaire. Cette faible activité semble cohérente à ce qui a été observé dans la figure 20. A l'inverse, le promoteur de *MtMSL2.4* est fortement actif au niveau de l'endoderme et à la pointe des pôles de xylème. Il présente aussi une forte activité à la pointe des racines, et ce dès les étapes précoces de leur développement. Le même profil peut être observé pour *pMtMSL2.5*, avec une moindre spécificité de localisation au niveau de l'endoderme ou des pôles de xylème. Cependant, quel que soit le promoteur étudié, aucune activité au sein des poils racinaires n'a pu être révélée par cette technique.

**Tableau 2. Bilan des profils d'expression de *MtMSL2.3*, *2.4* et *2.5*, révélés par coloration histochemique GUS: observation en vue latérale de racines transformées**

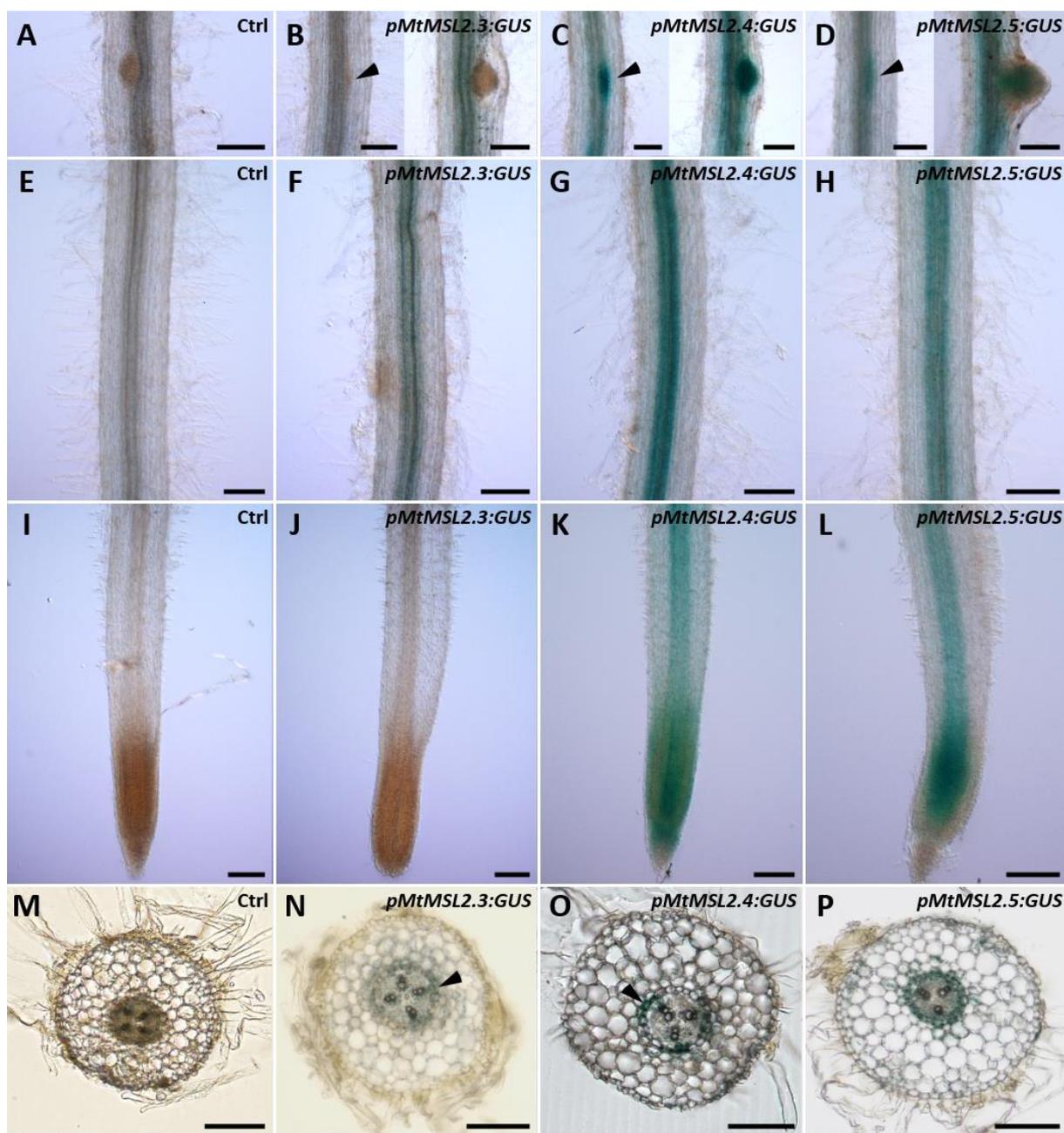
		Proportion de racines avec la région précisée colorée				
		Poils	PR	CC	Rh./par	R. lat
Vecteur vide	0	0%	0%	0%	0%	0%
<i>pMtMSL2.3:GUS</i>	8	0%	0%	100%	0%	13%
<i>pMtMSL2.4:GUS</i>	13	0%	85%	100%	23%	85%
<i>pMtMSL2.5:GUS</i>	13	0%	69%	100%	31%	69%

a. Une racine a été prélevée de chaque chimères produites par hairy-root. 26 à 28 racines ont été analysées; PR: pointe racinaire; CC: cylindre central; Rh./Par: rhizoderme ou parenchyme cortical (non différenciables en vue latérale); R. lat.: racines latérales.

**Tableau 3. Bilan des profils d'expression de *MtMSL2.3*, *2.4* et *2.5*, révélés par coloration histochemique GUS: observation en coupe transversale de racines transformées**

		Proportion de racines avec le tissu précisé coloré										
		PC		Endoderme			Péricycle					
		ext	int <sup>b</sup>	P. Xy.	P. Ph.	Tot. <sup>c</sup>	P. Xy.	P. Ph.	Tot. <sup>d</sup>			
Vecteur vide	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
<i>pMtMSL2.3:GUS<sup>e</sup></i>	0%	0%	0%	25%	0%	25%	25%	0%	0%	0%	0%	25%
<i>pMtMSL2.4:GUS</i>	0%	0%	43%	71%	14%	100%	0%	29%	29%	0%	0%	0%
<i>pMtMSL2.5:GUS</i>	0%	0%	25%	50%	0%	50%	25%	0%	25%	0%	0%	25%

a. Une racine a été prélevée à partir de chaque chimère produite par hairy-root. 3, 4, 7 et 4 racines ont été analysées respectivement. Pour les constructions comportant les promoteurs *pMtMSL2.3*, *2.4* ou *2.5*, seules les racines colorées ont été analysées. Pour le vecteur vide, les racines ont été sectionnées de manière aléatoire; **b.** La partie interne du parenchyme cortical est définie ici comme une couche, de une à deux cellules d'épaisseur, entourant l'endoderme; **c.** Inclue toutes les coupes présentant une coloration homogène ou non sur le pourtour de l'endoderme; **d.** Inclue toute les racines présentant une coloration homogène ou non sur le pourtour du péricycle; **e.** En vue latérale, la coloration générée par la construction *pMtMSL2.3:GUS* étant faible, celle-ci est devenue non visible dans la plupart des coupes transversales testées. Rh.: rhizoderme; PC: parenchyme cortical; P. Xy.: pôle de xylème; P. Ph.: pôle de phloème; Xy.: xylème; Ph.: Phloème; PM: parenchyme médullaire. L'annexe 3 présente l'organisation dans l'espace de ces différents tissus.



**Figure 21. Profils d'expression de *MtMSL2.3*, *2.4* et *2.5*, révélés par coloration histochimique GUS dans les racines**

Des racines de *Medicago* ont été transformées de manière transitoire avec le plasmide vide *pkGWFS7* (A, E, I et M – témoin négatif) ou les fusions transcriptionnelles *pMtMSL2.3:GUS:GFP* (B, F, J et N), *pMtMSL2.4:GUS:GFP* (C, G, K et O) ou *pMtMSL2.5:GUS:GFP* (D, H, L et P). L'activité des promoteurs a indirectement été révélée par une coloration histochimique GUS. Les profils de coloration obtenus ont été observés dans les racines au niveau de pointes racinaires (I-L) ou de zones matures (E-H). Le développement des racines secondaires a également été suivi au stade de quelques divisions cellulaires (A-D, panneaux de gauche) ou au stade de l'émergence d'une jeune racine secondaire (A-D, panneaux de droite). Les flèches indiquent la zone de division cellulaire. Des coupes transversales de 60 à 70  $\mu\text{m}$  d'épaisseur ont enfin été faites dans les zones matures de racines matures, puis observées (M-P). Les flèches indiquent l'intensité de coloration GUS accrue au niveau des pôles de Xylème. Les acquisitions ont été faites à l'aide d'un microscope à éclairage diascopique associé à un dispositif de contraste interférentiel (DIC) (A-L) ou d'un microscope à éclairage diascopique (M-P). Plusieurs plans focaux ont été acquis pour reconstituer une image unique nette grâce à l'outil "Extended Depth of Focus" du logiciel d'acquisition NIS-Elements D. Echelles: 100  $\mu\text{m}$ . Les images présentées sont représentatives des données présentées dans les tableaux 2 et 3.

### III.2.2. Localisation de l'expression de certains *MtMSL* dans les nodules

Pour avoir une vue un peu plus exhaustive du profil d'expression de ces *MtMSL* en contexte symbiotique, des racines modifiées ont été inoculées avec les bactéries *S. meliloti*. Une coloration GUS a ensuite été faite sur des nodules récoltés au bout de 21 jours de culture. Aucune coloration n'a pu être détectée pour les nodules de racines transformées avec *pMtMSL2.3:GUS* (Fig. 22B, F et Tab. 4). Pour *pMtMSL2.4:GUS*, on observe une coloration à la pointe du nodule, et dans une faible mesure dans leurs tissus vasculaires (Fig. 22C, G et Tab. 4). Enfin, pour les racines modifiées avec *pMtMSL2.5:GUS*, une coloration est également présente dans la pointe des nodules, et dans leurs tissus vasculaires (Fig. 22D, H et Tab. 4). Ces profils de coloration révèlent une redondance de localisation de l'activité des promoteurs *pMtMSL2.4* et *2.5* dans les nodules, à savoir dans leurs tissus vasculaires et leur pointe.

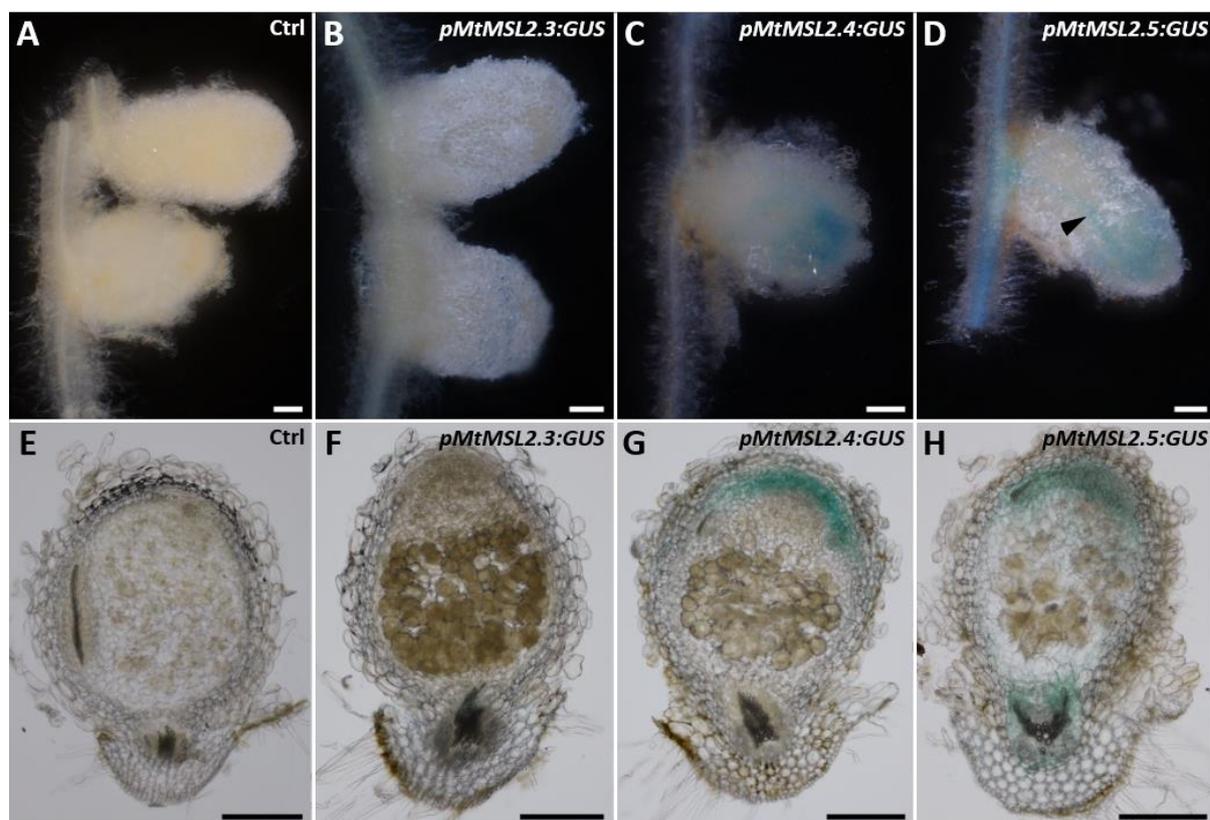
### III.3. Conclusion et discussion

On retrouve l'expression de *MtMSL* dans tous les organes de la plante avec différents niveaux d'intensité. Les analyses transcriptomiques et/ou histologiques au niveau des racines ont révélé que *MtMSL2.1*, *2.2*, *2.4*, *2.5* et *2.6* sont les plus exprimés dans cet organe. Des études plus poussées montrent également que *pMtMSL2.4* et *2.5* sont actifs à la pointe des racines et des nodules. Ils le sont également dans les tissus vasculaires des nodules et dans l'endoderme et/ou le péricycle des racines, à la pointe des pôles de xylème. Ces candidats doivent donc avoir des fonctions générales qu'ils assurent à la fois dans les racines et les nodules. En effet, on trouve à la pointe de ces deux organes les méristèmes qui sont chargés de diriger leur croissance en longueur. Ces deux *MtMSL* pourraient donc avoir un rôle général dans le développement de ces organes. En ce qui concerne la localisation dans l'endoderme et/ou à la pointe des xylèmes, on peut faire le lien entre ces sites et le mécanisme d'émergence des racines latérales. En effet, celles-ci émergent toujours à la pointe des

**Tableau 4. Synthèse des profils d'expression de *MtMSL2.3*, *2.4* et *2.5*, révélés par coloration histo-chimique GUS: observation de nodules en vue latérale et en coupe**

	Vue latérale		Coupe transversale				
			Proportion de nodules avec le tissu précisé coloré				
			ZM	ZD/ZI	ZF	TV	
Vecteur vide	14	0	6	0%	0%	0%	0%
<i>pMtMSL2.3:GUS</i>	6	0	4	0%	0%	0%	25%
<i>pMtMSL2.4:GUS</i>	10	4	4	75%	0%	0%	50%
<i>pMtMSL2.5:GUS</i>	12	6	5	80%	0%	0%	60%

**a.** Les nodules ont été obtenus 21 j après inoculation des racines avec la souche de *S. meliloti* Sm1021. Une racine a été prélevée à partir de chaque chimère produite par hairy-root; **b.** Les nodules apparaissant incolores en vue latérale ont été choisis de manière aléatoire pour effectuer des coupes transversales; ZM: zone méristématique; ZD/ZI: zone de différenciation/zone d'infection; ZF: zone de fixation; TV: tissus vasculaires.



**Figure 22. Profils d'expression de *MtMSL2.3*, *2.4* et *2.5*, révélés par coloration histo-chimique GUS, dans les nodules**

Des racines de *Medicago* ont été transformées de manière transitoire avec le plasmide vide *pkGWFS7* (A et E – témoin négatif) ou les fusions transcriptionnelles *pMtMSL2.3:GUS:GFP* (B et F), *pMtMSL2.4:GUS:GFP* (C et G) ou *pMtMSL2.5:GUS:GFP* (D et H). L'activité des promoteurs a indirectement été révélée par une coloration histo-chimique GUS sur des nodules. Ceux-ci ont été obtenus 21 jours après inoculation des racines avec la souche de *S. meliloti* Sm1021. Les profils de coloration ont été observés en vue latérale (A-D) ou en coupes de 60 à 70  $\mu\text{m}$  d'épaisseur (E-H). Les coupes ont été faites sur des tissus déjà colorés. D. La flèche montre la coloration au niveau des tissus vasculaires vus en transparence. Les acquisitions ont été faites à l'aide d'un macroscopie à éclairage épiscopique (A-D) ou d'un microscope à éclairage diascopique (E-H). Plusieurs plans focaux ont été acquis pour reconstituer une image unique nette grâce à l'outil "Extended Depth of Focus" du logiciel d'acquisition NIS-Elements D. Echelles: 200  $\mu\text{m}$ . Les images présentées sont représentatives des données présentées dans le tableau 4.

vaisseaux de xylème, entre l'endoderme et le péricycle. Il a été proposé que ce serait le relâchement des contraintes mécaniques, exercées par l'endoderme sur le péricycle, qui induirait des divisions cellulaires dans ce dernier, entraînant ainsi le développement des racines latérales (Marhavý *et al.*, 2016). On peut donc penser que les *MtMSL* pourraient également avoir un rôle dans la perception de ces relâchements pour réguler l'émergence des racines latérales.

Concernant les poils racinaires, les colorations histochimiques GUS n'ont pas permis de mettre en évidence l'expression de *MtMSL2.3*, *2.4* ou *2.5* dans ces cellules. Une condition de culture non adéquate pour induire l'expression de ces candidats pourrait être une explication de l'obtention de ce type de résultats. Un autre point faible pourrait aussi résider dans l'identification complète du promoteur utilisé pour ces fusions transcriptionnelles. En effet, il est pour l'instant impossible de prédire avec précision le promoteur total d'un gène donné. Il est donc possible que les régions sélectionnées en amont du site d'initiation de la transcription ne contiennent pas l'intégralité du promoteur. Afin de confirmer d'une autre manière ce résultat, des études quantifiant directement les transcrits endogènes de ces trois gènes ont été réalisées sur des échantillons de poils racinaires. Ces études permettront également de savoir si certains des candidats, non testés lors de l'analyse par fusion transcriptionnelle, sont présents dans ces cellules.

## Chapitre IV.

# Les *MtMSL*: s'expriment-ils dans les poils racinaires lors des étapes précoces de la symbiose et sont-ils localisés à la membrane plasmique?

Pour continuer de faire le tri parmi les potentiels candidats pouvant avoir un rôle dans les poils racinaires lors des étapes précoces de la symbiose, deux critères peuvent être utilisés. Le premier est leur localisation dans le tissu d'intérêt, à savoir le poil racinaire. Le deuxième est leur localisation dans la membrane d'intérêt, à savoir la membrane plasmique. Afin de chercher les candidats répondant au premier critère, des approches analysant la transcription de ces gènes dans les poils racinaires, en présence ou non de NFs, ont été mises en place. Pour le deuxième critère, des racines génétiquement modifiées ont été produites pour synthétiser des protéines chimères, composées des *MtMSL* d'intérêt et de la protéine fluorescente GFP. En utilisant des techniques de microscopie, on peut ainsi suivre la fluorescence de cette GFP et en déduire la localisation subcellulaire de ces canaux putatifs.

### IV.1. Les *MtMSL* s'expriment-ils dans les poils racinaires lors des étapes précoces de la symbiose?

Les équipes de Hervé Sentenac au BPMP de Montpellier, et de Nicolas Pauly et Alain Puppo à l'ISA de Nice, ont réalisé un RNAseq sur des échantillons de poils racinaires de *M. truncatula* traités ou non avec des NFs. Ils ont ensuite traité les données découlant de ce

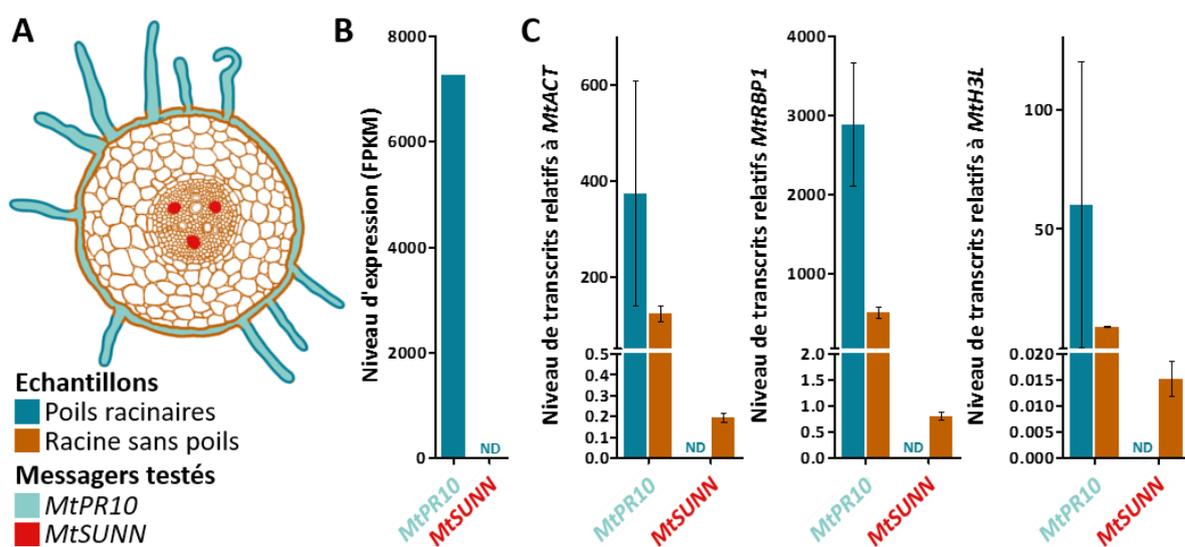
RNAseq (Damiani *et al.*, 2016 (cf. Article 1)). L'objectif général de cette collaboration, à laquelle nous avons participé en terme d'analyse des données concernant les canaux mécanosensibles, était d'avoir une vue d'ensemble des canaux, pompes, transporteurs et des systèmes de régulation redox présents dans les poils racinaires lors des étapes précoces de la symbiose. Les données présentées dans ce chapitre sont issues d'une part de cette publication et d'autre part, des analyses des transcrits de poils racinaires qui ont été obtenues dans le cadre de cette thèse de manière indépendante par PCR quantitative\* (qPCR). Ces études sont encore une fois ciblées sur les *MtMSLs* de la classe II.

### IV.1.1. Quantifications des ARNm des *MtMSL* dans les poils racinaires

Dans un premier temps, afin de confirmer que les échantillons de poils racinaires ne soient pas contaminés par d'autres tissus racinaires, les transcrits des gènes *MtPR10* et *MtSUNN* ont été étudiés. Il a été montré que *MtPR10* est spécifiquement exprimé dans le rhizoderme, et par extension dans les poils racinaires (Fig. 23A) (Ramos et Bisseling, 2003). A l'inverse, *MtSUNN* est exprimé dans les tissus phloémiens (Fig. R23A) (Schnabel *et al.*, 2012). Dans les échantillons de poils racinaires, on s'attend donc à détecter l'ARNm de *MtPR10* uniquement. A l'inverse, les transcrits de *MtSUNN* ne seront observés que dans les échantillons de racines dépourvues de poils. D'après les résultats obtenus par RNAseq et par qPCR, on s'aperçoit qu'on a pu détecter des transcrits de *MtPR10* dans les échantillons de poils racinaires, mais pas ceux de *MtSUNN* (Fig. 23B et C). Ces échantillons ne sont donc pas contaminés par d'autres tissus racinaires. Comme on s'y attendait également, on observe la présence de *MtSUNN* dans les échantillons de racines sans poils (Fig. 23C). Cela montre donc

---

\* La PCR (Polymerase Chain Reaction) permet de synthétiser en grande quantité un fragment d'ADN identique à une région ciblée d'une matrice initiale, généralement constituée d'ADN. Cette région de matrice est ciblée grâce à un couple d'amorces venant entourer la zone à amplifier. Cette amplification permet ainsi de détecter plus facilement ce fragment d'intérêt, en utilisant par exemple des agents chimiques intercalant aux propriétés fluorescentes pour révéler l'ADN formé. On peut également noter qu'avant la saturation du signal, la fluorescence observée au bout d'un certain nombre de cycles d'amplification sera proportionnelle au nombre d'ADN matrice présent à la base, avec un facteur de  $2^n$  (n représentant le nombre de cycles d'amplification).

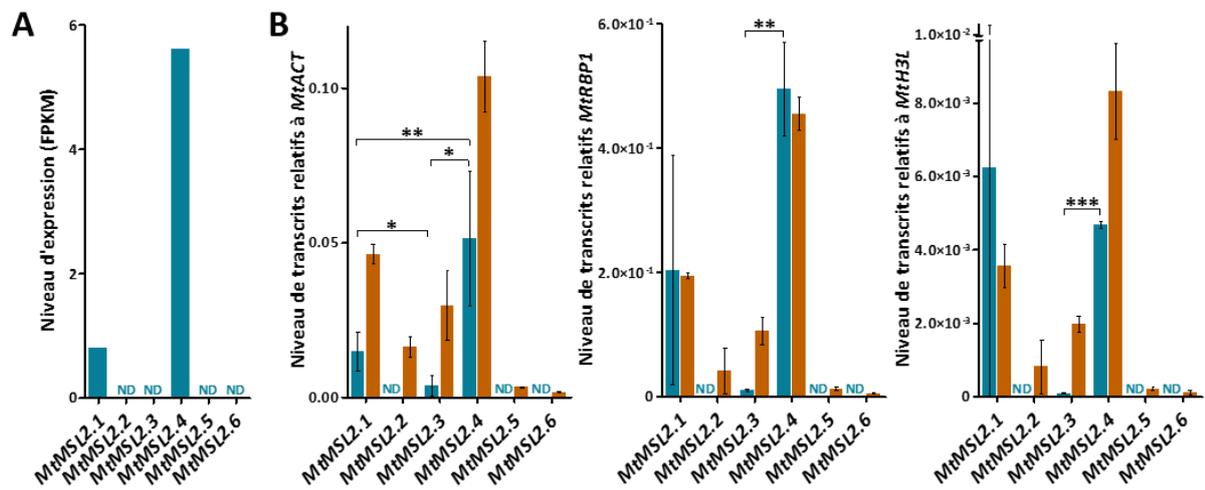


**Figure 23. Contrôle de la contamination des échantillons de poils racinaire par d'autres tissus**

**A.** Dessin représentant une coupe transversale de racine de *Medicago*. La coloration des contours cellulaires indique les différents tissus prélevés dans les échantillons de poils racinaires ou de racines dépourvues de poils. La coloration interne indique les tissus où sont exprimés les différents gènes utilisés comme contrôle en B et en C. **B.** Analyse par RNAseq de l'expression de *MtPR10* et *MtSUNN* dans les poils racinaires (Damiani *et al.*, 2016). Les résultats sont exprimés en FPKM (Fragments Per Kilobase Of Exon Per Million Fragments Mapped). **C.** Analyse par qPCR de l'expression des gènes *MtPR10* (spécifique du rhizoderme et de ses poils racinaires) et *MtSUNN* (spécifique du cylindre centrale) dans des échantillons de poils racinaires (bleu) et de racines dépourvues de poils racinaires (marron). Les résultats sont normalisés par rapport à l'expression des gènes constitutifs *MtACT*, *MtRBP1* ou *MtH3L* et sont présentés sous forme de moyennes  $\pm$  écart-type de  $n=3$  échantillons indépendants. ND : non détecté.

que le couple d'amorces utilisé est bien capable de détecter la présence de ces transcrits. On peut également noter que les transcrits de *MtPR10* sont détectables dans ces échantillons. Cela est dû au fait que la partie basale du rhizoderme est toujours présente dans les échantillons de racines sans poils. De plus, la technique d'extraction utilisée ne permet pas de collecter les poils racinaires de manière exhaustive (Sauviac *et al.*, 2005).

Dans un second temps, la présence des transcrits des *MtMSL* de la classe II dans les poils racinaires a été analysée. D'après les analyses par RNAseq, seuls *MtMSL2.1* et *2.4* sont détectés dans ces cellules, *MtMSL2.4* étant majoritairement représenté (Fig. 24A). Ces résultats sont confirmés par qPCR quand les niveaux de transcription des *MtMSL* sont normalisés par le niveau de transcription des gènes *MtACT* ou *MtRBP1* (Fig. 24B). On observe aussi cette tendance pour les niveaux normalisés par l'expression de *MtH3L*, mais dans une moindre mesure. Etant donné que les mêmes types d'observations sont constatés dans trois



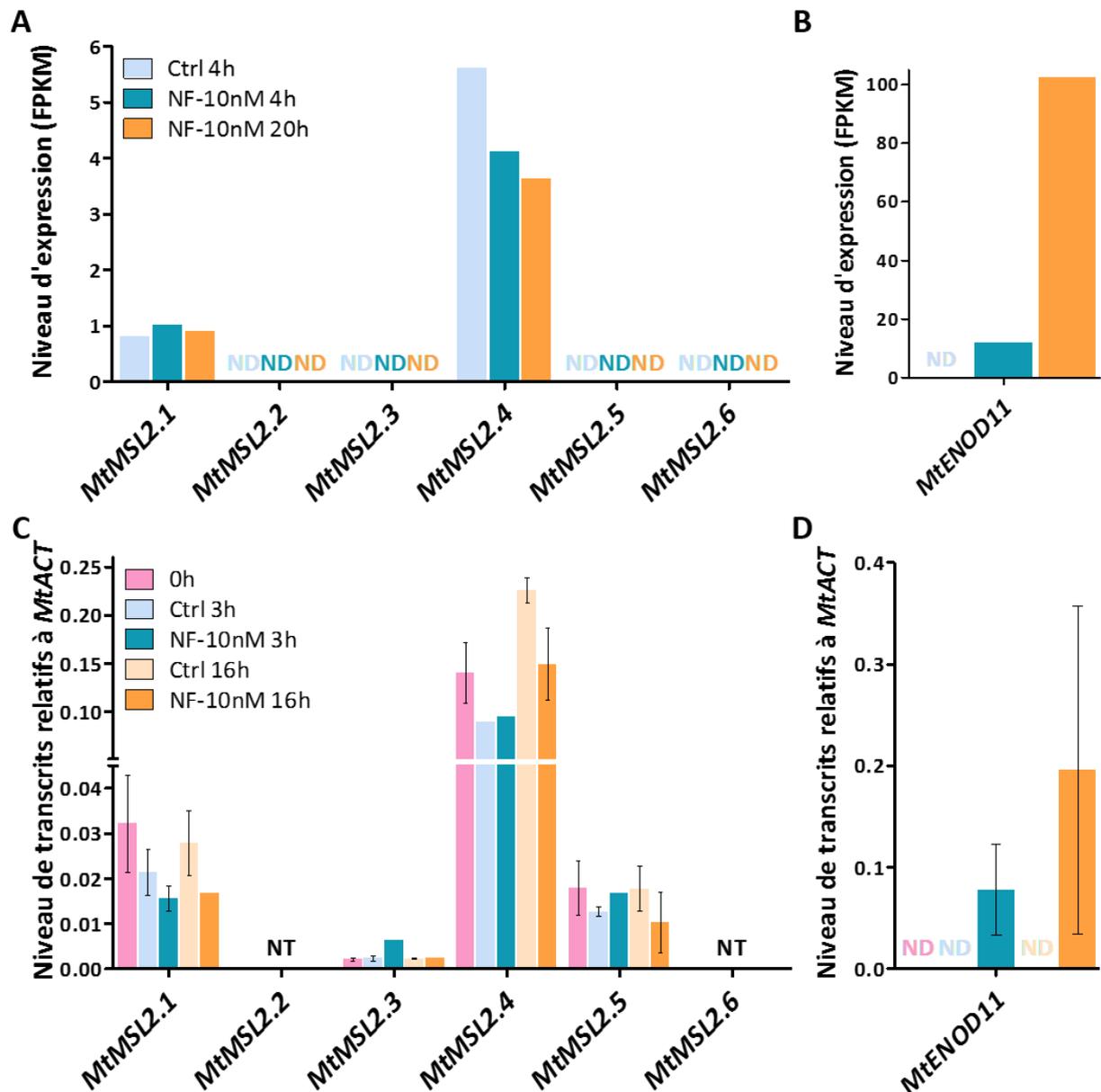
**Figure 24. Expression des *MtMSL* dans les poils racinaires**

**A.** Analyse par RNAseq de l'expression des *MtMSL* dans les poils racinaires (Damiani *et al.*, 2016). Seule la condition contrôle de cette publication est ici présentée. Les résultats sont exprimés en FPKM (Fragments Per Kilobase Of Exon Per Million Fragments Mapped). **B.** Analyse par qPCR de l'expression des *MtMSL* dans des échantillons de poils racinaires (bleu) et de racines dépourvues de poils racinaires (marron). Les résultats sont normalisés par rapport à l'expression des gènes constitutifs *MtACT*, *MtRBP1* ou *MtH3L* et sont présentés sous forme de moyennes  $\pm$  écart-type de n=2 à 3 échantillons indépendants. Un test-t non apparié, représentés par des astérisques, a été réalisé pour comparer l'expression des gènes dans les échantillons de poils (\* 0.01<p<0.05; \*\* 0.001<p<0.01 ; \*\*\* p<0.001). ND : non détecté.

cas sur quatre, il est probable que *MtH3L* ne soit pas le meilleur gène de référence à utiliser dans ces conditions. D'après les analyses par qPCR, on peut également constater une faible expression de *MtMSL2.3* dans les échantillons de poils racinaires. Cette différence de résultats avec l'analyse RNAseq peut être liée à la limite du niveau de détection utilisée dans cette dernière pour considérer un gène comme étant transcrit ou non. Enfin, l'analyse de l'expression des *MtMSL* dans les racines dépourvues de poils nous montre que tous les candidats de la classe II sont exprimés dans cet organe, mais que deux le sont très faiblement : *MtMSL2.5* et *MtMSL2.6* (Fig. 24B). De plus, quel que soit le gène, cette expression semble toujours supérieure à celle observée dans les échantillons de poils racinaires. Ainsi le fait de concentrer un type cellulaire spécifique n'a pas permis l'enrichissement supérieur en transcrits de *MtMSL* par rapport aux autres tissus racinaires.

Ces analyses transcriptionnelles nous montrent donc que tous les *MtMSL* de la classe II sont exprimés dans les racines, notamment *MtMSL2.1* à 2.4. Cependant, seuls *MtMSL2.1* et 2.4 le sont dans les poils racinaires. Nous avons vu précédemment que la simple application

de NFs sur les racines de Légumineuses induisait différents types de réponses dans les poils racinaires. Ces réponses incluent également la modulation de l'expression de certains gènes. Nous allons donc maintenant voir si cela peut s'appliquer aux *MtMSL*.



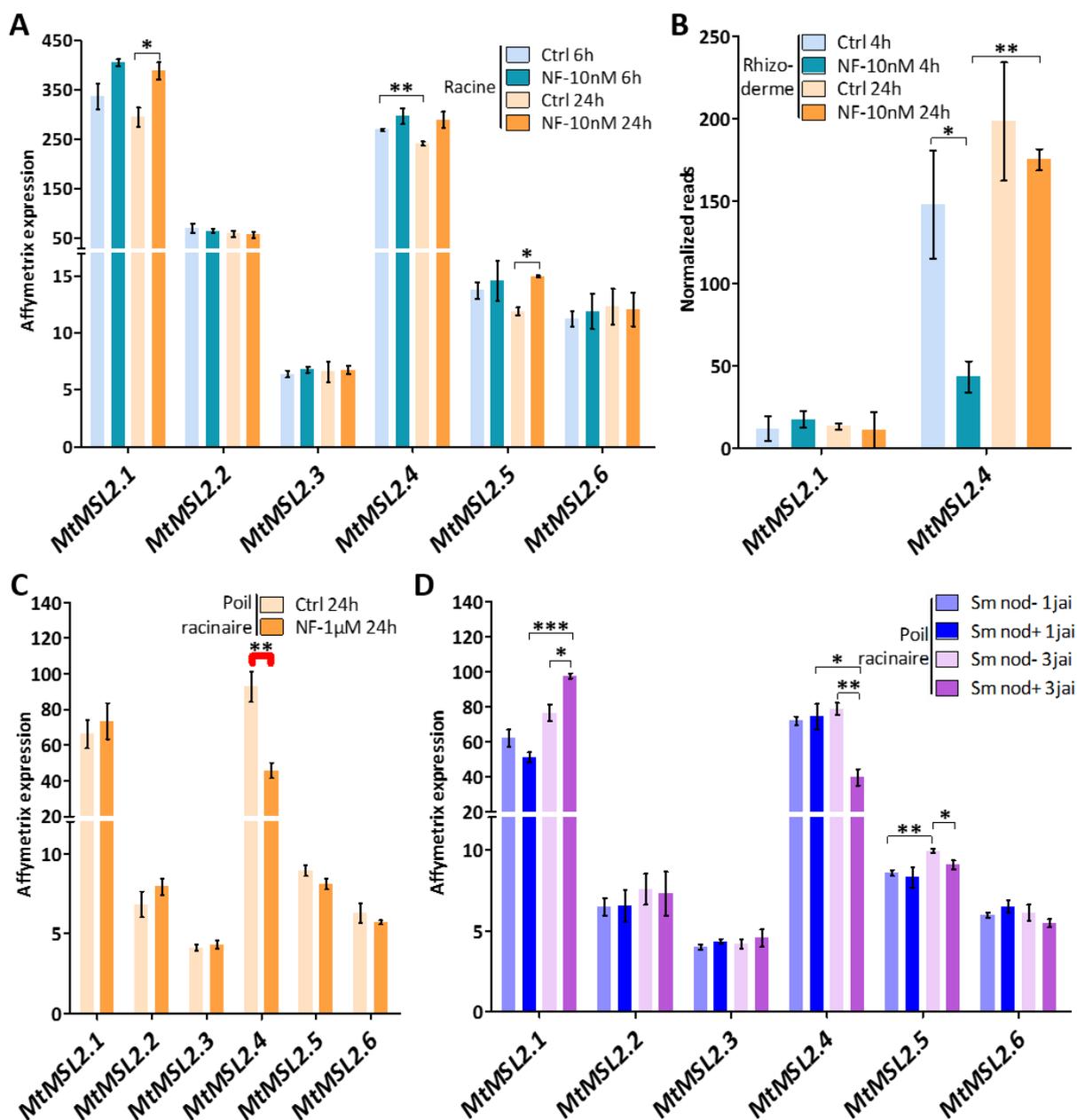
**Figure 25. Expression des *MtMSL* et de *MtENOD11* dans les poils racinaires en réponse au NF**

**A-B.** Analyse par RNAseq de l'expression dans les poils racinaires des *MtMSL* (A) et du marqueur de la nodulation précoce *MtENOD11* (B) après un traitement des racines avec du NF à 10nM, ou son contrôle, pendant 4h et 20h (Damiani *et al.*, 2016). Les résultats sont exprimés en FPKM (Fragments Per Kilobase Of Exon Per Million Fragments Mapped). Damiani *et al.*, 2016 ont considéré comme étant différentiellement régulés par rapport au contrôle tous les gènes ayant une valeur-p ajustée <0,05. Ce n'est le cas ni pour *MtMSL2.1*, ni pour *MtMSL2.4*. **C-D.** Analyse par qPCR de l'expression dans les poils racinaires des *MtMSL* (C) et du marqueur de la nodulation précoce *MtENOD11* (D) après un traitement des racines avec du NF à 10nM, ou son contrôle, pendant 3h et 16h. Le temps 0h correspond à une analyse sur des poils racinaires issus de racines non traitées. Les résultats sont normalisés par rapport à l'expression du gène constitutif *MtACT* et sont présentés sous forme de moyennes  $\pm$  écart-type de n=1 à 2 échantillons indépendants. ND : non détecté. NT: non testé.

### IV.1.2. Influence des NFs sur la transcription des *MtMSL* dans les poils racinaires

Des racines de *M. truncatula* ont été traitées ou non avec des NFs à 10nM pour ensuite pouvoir suivre l'expression de différents gènes dans les poils racinaires après différents temps suivant le traitement. Le gène marqueur *MtENOD11* est connu pour avoir son expression induite dans les poils racinaires en réponse à un traitement aux NFs (Charron *et al.*, 2004). Que ce soit par une analyse RNAseq ou une analyse par qPCR, on s'aperçoit que dans nos conditions ce gène n'est pas exprimé dans les contrôles, mais l'est dans les cas des racines traitées aux NFs (Fig. 25B et D). Comme attendu, son niveau d'expression augmente donc avec le temps suivant un traitement aux NFs. Ce traitement fonctionne donc bien dans nos conditions. Concernant les *MtMSL*, comme observé précédemment, *MtMSL2.4* et *2.1* sont majoritairement exprimés dans les poils racinaires (Fig. 25A et C). En comparant les niveaux d'expression des *MtMSL* avec celui de *MtENOD11* dans les données de RNAseq, on s'aperçoit qu'ils sont globalement faiblement exprimés (Fig. 25A et B). D'après les résultats de RNAseq, bien que l'expression de *MtMSL2.4* semble diminuée 4 et 20h après un traitement aux NFs, les tests statistiques réalisés ne permettent pas de conclure que la différence est significative (Fig. 25A). Dans le cas de l'analyse qPCR, on observe aussi une tendance à la diminution de *MtMSL2.4* et *2.1*, notamment 16h après traitement, mais le peu d'échantillons testés ne permet pas de conclure à ce sujet (Fig. 25C).

Des données de transcriptomiques de racines traitées aux NFs étaient déjà disponibles au début de ce travail, (Czaja *et al.*, 2012). Cependant, aucune donnée n'était alors disponible en ce qui concerne les poils racinaires de racines traitées aux NFs. Depuis, plusieurs études ont été publiées dans ce sens, (Breakspear *et al.*, 2014; Jardinaud *et al.*, 2016). Les études RNAseq réalisées sur le rhizoderme montrent aussi une expression majoritaire des *MtMSL2.1* et *2.4* dans ce type cellulaire, avec une prédominance de *MtMSL2.4* (Fig. 26B). Dans le cas de la seconde étude, il semble aussi que *MtMSL2.1* et *2.4* y soient majoritairement exprimés (Fig.



**Figure 26. Etudes in silico de l'expression des *MtMSL* dans la racine, le rhizoderme et les poils racinaire en réponse au NF**

**A.** Expression des *MtMSL* dans les racines 6h et 24h après traitement avec du NF à 10nM (Czaja *et al.*, 2012). **B.** Expression de *MtMSL2.1* et *2.4* dans le rhizoderme 4h et 24h après traitement avec du NF à 10nM (Jardinaud *et al.*, 2016). *MtMSL2.2*, *2.3*, *2.5* et *2.6* ne sont pas représentés car très peu ou pas exprimés. **C.** Expression des *MtMSL* dans les poils racinaires 24h après traitement des racines avec du NF à 1µM (Breakspear *et al.*, 2014). **D.** Expression des *MtMSL* dans les poils racinaires 1 et 3 jours après inoculation des racines avec des *S. meliloti* sauvages (nod+) ou des *S. meliloti* ne produisant pas de NF (nod-) (Breakspear *et al.*, 2014). Les profils d'expression sont issus de données de transcriptomique obtenues grâce à des puces à ARN spécifiques (Affymetrix Medicago Gene Chip®) (A, C et D) ou par RNAseq (B). Dans le cas des puces à ARN, les références des sondes analysées sont précisées dans les matériels et méthodes. Les histogrammes présentent les moyennes  $\pm$  écart-type de n=3 répétitions. Czaja *et al.* (2012) ont considéré comme étant différentiellement régulés tous les gènes ayant un rapport d'expression  $|\text{trait./ctrl}| \geq 1,5$  et une valeur-p<0,05. Breakspear *et al.* (2014) et Jardinaud *et al.* (2016) ont considéré les seuils  $|\text{trait./ctrl}| \geq 2$  et p<0,05. Les couples gènes/traitements vs gènes/contrôle remplissant ces conditions sont mis en évidence par un crochet rouge. Un test-t non apparié, dont les résultats sont présentés par des astérisques, a été réalisé *de novo* (\* 0.01<p<0.05; \*\* 0.001<p<0.01; \*\*\* p<0.001).

26C et D). Cependant, comme ces dernières données ont été obtenues à l'aide de puces à ARN et que les plantes ont poussé sur un milieu contenant de l' aminoéthoxyvinylglycine (AVG), favorisant la formation de nodules en inhibant la synthèse d'éthylène, il est difficile de comparer entre eux les niveaux d'expression des différents gènes.

Concernant le transcriptome de racine, l'expression des *MtMSL* de la classe II n'est pas influencée par un traitement aux NFs d'après les tests réalisés par les auteurs (Fig. 26A). Il en est de même dans le rhizoderme de racines traitées aux NFs et dans les poils racinaires des racines inoculées par des *S. meliloti* qui produisent ou non des NFs (Fig. 26B et D). Cependant, dans des échantillons de poils racinaires, *MtMSL2.4* voit son expression diminuée dans le cas d'une racine traitée aux NFs (Fig. 26C). Les tests réalisés *de novo* semblent aller dans le même sens pour *MtMSL2.4* dans le cas du rhizoderme 4h après un traitement aux NFs, et dans le cas des poils racinaires 3 jours après inoculation par des *S. meliloti* produisant des NFs (Fig. 26B et C).

Pour conclure, si la répression de l'expression de *MtMSL2.4* à la suite d'un traitement NFs s'avère vraie, celle-ci sera certainement minime. Dans tous les cas, cinq séries d'expériences réalisées différemment et de manières indépendantes (que ce soit au niveau de la technique de récolte des échantillons, de la technique de détection ou de l'équipe de recherche) montrent que *MtMSL2.1* et *MtMSL2.4* sont exprimés dans les poils racinaires (Fig. 24, 25 et 26B-D). De plus, *MtMSL2.4* semble être la forme majoritairement exprimée.

### **IV.2. *MtMSL2.1* et *2.4* sont-ils adressés à la membrane plasmique?**

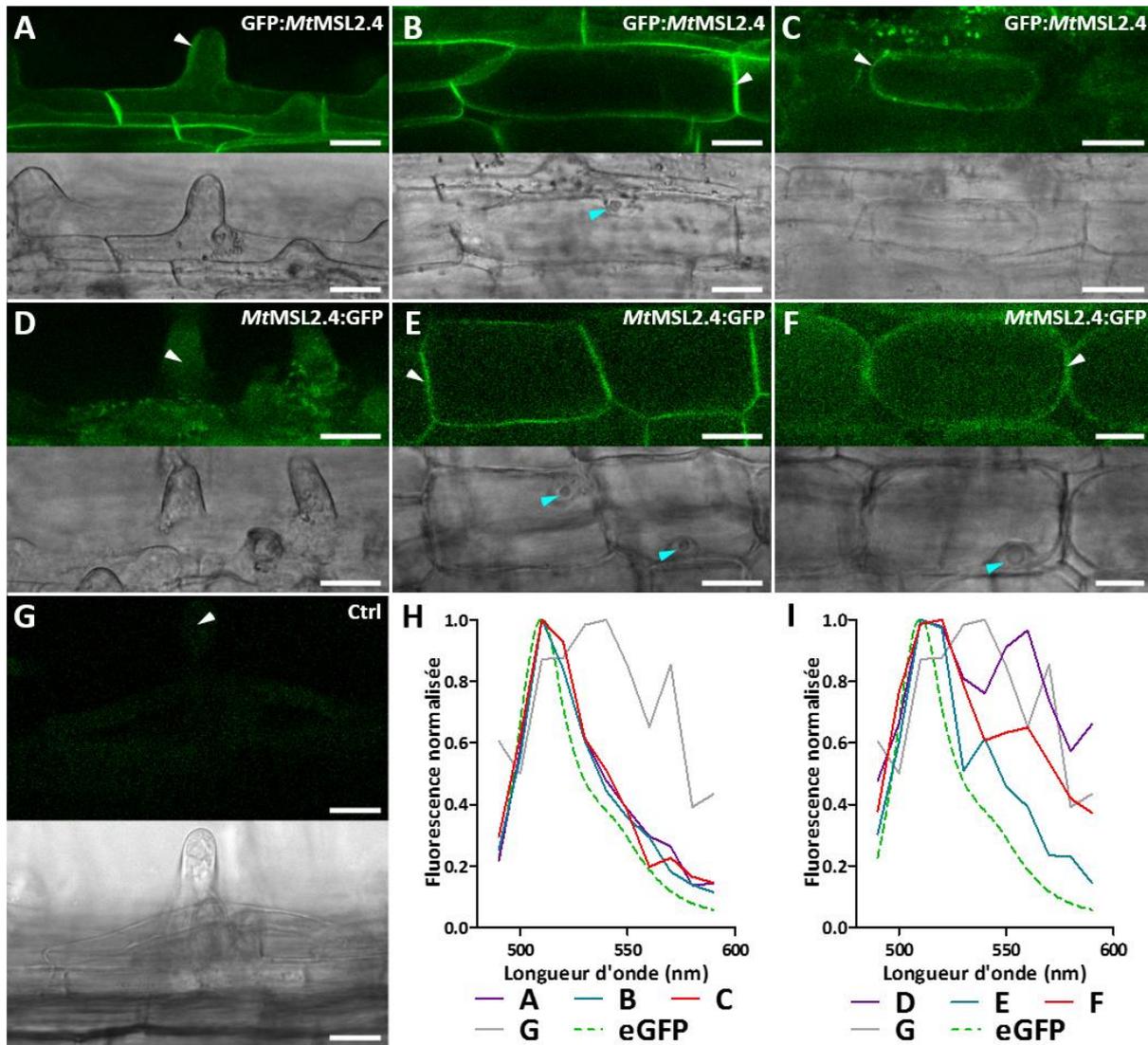
Les analyses précédentes nous ont montré que *MtMSL2.1* et *2.4* sont les deux seuls *MtMSL* candidats majoritairement transcrits dans les poils racinaires. Nous avons donc recentré notre analyse sur eux. L'outil de prédiction de la présence de peptides signaux suggère qu'il existe un peptide induisant la localisation de *MtMSL2.1* dans les chloroplastes

(Tab. 1). Comme le niveau de confiance attribué à cette prédiction est faible, il est tout de même mieux de s'assurer de la localisation de ce candidat, mais aussi de celle de *MtMSL2.4*. Pour cela, nous avons décidé de mettre en place une approche de fusion traductionnelle où les gènes codant pour ces canaux putatifs sont clonés, afin de les fusionner au gène codant pour la GFP. *MtMSL2.4* a été cloné avec succès. Cela n'est cependant pas le cas pour *MtMSL2.1* malgré plusieurs tentatives différentes (données non présentées). Le reste de cette étude sera donc focalisé sur *MtMSL2.4*.

Au cours d'un travail réalisé pendant mon stage de master 2, il a été montré dans des systèmes hétérologues, de protoplastes d'*Arabidopsis* et de cellules épidermiques de *Nicotiana benthamiana*, que la chimère GFP:*MtMSL2.4* se localisait en périphérie des cellules, mais également ailleurs dans le cytoplasme (Annexes 4 et 5). Afin de s'assurer que cette localisation est la même dans un système homologue, cette démarche a été renouvelée au cours de cette thèse. Plusieurs exemples montrent que le côté de fusion d'une GFP à une protéine d'intérêt peut modifier son adressage dans la cellule. Afin de s'assurer que cela ne soit pas le cas pour *MtMSL2.4*, deux chimères ont été produites, l'une ayant une GFP fusionnée sur le côté N-ter (GFP:*MtMSL2.4*) et l'autre ayant une GFP fusionnée sur le côté C-ter (*MtMSL2.4*:GFP).

Dans un premier temps, les gènes codant pour ces chimères ont été mis sous le contrôle d'un promoteur fort et actif dans la plupart des tissus végétaux (*p35S*). Des racines de *M. truncatula* ont été modifiées génétiquement avec ces constructions, puis observées en microscopie confocale (Fig. 27). Quel que soit le sens de la fusion, on observe un signal fluorescent en périphérie des cellules corticales et de la partie du trichoblaste formant le rhizoderme (Fig. 27A, B et E). Dans une cellule végétale, un signal en périphérie peut signifier plusieurs localisations. Comme la vacuole occupe la majeure partie de la cellule, la membrane

vacuolaire peut se retrouver adjacente à la membrane plasmique. Cependant, vers les zones à proximité du noyau où la vacuole est plus proche de la membrane plasmique, on observe



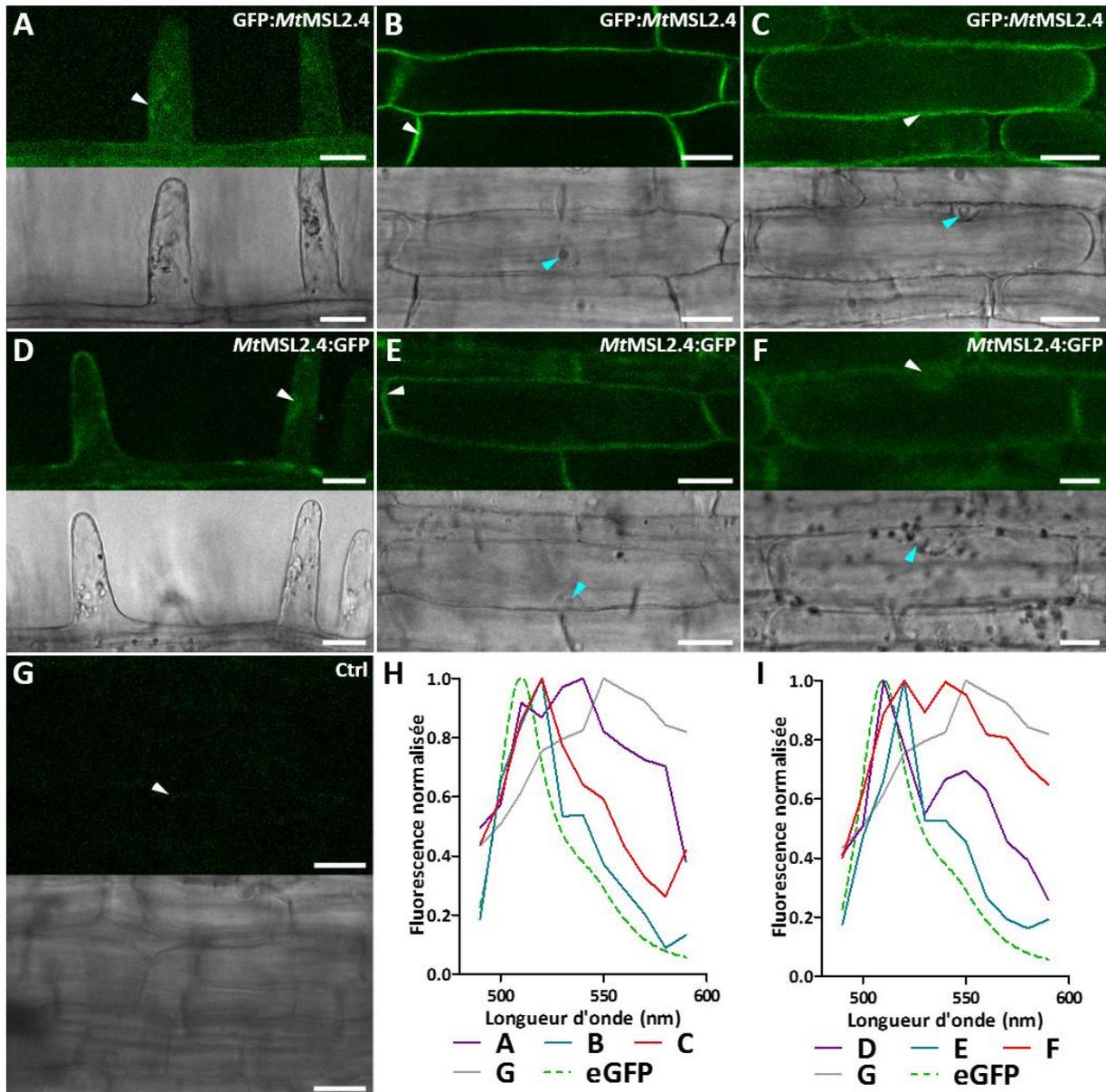
**Figure 27. Localisation subcellulaire de MtMSL2.4 fusionné à une GFP surexprimé dans la racine**

Des racines de *Medicago* ont été transformées de manière transitoire par les constructions *p35S:GFP: MtMSL2.4* ou *p35S: MtMSL2.4: GFP*. La fluorescence de la GFP des chimères *GFP: MtMSL2.4* et *MtMSL2.4: GFP* a été suivie par microscopie confocale (A-C et D-F respectivement) dans les poils racinaires (A et D) et le parenchyme cortical racinaire (B et E). C et F. Observation au microscope confocal de cellules de parenchyme racinaire en plasmolyse obtenues après un traitement des racines transformées avec une solution de sorbitol à 350mM. G. Observation au microscope confocal d'un poil racinaire de racine non transformée. A-G. Le panneau du haut correspond à l'observation de la fluorescence et le panneau du bas de la transmission. échelle : 20  $\mu$ m. Les pointes de flèches blanches indiquent les zones analysées dans les figures H et I. Les pointes de flèches bleues sur les images en transmission indiquent la position du noyau. A-B. Les images de fluorescence correspondent à la fusion d'une projection en z de trois images, les pixels les plus intenses parmi les trois coupes optiques étant conservés pour reconstituer l'image finale. Les images en transmission ont été obtenues par la fusion des coupes optiques correspondantes à l'aide du plugin ImageJ « Extended Depth of Field » (Forster *et al.*, 2004). D. L'image de fluorescence correspond à la fusion d'une projection en z de huit images, la somme des intensités de pixels sur les huit coupes optiques étant conservée pour reconstituer l'image finale. Les images en transmission ont été obtenues par la fusion des coupes optiques correspondantes à l'aide du plugin ImageJ « Extended Depth of Field » (Forster *et al.*, 2004). H et I. Analyse du spectre d'émission de fluorescence, après excitation des échantillons à 470nm, des zones indiquées par les flèches blanches dans les figures A-C et D-F respectivement. Les spectres d'émission de fluorescence du contrôle négatif (G) et de la GFP libre (eGFP) sont indiqués à titre de comparaison.

que le signal fluorescent se trouve vers l'extérieur de la cellule comparé à la position du noyau (Fig. 27B et E). Il ne s'agit donc pas d'un marquage de la vacuole. La paroi et la membrane plasmique sont également adjacentes dans une cellule. Cependant, en les plasmolysant pour rétracter la membrane par rapport à la paroi, on s'aperçoit que le signal fluorescent suit la position de la membrane plasmique (Fig. 27C et F). Au niveau de la partie allongée des poils racinaires, le signal fluorescent est périphérique, mais également plus diffus à l'intérieur de la cellule (Fig. 27A et D). Enfin, quel que soit le type cellulaire, la fluorescence observée est de faible intensité, comme le montre le bruit de fond au centre des cellules. Afin de s'assurer que ce signal ne soit pas dû à une autofluorescence de la paroi, une analyse de spectre d'émission a été faite. Les spectres associés au signal fluorescent des cellules exprimant la chimère GFP:*MtMSL2.4* ressemblent au spectre théorique de la GFP (Fig. 27H). Les signaux observés pour ces cellules correspondent donc à un signal de la GFP. Pour la chimère *MtMSL2.4*:GFP, les spectres présentent un pic d'émission à 510nm caractéristique de la GFP, mais le reste des spectres montre un niveau de fluorescence supérieur à ce qui aurait été attendu. Le signal fluorescent observé pourrait donc correspondre à celui de la GFP, additionné d'une légère auto-fluorescence de la paroi. On peut donc conclure que les chimères GFP:*MtMSL2.4* et *MtMSL2.4*:GFP sont adressées à la membrane plasmique que ce soit dans les poils racinaires ou dans les cellules de parenchyme cortical. De plus, ces chimères sont aussi adressées dans des endomembranes dans la partie allongée des poils racinaires.

Surexprimer un gène dans une cellule peut amener des biais de localisation de la protéine synthétisée. Aussi, afin de faire une étude plus fine de la localisation subcellulaire de *MtMSL2.4*, les gènes codant pour les chimères GFP:*MtMSL2.4* et *MtMSL2.4*:GFP ont été mis sous le contrôle du promoteur *pMtMSL2.4*. Le signal fluorescent des racines transformées avec ces constructions se localise aux mêmes endroits qu'observé pour les constructions sous le contrôle du promoteur *p35S* (Fig. 28A-F). L'intensité du signal fluorescent étant également

faible, une étude des spectres d'émission de ce signal a aussi été faite. Pour tous les spectres, on observe un maximum de fluorescence autour de 510nm moins marqué que pour les



**Figure 28. Localisation subcellulaire de MtMSL2.4 fusionné à une GFP exprimé dans la racine sous le contrôle du promoteur *pMtMSL2.4***

Des racines de *Medicago* ont été transformées de manière transitoire par les constructions *pMtMSL2.4:GFP::MtMSL2.4* ou *pMtMSL2.4:MtMSL2.4::GFP*. La fluorescence de la GFP des chimères *GFP::MtMSL2.4* et *MtMSL2.4::GFP* a été suivie par microscopie confocale (A-C et D-F respectivement) dans les poils racinaires (A et D) et le parenchyme cortical racinaire (B et E). C et F. Observation au microscope confocal de cellules de parenchyme racinaire en plasmolyse obtenues après un traitement des racines transformées avec une solution de sorbitol à 350mM. G. Observation au microscope confocal de parenchyme cortical de racine non transformée. A-G. Le panneau du haut correspond à l'observation de la fluorescence et le panneau du bas de la transmission. échelle : 20µm. Les pointes de flèches blanches indiquent les zones analysées dans les figures H et I. Les pointes de flèches bleues sur les images en transmission indiquent la position du noyau. A-F. Les images de fluorescence correspondent à la fusion d'une projection en z de 2 à 4 images, la somme des intensités de pixels sur ces coupes optiques étant conservées pour reconstituer l'image finale. Les images en transmission ont été obtenues par la fusion des coupes optiques correspondantes à l'aide du plugin ImageJ « Extended Depth of Field » (Forster *et al.*, 2004). H et I. Analyse du spectre d'émission de fluorescence, après excitation des échantillons à 470nm, des zones indiquées par les flèches blanches dans les figures A-C et D-F respectivement. Les spectres d'émission de fluorescence du contrôle négatif (G) et de la GFP libre (eGFP) sont indiqués à titre de comparaison.

constructions sous le contrôle du promoteur *p35S* (Fig. 28H et I). De plus, à part les signaux des figures 28B et E, le reste du spectre d'émission correspond peu à celui de la GFP. A l'exception des figures 28B et E, la fluorescence observée correspond donc à un signal émis par la GFP, additionné d'une forte autofluorescence, surtout pour les figures 28A et F. On peut donc conclure que les chimères GFP:*MtMSL2.4* et *MtMSL2.4*:GFP, exprimées sous le contrôle du promoteur *pMtMSL2.4*, sont adressées en très faible quantité dans la membrane plasmique et dans une moindre mesure dans des endomembranes.

### IV.3. Conclusion et discussion

Par l'étude de la transcription des gènes codant pour les *MtMSL* de la classe II, il a été montré que *MtMSL2.1* et *MtMSL2.4* sont exprimés dans les poils racinaires avant et pendant un traitement aux NFs. Un tel traitement semble légèrement réprimer l'expression de *MtMSL2.4*, mais des analyses plus complètes devraient être faites pour confirmer cette observation. Cependant, cette légère répression, voir l'absence de modifications de la transcription des *MtMSL* en réponse aux NFs ne signifie pas forcément que ces canaux n'ont pas de rôles dans les étapes précoces de la symbiose. En effet, la fonction d'une protéine peut être régulée à plusieurs niveaux, comme par exemple lors de l'étape de traduction de l'ARNm en protéine. Des modifications post traductionnelles, comme la phosphorylation, pourraient aussi modifier l'activité ou la localisation de ces protéines. Les canaux quant à eux ont un statut particulier. En effet, présents dans la membrane dans un état inactif (fermé), ils ne produisent aucun effet. Par contre, lorsqu'ils sont activés (par un ligand, une stimulation mécanique...) ils génèrent un signal ionique et électrique. Il serait donc intéressant de pousser les études dans ces directions.

Les analyses de localisation subcellulaire ont révélé que quel que soit le promoteur utilisé, *MtMSL2.4*:GFP et GFP:*MtMSL2.4* sont localisées à la membrane plasmique et dans des

endomembranes des cellules du parenchyme cortical et du rhizoderme. Cette localisation est semblable à celle observée jusqu'à présent pour *AtMSL8* et *10* (Haswell *et al.*, 2008; Hamilton *et al.*, 2015). Il est possible que ces endomembranes fassent partie du RE, ou bien d'un système lié à l'adressage à la membrane plasmique de ce canal putatif. Des études plus poussées sont donc nécessaires pour confirmer la nature de ces endomembranes.

Concernant les constructions sous le contrôle du promoteur fort *p35S*, il est étonnant qu'on ait obtenu qu'un faible signal de fluorescence. Une hypothèse est que la surexpression de ce canal putatif entraîne la mise en place de processus de silencing\* par la plante. Une autre hypothèse est que la surexpression de ces chimères entraîne le même type de phénotype observé chez *A. thaliana* lors de la surexpression de *AtMSL10:GFP* (Velej *et al.*, 2014; Zou *et al.*, 2016). En effet, comme nous l'avons vu précédemment, les plantes où cette construction a été surexprimée présentent un fort taux de mort cellulaire. Ainsi, en utilisant un protocole de transformation par hairy root, les racines produisant beaucoup de *MtMSL2.4:GFP* auraient plus de mal à se développer, et seraient par conséquent éliminées à l'étape de transfert des plantes depuis le milieu sélectif vers le milieu de croissance final. Comme jusqu'à présent aucune étude similaire n'a été menée avec la chimère *GFP:AtMSL10*, il est difficile de dire si la surexpression de celle-ci, et par extension de *GFP:MtMSL2.4*, pourrait entraîner le même type de phénotype que *AtMSL10:GFP*.

Pour les constructions sous le contrôle du promoteur *pMtMSL2.4*, il est étonnant d'avoir pu observer une localisation, même faible, de la fluorescence de la GFP dans les poils racinaires. En effet, le promoteur utilisé ici était le même que celui utilisé pour étudier son activité par une fusion transcriptionnelle avec le gène GUS. Grâce à cette étude, on pouvait

---

\* Le silencing est un système de régulation visant à diminuer la production de protéines aberrantes, obtenues par exemple quand on les fait surexprimer de manière artificielle. Selon le mécanisme mis en œuvre, ce système peut agir lors des différentes étapes aboutissant à la synthèse de la protéine aberrante (ex: dégradation des ARNm ou blocage de leur traduction).

s'attendre à avoir une localisation du signal fluorescent dans le parenchyme cortical. En effet, un quart des racines colorées présentaient une coloration dans ce tissu (Tab. 2). Par contre, aucune d'entre elles ne présentaient de coloration dans les poils racinaires. On pourrait expliquer cette différence par la sensibilité du système de détection utilisé. En effet, il a été montré auparavant qu'une faible coloration GUS, observée en microscopie à éclairage diascopique, pouvait être plus facilement détectée par des systèmes se basant sur la détection de la fluorescence émise par le composé bleu formé par la  $\beta$ -glucoronidase (Rech *et al.*, 2003). On peut donc émettre l'hypothèse que la détection de la fluorescence de la GFP soit plus sensible que la détection de la coloration GUS bleue en éclairage diascopique. Cependant, l'observation "classique" de cette dernière reste tout de même plus aisée, comparée à l'utilisation de techniques de microscopie à fluorescence qui peuvent parfois être lourdes à mettre en œuvre.

Une nouvelle étude à réaliser serait maintenant d'observer la localisation subcellulaire de ces protéines, lors d'un traitement aux NFs ou après une inoculation avec des bactéries symbiotiques. Pour faciliter l'observation de cette localisation, une solution serait d'utiliser un promoteur induisant une expression plus faible que le *p35S*, mais tout de même plus forte que *pMtMSL2.4*. Le promoteur spécifique de l'épiderme *pLeEXT1* semble ainsi être une bonne alternative (Rival *et al.*, 2012). Faciliter l'observation de la localisation des *MtMSL* serait aussi intéressant à exploiter afin de mettre en évidence une éventuelle corrélation entre cette localisation et celle des forces majoritairement présentes dans les poils racinaires sous différentes conditions.



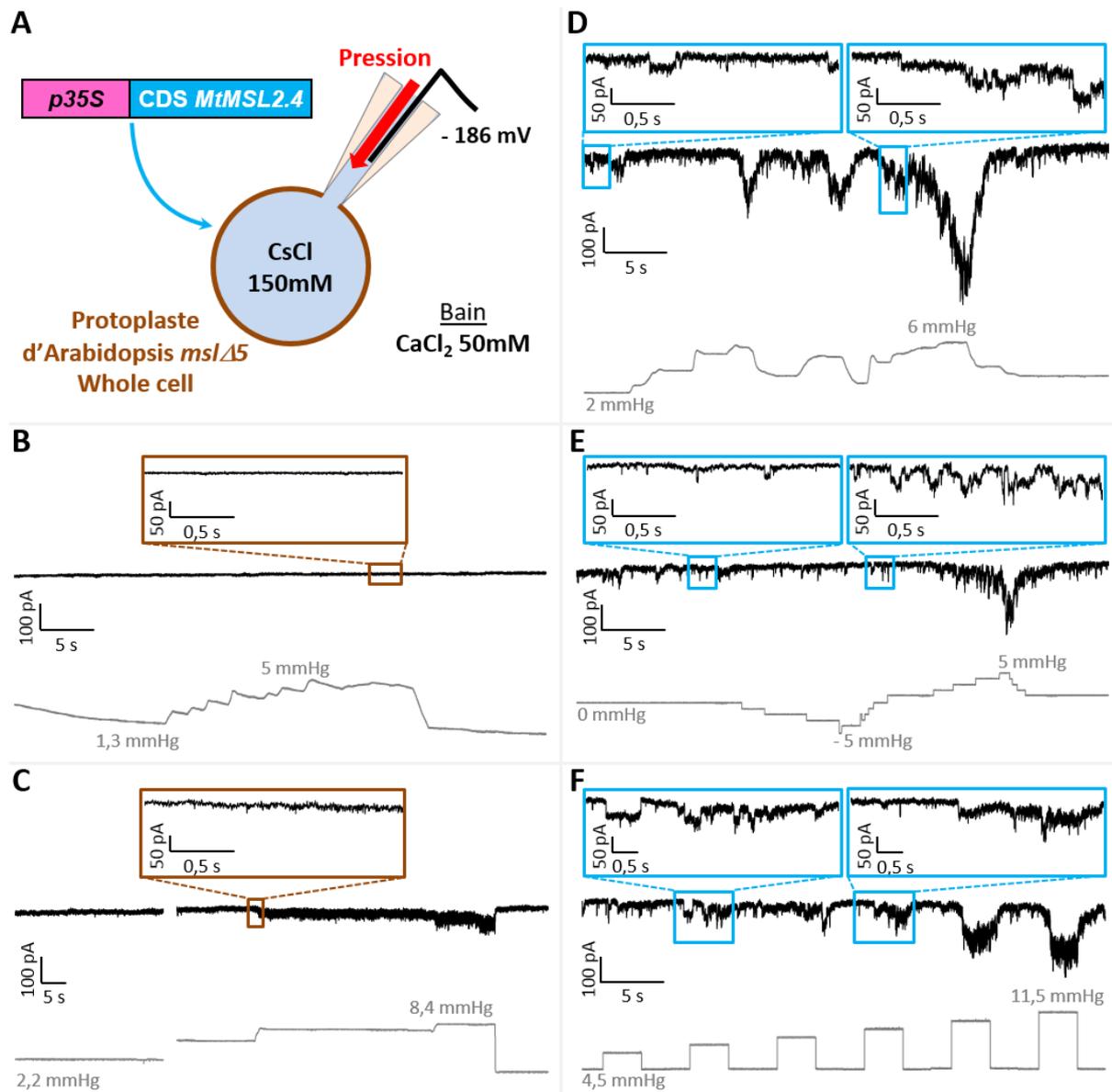
# Chapitre V.

## Analyses électrophysiologiques des activités MS du poil racinaire et de *MtMSL2.4*

Jusqu'à présent, on ne pouvait que faire des suppositions sur la nature de la protéine codée par *MtMSL2.4*. L'homologie de séquence de celle-ci avec *AtMSL10* laisse penser que *MtMSL2.4* serait un canal mécanosensible. Pour avoir une preuve directe de sa fonction, une approche de complémentation fonctionnelle a été réalisée. Elle se base sur l'utilisation de protoplastes extraits d'un mutant d'*A. thaliana* où cinq *AtMSL* ont été inactivés (*AtMSL4*, *AtMSL5*, *AtMSL6*, *AtMSL9* et *AtMSL10*). Des mesures électrophysiologiques réalisées sur ce quintuple mutant, désormais nommé *AtmslΔ5*, montrent qu'aucune activité canal MS ne peut y être détectée dans les conditions testées (Haswell *et al.*, 2008). L'objectif de l'étude est de surexprimer dans ces protoplastes le gène codant pour *MtMSL2.4* afin de voir si cette activité MS peut être retrouvée. Cette approche permettra également d'établir la carte d'identité de ce canal. En parallèle, il est aussi intéressant de savoir s'il est possible de détecter une activité MS dans les poils racinaires de *M. truncatula*.

### V.1. *MtMSL2.4* induit-il des courants mécanosensibles?

Comme expliqué précédemment, la séquence codant *MtMSL2.4* sous le contrôle du promoteur *p35S* a été introduite dans des protoplastes extraits de *AtmslΔ5*. Ces protoplastes, ainsi que des protoplastes non transformés, ont été analysés par la technique du patch clamp



**Figure 29. *MtMSL2.4* exprimé dans le fond silencieux *AtmslΔ5* présente une activité canal MS**

**A.** Schéma présentant les principales conditions de mesure. Des protoplastes, extraits de cals du mutant *mslΔ5* d'*Arabidopsis*, ont été transformés avec des plasmides portant la construction *p35S::MtMSL2.4*. L'activité canal MS de ceux-ci, ainsi que de protoplastes non transformés, a été mesurée à l'aide de la technique du patch clamp en configuration cellule entière. Les conditions ioniques pour les ions majoritaires internes et externes sont respectivement de 150 mM de CsCl et 50 mM de CaCl<sub>2</sub> (détails de la composition des solutions dans le tableau 11). Le potentiel a été maintenu à -186 mV. **B-C.** Présentation d'enregistrements représentatifs de l'activation du courant (en noir) en réponse à différents protocoles de pression (en gris) chez des protoplastes *AtmslΔ5* contrôles. Des agrandissements de ces courants sont représentés dans les encadrés marrons en haut. **D-F.** Présentation d'enregistrements représentatifs de l'activation du courant (en noir) en réponse à différents protocoles de pression (en gris) chez des protoplastes *AtmslΔ5* transformés avec la construction *p35S::MtMSL2.4*. Des agrandissements de ces courants sont représentés dans les encadrés bleus en haut.

en configuration whole cell\* (Fig. 29A). Chez les 14 protoplastes non transformés testés, une augmentation de la tension exercée sur la membrane ne provoque aucune modification de

\* La configuration whole cell conserve la totalité de la membrane du protoplaste testé. Cependant, la composition du milieu intracellulaire est contrôlée grâce à une continuité existant entre ce milieu et la solution présente dans la pipette de mesure.

courant électrique (Fig. 29B, regarder les tracés de courants non agrandis). On peut cependant noter que pour certains d'entre eux, un faible courant entrant\* est généré en réponse à de plus fortes sollicitations mécaniques (Fig. 29C). Des études réalisées au sein de notre équipe dans les mêmes conditions ioniques ont montré que ce profil de courant pouvait être attribué à un canal calcique MS à petite conductance (données en cours de publication). Mais de manière générale, ces protoplastes ne présentent globalement pas les courants MS de forte intensité observés chez le sauvage dans les même conditions (Haswell *et al.*, 2008).

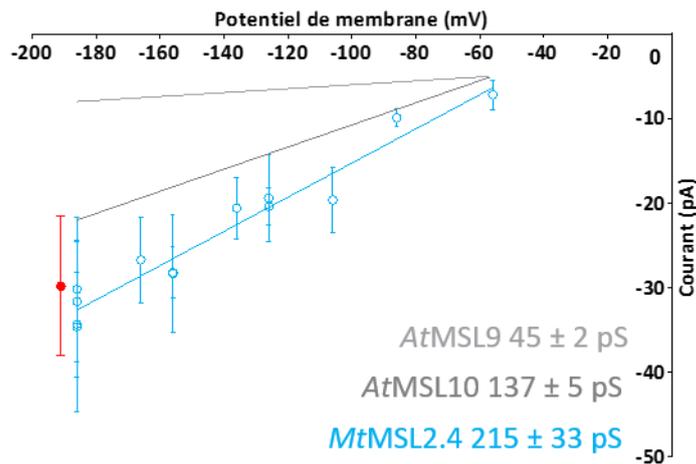
Chez les protoplastes transformés avec *p35S:MtMSL2.4*, une augmentation de tension de membrane induit un fort courant entrant, qui s'arrête quand la tension de membrane est relâchée (Fig. 29D-F, regarder les tracés de courants non agrandis). Cette observation a pu être faite sur 15 des 32 protoplastes transformés testés. *MtMSL2.4* est donc capable de compléter la perte d'activité MS du mutant *Atmsl15*. Il s'agit donc bien d'un canal MS.

Afin de déterminer plus en détail le profil de ce canal, l'intensité des courants unitaires† MS a été mesurée, en configuration whole cell, alors que différents potentiels de membrane étaient appliqués sur des protoplastes de *Atmsl15* complétés avec *MtMSL2.4*. Dans un graphe I-V, les données obtenues peuvent être ajustées par une droite (Fig. 30). Selon la loi d'Ohm ( $U=R*I$ , avec U la tension, R la résistance et I le courant), la pente de cette droite reflète l'inverse de la résistance du canal, aussi appelée la conductance. *MtMSL2.4* a donc une conductance de  $215 \pm 33$  pS.

---

\* Quand un courant électrique mesuré dévie de la ligne de base de manière plus négativement, on dit que ce courant est entrant. Ce courant peut être dû soit à une entrée de cations, soit à une sortie d'anions. A l'inverse, un courant déviant de la ligne de base de manière plus positive est un courant sortant dû soit à une sortie de cations, soit à une entrée d'anions.

† Un courant unitaire correspond à un courant induit par l'ouverture d'un seul canal. Sur une courte échelle de temps, un canal, présentant par exemple des configurations simples telles qu'ouverte ou fermée, génère un courant d'aspect rectangulaire (brusque diminution, ou augmentation, de courant correspondant à son ouverture et brusque retour à la ligne de base correspondant à sa fermeture).



**Figure 30. Conductance de *MtMSL2.4* exprimée en protoplaste *mslΔ5* d'*Arabidopsis* et amplitude du courant MS des poils racinaires de *Medicago***

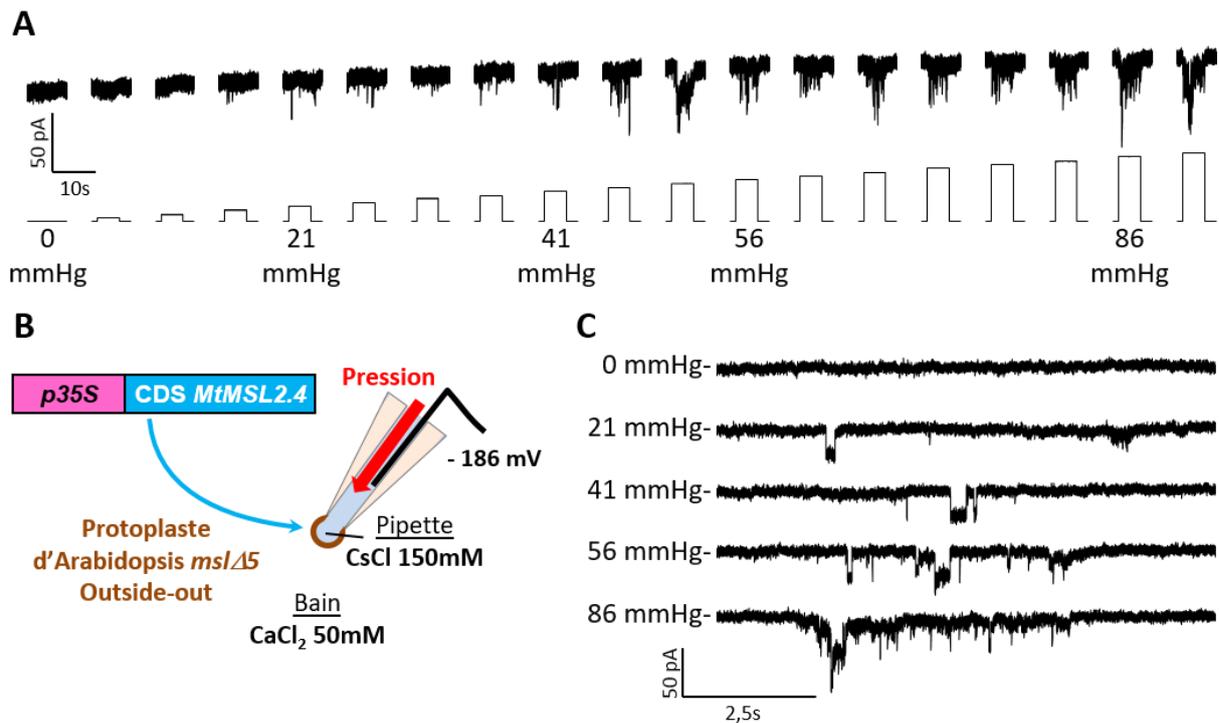
Des protoplastes, extraits de cals du mutant *mslΔ5* d'*Arabidopsis*, ont été transformés avec des plasmides portant la construction *p35S:MtMSL2.4*. L'activité canal MS de ceux-ci, a été mesurée à l'aide de la technique du patch clamp en configuration cellule entière. Les conditions ioniques sont les mêmes que celles présentées dans la figure 29. Le potentiel a été maintenu à différents niveaux afin d'étudier la conductance de *MtMSL2.4*. Les courants unitaires de chaque protoplastes étudiés ont été mesurés individuellement. Chaque point bleu du nuage de points représente la moyenne ± écart-type de ces courants pour un protoplaste à un potentiel de membrane donné.  $n=4$  protoplastes ont été analysés. La pente de la droite ajustant ces points représente la conductance de *MtMSL2.4*. Cette valeur est reportée en bas à droite du graphe. Pour information, les conductances de *AtMSL9* et *10* sont respectivement présentées en gris clair et gris foncé. L'amplitude du courant MS endogène des protoplastes de poils racinaires de *M. truncatula*, mesurée à  $-186\text{mV}$  dans les mêmes conditions ioniques et de configuration, est présentée par un point rouge. Il s'agit de la moyenne ± écart-type de l'amplitude des courants unitaires mesurés dans  $n=4$  protoplastes. Le point de cette valeur a été décalé de  $5\text{mV}$  vers la gauche afin de faciliter la lecture.

On peut enfin noter qu'en configuration excisée outside-out\* on observe une activité canal MS peu fréquente. En effet, sur les 10 patchs excisés obtenus, seulement 3 présentent une activité MS dont l'amplitude de courant semble compatible avec celle observée en whole cell à  $-186\text{mV}$  (Fig. 31A et C).

### V.2. Existe-t-il un canal MS dans les poils racinaires de *M. truncatula* ?

Les données précédentes nous ont montré que *MtMSL2.4* était un canal mécanosensible. Il serait donc maintenant intéressant de savoir s'il existe des canaux MS dans les poils racinaires de *M. truncatula*. Pour répondre à cette question, des protoplastes de poils racinaires ont été extraits par digestion enzymatique de racines de *M. truncatula* sauvages.

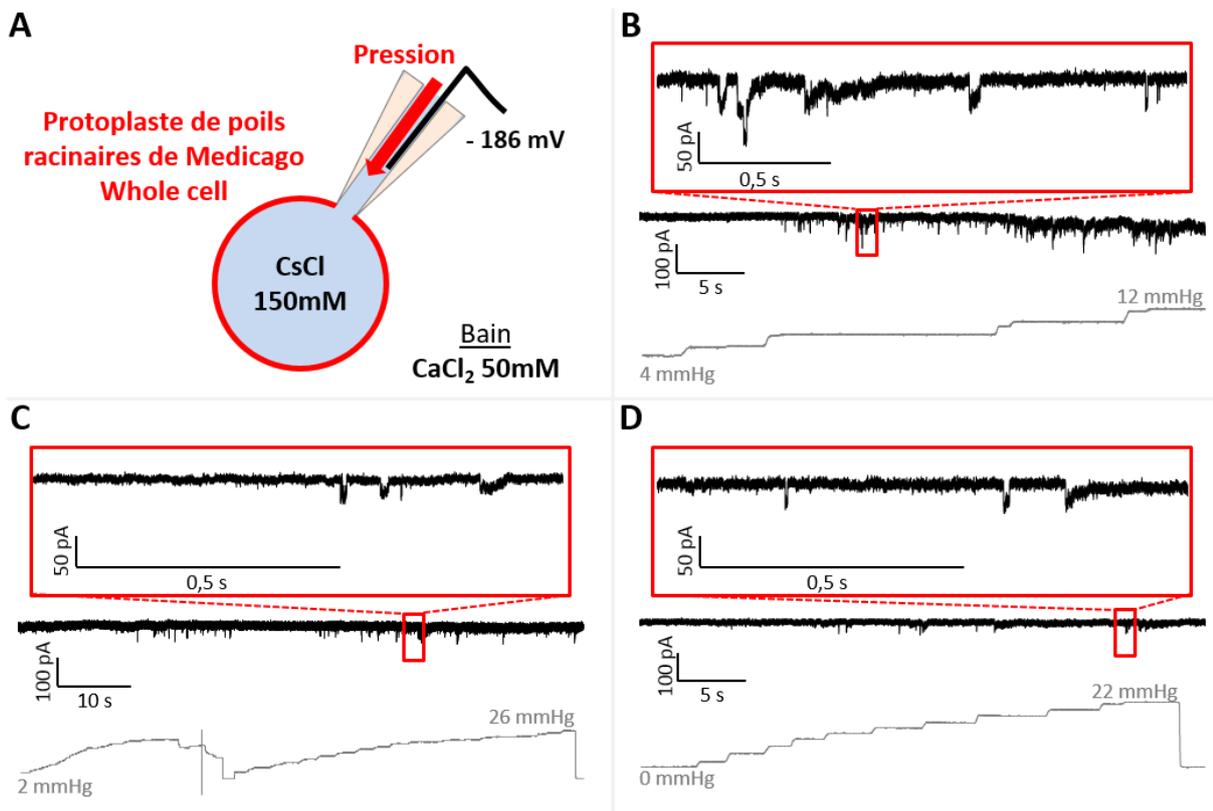
\* Une configuration excisée ne conserve qu'un fragment de la membrane d'une cellule. Selon la technique d'excision utilisée, le côté de la membrane se trouvant vers l'extérieur de la cellule d'origine peut rester vers l'extérieur dans ce fragment de membrane (configuration excisée outside-out). A l'inverse, le côté de membrane interne peut se retrouver dirigé vers l'extérieur après excision (configuration inside-out).



**Figure 31. Activité de *MtMSL2.4* observée en patch excisé**

**B.** Schéma présentant les principales conditions de mesure. Ces conditions sont les mêmes que celles présentées dans la figure 29. Dans ce cas, les mesures ont été faites dans une configuration excisée outside-out. **A.** Présentation d'enregistrements représentatifs de l'activation du courant (partie haute) en réponse à différents protocoles de pression (partie basse) chez des protoplastes *Atms1Δ5* transformés avec la construction *p35S:MtMSL2.4*. **C.** Agrandissement de certains courants présentés en A.

Les courants de ces protoplastes ont été mesurés dans les mêmes conditions ioniques et configuration que précédemment. Sur 23 protoplastes testés, 9 présentent une augmentation de courant entrant en réponse à une augmentation de tension de membrane (Fig. 32B-D, regarder les tracés de courants non agrandis). Les poils racinaires de *M. truncatula* possèdent donc des canaux MS sur leur membrane plasmique. Enfin, on peut aussi noter que bien qu'étant en configuration whole cell, on n'observe qu'une faible activité MS de manière générale. Cette faible activité ne nous a pas permis de tracer des courbes de conductance. Il faut en effet pouvoir faire suffisamment de mesures à différents potentiels. Par contre, nous mesurons une amplitude de courant, pour ces canaux MS, de  $30 \pm 8$  pA à un potentiel maintenu à -186 mV. Cette valeur est proche de celle mesurée pour *MtMSL2.4* exprimée dans *Atms1Δ5* dans les mêmes conditions ( $36 \pm 7$  pA) (Fig. 30).



**Figure 32. Une activité canal mécanosensible est observée dans les protoplastes de poils racinaires de Medicago**

**A.** Schéma présentant les principales conditions de mesure. Des protoplastes ont été extraits de poils racinaires de *M. truncatula* A-17. L'activité canal MS de ceux-ci a été mesurée à l'aide de la technique du patch clamp en configuration cellule entière. Les conditions ioniques pour les ions majoritaires internes et externes sont respectivement de 150 mM de CsCl et 50 mM de CaCl<sub>2</sub> (détails de la composition des solutions dans le tableau 11). Le potentiel a été maintenu à -186 mV. **B-D.** Présentation d'enregistrements représentatifs de l'activation du courant (en noir) en réponse à différents protocoles de pression (en gris) chez des protoplastes de poils racinaires de *M. truncatula*. Des agrandissements de ces courants sont représentés dans les encadrés rouges en haut.

### V.3. Conclusion et discussion

Par des analyses électrophysiologiques, nous avons pu déterminer que *MtMSL2.4* est un canal MS ayant une conductance de  $215 \pm 33$  pS. On peut déjà remarquer que cette conductance est nettement supérieure à celles mesurées pour *AtMSL9* et *AtMSL10* (respectivement  $45 \pm 2$  pS et  $137 \pm 5$  pS) (Haswell *et al.*, 2008). *MtMSL2.4* a donc une plus grande facilité à faire passer les ions à travers la membrane que *AtMSL10*. On a également pu observer que le passage en configuration excisée semblait fortement diminuer ou annuler l'activité canal MS mesurée. Ce résultat peut être expliqué de plusieurs manières. La première est que la densité de canaux en configuration whole cell est faible. En effet, on observe par exemple dans la figure 29D que l'amplitude maximale mesurée avec une pression de 6mmHg

est d'environ 400pA. D'après l'amplitude unitaire moyenne mesurée pour *MtMSL2.4*, ce courant correspondrait donc à l'ouverture cumulée d'une dizaine de ces canaux. La probabilité de conserver l'un de ces canaux en configuration excisée serait donc faible. Cependant, il est aussi possible que la pression appliquée en configuration whole cell ne soit pas suffisamment grande pour induire l'ouverture de l'ensemble des canaux se trouvant sur la membrane du protoplaste. En effet, afin de ne pas risquer de perdre la continuité membrane/pipette, il n'est pas possible d'appliquer de fortes pressions au protoplaste en configuration whole cell. La deuxième hypothèse pouvant expliquer la perte d'activité MS en configuration excisée, est que d'autres éléments cellulaires sont nécessaires pour réguler l'activité de ce canal. Ainsi, la configuration whole cell permettrait la conservation de ces éléments, tandis qu'ils seraient perdus en configuration excisée. Il serait maintenant intéressant d'étudier la sélectivité de ce canal afin de voir si lui aussi présente une sélectivité aux anions.

Un canal MS a aussi pu être identifié dans des protoplastes extraits de poils racinaires de *M. truncatula*. Cependant, celui-ci possède une très faible activité lors de stimulations mécaniques. Cela n'était pas observé pour les protoplastes racinaires d'*Arabidopsis* (Haswell *et al.*, 2008). Ceci suggère un manque d'éléments régulateurs dans les protoplastes extraits. Il est aussi intéressant de noter que l'amplitude moyenne d'ouverture de ce canal à -186mV est proche de celle mesurée pour *MtMSL2.4* dans les mêmes conditions. Comme il a été montré que *MtMSL2.4* est présent à la membrane plasmique des poils racinaires de *M. truncatula*, il est donc probable que l'activité MS observée dans ceux-ci soit due à *MtMSL2.4*. La faible activité observée serait alors le reflet de la faible quantité de transcrits de *MtMSLs* observée dans les poils racinaires. Cependant, des études supplémentaires seraient nécessaires pour confirmer cette supposition. Une solution serait d'étudier si ce courant MS est toujours présent dans les poils racinaires de mutants n'exprimant pas ce canal.



## Chapitre VI.

# ***MtMSL2.4*: à quoi sers-tu dans la racine et dans les poils racinaires de *M. truncatula* ?!?**

Une approche pour identifier le rôle d'une protéine dans un organisme est d'étudier les phénotypes associés à l'absence de cette protéine. Cette stratégie a donc été utilisée pour *MtMSL2.4* afin d'identifier son rôle lors des étapes précoces de la symbiose, mais aussi lors du développement du poil racinaire. Comme nous avons vu que ce gène était également exprimé dans les nodules, il est aussi intéressant de savoir comment son absence affecte le développement des nodules. Enfin, l'expression de ce gène dans l'endoderme en face des pôles de xylème, mais aussi dans la pointe racinaire, nous a fait supposer qu'il pourrait aussi avoir un rôle dans l'émergence et la croissance des racines. Il est donc aussi intéressant de tester de tels phénotypes.

Pour empêcher la production d'une protéine d'intérêt, deux approches sont possibles. On peut favoriser la dégradation des ARNm codant pour cette protéine grâce, par exemple, à des petits ARN artificiels (amiARN) (voir le principe de cette méthode dans les matériels et méthode). On peut aussi avoir recours à des mutants d'insertion. Du matériel pour produire des amiARN a été créé au cours de cette thèse, au cas où il n'aurait pas été possible d'obtenir

des mutants dans le gène *MtMSL2.4*. Grâce à la collection de mutants d'insertion\* de *M. truncatula*, il a cependant été possible d'isoler deux lignées portant une insertion dans ce gène (Tadege *et al.*, 2008). Ces deux insertions sont présentes à des endroits différents dans ce gène. Aussi, les allèles ainsi obtenus ont été nommés *Mtmsl2.4-1* et *Mtmsl2.4-2* (voir la partie matériels et méthodes pour les sites précis d'insertion). Nous avons donc décidé de favoriser l'utilisation de ces lignées. En effet on ne peut, chez *Medicago*, que produire de manière provisoire les amiARN dans les racines. De plus, la dégradation des ARNm ciblés par cette méthode n'est pas totale. Aussi, les lignées *Mtmsl2.4-1* et *Mtmsl2.4-2* se sont présentées comme étant plus flexibles d'utilisation, par leur stabilité et leur efficacité d'extinction, que les amiARN.

La majorité des études présentées dans ce chapitre ont été faites sur les descendants de plantes ayant été identifiées comme homozygotes<sup>†</sup> sauvages (ne possédant pas l'insertion) ou mutantes (possédant l'insertion) dans le gène d'intérêt. Afin de simplifier la notation, les plantes issues des lignées 1 et 2 présentant l'allèle sauvage *MtMSL2.4* à l'état homozygote sont notées WT-1 et WT-2 respectivement. A l'inverse, les plantes issues des lignées 1 et 2 présentant les allèles mutants *Mtmsl2.4-1* et *Mtmsl2.4-2* à l'état homozygote sont notées HO-1 et HO-2 respectivement (pour avoir plus de clarté sur l'origine et l'annotation des plantes

---

\* Le principe d'un mutant d'insertion est d'insérer au milieu d'un gène d'intérêt un grand fragment d'ADN, portant ou non des gènes codant pour une protéine quelconque. Cette insertion empêchera donc la production d'ARNm complets du gène d'intérêt. Dans le cas des plantes, la modification ciblée d'un gène d'intérêt n'est pas encore largement développée. Aussi, des stratégies d'insertions aléatoires sont plutôt utilisées. Des collections de mutants d'insertion ont ainsi été créées, et les sites d'insertion ont été identifiés *a posteriori*. La production de ces mutants est gérée par des fondations indépendantes, chez lesquelles il est possible de commander les mutants portant des insertions dans nos gènes d'intérêt.

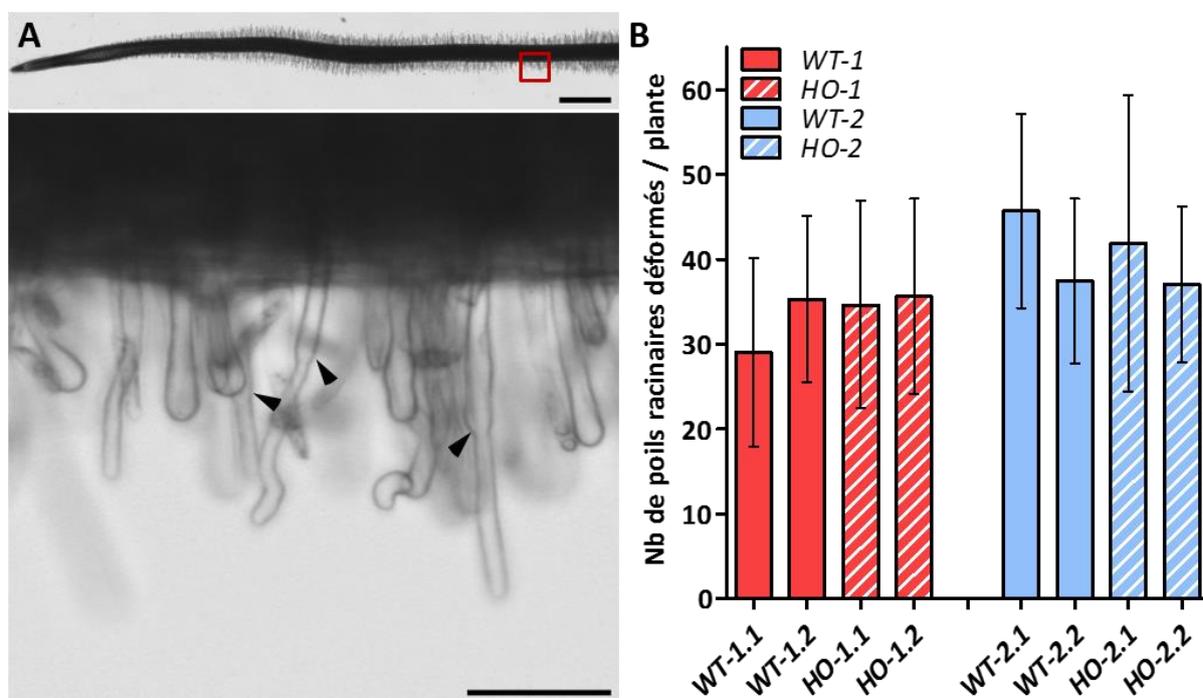
† Les plantes sont des organismes diploïdes. Cela signifie que pendant la majorité de leur cycle de vie, chacun de leurs chromosomes est présent en deux copies, une des deux copies étant issue de la plante femelle, et l'autre de la plante mâle. Si on compare des gènes se trouvant à la même position (aussi appelée locus) sur ces copies, il est possible de trouver des différences de séquences expliquant la variabilité de caractère entre individus. Ainsi, les deux versions d'un même gène sont nommées allèles. Si un individu possède sur les deux chromosomes d'une même paire le même allèle d'un gène donné, on dit que cet individu est homozygote pour ce gène. A l'inverse, s'il possède deux allèles différents d'un même gène, on dit qu'il est hétérozygote pour ce gène.

utilisées, se référer à la figure 51A du chapitre matériels et méthodes).

## VI.1. *MtMSL2.4* a-t-il un rôle à différentes étapes de la mise en place de la symbiose?

### VI.1.1. Effet de *MtMSL2.4* sur l'infection des poils racinaires par les rhizobia

Plusieurs phénotypes peuvent être testés pour étudier le rôle de ce canal pendant l'infection des poils racinaires de *M. truncatula* par des bactéries symbiotiques. On peut par exemple compter le nombre de poils racinaires infectés par des bactéries produisant des



**Figure 33. Effet du facteur Nod sur la déformation des poils racinaires chez les mutants *Mtmsl2.4***

Pour chacune des lignées Tnt1 utilisées, quatre populations R3, issues d'autant de lots de graines R2 indépendants, ont été analysées. Deux d'entre elles sont sauvages sur le locus *MtMSL2.4* (*WT-1.1* et *WT-1.2* pour la première lignée, *WT-2.1* et *WT-2.2* pour la deuxième). Les deux autres possèdent à l'état homozygote les allèles mutants *Mtmsl2.4-1* ou *Mtmsl2.4-2* sur le locus *MtMSL2.4* (*HO-1.1* et *HO-1.2* pour la première lignée, *HO-2.1* et *HO-2.2* pour la deuxième). Les racines cultivées *in vitro* ont été traitées avec une solution contenant 10 nM de facteur Nod, puis observées 24h après traitement à l'aide d'un microscope à éclairage diascopique. **A.** Présentation d'une acquisition utilisée pour dénombrer les poils racinaires déformés par le traitement au facteur Nod. Panneau du haut: vue d'ensemble de la racine; échelle : 1 mm. Panneau du bas: vue détaillée de l'encadré rouge du panneau du haut, mettant en avant par des flèches noires la déformation des poils racinaires par le traitement au facteur Nod; échelle: 100  $\mu$ m. **B.** Fréquence par plante des poils racinaires déformés par le traitement au facteur Nod pour chaque population R3 étudiées. Les données sont sous la forme de moyennes  $\pm$  écart type de deux répétitions biologiques, menées pour chaque couple répétition / population R3 avec  $n = 2$  à 7 racines. Le test Mann et Whitney a été effectué pour comparer les sauvages et mutants issus d'une même lignée Tnt1. Aucune différence significative n'a été constatée.

marqueurs, tels que la GFP ou la  $\beta$ -galactosidase\*, afin de faciliter leur identification. A cause de problèmes d'ordre technique, il n'a pas été possible d'effectuer de telles identifications sur une échelle suffisamment grande pour que ce comptage ait un sens. On peut cependant noter qu'il a été possible d'observer quelques cordons d'infections chez les racines des mutants HO-1 et HO-2 (données non montrées).

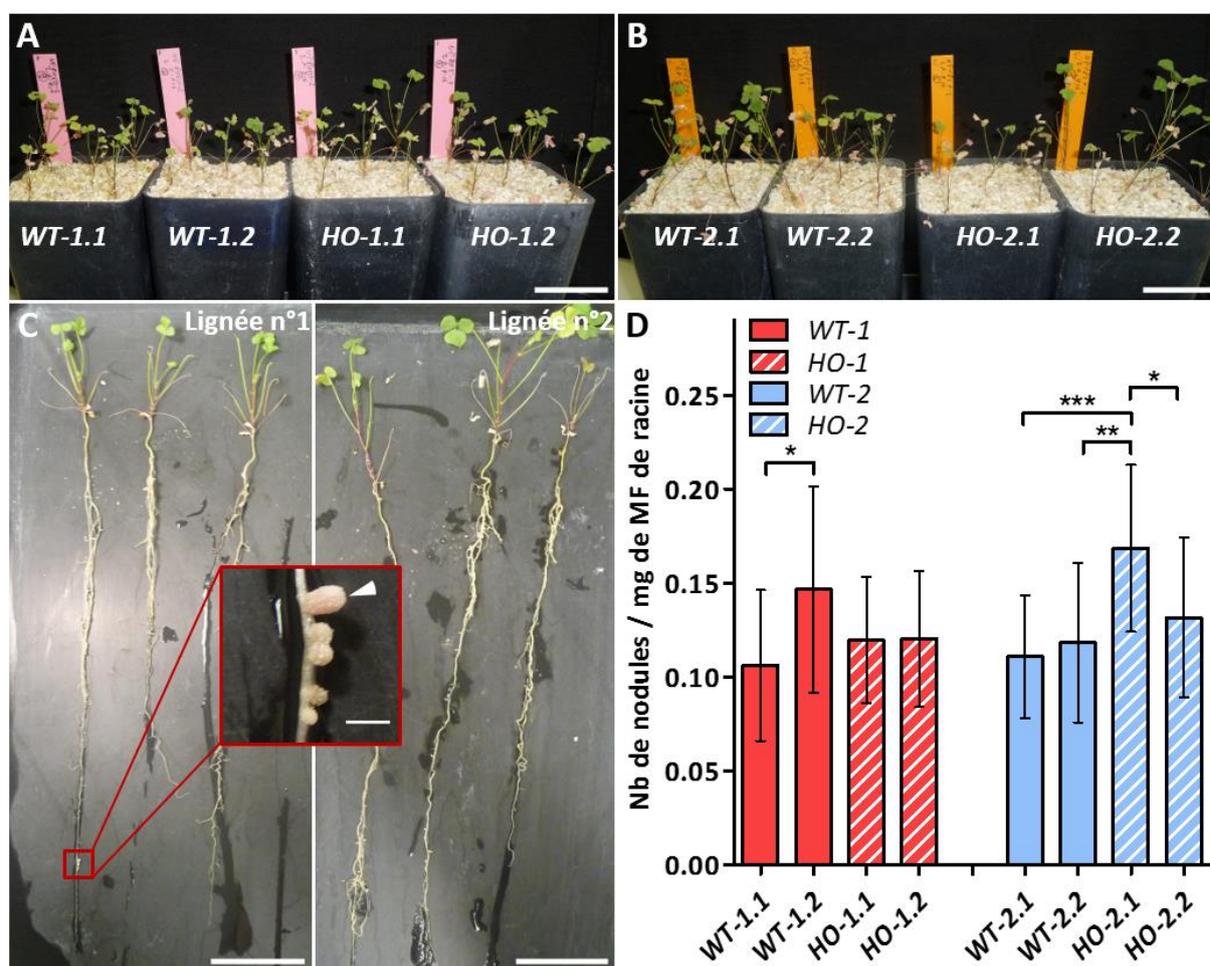
Nous avons vu lors de l'introduction que les NFs seuls étaient capables d'induire la déformation des poils racinaires. Cette déformation se caractérise par un gonflement de la pointe du poil suivie d'une reprise de sa croissance polarisée (Fig. 33A). Il est donc intéressant de savoir si cette déformation peut être influencée par la présence ou non de *MtMSL2.4*. Pour cela, le nombre de poils déformés, 24h après un traitement avec 10nM de NFs, ont été comptés (Fig. 33B). Comme on peut le voir en comparant les plantes WT-1 avec les plantes HO-1 et les plantes WT-2 avec les plantes HO-2, la présence des allèles *Mtmsl2.4-1* et *Mtmsl2.4-2* à l'état homozygote ne modifie pas de manière significative le nombre de poils racinaires déformés en réponse à un traitement aux NFs.

### VI.1.2. Effet de *MtMSL2.4* sur le développement des nodules

Nous avons vu, grâce à l'analyse par fusion transcriptionnelle, que *MtMSL2.4* était exprimé dans la pointe des nodules. Ce canal pourrait donc avoir un rôle dans leur développement. De plus, observer la présence de telles structures peut aussi refléter si le processus d'infection s'est bien déroulé auparavant. Le nombre de nodules a donc été quantifié chez les plantes WT-1, HO-1, WT-2 et HO-2 infectées par les rhizobia *S. medicae*. On peut déjà constater que les deux lignées de plantes utilisées possèdent des phénotypes différents, indépendamment de la présence ou non d'insertion dans le locus *MtMSL2.4*. En

---

\* La  $\beta$ -galactosidase est une enzyme capable de catalyser l'hydrolyse de différents sucres tels que le  $\beta$ -galactoside. Comme la  $\beta$ -glucuronidase, elle peut aussi avoir une action sur toute une variété de substrats, dont certains deviennent colorés une fois hydrolysés.



**Figure 34. Développement des nodules après inoculation de racines de mutants *Mtmsl2.4* par la bactérie symbiotique *S. medicae***

Pour chacune des lignées Tnt1 utilisées, quatre populations R3, issues d'autant de lots de graines R2 indépendants, ont été analysées. Deux d'entre elles sont sauvages sur le locus *MtMSL2.4* (WT-1.1 et WT-1.2 pour la première lignée, WT-2.1 et WT-2.2 pour la deuxième). Les deux autres possèdent à l'état homozygote les allèles mutants *Mtmsl2.4-1* ou *Mtmsl2.4-2* sur le locus *MtMSL2.4* (HO-1.1 et HO-1.2 pour la première lignée, HO-2.1 et HO-2.2 pour la deuxième). Les plantes cultivées en pots ont été inoculées avec la souche de *S. medicae* WSM419. Les différentes analyses se sont déroulées 37 jours après inoculation. **A-B.** Vues macroscopiques des plantes en pots 37 jours après inoculation, respectivement pour la première et la deuxième lignée Tnt1 ; échelles: 5 cm. **C.** Vues de plantes déterrées des deux lignées Tnt1 analysées, avec un aperçu dans l'encadré rouge de nodules 37 jours après inoculation. La flèche blanche indique un nodule avec une coloration rosée; échelles: 5 cm et 2 mm pour les vues générales et l'encadré respectivement. **D.** Nombre de nodules par mg de matière fraîche de racines pour chaque population R3 étudiée. Les données sont sous la forme de moyennes  $\pm$  écart type de deux répétitions biologiques, menées pour chaque couple répétition / population R3 avec  $n = 10$  racines. Le test Mann et Whitney a été effectué pour comparer les sauvages et mutants issus d'une même lignée Tnt1. (\*  $0.01 < p < 0.05$ ; \*\*  $0.001 < p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ).

effet, les plantes de la lignée 1 semblent posséder dans les conditions testées des longueurs de pétioles\* légèrement plus petites que les plantes de la lignée 2 (Fig. 34A-B). Cependant, la présence de l'allèle *Mtmsl2.4-1* ne semble pas modifier le nombre de nodules dans les plantes HO-1 comparé aux plantes WT-1 (Fig. 34D). Pour la lignée 2, bien que les plantes mutantes

\* Le pétiole est l'organe reliant la feuille à la tige

HO-2.1 possèdent plus de nodules que les sauvages WT-2, ce n'est pas le cas pour les plantes HO-2.2. Là encore la présence de l'allèle *Mtmsl2.4-2* ne semble pas modifier le nombre de nodules. Néanmoins, une étude de la cinétique de formation des nodules pourrait peut-être mettre en évidence un phénotype qui ne peut être observé à un temps fixe. On peut enfin noter que les nodules étudiés possèdent une coloration rosée, témoignant de leur fonctionnalité pour fixer l'azote atmosphérique (Fig. 34C). Cependant, des études supplémentaires seraient nécessaires pour voir si l'absence de *MtMSL2.4* affecte d'une manière ou d'une autre cette coloration.

### VI.2. *MtMSL2.4* modifie-t-il la croissance des poils racinaires?

Les tubes polliniques et les poils racinaires partagent des similitudes dans leurs mécanismes d'élongation (Mendrinna et Persson, 2015). Par homologie de fonction avec *AtMSL8* qui a un rôle dans l'élongation du tube pollinique, on peut émettre l'hypothèse que *MtMSL2.4* ait un rôle dans l'élongation des poils racinaires. L'étude de leur croissance est donc une voie à explorer vers l'identification de la fonction de ce canal.

#### VI.2.1. Mise en place d'un système semi-automatique de mesure des poils racinaires

Les phénotypes des mutants MSL perte de fonction chez *A. thaliana* sont généralement peu marquant (Tran *et al.* (cf. Article 2); Haswell *et al.*, 2008; Zou *et al.*, 2016). Pour les mettre en évidence, une solution peut être d'augmenter la taille des échantillons analysés. Afin de faciliter la mesure de la taille d'un plus grand nombre de poils racinaires, j'ai été amenée à développer une méthode basée sur l'analyse d'images dans le cadre de ma thèse. Nous verrons par la suite que cette méthode présente aussi l'avantage d'être moins subjective quant au choix de la zone de la racine où mesurer la taille des poils racinaires. Le principe de cette méthode sera donc expliqué ici. Une mise à l'épreuve de cette technique sera également présentée, mais celle-ci sera faite en dehors du contexte même de l'étude.

### VI.2.1.a. Principe du système de mesure

Le principe de cette mesure repose sur le fait qu'on puisse ramener la forme de la partie allongée du poil racinaire à celle d'un rectangle. En connaissant la hauteur ( $h$ ) et l'aire ( $A$ ) du rectangle, on peut donc facilement en déduire sa longueur en utilisant la simple formule de calcul de l'aire d'un rectangle:

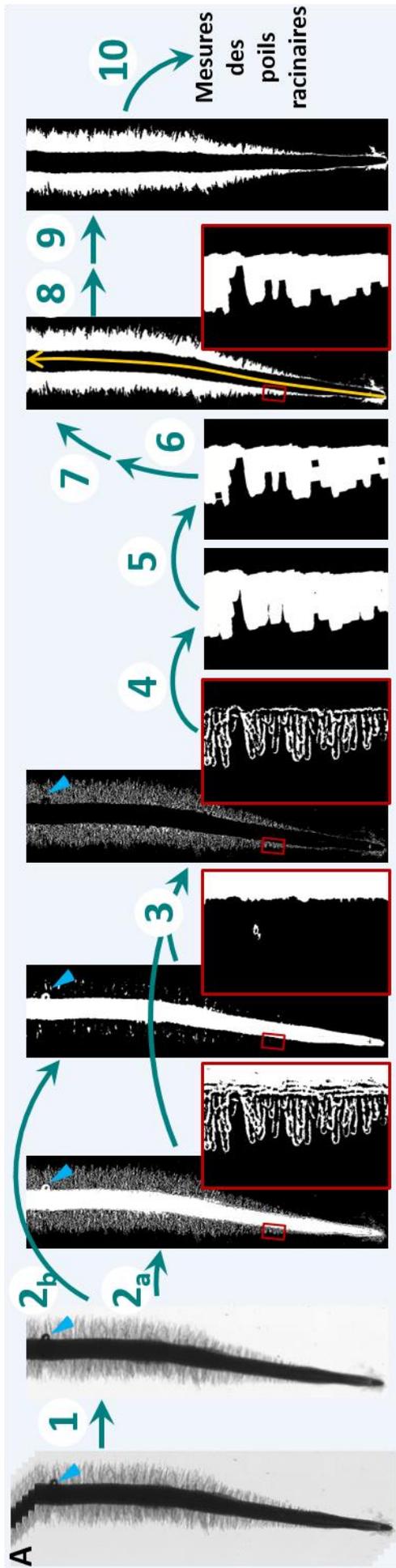
$$A = L \times h [1]$$

Pour pouvoir utiliser ce calcul sur des images de racines acquises au microscope, il est d'abord nécessaire de traiter ces images de différentes manières. L'acquisition et le traitement de ces images sont expliqués ci-après.

Afin de pouvoir plus facilement choisir la zone à analyser par la suite, il est dans un premier temps nécessaire de faire une acquisition au microscope de l'image de la racine et de ses poils. Celle-ci est à faire sur une zone allant de la pointe racinaire jusqu'à, au minimum, la zone où les poils ont fini leur croissance, le mieux étant de faire cette acquisition de la manière la plus large possible. Dans le cadre de cette étude, un microscope à éclairage diascopique avec une platine motorisée a été utilisé pour pouvoir prendre une mosaïque de photos. Cette mosaïque a ensuite été reconstituée automatiquement par le logiciel de pilotage du microscope (Microscope Leica DMI6000 avec platine motorisée x, y, z. Logiciel LAS. Lampe halogène (Leica). Objectif 5x sec + DIC (NA : 0.15) (Leica), remarque: le DIC n'a pas été utilisé pour faire ces acquisitions. Camera noir & blanc Orca ER-1395, Hamamatsu, (taille de pixel : 6.45 x 6.45  $\mu\text{m}$ )). Comme les poils racinaires n'apparaissent pas tous nets sur le même plan focal, il a aussi été nécessaire de faire plusieurs acquisitions d'images sur différents plans focaux. Dans cette étude, cinq plans focaux séparés de 100 $\mu\text{m}$  chacun ont été acquis.

Les cinq plans focaux obtenus précédemment ont ensuite été traités grâce au logiciel d'analyse d'image ImageJ. Dans un premier temps, ceux-ci ont été regroupés en une seule

image par une projection en Z par sommation (Fig. 35 – étape 1). Par la suite un seuillage a été réalisé, avec pour objectif de ne faire ressortir que la forme des poils en blanc. Pour cela, l'image projetée en Z a été traitée selon deux méthodes de seuillage. Dans nos conditions, la méthode de Bernsen permet de mettre en évidence la forme des poils racinaires, mais également la partie centrale de la racine (Fig. 35 – étape 2a). La méthode de Phansalkar



### B 1 Projection en z par addition de 5 plans focaux (Z-project + Sum Slices)

Seuillage pour faire ressortir les poils racinaires uniquement:

- 2 a - Seuillage local par la méthode de Bernsen – rayon = 5 (Auto local Threshold)
- b - Seuillage local par la méthode de Phansalkar – rayon = 100 (Auto local Threshold)

3 Soustraction de l'image obtenue en 2a par l'image obtenue en 2b (Image Calculator)

4 5 dilatations des pixels (Dilate)

5 5 érosions des pixels (Erode)

6 Remplissage des trous (Fill holes)

7 Elimination des artefacts (ex: bulles d'air) avec l'outil pinceau ◀

Redressement de la racine avec le plugin « Straighten » (Kocsis et al., 1991)

8 a - Tracé de la ligne médiane de la racine en partant de la pointe racinaire (flèche jaune sur le panneau A) ◀

b - Redressement de la racine

9 Elimination des impuretés en arrière plan ◀

10 Division du niveau de gris des pixels par 255 (les pixels noirs et blancs prennent une valeur de 0 et 1 respectivement) (Substract)

### Figure 35. Protocole semi-automatique de préparation des photos de racines pour la mesure des poils racinaires

A. Illustration de la modification d'images de racines de *M. truncatula* obtenues par microscopie à éclairage diascopique. L'image finale servira dans un second temps à la mesure de la taille des poils racinaires (Fig. 36). Les nombres bleus indiquent l'étape à laquelle se référer en B pour avoir des détails. Les encadrés rouges présentent des agrandissements des images associées en arrière-plan à gauche. Les flèches bleues claires indiquent un artefact (ici une bulle d'air dans la préparation). La flèche jaune représente la ligne médiane tracée à l'étape 8a. B. Détails des étapes illustrées en A. Le texte rouge indique l'outil utilisé dans ImageJ. Les flèches rouges indiquent les étapes manuelles du protocole. C. Présentation de la similitude entre l'image finale (contours présentés en rouge) et l'image projetée obtenue à l'étape 1. échelle: 100  $\mu\text{m}$ .

permet, elle, de ne mettre en évidence que la partie centrale de la racine (Fig. 35 – étape 2b). Par soustraction de l'image obtenue en 2a avec celle obtenue en 2b, on obtient donc une image avec uniquement la forme des poils racinaires mise en évidence en blanc (Fig. 35 – étape 3). Cependant, l'intérieur des poils n'est pas d'un blanc homogène dans cette image. L'étape suivante consiste donc à dilater\* les pixel blancs un certain nombre de fois jusqu'à ce que la majorité soient connectés entre eux (Fig. 35 – étape 4). Il est ensuite nécessaire d'éroder† l'image autant de fois afin que la longueur des poils racinaires retrouve leur taille initiale (Fig. 35 – étape 5). Les zones noires restantes sont ensuite éliminées en les remplissant avec l'option "Fill holes" (étape 6). Comme on peut le voir dans la figure 35C, l'image obtenue définit bien le contour de l'extrémité des poils racinaires de l'image d'origine.

Il peut arriver que certains artéfacts empêchent la mise en évidence de la longueur réelle des poils sur toute une zone (par exemple une bulle d'air ou une fibre se superposant sur les poils). Si l'élimination de ceux-ci n'entraîne pas trop de modification de l'image, il est possible de les rectifier manuellement (étape 7). Par exemple dans le cas de la bulle d'air de la figure 35, il est facile de deviner la forme de la partie centrale de la racine, la zone cachée par cette bulle étant suffisamment petite. Par contre, si ces artéfacts nécessitent de modifier de manière trop conséquente l'image pour les rectifier, il faut éliminer cette zone du traitement final des données, afin de ne pas risquer de créer de fausses informations.

L'étape de mesure des poils racinaires nécessite le déplacement d'une zone de sélection le long de la racine, cette zone devant être perpendiculaire à l'axe de croissance du poil. Cependant, il n'était pas toujours possible de positionner la racine de manière parfaitement droite lors de l'acquisition initiale. Pour pallier à ce problème il est possible de redresser la

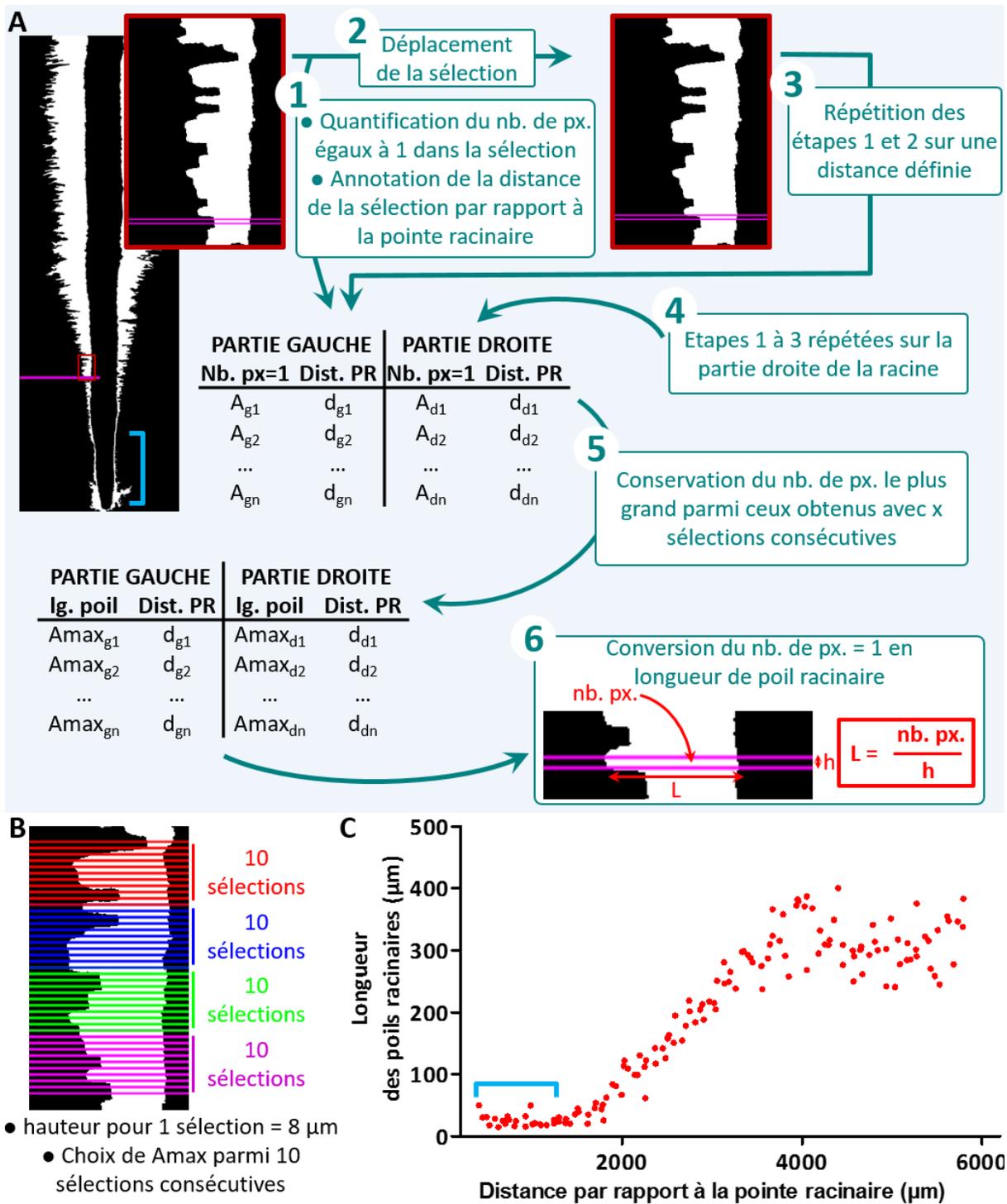
---

\* La dilation d'une image dans ce cas consiste à rajouter une rangée de pixels blancs sur le bord d'un objet blanc

† L'érosion d'une image dans ce cas consiste à enlever une rangée de pixels blancs sur le bord d'un objet blanc

racine grâce au plugin "Straighten" (Kocsis *et al.*, 1991). Pour cela, il faut dans un premier temps tracer manuellement la ligne médiane de la racine (étape 8). Dans ce plugin, l'épaisseur de la ligne médiane définit la zone à redresser. Il est donc nécessaire de régler l'épaisseur de cette ligne de façon à recouvrir, de part et d'autre de la racine, toute la longueur des poils racinaires. Une fois ce réglage fait, l'étape de redressement par le plugin peut être effectuée (Fig. 35 – étape 9). Cette étape de redressement fait perdre la propriété binaire de l'image. Avant de continuer, il faut donc la rebinariser avec l'option "Make binary". Par la suite, le principe de mesure de la longueur des poils racinaires nécessite que l'arrière-plan soit totalement net de toute impureté. En effet, la mesure se base sur la quantification du nombre de pixels formant les poils dans une sélection donnée. Il ne faut donc pas qu'aux pixels des poils viennent s'ajouter les pixels des impuretés pour ne pas surestimer leur longueur. Un moyen d'effectuer ce nettoyage est de sélectionner la plage de pixels blancs de l'ensemble des poils avec l'outil "Wand" (cette sélection étant rapide puisque cette plage est continue sur l'ensemble de la racine). Ensuite, il est possible d'obtenir le négatif de cette sélection avec l'option "Make Inverse". Il suffit alors de remplir cette nouvelle sélection en noir avec l'option "Fill". Enfin, la valeur du niveau de gris des pixels de chaque image doit être divisée de telle sorte que les pixels blancs prennent une valeur de 1 et les pixels noirs une valeur de 0. Il faut donc diviser ces valeurs par 255 puisque l'étape de binarisation crée une image en 8-bit (étape 10). L'image ainsi obtenue peut enfin être utilisée pour l'étape de mesure en elle-même.

La mesure des poils racinaires se fait grâce à une sélection rectangulaire suffisamment haute pour recouvrir environ la moitié de l'épaisseur d'un poil racinaire. Dans notre cas, une épaisseur de 8  $\mu\text{m}$  semblait convenir (Fig. 36B). Une fois faite, le nombre de pixels ayant un niveau de gris égal à 1 dans cette sélection représente l'aire du rectangle simplifiant la forme du poil. On peut donc récupérer ce nombre de pixels avec l'outil "Measure", après avoir pris soin de cocher "Integrated density" dans le réglage des données à mesurer. Il est aussi



**Figure 36. Protocole de mesure automatique de la longueur des poils racinaires**

**A.** Illustration pas à pas du principe (Etape 6) et du protocole de mesure automatique de la longueur des poils racinaires. Ces explications sont dans la continuité de celles présentées dans la figure 35. Afin de simplifier la visualisation, l'image analysée présentée a été modifiée de telle sorte que les pixels ayant un niveau de gris égal à 1 apparaissent en blanc. px: pixel, Dist.: distance, PR: pointe racinaire, lg.: longueur. **B.** Présentation des paramètres de mesures utilisés pour les différentes analyses à suivre. **C.** Présentation d'un exemple des données obtenues avec ce système de mesure pour une racine, en confondant les points correspondant à la partie gauche et droite de la racine. Les crochets bleus en A et C indiquent le bruit de fond lié à l'épaisseur du contour de la racine sans poils présent au niveau de la pointe racinaire.

nécessaire de relever en même temps la distance de la sélection par rapport à la pointe racinaire pour pouvoir sélectionner les zones à analyser par la suite (Fig. 36A – étape 1). Il

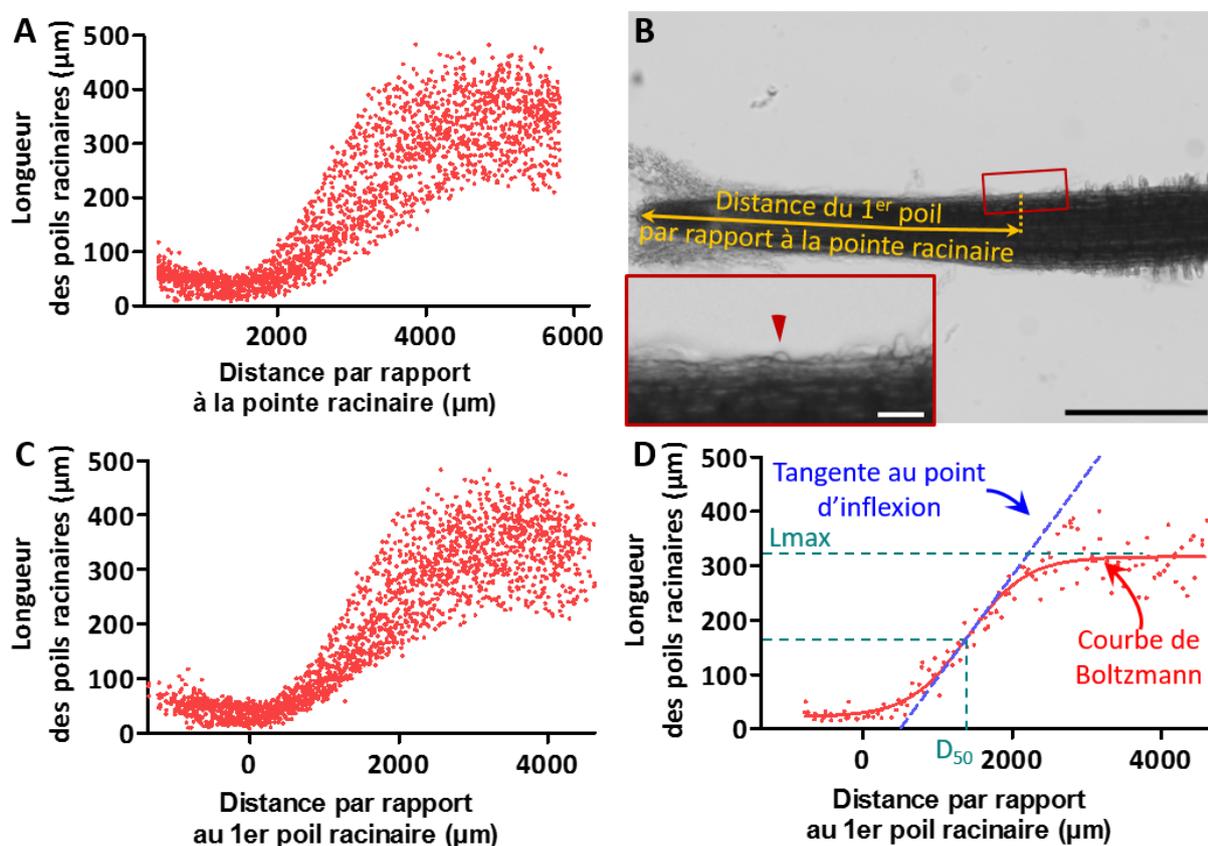
suffit ensuite de faire glisser la sélection sur la position adjacente afin de relever le nombre de pixels au niveau égal à 1 dans cette nouvelle sélection (Fig. 36 – étapes 2 et 3). Les étapes 1 et 2 sont à répéter sur toute la longueur de la racine, que ce soit sur sa partie droite ou sa partie gauche (Fig. 36 – étapes 3 et 4). A l'issue de ces étapes, on obtient une matrice de données dans laquelle seules certaines valeurs nous sont utiles. En effet, les zones mesurées par exemple entre deux poils ne sont pas intéressantes dans notre cas. Pour faire le tri de ces données, la valeur maximale mesurée sur 10 sélections consécutives est retenue, avec sa distance de la pointe racinaire associée (Fig. 36 – étape 5). Ce nombre de sélections permet de couvrir environ 4 à 6 poils consécutifs (Fig. 36B). Il suffit enfin de déduire la longueur des poils, à partir du nombre de pixels mesurés dans chaque sélection conservée, et de la hauteur de cette sélection convertie en pixels (Fig. 36 – étape 6). Les longueurs obtenues sont en pixels, il faut donc les convertir en  $\mu\text{m}$  selon l'échelle de l'image. Un exemple de données obtenues pour une racine est présenté dans la figure 36C. On peut remarquer sur ce graphe qu'il existe un bruit de fond vers la pointe racinaire qui est lié à l'épaisseur du contour de la racine sans poils à ce niveau.

Afin d'automatiser les étapes de modification d'image et de mesure, plusieurs macros ont été créées dans ImageJ. Elles doivent être utilisées successivement sur les images créées par la précédente. Une première macro va réaliser l'étape 1 de la figure R19, une deuxième les étapes 2 à 6, une troisième les étapes 7 à 10 et une quatrième toutes les étapes de la figure 36.

### **VI.2.1.b. Comment peut-on utiliser les données obtenues?**

Dans les publications mesurant la longueur de poils racinaires, la zone de mesure est définie de plusieurs manières. La première est de mesurer les poils se trouvant à une certaine distance de la pointe racinaire. Ce genre de sélection peut aussi être fait avec les données

obtenues par le système de mesure décrit auparavant. Cependant l'avantage de ce système est que l'on peut être plus exhaustif dans la zone de mesure que l'on veut tester. Le problème de ce genre de décision est que, selon la distance choisie, les poils mesurés ne seront pas forcément au même stade de développement. En effet, si une population mesurée présente des racines ayant, par exemple, une zone d'élongation plus grande, les poils mesurés à une distance donnée seront plus jeunes que les poils mesurés dans une population dont les racines présentent une zone d'élongation plus courte. Une différence observée sur la longueur des



**Figure 37. Méthodes d'ajustement des données obtenues par mesure automatique de la longueur des poils racinaires**

Les graphes présentent un exemple de données obtenues avec la méthode présentée en figures 35 et 36. **A.** Longueur des poils racinaires en fonction de leur distance par rapport à la pointe racinaire. Ces résultats sont issus de 16 racines. Les mesures faites à gauche et à droite de la racine ont été confondues. **B.** Afin d'homogénéiser les données présentées en A, la distance du premier poil racinaire (flèche rouge) par rapport à la pointe racinaire a été mesurée (double flèche jaune). Echelles: 500 µm pour la vue large, 50 µm pour la vue agrandie dans l'encadré rouge. **C.** Résultats de l'homogénéisation des données en exprimant la longueur des poils racinaires en fonction de leur distance par rapport au premier poil émergeant. **D.** Exemple d'ajustement de la longueur des poils racinaires, en fonction de leur distance par rapport au premier poil émergeant, par une courbe d'équation de Boltzmann (courbe rouge). L'équation de cette courbe permet de déduire une tangente au point d'inflexion (droite bleue), dont la pente reflète indirectement la vitesse de croissance des poils racinaires. Ces mesures sont issues d'une racine. Lmax: longueur maximale des poils racinaire estimée par l'ajustement avec l'équation de Boltzmann. D50: distance, par rapport à la pointe, à laquelle les poils ont atteint la moitié de leur longueur maximale.

poils racinaires risque donc de refléter un autre problème sous-jacent. Ce problème peut être corrigé en se basant plutôt sur la distance des poils mesurés par rapport au premier poil émergeant (Fig. 37A-C).

Une deuxième méthode pour sélectionner la zone de mesure est de mesurer la taille des poils ayant achevé leur croissance. Cependant, la définition du commencement de cette zone peut parfois être subjective. Cela peut aussi être le cas dans la première méthode pour sélectionner la distance à partir de laquelle mesurer les poils racinaires. Les données obtenues avec le système de mesure développé ici permettent d'utiliser un critère de sélection moins subjectif. En effet, les nuages de points présentant la taille des poils racinaires en fonction d'une distance quelconque, prennent l'aspect d'une sigmoïde. Il est donc possible d'ajuster ces données avec de telles courbes. L'équation de Boltzmann est un exemple d'équation permettant d'obtenir ce type de courbe [2]. Par rapport à une équation de sigmoïde plus simple, celle-ci a l'avantage de prendre en compte le bruit de fond décalant la base de la sigmoïde de l'axe des abscisses:

$$f(d) = \frac{L_{max} - L_{bruit}}{1 + e^{(d_{50} - d) / dc}} + L_{bruit} [2]$$

d: distance par rapport à la pointe racinaire;  $L_{max}$ : longueur maximale des poils;  $d_{50}$ : distance à partir de laquelle les poils ont atteint la moitié de leur longueur maximale;  $dc$ : facteur reflétant en partie la pente de la courbe au point d'inflexion;  $L_{bruit}$ : bruit de fond présent à la pointe racinaire.

L'ajustement de ces données avec l'équation de Boltzmann permet ainsi d'extraire différentes valeurs intéressantes à comparer dans différents cas de figure (Fig. 37D). La première, et la plus évidente, est la longueur maximale des poils racinaires  $L_{max}$ . La deuxième est la valeur de la pente au point d'inflexion de la courbe. La valeur de cette pente ( $Pente_{infl}$ ) peut être déduite de l'équation suivante:

$$Pente_{infl} = \frac{L_{max} - L_{bruit}}{4 \times dc} [3]$$

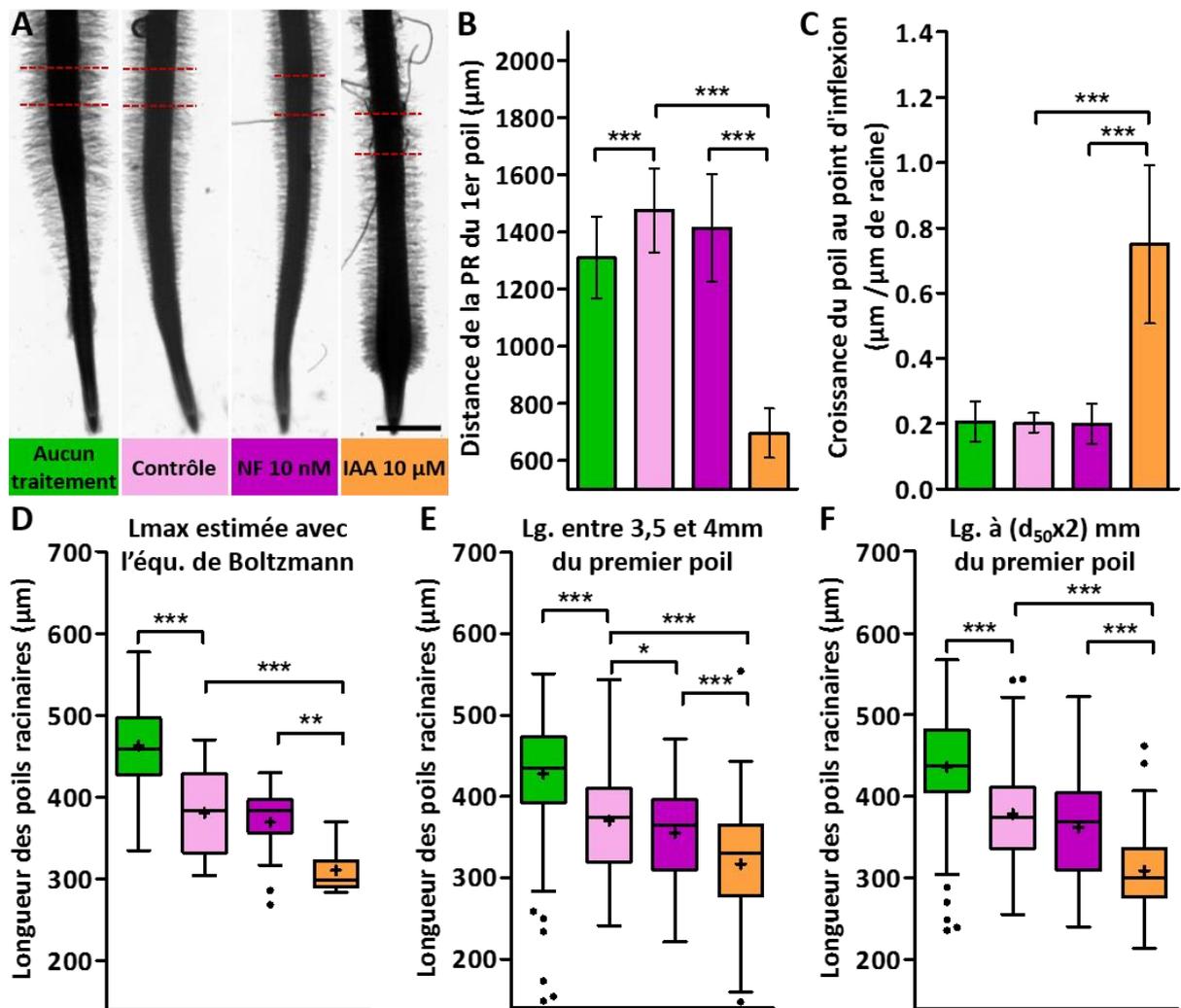
Cette pente reflète indirectement la vitesse de croissance des poils racinaires, qui est alors exprimée en taille de poil racinaire/distance de racine. En effet, les poils les plus jeunes se trouvent du côté de la pointe racinaire, tandis que les poils les plus âgés se trouvent du côté opposé de cette pointe. La distance, séparant deux stades de développement de poil sur la racine, reflète donc une période de temps, si on admet que la racine a poussé de manière continue entre les temps d'émergence des deux poils considérés. Une manière de déduire la vitesse de croissance réelle des poils serait donc de mesurer en parallèle la vitesse de croissance de la racine ( $v_{racine}$ ) dans la condition donnée. La vitesse de croissance des poils ( $v_{poil}$ ) racinaires serait donc simplement calculée à l'aide de l'équation [4].

$$v_{poil} = Pente_{infl} \times v_{racine} [4]$$

Enfin, une dernière valeur qui peut être utilisée est la distance  $d50$ . Si cette distance est définie en ajustant les données exprimées par rapport au premier poil émergeant, la distance  $d50 \times 2$  correspondrait à la distance à laquelle le plateau de la courbe est atteint. Choisir la zone de mesure, de la taille moyenne des poils racinaires, à une distance  $d50 \times 2$  par rapport au premier poil émergeant, serait donc moins subjectif.

### VI.2.1.c. Mise à l'épreuve du système de mesure

Afin de tester ce système de mesure, des racines de *M. truncatula* sauvages R108 ont été mises à pousser dans les mêmes conditions, puis traitées de différentes manières (Fig. 38A). Un premier lot de racines n'a reçu aucun traitement, un deuxième lot a été traité avec de l'eau, un troisième lot avec de l'eau additionnée en NF à 10nM et un quatrième avec de



**Figure 38. Effet du facteur Nod et de l'auxine sur la taille des poils racinaires de Medicago**

Des racines de Medicago R108 ont été traitées avec du facteur Nod à 10nM (données magenta), de l'IAA à 10 $\mu$ M (données oranges) ou de l'eau (condition contrôle - données roses), puis observées 18h après traitement. Un lot de racines n'ayant subi aucun traitement a également été analysé (données vertes). **A.** Images projetées en Z d'observations de racines 18h après différents traitements. Les acquisitions ont été faites avec un microscope à éclairage diascopique. Les pointillés rouges indiquent la zone analysée en E. Echelle: 1mm. **B.** Distance, par rapport à la pointe racinaire, des premiers poils émergeant. PR: pointe racinaire. **C.** Pente de la tangente au point d'inflexion de la courbe d'équation de Boltzmann ajustant les données. Cette pente reflète indirectement la vitesse de croissance des poils racinaires. **D.** Longueur maximale des poils racinaires estimée par l'ajustement des données avec l'équation de Boltzmann. **E.** Longueur des poils racinaires dans une zone distante de 3,5 à 4mm par rapport au premier poil émergeant. **F.** Longueur des poils racinaires dans une zone distante de  $2 \cdot D_{50}$  à  $2 \cdot D_{50} + 500\mu$ m par rapport au premier poil émergeant. **B-C.** Données sous la forme de moyennes  $\pm$  écart-type. **D-F.** Les croix dans les diagrammes en boîte indiquent la valeur moyenne des données. Les points présentent les valeurs atypiques déterminées par la méthode de Tukey. **C, D et F.** Pour toutes les conditions (sauf IAA), les ajustements ont été faits avec des données obtenues à une distance de 400 à 6000 $\mu$ m de la pointe racinaire. Pour la condition IAA, seules les données obtenues entre 400 à 3000 $\mu$ m de la pointe racinaire ont été ajustées. Avant l'ajustement, les données ont été homogénéisées en fonction de la distance du premier poil émergeant par rapport à la pointe racinaire. **B-F.** Pour chacune des deux répliques biologiques analysées, 6 à 8 racines ont été mesurées. Les mesures faites à gauche et à droite de la racine ont été confondues. **E.** Toutes racines confondues, effectifs de 88 à 104 points de mesures pour chaque réplique biologique (33 pour la condition IAA). **F.** Toutes racines confondues, effectifs de 56 à 96 points de mesures pour chaque réplique biologique. Le test de Mann et Whitney a été effectué pour comparer les différentes conditions (\* 0.01<p<0.05; \*\* 0.001<p<0.01; \*\*\* p<0.001).

l'eau supplémentée en une forme d'auxine\*. Ces racines ont ensuite été analysées selon le protocole présenté précédemment. Dans un premier temps, la distance du premier poil racinaire émergeant par rapport à la pointe racinaire a été mesurée (Fig. 38B). On peut observer que ce premier poil émerge à une plus grande distance de la pointe racinaire chez les plantes traitées avec de l'eau que chez les plantes non traitées. A l'inverse, cette distance est significativement plus courte chez les plantes traitées avec de l'IAA que chez les plantes traitées avec de l'eau. Le traitement aux NFs, lui, n'influence pas cette distance comparée à sa condition contrôle. La zone entre le premier poil et la pointe racinaire inclue les zones de division et d'élongation. On peut dire que les traitements à l'eau ou à l'auxine ont modifié le développement d'une de ces zones, soit en augmentant le taux de division dans la zone de division, soit en augmentant le taux d'élongation des cellules dans la zone d'élongation. Comme le traitement à l'eau s'apparente à un choc hypoosmotique, on peut émettre l'hypothèse que les cellules en élongation vont avoir une pression de turgescence beaucoup plus élevée. Ainsi, comme leur paroi n'est pas encore totalement formée, elles auront tendance à être beaucoup plus longues. Concernant le traitement à l'auxine, on pouvait s'attendre à un tel phénotype puisqu'à la forte concentration utilisée ici, cette hormone est connue pour inhiber l'élongation racinaire (Eliasson *et al.*, 1989; Breakspear *et al.*, 2014).

Le traitement à l'auxine a aussi un effet sur la pente au point d'inflexion de la courbe de Boltzmann ajustant les données. En effet, cette pente est beaucoup plus importante chez les plantes traitées à l'auxine comparée aux plantes traitées à l'eau (Fig. 38C). Cependant, aucune différence ne peut être observée entre les autres traitements. Un traitement à l'auxine semble donc augmenter la vitesse de croissance des poils racinaires. Il faut cependant noter que si on

---

\* L'auxine est une hormone végétale par exemple communément utilisée pour bouturer les plantes lorsqu'elle est utilisée en faible concentration. Un homologue synthétique de cette hormone a cependant un passé moins glorieux. En effet, il s'agit du composé majoritaire de l'herbicide nommé "agent orange", utilisé par exemple lors de la guerre du Viêt Nam pour défolier les forêts après un épandage de masse au cours d'opérations militaires.

corrigeait les valeurs de ces pentes avec la vitesse de croissance des racines, ces différences ne seraient peut-être pas les mêmes. En effet, les racines traitées à l'auxine semblent pousser plus lentement que les racines non traitées.

Concernant la taille des poils racinaires, quel que soit le mode de calcul utilisé, on observe toujours les mêmes tendances entre les différents traitements (Fig. 38D-F). En effet, les plantes non traitées possèdent toujours les poils les plus grands comparés aux poils racinaires des plantes traitées avec de l'eau. A l'inverse, les plantes traitées à l'auxine possèdent des poils plus courts que les plantes traitées à l'eau. Enfin, les plantes traitées aux NFs possèdent des poils de la même taille que les plantes traitées à l'eau. Les traitements à l'eau ou à l'auxine inhibent donc la croissance des poils, tandis que les NFs n'ont aucun effet sur cette croissance. On pouvait s'attendre à ce résultat pour le traitement à l'auxine. En effet, il a été montré qu'à faible concentration cette hormone induisait l'élongation des poils racinaires, tandis que cette élongation était inhibée avec de fortes concentrations d'auxine comme utilisées ici (Kubeš *et al.*, 2012). Pour le traitement à l'eau, on peut expliquer ce résultat avec le fait que même après avoir retiré l'eau du milieu de culture après traitement, l'humidité du milieu reste tout de même plus élevée que celle du milieu non traité. Les plantes poussant dans le milieu à forte humidité ont donc moins besoin d'augmenter leur surface d'échange avec l'extérieur pour capter cette eau. Les racines réduiront donc la taille de leurs poils.

Pour la suite des études, nous utiliserons préférentiellement la taille moyenne des poils racinaires entre une distance de  $(d50 \times 2)$ mm et  $(d50 \times 2 + 0,5)$ mm par rapport au premier poil émergeant. En effet, la longueur  $L_{max}$  estimée avec la courbe de Boltzmann fait perdre la variabilité de la taille des poils qui peut exister dans la mesure. Or c'est potentiellement dans cette variabilité qu'il sera possible de trouver des différences entre deux groupes quasi

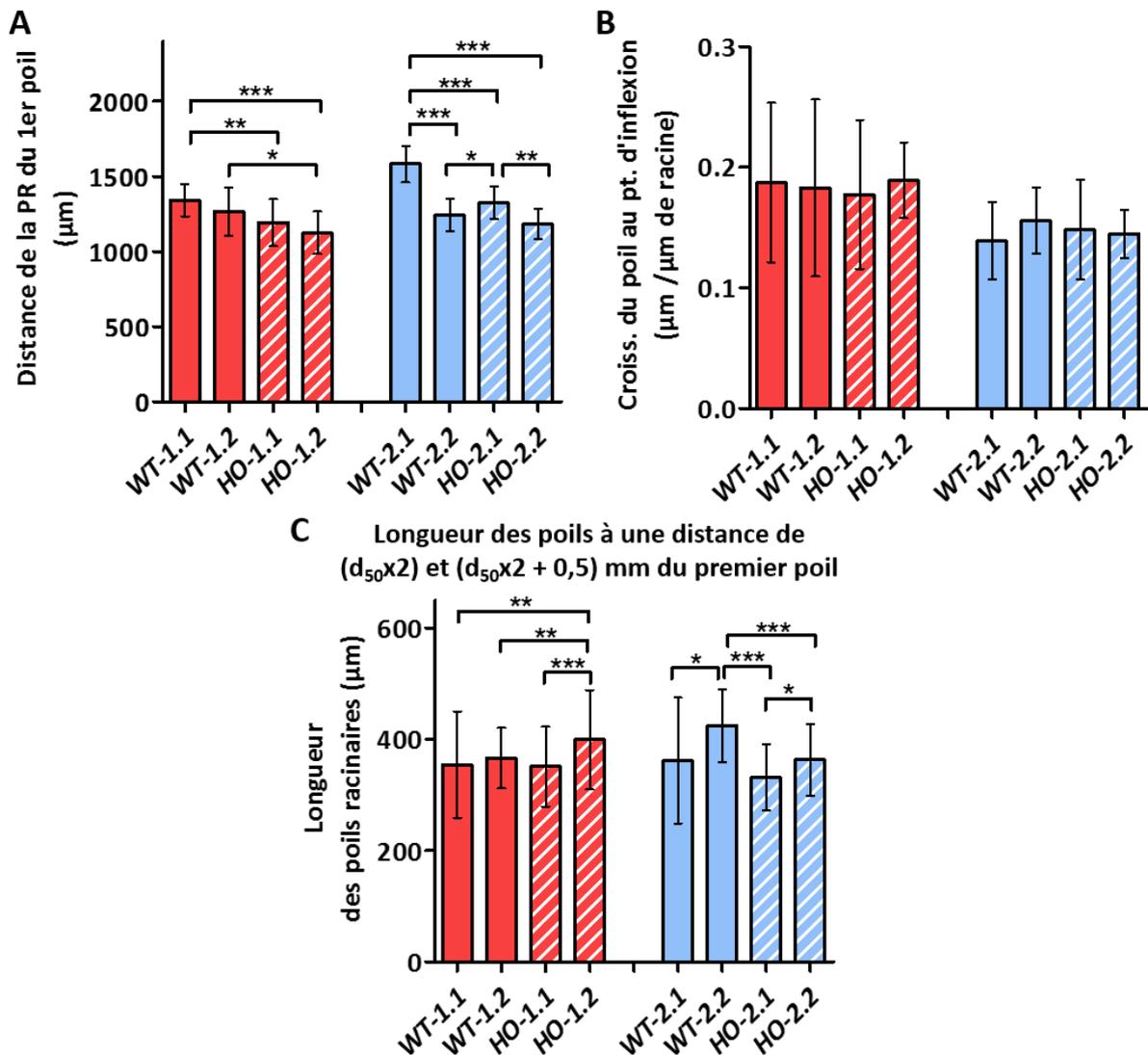
similaires. La moyenne présentée dans la figure 38E ne sera pas non plus utilisée pour les raisons évoquées dans la partie VI.2.1.b.

### **VI.2.2. Effet de *MtMSL2.4* sur la croissance des poils racinaires et sur les zones de division et d'élongation racinaire**

Comme nous l'avons vu lors de la partie précédente, la mesure de la taille des poils racinaires sera exprimée en fonction de leurs distances du premier poil émergeant. Le fait de relever cette information permet également d'avoir un aperçu de l'état des zones de division ou d'élongation. La taille des poils racinaires, ainsi que la distance du premier poil émergeant par rapport à la pointe racinaire, seront donc analysées chez des plantes sauvages comparées aux plantes portant les allèles mutants *Mtmsl2.4-1* ou *Mtmsl2.4-2*.

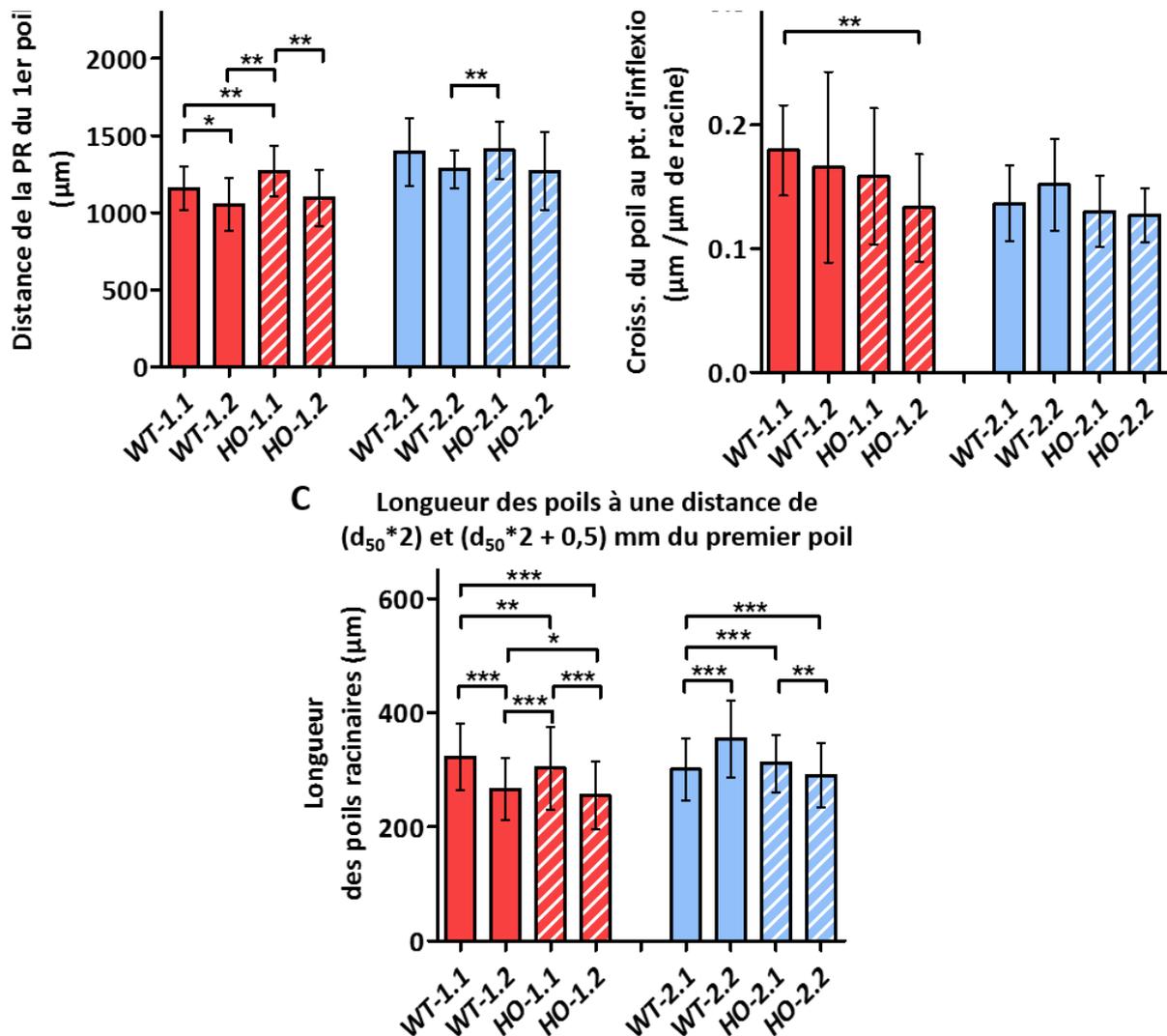
#### **VI.2.2.a. Etude de phénotypes en conditions standards dépourvues en azote**

Dans un premier temps, afin de savoir si *MtMSL2.4* pourrait être utile pour la croissance des poils racinaires et dans le développement des zones de division et d'élongation, ces phénotypes ont été testés dans un contexte où la plante est réceptive à la symbiose avec des rhizobia. Chez les plantes de la lignée 1, bien que la distance du premier RH par rapport à la pointe racinaire soit plus importante chez les racines WT-1.1 comparée aux deux mutants HO-1.1 et HO-1.2, cette distance chez le sauvage WT-1.2 n'est, elle, pas différente de celle chez le mutant HO-1.1 (Fig. 39A). On peut faire à peu près les mêmes observations chez les plantes de la lignée 2. Concernant la pente au point d'inflexion, aucune différence significative n'est non plus observée entre les sauvages et les mutants des deux lignées (Fig. 39B). Il n'existe pas non plus de corrélation entre la présence des allèles mutants et les différences significatives observées lorsqu'on s'intéresse à la longueur des poils racinaires (Fig. 39C). Dans des conditions standards dépourvues d'azote, *MtMSL2.4* ne semble donc pas avoir de rôle ni dans le développement des zones de division ou de différenciation, ni dans la croissance des poils racinaires.



**Figure 39. Effet de *MtMSL2.4* sur la croissance des poils racinaires**

Pour chacune des lignées *Tnt1* utilisées, quatre populations R3, issues d'autant de lots de graines R2 indépendants, ont été analysées. Deux d'entre elles sont sauvages sur le locus *MtMSL2.4* (*WT-1.1* et *WT-1.2* pour la première lignée (barres rouges), *WT-2.1* et *WT-2.2* pour la deuxième (barres bleues)). Les deux autres possèdent à l'état homozygote les allèles mutants *Mtmsl2.4-1* ou *Mtmsl2.4-2* sur le locus *MtMSL2.4* (*HO-1.1* et *HO-1.2* pour la première lignée (barres hachurées rouges), *HO-2.1* et *HO-2.2* pour la deuxième (barres hachurées bleues)). Les racines cultivées *in vitro* ont été observées à l'aide d'un microscope à éclairage diascopique. Les acquisitions résultantes ont permis de déterminer différents paramètres de croissance du poil absorbant. **A.** Mesure de la distance du premier poil par rapport à la pointe racinaire.  $n = 5$  à 8 racines par population R3. **B.** Mesure de la pente au point d'inflexion de la courbe de Boltzmann, ajustant les données obtenues par mesure automatique de la longueur des poils racinaires.  $n = 4$  à 7 racines par population R3. **C.** Mesure de la longueur des poils racinaires dans une zone distante de  $2 \cdot D_{50}$  à  $2 \cdot D_{50} + 500 \mu\text{m}$  par rapport au premier poil émergeant. Dans la zone concernée, en moyenne 66 points de mesures ont été analysés pour chaque population R3.  $n = 3$  à 7 racines par population R3. Toutes les données sont sous la forme de moyennes  $\pm$  écart type d'une seule répétition biologique. Le test Mann et Whitney a été effectué pour comparer les sauvages et mutants issus d'une même lignée *Tnt1* (\*  $0.01 < p < 0.05$ ; \*\*  $0.001 < p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ).



**Figure 40. Effet de *MtMSL2.4* sur la croissance des poils racinaires en réponse au facteur Nod**

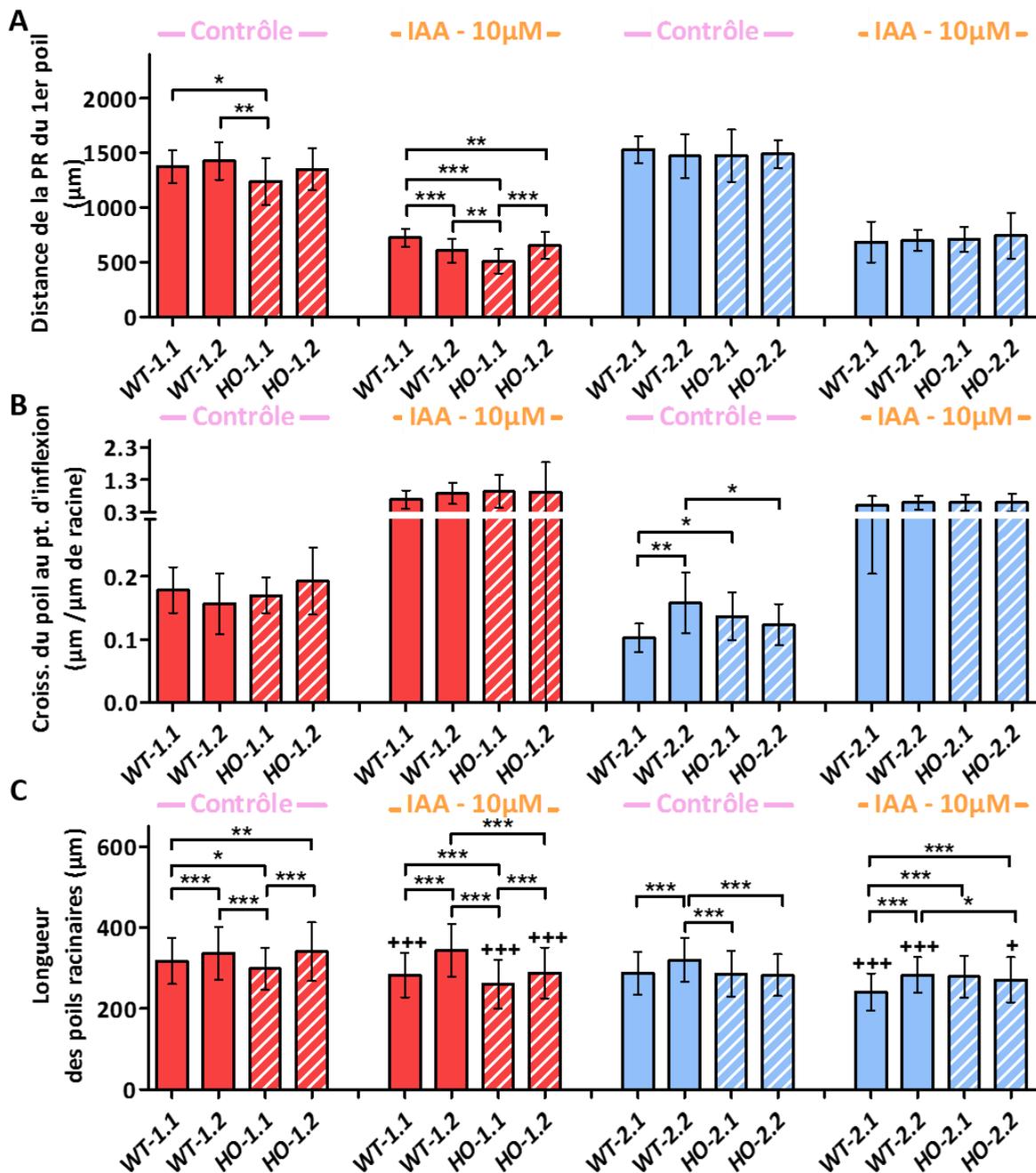
Pour chacune des lignées *Tnt1* utilisées, quatre populations R3, issues d'autant de lots de graines R2 indépendants, ont été analysées. Deux d'entre elles sont sauvages sur le locus *MtMSL2.4* (*WT-1.1* et *WT-1.2* pour la première lignée (barres rouges), *WT-2.1* et *WT-2.2* pour la deuxième (barres bleues)). Les deux autres possèdent à l'état homozygote les allèles mutants *Mtmsl2.4-1* ou *Mtmsl2.4-2* sur le locus *MtMSL2.4* (*HO-1.1* et *HO-1.2* pour la première lignée (barres hachurées rouges), *HO-2.1* et *HO-2.2* pour la deuxième (barres hachurées bleues)). Les racines cultivées *in vitro* ont été traitées avec une solution de facteur Nod à 10 nM, puis observées 24 h après traitement à l'aide d'un microscope à éclairage diascopique. Les acquisitions résultantes ont permis de déterminer différents paramètres de croissance du poil absorbant. **A.** Mesure de la distance du premier poil par rapport à la pointe racinaire.  $n = 5$  à 8 racines par population R3 et par réplique biologique. **B.** Mesure de la pente au point d'inflexion de la courbe de Boltzmann, ajustant les données obtenues par mesure automatique de la longueur des poils racinaires.  $n = 5$  à 8 racines par population R3 et par réplique biologique. **C.** Mesure de la longueur des poils racinaires dans une zone distante de  $2 * D_{50}$  à  $2 * D_{50} + 500 \mu\text{m}$  par rapport au premier poil émergeant. Dans la zone concernée, en moyenne 73 points de mesures, par répétition biologique, ont été analysés pour chaque population R3.  $n = 3$  à 8 racines par population R3 par réplique biologique. Toutes les données sont sous la forme de moyennes  $\pm$  écart type de deux répétitions biologiques. Le test Mann et Whitney a été effectué pour comparer les sauvages et mutants issus d'une même lignée *Tnt1* (\*  $0.01 < p < 0.05$ ; \*\*  $0.001 < p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ).

**VI.2.2.b. Etude de phénotypes de racines traitées aux NFs**

Nous avons vu précédemment que les NFs ne semblaient pas modifier la croissance des poils racinaires, ni la taille des zones de division ou de différenciation, dans des conditions standards de croissance, dépourvues d'azote (Fig. 38). Mais peut être que cette croissance n'est pas perturbée car des éléments cellulaires ajustent efficacement les effets que les NFs ont sur elle. Nous cherchons donc ici à savoir si *MtMSL2.4* peut faire partie de ces éléments régulateurs. L'absence de *MtMSL2.4* n'est pas corrélée avec les différences de distances, du premier poil par rapport à la pointe racinaire, observées chez la lignée 1 (Fig. 40A). Dans la lignée 2, presque aucune différence significative n'existe également entre les racines sauvages et mutantes. La croissance du poil au point d'inflexion n'est pas non plus impactée par l'absence de *MtMSL2.4* (Fig. 40B). On ne peut non plus conclure sur une différence de taille de poils racinaires entre les plantes mutantes et sauvages au locus du gène *MtMSL2.4* (Fig. 40C). *MtMSL2.4* n'a donc pas de rôle dans la régulation de la croissance des poils racinaires et des zones de division ou de différenciation, chez des racines traitées avec du NF.

**VI.2.2.c. Etude de phénotypes de racines traitées à l'auxine**

Comme *MtMSL2.4* ne semble pas avoir de rôles dans des conditions où la croissance racinaire n'est pas perturbée ou peu perturbée, on peut se demander si cela peut être le cas dans des conditions où la croissance est fortement perturbée. Nous avons vu précédemment qu'en présence d'une forte concentration d'auxine, la croissance racinaire et le développement des poils racinaires étaient fortement perturbés (Fig. 38). Nous avons donc testé ces mêmes conditions chez des plantes mutées ou non dans le gène *MtMSL2.4*. La distance du premier poil par rapport à la pointe racinaire n'est pas significativement différente entre les racines sauvages ou mutantes chez les plantes de la lignée 2, que ce soit dans la condition contrôle ou dans la condition avec auxine (Fig. 41A). Aucune corrélation ne peut non plus être faite entre les différences de distance observées et la présence de *MtMSL2.4*



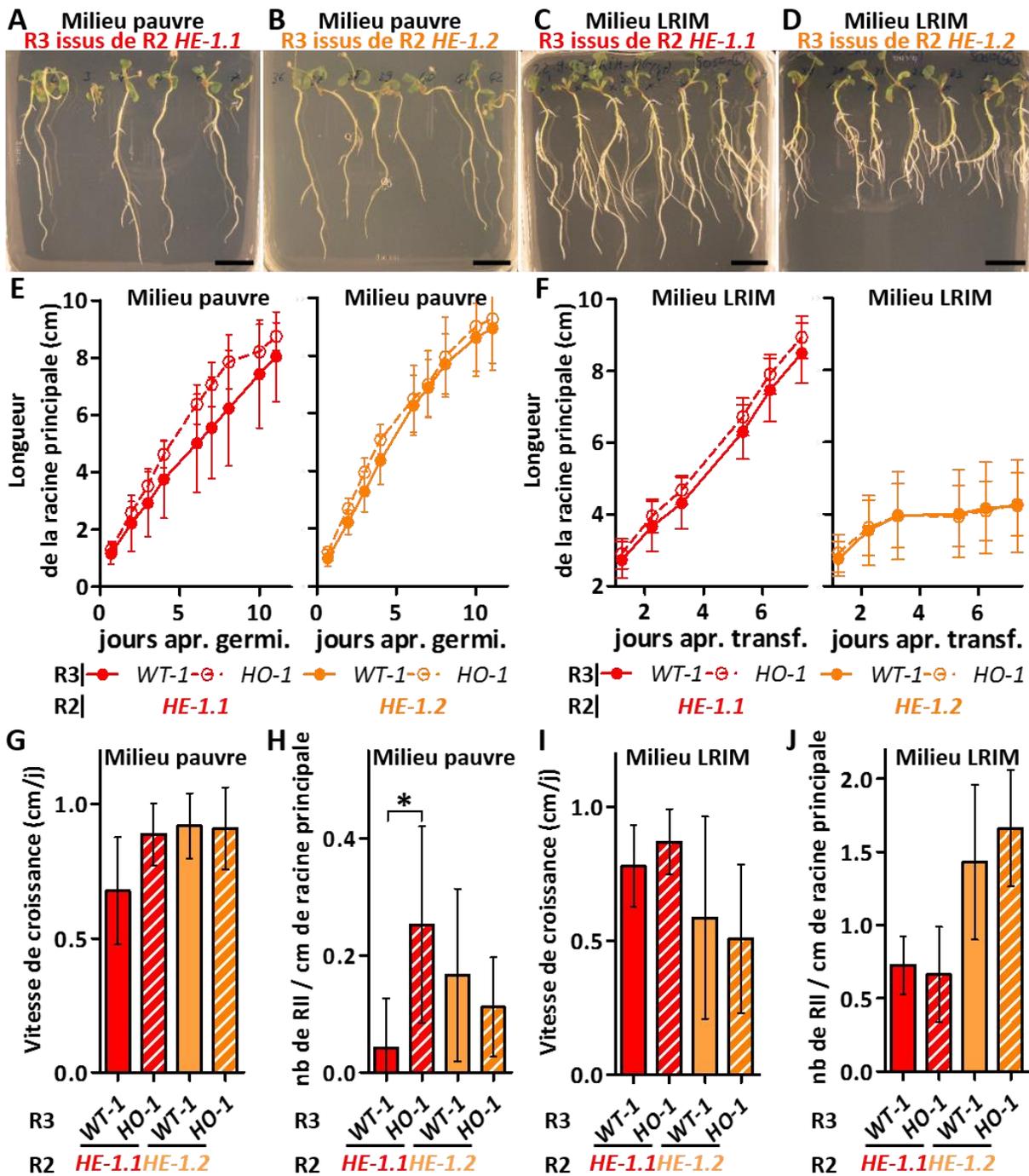
**Figure 41. Effet de *MtMSL2.4* sur la croissance des poils racinaires en réponse à l'auxine**

Pour chacune des lignées Tnt1 utilisées, quatre populations R3, issues d'autant de lots de graines R2 indépendants, ont été analysées. Deux d'entre elles sont sauvages sur le locus *MtMSL2.4* (WT-1.1 et WT-1.2 pour la première lignée (barres rouges), WT-2.1 et WT-2.2 pour la deuxième (barres bleues)). Les deux autres possèdent à l'état homozygote les allèles mutants *Mtmsl2.4-1* ou *Mtmsl2.4-2* sur le locus *MtMSL2.4* (HO-1.1 et HO-1.2 pour la première lignée (barres hachurées rouges), HO-2.1 et HO-2.2 pour la deuxième (barres hachurées bleues)). Les racines cultivées *in vitro* ont été traitées avec de l'eau (contrôle) ou une solution de IAA à 10 µM, puis observées 19 h après traitement à l'aide d'un microscope à éclairage diascopique. Les acquisitions résultantes ont permis de déterminer différents paramètres de croissance du poil absorbant. **A.** Mesure de la distance du premier poil par rapport à la pointe racinaire. **B.** Mesure de la pente au point d'inflexion de la courbe de Boltzmann, ajustant les données obtenues par mesure automatique de la longueur des poils racinaires. **C.** Mesure de la longueur des poils racinaires dans une zone distante de  $2 \cdot D_{50}$  à  $2 \cdot D_{50} + 500 \mu\text{m}$  par rapport au premier poil émergeant. Dans la zone concernée, en moyenne 80 points de mesures, par répétition biologique, ont été analysés pour chaque population R3. Toutes les données sont sous la forme de moyennes  $\pm$  écart type de  $n = 3$  à 8 racines par population R3 et par réplique biologique. Deux répliques biologiques ont été faites. Le test Mann et Whitney a été effectué pour comparer les sauvages et mutants issus d'une même lignée Tnt1 (\*  $0.01 < p < 0.05$ ; \*\*  $0.001 < p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ). En C, ce test a été réalisé pour comparer chaque population R3 traitées avec de l'auxine avec la même population traitée avec de l'eau (+  $0.01 < p < 0.05$ ; +++  $p < 0.001$ ).

chez les plantes de la lignée 1. La pente au point d'inflexion, reflétant indirectement la croissance des poils racinaires, n'est pas non plus impactée par l'absence de *MtMSL2.4* (Fig. 41B). On ne peut pas non plus faire de corrélation entre l'absence de *MtMSL2.4* et les différences de taille de poils racinaires observées chez les deux lignées et les deux conditions testées (Fig. 41C). *MtMSL2.4* n'a donc pas de rôle dans la régulation de la croissance des poils racinaires et des zones de division ou de différenciation, dans des conditions où les racines ont été traitées avec de fortes concentrations d'auxine.

### **VI.3. *MtMSL2.4* modifie-t-il la croissance de la racine principale et l'émergence des racines secondaires?**

L'analyse des fusions transcriptionnelles nous ont montré que le promoteur de *MtMSL2.4* était actif dans les pointes des racines principales et secondaires, mais également dans les tissus périphériques du cylindre central, notamment en face des pôles de xylème. Nous avons alors émis l'hypothèse que *MtMSL2.4* pouvait avoir un rôle dans la croissance des racines et l'émergence des racines secondaires. Il est donc intéressant de tester ces phénotypes avec les lignées de mutants que nous avons à disposition. Pour cela, deux milieux de croissance ont été utilisés. Le premier est un milieu pauvre et le deuxième est un milieu riche en sucre, connu pour induire la formation d'un grand nombre de racines secondaires (Fig. 42A-D) (milieu LRIM, Gonzalez-Rizzo *et al.*, 2006). Concernant les plantes analysées, nous avons cependant utilisé une stratégie différente de la précédente. En effet, nous avons cette fois-ci étudié ces phénotypes sur les descendants par autofécondation de plantes qui ont été identifiées comme hétérozygotes au locus de *MtMSL2.4*. Dans ces descendants, on s'attend donc à obtenir un mélange d'homozygotes mutants ou sauvages et d'hétérozygotes à ce locus. Nous avons donc analysé les phénotypes de croissance racinaire de chacune des plantes semées, puis nous avons analysé leurs génotypes sur le gène *MtMSL2.4* afin d'identifier les plantes homozygotes mutantes et sauvages. Seules les populations de descendants



**Figure 42. Croissance de la racine principale et des racines latérales chez les mutants *Mtmsl2.4***

Deux populations R3, dont l'allèle mutant *Mtmsl2.4-1* ségrège, ont été analysées. Elles sont issues de deux lots indépendants de graines R2 produites par des plantes mères hétérozygotes sur le locus *MtMSL2.4* (HE-1.1 et HE-1.2). Ces populations ont été mises à croître sur un milieu pauvre (A, B, E, G et H) ou sur un milieu LRIM (C, D, F, I et J). A-D. Exemples de prises de vue utilisées pour la mesure de différents phénotypes, aux temps 10 ou 7 j de croissance sur milieu pauvre ou milieu LRIM respectivement; A et C: plantes issues du lot de graines HE-1.1, B et D: plantes issues du lot de graines HE-1.2; échelles : 2 cm. E et F. Evolution au cours du temps de la longueur des racines principales. G et I. Vitesse de croissance de la racine principale, entre 0 et 8 j ou 0 et 3 jours de croissance sur milieu pauvre ou milieu LRIM respectivement. H et J. Nombre de racines secondaires formées en fonction de la taille de la racine principale, aux temps 10 j ou 7 j de croissance sur milieu pauvre ou milieu LRIM respectivement. RII: racine secondaire. Seuls les phénotypes des plantes homozygotes sauvages (WT-1) ou mutantes (HO-1) sur le locus *MtMSL2.4* sont mentionnés dans les figures. E-J. Les résultats présentent une moyenne ± écart-type. 4 à 13 ou 8 à 14 racines de plantes poussant sur milieu pauvre ou sur milieu LRIM ont respectivement été étudiées. Le test Mann et Whitney a été effectué pour comparer les sauvages et mutants issus d'un même lot de graines (\* 0.01 < p < 0.05).

de deux plantes hétérozygotes de la lignée 1 ont été analysées. Pour simplifier l'écriture, ces deux plantes de la lignée 1 ont été appelées HE-1.1 et HE-1.2.

La croissance des racines a été analysée au cours du temps. Que ce soit en milieu pauvre ou en milieu LRIM, la taille des racines principales des descendants homozygotes sauvages de la plante HE-1.1 n'est significativement pas différente de celle des descendants homozygotes mutants de cette plante (Fig. 42E et F). Cette absence de différence se retrouve également quand on analyse la vitesse de croissance de ces racines (Fig. 42G et I). Dans un milieu pauvre, les descendants homozygotes sauvages et mutants de la plante HE-1.2 ne présentent pas non plus de différence de taille de racine principale, ni de vitesse de croissance (Fig. 42E-G). On peut cependant remarquer que dans un milieu LRIM, les descendants de la plante HE-1.2 ont une croissance de racine principale qui ralentit au bout de 3 jours de croissance. Ce ralentissement est cependant observé que ce soit pour les racines sauvages ou mutantes (Fig. 42F). De plus, la vitesse de croissance de la racine principale, pendant les trois premiers jours de culture en milieu LRIM, n'est pas non plus modifiée quel que soient les descendants de la plante HE-1.2 (Fig. 42I). On peut donc conclure que l'absence de *MtMSL2.4* ne modifie pas la croissance des racines principales, que ce soit en milieu riche ou en milieu pauvre. Enfin, la croissance sur milieu LRIM des descendants de la lignée HE-1.2 est différente de celle des descendants de la lignée HE-1.1 (Fig. 42F). On peut donc penser qu'un autre gène, que *MtMSL2.4*, a été affecté par une insertion chez la plante HE-1.2, et que la mutation de ce gène entraîne une perturbation de la croissance racinaire sur un milieu LRIM.

A part la faible différence observée pour les descendants de la plante HE-1.1 poussant sur milieu pauvre, aucune différence de nombre de racines latérales ne peut être observée en comparant les mutants et les sauvages sur le locus *MtMSL2.4* (Fig. 42H et J). On peut donc conclure que l'absence de *MtMSL2.4* n'influence pas non plus l'émergence des racines

latérales.

### VI.4. Conclusion et discussion

Grâce à l'ensemble des analyses phénotypiques réalisées, il a été montré que *MtMSL2.4* n'influence pas le nombre de poils racinaires déformés par les NFs, ni le nombre de nodules formés après une infection par des rhizobia. De plus, bien qu'il soit présent dans les poils racinaires, ce canal ne semble pas influencer leur croissance dans les conditions testées, c'est-à-dire un milieu standard sans azote, un traitement aux NFs et un traitement à l'auxine. Enfin, *MtMSL2.4* n'influence pas non plus la croissance des racines principales et l'émergence des racines secondaires dans un milieu pauvre ou dans un milieu riche.

Cette absence de phénotype pourrait être expliquée par une mauvaise extinction de l'expression de *MtMSL2.4*. Aussi, afin d'écarter cette hypothèse, il serait intéressant de vérifier si les transcrits de *MtMSL2.4* sont bien absents chez ces mutants. De plus, ces analyses ont été faites sur des plantes portant d'autres insertions dans leurs génomes (en théorie une trentaine pour la lignée 1 et une cinquantaine pour la lignée 2 – cf. matériels et méthodes). Ces insertions, dont les combinaisons ne sont pas les mêmes selon les plantes étudiées, peuvent ainsi induire de la variabilité dans les analyses comme on a pu le constater à plusieurs reprises. Il est donc nécessaire de nettoyer le fond génétique de ces lignées. Des croisements successifs de celles-ci avec des plantes sauvages sont actuellement en cours pour atteindre ce but. Nous avons actuellement à disposition les graines F2 issues de plantes génotypées hétérozygotes pour les insertions d'intérêt, ces plantes étant elles-mêmes issues de deux croisements successifs avec un sauvage R108 (cf. matériels et méthodes). On ne peut pas non plus exclure une redondance fonctionnelle des autres *MtMSL* présents dans les poils racinaires. Dans cet objectif, des plantes portant des insertions à la fois dans les gènes *MtMSL2.4* et *MtMSL2.1*, ont commencé à être produites. Il faudrait maintenant refaire les

analyses phénotypiques sur ces plantes.

Il peut aussi être envisagé que les *MtMSL* aient un rôle dans des conditions "d'urgence". Aussi, en analysant des phénotypes de longues périodes après un traitement, il est possible que nous n'ayons pas pu observer le réel phénotype de ces mutants. Une possibilité pour étudier ce rôle serait d'observer sur une échelle de temps courte l'action d'un traitement sur le développement des poils racinaires, par exemple au niveau de leurs mouvements cytoplasmiques ou de l'intensité de gonflement des poils en réponse aux NFs.

Enfin, cette partie a également permis de présenter un aspect plus technique représenté par le développement d'un système semi-automatique de mesure des poils racinaires.



# Chapitre VII.

## Conclusion générale et discussion

La détection de contraintes mécaniques par les cellules a déjà été mise en évidence dans différents modèles. Par exemple, en plus d'une reconnaissance liée à un système ligand/récepteur, les macrophages sont aussi capables de reconnaître leur cible selon leur rigidité. Ils ont ainsi une préférence pour les cibles plus rigides (Beningo et Wang, 2002). Les hyphes de champignons sont aussi capables de distinguer leur site de pénétration par le touché. En effet, en faisant croître le pathogène *Uromyces appendiculatus* sur un support artificiel, celui-ci forme préférentiellement des appressoria si les irrégularités de ce support sont d'une hauteur d'environ 0,5 $\mu$ m (Hoch *et al.*, 1987). De manière intéressante chez la plante hôte de ce pathogène, la dépression en direction de l'ostiole d'un stomate, point d'entrée de l'appressorium, présente une hauteur similaire. Ces détections cellulaires de contraintes mécaniques sont illustrées ici pour des Métazoaires ou des champignons. Cependant, de telles observations peuvent aussi être faites dans le règne végétal.

La détection d'une force appliquée localement chez les plantes paraît intuitive dans le cas de la Dionée ou de l'Utriculaire. En effet, ces plantes ont un système de détection de proies par le touché qui peut se voir à l'œil nu: il s'agit de poils sensitifs se trouvant à la surface de leurs organes de capture respectifs (une feuille modifiée dans les deux cas). Chez les plantes moins atypiques, une adaptation aux contraintes mécaniques environnantes est aussi visible. Des plants de blés protégés du vent auront par exemple une tige plus fine et plus flexible que celle de blés non protégés (Crook et Ennos, 1996). Au cours de l'introduction de ce manuscrit

de thèse, nous avons pu voir que des interactions biotiques chez les plantes étaient aussi capables de générer des contraintes mécaniques, dont la perception peut se faire même à l'échelle cellulaire. Enfin, le développement de la plante en elle-même peut aussi engendrer des contraintes mécaniques locales auxquelles la plante s'adapte en permanence (Hamant *et al.*, 2008). La recherche de capteurs de ces contraintes mécaniques est donc un domaine de plus en plus exploré. Parmi les différents types de capteurs pouvant exister, les canaux mécanosensibles de la famille des MSL sont de bons candidats.

Pour étudier les MSL, un modèle original a été utilisé dans le cadre de cette thèse: le poil racinaire de la légumineuse *M. truncatula*. Il a été montré que celui-ci pouvait présenter plusieurs intérêts (Libault *et al.*, 2010). En effet, les poils racinaires occupent une place importante dans le prélèvement des nutriments dans le sol. Ils représentent aussi, chez les légumineuses, le site initial d'invasion des racines par les bactéries fixatrices d'azote lors d'interactions symbiotique. De plus, un poil racinaire se développe à partir d'une seule cellule épidermique. Cette particularité est partagée par peu d'autres cellules, telles que les tubes polliniques, les axones et les hyphes des champignons filamenteux. Enfin, leur facilité d'accès permet d'observer des phénomènes ayant lieu à une échelle très locale. En plus d'avoir un rôle dans la nutrition de la plante, qu'elle soit minérale ou symbiotique, le poil racinaire est donc aussi un modèle intéressant de biologie cellulaire. Nous avons donc exploité ce modèle chez *M. truncatula* pour étudier le rôle des *MtMSL* lors des étapes précoces de la symbiose, mais aussi lors du développement de ces cellules.

### VII.1. Résultats principaux

Par des études *in silico*, nous avons pu définir la famille des MSL chez *M. truncatula*. Cette famille est composée de 10 membres répartis en deux classes. La première classe comporte 4 *MtMSL* proches de *AtMSL1* et *AtMSL2,3* qui sont respectivement localisés dans la

membrane des mitochondries et des plastes (Haswell et Meyerowitz, 2006; Lee *et al.*, 2016). On s'attend donc à ce que les *MtMSL* de cette classe soient aussi adressés dans les plastes et les mitochondries. La deuxième classe comprend 6 *MtMSL* proches de *AtMSL8*, 9 et 10 qui ont tous été identifiés comme localisés dans la membrane plasmique mais aussi dans des endomembranes (Haswell *et al.*, 2008; Hamilton *et al.*, 2015). Nous nous sommes donc focalisé sur les *MtMSL* de cette deuxième classe, puisque la membrane plasmique est la deuxième barrière rencontrée par les rhizobia dans les poils racinaires, après la paroi pecto-cellulosique.

L'analyse de la localisation générale de l'expression de ces candidats nous a révélé que les *MtMSL* étaient exprimés dans tous les organes de la plante. Dans certains cas, cette expression semble modulée de manière différente selon le candidat étudié. C'est par exemple le cas de *MtMSL2.1* et *MtMSL2.4* lors d'un stress hydrique. Une approche plus poussée pour révéler la localisation tissulaire de cette expression dans les tissus racinaires a été faite à l'aide d'une fusion transcriptionnelle. Elle nous a montré que *MtMSL2.4* et *MtMSL2.5* étaient exprimés dans les pointes des racines principales et secondaires, mais également dans les tissus périphériques du cylindre central, tels que l'endoderme, notamment en face des pôles de xylèmes. Cette expression est également localisée à l'apex des nodules, mais aussi dans leurs tissus vasculaires.

Dans le contexte de notre étude, en collaboration avec d'autres équipes de recherche dans le cadre d'un projet ANR, nous avons aussi pu mettre en évidence que deux *MtMSL* étaient exprimés dans les poils racinaires: *MtMSL2.1* et *MtMSL2.4* (Damiani *et al.*, 2016). Plusieurs autres études montrent également la même tendance (Breakspear *et al.*, 2014; Jardinaud *et al.*, 2016). Lors d'un traitement de racines avec des NFs, l'expression de *MtMSL2.1* et de *MtMSL2.4* ne semble pas modifiée. Seule une étude réalisée de manière indépendante

montre une diminution des transcrits de *MtMSL2.4* après 24h de traitement aux NFs (Breakspear *et al.*, 2014).

*MtMSL2.4* étant le candidat le plus exprimé dans les poils racinaires, nous nous sommes intéressés à celui-ci en particulier. Des études de fusions traductionnelles, sous le contrôle de promoteurs fort ou endogène, nous ont montré que cette protéine était localisée à la membrane plasmique et dans les endomembranes. Cette protéine membranaire a aussi été identifiée comme un canal mécanosensible par des techniques de mesure électrophysiologiques. De manière intéressante, la conductance de ce canal est plus élevée que celle mesurée pour *AtMSL9* et *10* dans les mêmes conditions. De plus, certains profils de ce canal semblent correspondre aux canaux MS qui ont été identifiés dans les protoplastes de poils racinaires de *M. truncatula* dans les mêmes conditions.

Différentes stratégies d'extinction de gènes ont été envisagées. Des amiARN ciblant les transcrits de *MtMSL2.4* ont été clonés et des mutants d'insertion dans le gène *MtMSL2.4* ont été isolés. Ces derniers permettant d'avoir une inactivation des gènes d'intérêt de manière stable au cours des générations, nous les avons privilégiés pour élaborer plusieurs analyses phénotypiques. L'objectif ici était de rechercher le rôle de ce canal dans différents cas de figures. Il a été montré que *MtMSL2.4* n'intervenait pas dans la déformation et la croissance des poils racinaires après un traitement aux NFs. De même, *MtMSL2.4* ne semble pas avoir de rôles dans le développement des nodules. Grâce à un système de mesure semi-automatique de la taille des poils racinaires, développé dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes également intéressés au rôle de *MtMSL2.4* dans la croissance des poils racinaires dans différentes conditions. Cependant, ce canal n'intervient pas non plus dans cette croissance, que ce soit dans des conditions standards, ou lors de traitements avec de fortes concentrations d'auxine. Enfin, pour relier le rôle de *MtMSL2.4* à sa localisation dans les

pointes racinaires, nous avons également étudié la croissance de ces dernières. Cependant, l'absence de *MtMSL2.4* ne semble pas non plus affecter la croissance de la racine principale, ni la taille des zones de division ou de différenciation. L'absence de ce canal ne semble pas non plus affecter l'émergence des racines secondaires, bien qu'il soit également exprimé dans l'endoderme en face des pôles de xylème. Néanmoins, l'ensemble de ces analyses phénotypiques ne sont que préliminaires. En effet, les fonds génétiques de ces mutants nécessitent d'être nettoyés des autres insertions qu'ils possèdent. Ce nettoyage permettrait ainsi de diminuer les variabilités de phénotypes observées chez les descendants d'une même lignée de mutants. On ne peut non plus exclure un phénomène de redondance fonctionnelle entre *MtMSL2.4* et *MtMSL2.1*.

## VII.2. Discussion et perspectives à court et moyen terme

### VII.2.1. Approfondir l'analyse des propriétés électrophysiologiques de *MtMSL2.4*

Au cours de cette thèse, nous avons pu analyser la conductance de *MtMSL2.4*. Dans les conditions expérimentales que nous avons utilisées les courants unitaires peuvent être attribués soit à une entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  soit à une sortie de  $\text{Cl}^-$ . Comme *AtMSL 9* et *10* sont préférentiellement sélectifs pour les anions, il serait donc intéressant de savoir si cela est aussi le cas pour notre canal d'intérêt (Haswell *et al.*, 2008). Outre l'analyse de la sélectivité de ce canal, son seuil de mécanosensibilité pourrait également être testé. Enfin, d'autres facteurs pouvant influencer son activité pourraient aussi être testés, comme par exemple l'effet d'un traitement aux NFs. En effet, cette molécule possède une composante lipidique. On pourrait donc penser que cette région puisse influencer directement la modification de la structure des lipides membranaires. Cette modification pourrait ainsi favoriser ou défavoriser le seuil de mécanosensibilité de *MtMSL2.4*. Comme ce genre d'action ne dépend pas de la présence d'un récepteur spécifique, le fait d'utiliser le système hétérologue *Atmsl15* ne sera donc pas

limitant.

### VII.2.2. Tirer profit des mutants d'insertion *Tnt1* générés

#### VII.2.2.a. Confirmer les phénotypes observés précédemment

Le nettoyage du fond génétique des mutants *Mtmsl2.4* a été amorcé au cours de ce travail (cf. Matériels et méthodes, Tab. 8 et 9, et Fig. 51B). Nous avons maintenant à disposition, pour les deux lignées étudiées (NF8050 et NF11827), les graines F2 issues d'une série de deux rétrocroisements successifs (c.à.d. les graines BC2-F2). Les plantes mères de ces graines ont été identifiées comme portant l'insertion *Tnt1* à l'état hétérozygote dans notre gène d'intérêt. Les mêmes genres d'analyses phénotypiques que présentés précédemment pourraient donc être refaits chez les descendants F3 de ces graines BC2-F2. Cependant, comme 20 à 30 autres insertions ont été identifiées chez ces lignées, deux rétrocroisements ne sont pas suffisants pour les éliminer (cf. Matériels et méthode, Tab. 7). Aussi, l'impact du fond génétique sera diminué, mais toujours présent. Cela montre l'intérêt d'analyser plusieurs lignées en parallèle afin de voir si un même phénotype peut être corrélé à l'inactivation de *MtMSL2.4*.

Il est aussi intéressant de noter que le travail de nettoyage du fond génétique a été entamé chez une lignée *Tnt1* portant une insertion dans le gène *MtMSL2.1* (lignée NF12936 - cf. Matériels et méthodes, Tab. MM8 et 9, et Fig. 51B). Comme *MtMSL2.1* est le deuxième des *MtMSL* de la classe II présent dans les poils racinaires, les mêmes types d'analyses phénotypiques pourront être faits chez les descendants F3 des graines BC2-F2 disponibles. Cependant, afin de pouvoir comparer les résultats obtenus, il sera aussi nécessaire de nettoyer le fond génétique de l'autre mutant *Mtmsl2.1* à disposition (lignée NF7853, cf. Matériels et méthodes).

Pour éliminer l'hypothèse de la redondance fonctionnelle entre *MtMSL2.1* et *MtMSL2.4*,

une lignée portant une insertion *Tnt1* dans les gènes *MtMSL2.1* et *MtMSL2.4* a également été obtenue par croisement de plantes homozygotes R2 (cf. Matériels et méthodes, Tab. 8 et Fig. 51B). Nous avons actuellement les graines F2 issues de ce croisement. Les analyses phénotypiques, réalisées avec les lignées simples mutantes, pourraient donc être refaites avec les descendants F3 de ces graines. Cependant, ces analyses ne devront être que préliminaires. En effet, il serait peut-être plus judicieux d'obtenir des doubles mutants à partir des plantes aux fonds génétiques nettoyés disponibles, afin d'éviter de cumuler les effets de ces fonds. Ce travail de croisement devra donc être fait à l'avenir.

### VII.2.2.b. Que dire du rôle des *MtMSL* pendant un choc hypoosmotique?

Le canal *EcMscS*, définissant la famille des MSL, permet aux bactéries de résister aux chocs hypoosmotiques (Levina *et al.*, 1999). De même, chez la plante modèle *A.thaliana*, *AtMSL8* permet aux grains de pollen de résister au choc hypoosmotique généré par l'arrivée de ce grain sec sur le pistil humide des pièces florales femelles (Hamilton *et al.*, 2015). Le fait que l'expression des *MtMSL* soit régulée par le statut hydrique du sol n'est donc pas étonnant (Fig. 20C - Zhang *et al.*, non publié). *M. truncatula* est originaire du bassin méditerranéen. Ces plantes poussent essentiellement sur des sols bien drainés, dans un climat chaud et sec en été et doux et humide en hiver (FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations). Les propriétés drainantes de son sol et le climat sec de sa région d'origine doivent donc rendre cette plante sujette à de relativement gros chocs hypoosmotiques, lors d'une courte période pluvieuse par exemple. Ces conditions de vie pourraient peut-être expliquer la plus forte conductance générée par *MtMSL2.4*, comparée à celle de *AtMSL10*. En effet, afin d'éviter leur dommage lors de ces chocs, ce canal permettrait alors à la plante de relâcher les solutés présents dans les cellules, plus rapidement et en plus grande quantité. Aussi, il serait intéressant d'explorer l'utilité de ce canal sur des temps courts, par exemple dans des conditions de sécheresse prolongée, suivie d'une forte réhydratation. Ces analyses pourront

également être faites avec les mutants *Mtmsl2.1*, l'expression de *MtMSL2.1* étant fortement modifiée par une période de sécheresse (Fig. 20).

### VII.2.2.c. Comment expliquer la présence de *MtMSL2.4* dans les pointes racinaires?

Une racine est capable d'éviter les obstacles que sa pointe rencontre. Au moment du contact entre cette pointe racinaire et l'obstacle, celle-ci doit probablement subir des contraintes de compression. Aussi, on peut émettre l'hypothèse que les MSL puissent percevoir ces contraintes dans les pointes racinaires, pour induire une modification de croissance. Il serait donc intéressant de mesurer la croissance des mutants *Mtmsl2.4* dans un milieu non homogène, comme par exemple un milieu gélosé incluant des billes de verre de tailles variables.

Il serait également intéressant de tirer profit du système développé par l'équipe d'Evelyne Kolb\* se basant sur l'utilisation de grains photo-élastiques. En effet, le passage d'une racine entre deux de ces grains permet de mesurer simultanément les forces exercées par la racine sur ces grains, mais aussi les modifications morphologiques associées, comme par exemple l'épaisseur racinaire. Nous pourrions ainsi soumettre nos mutants *Mtmsl2.4* à ce système, puis mesurer si les forces exercées par leurs pointes racinaires sur ces grains diffèrent des contrôles sauvages.

## VII.3. Discussion et perspectives à long terme

### VII.3.1. Rôle des *MtMSL* dans la symbiose: et après?

L'étude de mutants de MSL par une approche perte de fonction semble à plusieurs reprises induire des phénotypes faibles à inexistantes (Tran *et al.* (cf. Article 2); Haswell *et al.*, 2008; Zou *et al.*, 2016). On pourrait donc à l'inverse favoriser des approches gain de fonction,

---

\* Équipe "Bio-mechanics and plant root growth"; laboratoire de Physique et Mécanique des Milieux Hétérogènes (PMPH); Université Pierre et Marie Curie; voir le site: <https://blog.espci.fr/evelyne/research/bio-mechanics/>

en surexprimant par exemple les *MtMSL* dans les poils racinaires pour observer si cela peut affecter la symbiose ou le développement de ces poils. Un autre indice qui peut suggérer ce genre d'approche, est le fait qu'une autre analyse transcriptomique a détecté une baisse du nombre de transcrits de *MtMSL2.4* dans les poils racinaires en réponse à un traitement aux NFs (Breakspear *et al.*, 2014). Ainsi, le fait d'augmenter sa présence dans le poil, alors qu'il devrait y être moins présent à ce stade, pourrait mettre en évidence un phénotype. Comme cette baisse d'expression semble arriver longtemps après l'action du NF (24h), il faudrait donc axer la recherche de phénotypes sur des étapes précoces postérieures au gonflement du poil racinaire. La courbure des cross de berger et l'avancée du cordon d'infection semblent donc être de meilleurs phénotypes à mesurer. Enfin, la migration nucléaire dans les cellules du rhizoderme, observée en réponse à une stimulation mécanique ou lors d'une interaction avec des champignons à AMF, pourrait aussi être testée chez ces mutants (Genre *et al.*, 2009).

### **VII.3.2. Tirer profit des différences entre *MtMSL2.4* et *AtMSL10* pour mettre en relation la structure à la fonction moléculaire de ces canaux**

Comme *MtMSL2.4* possède une plus forte conductance que *AtMSL 9* et *10*, on pourrait également tirer profit cette différence pour expliquer la fonction de certains domaines sur le plan moléculaire. Pour cela, on pourrait utiliser les mêmes approches que Zhang *et al.* (2012). En effet, le *TtMscS* de *T. tengcongensis* possède une plus forte sélectivité pour le nitrate, mais une faible conductance, tandis que *EcMscS* possède une faible sélectivité, mais une plus forte conductance. En réalisant une chimère où le tonneau- $\beta$  de *EcMscS* a été remplacé par le tonneau- $\beta$  de *TtMscS*, mais également en réduisant la taille des portails vestibulaires de *EcMscS* dans cette chimère, les auteurs de ce travail ont réussi à obtenir un canal MS dont la conductance a été réduite et la sélectivité augmentée. Cependant, l'absence d'homologie de séquence entre les MscS et les MSL en aval du domaine- $\beta$ , ainsi que l'absence de structures cristallographiques des MSL, ne permettent pas de prédire si l'on peut aussi trouver un

tonneau- $\beta$  et des portails vestibulaires chez les MSL. Pour tenter ce genre d'approche, il faudrait donc essayer des combinaisons plus larges, en conservant comme base la région TM3 et le domaine- $\beta$ . En effet ces domaines sont conservés, tant sur la séquence protéique que sur la fonction de gating de certains résidus du TM3a (Hamilton et Haswell, 2017). On pourrait par exemple réaliser une chimère dans laquelle le TM3/domaine- $\beta$  de *MtMSL2.4* est remplacé par le TM3/domaine- $\beta$  de *AtMSL9* ou 10 pour voir si une conductance similaire à celle de *MtMSL2.4* est conservée ou non. On pourrait aussi faire des échanges moins larges en ciblant par exemple la région entre le 4<sup>ème</sup> et le 5<sup>ème</sup> domaine transmembranaire, ou bien la région en aval du domaine- $\beta$ .

### VII.3.3. Pourquoi pas un rôle des MSL dans la résistance aux pathogènes et à l'herbivorie?

Pour expliquer la présence de l'expression de *MtMSL2.4* et *MtMSL2.5* dans les tissus endodermiques ou en face des pôles de xylème, on pourrait faire le lien avec le modèle proposé par Farmer *et al.*, (2014) (Fig. 7). En effet, dans ce modèle, une blessure des plantes entraînerait la propagation axiale d'une modification de pression dans les cellules de xylème. Ces modifications seraient alors perçues par les cellules en contact avec le xylème, ce qui entrainerait à terme une génération de flux ioniques radiaux aboutissant à la synthèse de JA. Les candidats, dans le cadre de notre hypothèse, percevant directement ces modifications locales de pression seraient donc les MSL.

Les JA ont un rôle dans la défense contre l'herbivorie et les pathogènes nécrotrophes (Browse, 2009). Au vue de ces rôles, un argument supplémentaire pourrait venir étayer la probable fonction des MSL dans ce contexte. En effet il a été montré, par des techniques de transcriptomique, que les transcrits d'un gène homologue à *AtMSL9* étaient dix fois moins présents chez une plante hyperaccumulant le nickel, en comparaison d'une plante ne l'hyperaccumulant pas (Vanesa Sanchez Garcia de la Torre et Sylvain Merlot, communication

personnelle). On peut aussi noter que cette baisse de niveau de transcrits chez les plantes hyperaccumulatrices est corrélée à une baisse d'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans les voies de défenses contre les pathogènes ou contre l'herbivorie. Cette observation va dans le sens d'une hypothèse selon laquelle l'hyperaccumulation de métaux, tels que le zinc, le nickel ou le cadmium, permettrait aux plantes de résister aux pathogènes et aux herbivores (Hörger *et al.*, 2013). Au cours de l'évolution, ces plantes auraient donc diminué la production de systèmes de défense "classique", afin de ne pas perdre de l'énergie à les produire alors qu'ils ne leurs sont plus utiles. Cette co-régulation entre les MSL et ces gènes de défense laisse donc penser que ces canaux MS pourraient aussi avoir un rôle dans la défense contre les pathogènes ou l'herbivorie. Comme les MSL sont exprimés dans des cellules en contact avec les tissus vasculaires, leur action pourrait par exemple se faire au niveau de la transmission d'un signal sur une longue distance, aboutissant à la synthèse de JA en réponse à une blessure provoquée par un herbivore.

*MtMSL2.1* et *MtMSL2.4* sont les deux seuls *MtMSL* de la classe II qui ont été identifiés dans les poils racinaires. Ce faible nombre peut être un indice de leur importance fonctionnelle dans ces structures unicellulaires. De plus, nous avons pu mettre en évidence une différence de conductance entre *MtMSL2.4* et *AtMSL9* et *10*. Enfin, la localisation endodermique de MSL n'avait pour l'instant jamais été montrée. Ainsi, grâce à l'étude des MSL dans un organisme modèle autre que *A. thaliana*, nous avons réussi à soulever un peu plus le voile sur l'identification de leurs fonctions, putatives ou avérées, au sein des plantes. Cependant, il reste encore beaucoup de chemin à parcourir avant de découvrir les fonctions cachées derrière ce voile. Aussi, "the show must go on"! (Mercury *et al.*, 1991).



# Chapitre VIII.

## Matériels et méthodes

### VIII.1. Recherche, classification et analyse des transcrits des gènes candidats

#### VIII.1.1. Recherche des *MSL* dans le génome de différentes espèces

La recherche de candidats a été faite grâce à la base de données de l'annotation Mt4.0 du génome de *M. truncatula*, disponible sur le site du JCVI Medicago (<http://www.jcvi.org/medicago>), (Tang *et al.*, 2014). L'étude a été complétée par la recherche de protéines homologues à *AtMSL2* (At5g10490), *AtMSL9* (At5g19520) et *EcMscS* (Gene ID 947416) par alignement de séquences dans ce génome (outil BLASTp). Les séquences situées 3kb en amont et en aval des annotations Medtr8g071250, Medtr4g081940, Medtr8g030960, Medtr8g031050 et Medtr8g031060 ont été récupérées via l'outil "JBrowse" du JCVI. Ces séquences ont ensuite été alignées grâce à l'outil BLASTx du NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), en utilisant l'ensemble des génomes séquencés chez les plantes comme référence (Viridiplantae (taxon 33090)), tout en en excluant celui de *M. truncatula* (*Medicago truncatula* (taxon 3880)).

Pour trouver les MSL chez d'autres espèces, différentes sources ont été utilisées. Les séquences de *S. pombe*, *C. reinhardtii*, *O. sativa* et *A. thaliana* ont été récupérées sur les bases des analyses faites dans différentes publications (Haswell et Meyerowitz, 2006; Haswell, 2007; Nakayama *et al.*, 2007; Nakayama *et al.*, 2012; Saddhe et Kumar, 2015). Pour *P. patens* et *G. max*, les séquences protéiques de *EcMscS*, *AtMSL2* et *AtMSL9* ont été alignées avec les génomes contenus dans la base de données du NCBI (respectivement taxons 3218 et 3847)

## Chapitre VIII

à l'aide de l'outil BLASTp. Pour *S. tuberosum*, la base de données Phytozome a été utilisée pour aligner les séquences de *EcMscS*, *AtMSL2* et *AtMSL9* avec le génome de *S. tuberosum*, Groupe Phureja, à l'aide de l'outil tBLASTn (Goodstein *et al.*, 2012). Les références de l'ensemble des

**Tableau 5. Accessions des protéines utilisées dans l'arbre phylogénétique**

Nom des protéines dans l'arbre	Accession des protéines	Nom des protéines dans l'arbre	Accession des protéines
<b><i>E. coli</i></b>		<b><i>M. truncatula</i></b>	
MscS <sup>a</sup>	NP_417399	MtMSL1.1 <sup>h</sup>	XP_003602909.1
<b><i>S. pombe</i></b>		MtMSL1.2 <sup>h</sup>	XP_003602913.2
SpMsy1 <sup>b</sup>	NP_587894.1	MtMSL1.3 <sup>h</sup>	XP_003613048.2
SpMsy2 <sup>b</sup>	NP_594520.1	MtMSL1.4 <sup>h</sup>	XP_013444796.1
<b><i>C. reinhardtii</i></b>		MtMSL2.1 <sup>h</sup>	XP_003592677.1
CrMSC1 <sup>c</sup>	XP_001690640.1	MtMSL2.2 <sup>h</sup>	XP_013463510.1
CrMSC2 <sup>c</sup>	XP_001690099.1	MtMSL2.3 <sup>h</sup>	XP_003603195.2
CrMSC3 <sup>c</sup>	XP_001689635.1	MtMSL2.4 <sup>h</sup>	XP_003603197.1
CrMSCL4 <sup>d</sup>	XP_001700183.1	MtMSL2.5 <sup>h</sup>	XP_003603202.2
CrMSCL1 <sup>d</sup>	XP_001698533.1	MtMSL2.6 <sup>h</sup>	XP_013446290.1
<b><i>P. patens</i></b>		<b><i>G. max</i></b>	
PpaMSCL1 <sup>e</sup>	XP_001777536.1	GmMSL1.1 <sup>h</sup>	XP_003517697.1
PpaMSCL2 <sup>e</sup>	XP_001764318.1	GmMSL1.2 <sup>h</sup>	XP_003522763.1
PpaMSCL3 <sup>e</sup>	XP_001776444.1	GmMSL1.3 <sup>h</sup>	XP_003526544.1
PpaMSCL4 <sup>e</sup>	XP_001781898.1	GmMSL1.4 <sup>h</sup>	XP_003528840.1
PpaMSCL8 <sup>e</sup>	XP_001757514.1	GmMSL1.5 <sup>h</sup>	XP_003533418.1
PpaMSCL9 <sup>e</sup>	XP_001765846.1	GmMSL1.6 <sup>h</sup>	XP_003548448.1
PpaMSCL10 <sup>e</sup>	XP_001763022.1	GmMSL2.1 <sup>h</sup>	XP_003523652.1
PpaMSCL11 <sup>e</sup>	XP_001751467.1	GmMSL2.2 <sup>h</sup>	XP_003526048.1
PpaMSCL12 <sup>e</sup>	XP_001771567.1	GmMSL2.3 <sup>h</sup>	XP_003534944.1
PpaMSCL13 <sup>e</sup>	XP_001751968.1	GmMSL2.4 <sup>h</sup>	XP_003555851.1
PpaMSCL14 <sup>e</sup>	XP_001759935.1	GmMSL2.5 <sup>h</sup>	XP_003547499.1
PpaMSCL15 <sup>e</sup>	XP_001762359.1	GmMSL2.6 <sup>h</sup>	XP_003548581.1
PpaMSCL16 <sup>e</sup>	XP_001752918.1	GmMSL2.7 <sup>h</sup>	XP_003548713.1
<b><i>O. sativa</i></b>		GmMSL2.8 <sup>h</sup>	XP_003555850.1
OsMSL1 <sup>f</sup>	XP_015636376.1	<b><i>S. tuberosum</i></b>	
OsMSL2 <sup>f</sup>	XP_015627650.1	StMSL1.1 <sup>h</sup>	XP_006338061.1
OsMSL4 <sup>f</sup>	XP_015626862.1	StMSL1.2 <sup>h</sup>	XP_006353169.1
OsMSL5 <sup>f</sup>	XP_015633758.1	StMSL2.1 <sup>h</sup>	XP_006342091.1
OsMSL6 <sup>f</sup>	XP_015641284.1	StMSL2.2 <sup>h</sup>	XP_006360891.1
<b><i>A. thaliana</i></b>		StMSL2.3 <sup>h</sup>	XP_006351619.1
AtMSL1 <sup>g</sup>	NP_567165.2	StMSL2.4 <sup>h</sup>	XP_006342705.1
AtMSL2 <sup>g</sup>	NP_568230.2	StMSL2.5 <sup>h</sup>	XP_006350354.1
AtMSL3 <sup>g</sup>	NP_176116.2		
AtMSL4 <sup>g</sup>	NP_175752.1		
AtMSL5 <sup>g</sup>	NP_188099.2		
AtMSL6 <sup>g</sup>	NP_177982.1		
AtMSL7 <sup>g</sup>	NP_179292.1		
AtMSL8 <sup>g</sup>	NP_001323613.1		
AtMSL9 <sup>g</sup>	NP_197453.1		
AtMSL10 <sup>g</sup>	NP_196769.1		

Origine des noms: **a.** Levina *et al.*, 1999 (YggB); **b.** Nakayama *et al.*, 2012; **c.** Nakayama *et al.*, 2007; **d.** Haswell, 2007; **e.** Annotation dans NCBI; **f.** Saddhe et Kumar, 2015; **g.** Haswell et Meyerowitz, 2006; **h.** Cette thèse.

séquences utilisées pour la suite sont résumées dans le tableau 5

### VIII.1.2. Classification et prédiction des structures des candidats

Les séquences protéiques, récupérées selon les méthodes expliquées précédemment, ont été alignées avec la méthode de calcul MUSCLE, à l'aide du logiciel Mega6. A partir de cet alignement, un arbre a été construit avec la méthode de calcul PhyML, à l'aide de l'outil en ligne Mobyle Pasteur (<http://mobyle.pasteur.fr>). La robustesse des embranchements a été testée avec un bootstrap de 1000. L'arbre a ensuite été mis en forme avec le logiciel FigTree.

Les prédictions des peptides signaux ont été réalisées avec l'outil en ligne TargetP (Emanuelsson *et al.*, 2007). Celles des séquences transmembranaires ainsi que des domaines MscS ont été faites avec l'outil en ligne HMMER v2.7.3 (Finn *et al.*, 2015).

## VIII.2. Construction des vecteurs pour les fusions transcriptionnelles, traductionnelles et l'extinction de gènes par microARN artificiel

### VIII.2.1. Vecteurs pour les fusions transcriptionnelles

Les promoteurs de *MtMSL2.3*, *2.4* et *2.5* ont été clonés afin d'être introduits dans le vecteur de destination *pKGWFS7* (Fig. 43) (Karimi *et al.*, 2007). Pour cela, une séquence génomique d'une longueur d'environ 3kb en amont du codon d'initiation de la traduction, a été sélectionnée pour chaque gène. La technologie Gateway (*Invitrogen*) a été utilisée pour introduire ces promoteurs dans le vecteur de destination finale. L'amplification simple de ces promoteurs, en utilisant un seul couple d'amorces possédant les cassettes de recombinaison Gateway AttB1 et AttB2, n'a pas été possible. Aussi, le détail de leur obtention est présenté ici. Toutes les PCR effectuées ici ont été faites avec l'ADN polymérase de haute-fidélité Phusion (*Thermo scientific*). L'ADNg utilisé en matrice a été extrait à partir de feuilles grâce au kit d'extraction *Qiagen DNAeasy plant*.

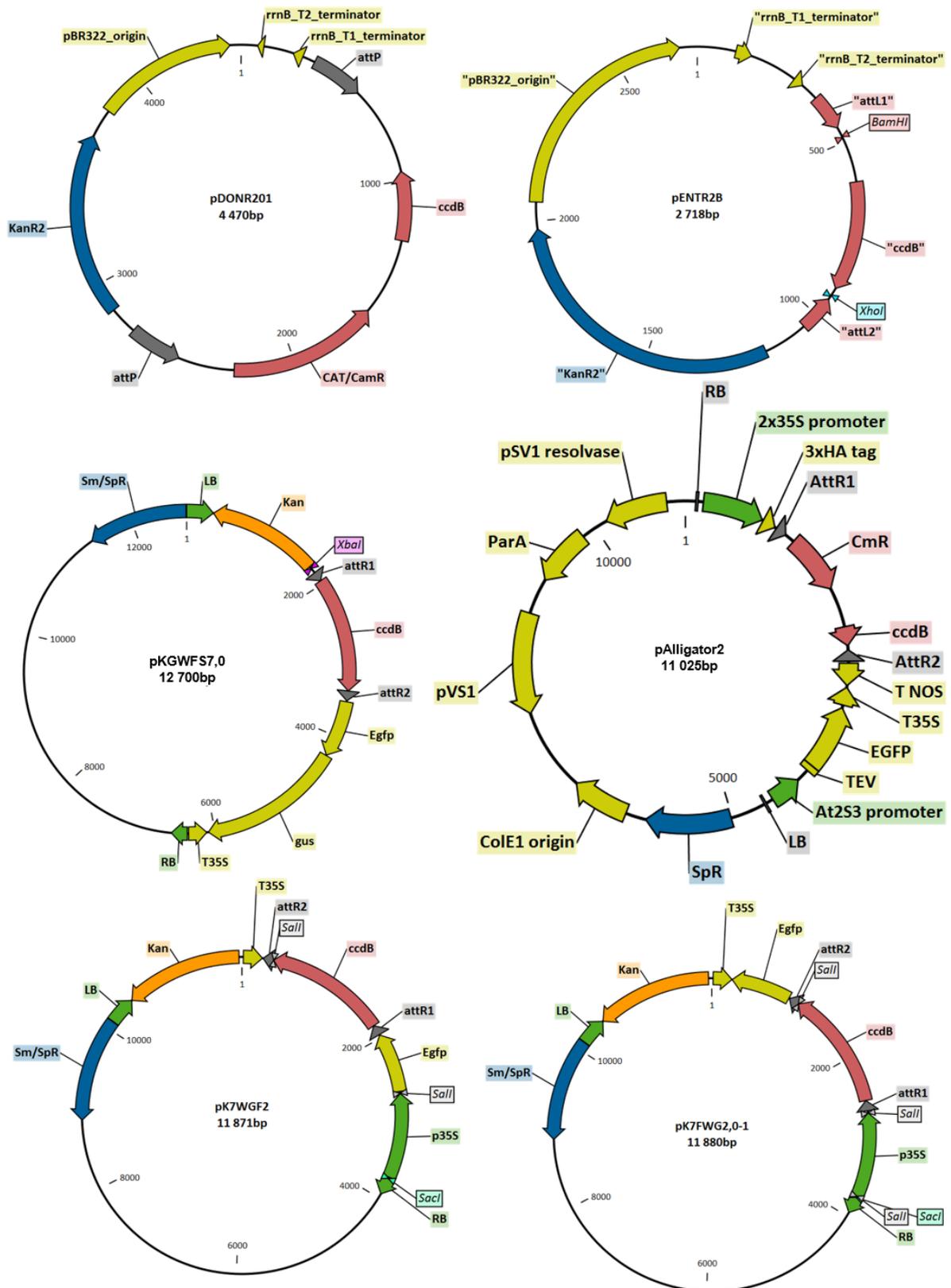
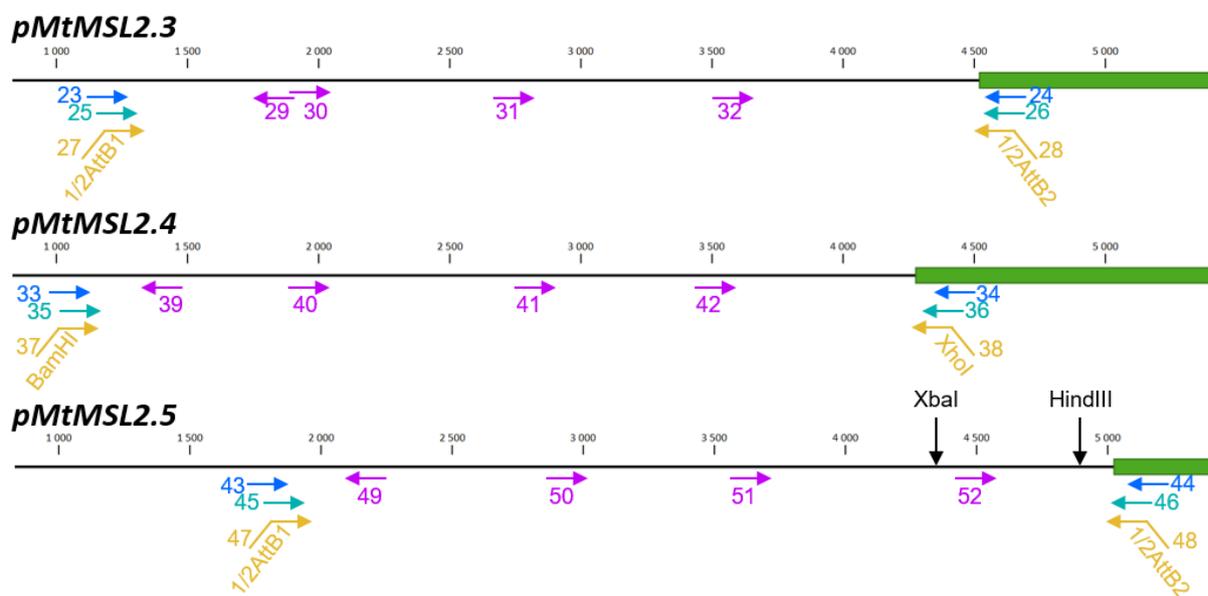


Figure 43. Cartes des vecteurs utilisés pour réaliser des fusions traductionnelles ou transcriptionnelles avec les promoteurs ou les CDS des MtMSL

– Clonage du promoteur pMtMSL2.3

Une première PCR a été réalisée avec les amorces n°23 et 24 (Fig. 44). Le mélange

réactionnel était composé du tampon de la polymérase concentré 1X, de 200 $\mu$ M de dNTP, 0,2 $\mu$ M d'amorce sens, 0,2 $\mu$ M d'amorce anti-sens, de 0,02u/ $\mu$ L de polymérase et 40ng de matrice pour 20 $\mu$ L de mélange réactionnel. Quatre mélanges réactionnels ont été préparés, pour tester quatre températures d'hybridation des amorces différentes lors des cycles d'amplification: [98°C-30s; (98°C-10s; X°C-30s; 72°C-1min40s) 30 cycles; 72°C-5min] X=51°C, 55°C, 62°C ou 67°C. A l'issue de cette PCR, aucun signal d'amplification n'a pu être observé après une électrophorèse en gel d'agarose supplémenté en bromure d'éthidium (BEt). Ces quatre produits de PCR ont donc été mélangés et purifiés à l'aide du kit *Qiagen PCR purification*. Ce produit de purification a été utilisé comme matrice pour une deuxième PCR (ou "nested PCR"), obtenue à l'aide amorces situées entre les deux premières amorces utilisées précédemment (n°25 et 26) (Fig. 44). La même composition de mélange et le même programme d'amplification que la première PCR ont été utilisés. Deux températures d'hybridation permettent d'obtenir l'amplification d'un produit de PCR unique visualisé grâce



**Figure 44. Sites d'hybridation des amorces utilisés pour le clonage des promoteurs**

Les séquences génomiques des gènes *MtMSL2.3*, *2.4* et *2.5* sont représentées proportionnellement à leurs tailles. Les cadres verts indiquent le premier exon. Les flèches indiquent le site d'hybridation des amorces utilisés pour le clonage ou le séquençage, mais leur taille n'est pas proportionnelle à leur taille réelle. Les numéros à côté de chaque flèche indiquent les numéros de l'amorce dans le tableau 6. A part pour les violettes, chaque couleur de flèches indique un couple d'amorce utilisé pour amplifier une région d'intérêt. Les flèches violettes présentent elles les amorces dessinées spécialement pour séquencer les promoteurs et leurs jonctions avec les vecteurs dans lesquels ils ont été insérés.

## Chapitre VIII

à une électrophorèse: 55°C et 62°C. Les mélanges réactionnels, issus des amplifications utilisant ces températures, ont été rassemblés et purifiés grâce au kit *Qiagen PCR purification*.

**Tableau 6. Liste des amorces utilisées au cours de ce travail**

N°	Nom de l'amorce	Séquence de l'amorce
1	<i>MtMSL2.1-qfor.1</i>	CCATGTAGCTACCCACCTG
2	<i>MtMSL2.1-qrev.1</i>	TGAATGTCGAGATCCCTGAA
3	<i>MtMSL2.2-qfor2</i>	GCGATTCTGTTGAATTTGCTG
4	<i>MtMSL2.2-qrev1</i>	TTAACGATTACGTTGTGGTTCCG
5	<i>MtMSL2.3-qfor.2</i>	GGCGATCGTTGTGTTGTAGA
6	<i>MtMSL2.3-qrev.1</i>	TCTCCGCGTACCTCGTTATT
7	<i>MtMSL2.4-qfor.1</i>	GAGAAAATTGGGGCACTGAA
8	<i>MtMSL2.4-qrev.1</i>	CACTTCTCCGCTTGGTCTTC
9	<i>MtMSL2.5-qfor.1</i>	AGCCATAAAACCGATCAGCA
10	<i>MtMSL2.5-qrev.1</i>	TCCTTCACTGCCAAACTGAA
11	<i>MtMSL2.6-qfor3</i>	TGGTGTCCAGATGATTGTGG
12	<i>MtMSL2.6-qrev2</i>	GCCATCACACTATGCTTTGG
13	<i>MtPR10-qfor1</i>	GGTTATTGATGCCATCCAAAGT
14	<i>MtPR10-qrev1</i>	GTCTGGAAGTCCACCACCAC
15	<i>MtSUNN-qfor.1</i>	TTTTGAGGCTCATGTTGCTG
16	<i>MtSUNN-qrev.1</i>	TTCACCAACTGGCTTCCTTC
17	<i>MtH3L-qfor.1</i>	CTTGCTTGGTGCTGTTTAGATGG
18	<i>MtH3L-qrev.1</i>	ATCCAAAGGCGGCTGCATA
19	<i>MtRBP1-qfor.1</i>	AGGGGCAAGTTCCTTCATTT
20	<i>MtRBP1-qrev.1</i>	GGTAGAAGTGCTGGCTCAGG
21	<i>MtActine-qfor.1</i>	TGGCATCACTCAGTACCTTTCAACTG
22	<i>MtActine-qrev.1</i>	ACCCAAAGCATCAAATAATAAGTCAACC
23	nest.p <i>MtMSL2.3-for1-1</i>	GAACAATTGTAGGAGCTAGG
24	nest.p <i>MMSL2.3-rev1-1</i>	CTCCATCATGTTTACTTCAC
25	nest.p <i>MtMSL2.3-for2-1</i>	GTGTTGGTGCAACTACTG
26	nest.p <i>MMSL2.3-rev2-1</i>	CCACCTTGATGCTTATTAC
27	1/2.attB1.p <i>MtMSL2.3-for1</i>	TACAAAAAGCAGGCTTCCTAAGGCTTGATCTCC
28	1/2.attB2.p <i>MtMSL2.3-rev1</i>	CAAGAAAGCTGGGTCTAACGTAAGCATATTACAAA
29	seq.p <i>MtMSL2.3.1</i>	GCGGAATTCTTTAAACCTG
30	seq.p <i>MtMSL2.3.2</i>	AAGGCGTAACTCCCAATC
31	seq.p <i>MtMSL2.3.3</i>	AGTTTCGATCCAAATTGACC
32	seq.p <i>MtMSL2.3.4</i>	ACATTGCTCTGGTTGTGG
33	nest.p <i>MtMSL2.4-for1-1</i>	TTTGTAAGTGCTGACGTAAT
34	nest.p <i>MMSL2.4-rev1-1</i>	ACTCACATTTGAAATAGGAAC
35	nest.p <i>MtMSL2.4-for2-1</i>	AGTTTTGTGGGAATAACATT
36	nest.p <i>MMSL2.4-rev2-1</i>	TCTATTCTCCATCATGCTTA
37	BamHI.p <i>MMSL2.4-for1</i>	NNNNGGATCCAGTTTTGTGGGAATAACATT
38	XhoI.p <i>MMSL2.4-rev1</i>	NNNNCTCGAGTCACAAATCACAATCCTAAG
39	seq.p <i>MtMSL2.4.1</i>	AAACTTACAAGCGTGGATG
40	seq.p <i>MtMSL2.4.2</i>	TGCTATCTTGTGGTCTAAAG
41	seq.p <i>MtMSL2.4.3</i>	ATCCGCATAAGCTTAGCTC

Tableau 6. Liste des amorces utilisées au cours de ce travail (suite)

N°	Nom de l'amorce	Séquence de l'amorce
42	seq.pMtMSL2.4.4	TCCGAAACTAACTCGAAAG
43	nest.pMtMSL2.5-for1-1	CCTTCTGCATATCACTCTT
44	nest.pMMSL2.5-rev1-1	ACCACTTCTGTTTTCTTCTC
45	nest.pMtMSL2.5-for2-1	AATGAATTAGGCCACTAAA
46	nest.pMMSL2.5-rev2-1	ATTATTACCATCCATTCA
47	1/2.attB1.pMtMSL2.5-for1	TACAAAAAAGCAGGCTTCAGTTAGAGGTTTCGACTGAAG
48	1/2.attB2.pMtMSL2.5-rev1	CAAGAAAGCTGGGTCTCACAACCCTATGCATATC
49	seq.pMtMSL2.5.1	CTATATTATAGTCCGGATACATCC
50	seq.pMtMSL2.5.2	GTGAACAAACTCACATCATCC
51	seq.pMtMSL2.5.3	CAGCATGTGTCCTAGATAAGC
52	seq.pMtMSL2.5.4	TTTGCCTAAAGGTCCGGTG
53	1/2attB1.MtMSL2.4-for1	TACAAAAAAGCAGGCTTCATGGATAGTAATAAGCATCAT
54	1/2attB2.MtMSL2.4.NS-rev1	CAAGAAAGCTGGGTCTTTGAGATAACTTGCATC
55	seq.CDS-MtMSL2.4.1	TGCCACAAAATGTCACCATC
56	seq.CDS-MtMSL2.4.2	AAGTCTGGAACGGTGAATCG
57	seq.CDS-MtMSL2.4.3	GCGAGTACTAGCTGCGATGA
58	seq.CDS-MtMSL2.4.4	CAAGCTTGTTACAGGGGTCCT
59	Sacl.pMtMSL2.4-for1	NNNNNGAGCTCAGTTTTGTGGGAATAACATTTTTAAC
60	Sall.pMtMSL2.4-rev1	NNNNNGTCGACTCACAATCACAATCCTAAGCATA
61	MtMSL2.4-amiARN1-I	gaTTAAAGCGTGTGCCGGTCTTctctcttttgtattcca
62	MtMSL2.4-amiARN1-II	agAAGGACCGGCACACGCTTTAAAtcaaagagaatcaatga
63	MtMSL2.4-amiARN1-III	agAAAGACCGGCACAGGCTTTATtcacaggtcgtgatag
64	MtMSL2.4-amiARN1-IV	gaATAAAGCCTGTGCCGGTCTTctacatatattccta
65	MtMSL2.4-amiARN2-I	gaTGCTAATCGGTTTAGACGCGCctctcttttgtattcca
66	MtMSL2.4-amiARN2-II	agGCGCGTCTAAACCGATTAGCATcaaagagaatcaatga
67	MtMSL2.4-amiARN2-III	agGCACGTCTAAACCCATTAGCTtcacaggtcgtgatag
68	MtMSL2.4-amiARN2-IV	gaAGCTAATGGGTTTAGACGTGCctacatatattccta
69	attB1-amiARN-A	GGGGACAAGTTT- GTACAAAAAAGCAGGCTCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAAC
70	attB2-amiARN-B	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT GCGGATAACAAT- TTCACACAGGAAACAG
71	AttB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTT
72	AttB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC
73	Geno.MtMSL2.1-NF7853-for1	TTTGTCCGGGATGATTGGGA
74	Geno.MtMSL2.1-NF7853-rev1	AGCAAGCCTTCTCCTCCT
75	Geno.MtMSL2.1-NF12936-for1	CTCCCTATTCTCCAGACCG
76	Geno.MtMSL2.1-NF12936-rev1	CCACAACCTAAGCTGCCACA
77	Geno.MtMSL2.4-NF8050-for1	TCCAGTAGAGGCAAGCGAAA
78	Geno.MtMSL2.4-NF8050-rev1	TTGAGTCCGCCGATCTTCT
79	Geno.MtMSL2.4-NF11827-for1	TTCAAATGTGAGTCCGAGACC
80	Geno.MtMSL2.4-NF11827-rev1	CCGTAAACTAGCCAACAAGC
81	Geno.MtMSL2.4-NF21018-for1	AAATCAAGATTTGGTGAACAACC
82	Geno.MtMSL2.4-NF21018-rev1	AAAAGCACCCATGTGAGGAG
83	LTR4	TACCGTATCTCGGTGCTACA
84	LTR6	GCTACCAACCAACCAAGTCAA

Pour ajouter les cassettes, deux PCR successives ont aussi été faites. Dans un premier temps, les amorces n°27 et 28 (Fig. 44) portant sur le côté 5' la moitié des cassettes AttB1 et AttB2, ont respectivement été utilisées. Le mélange réactionnel était composé du tampon de la polymérase concentré 1X, de 200 $\mu$ M de dNTP, 0,2 $\mu$ M d'amorce sens, 0,2 $\mu$ M d'amorce anti-sens, de 0,02u/ $\mu$ L de polymérase et 10ng de matrice pour 10 $\mu$ L de volume final. Le programme d'amplification utilisé était de [98°C-30s; (98°C-10s; 55°C-30s; 72°C-1min40s) 10 cycles; 72°C-5min]. Consécutivement à cette réaction, une deuxième PCR a été préparée avec les amorces AttB1 et AttB2 portant les séquences des cassettes de recombinaison Gateway du même nom. Le mélange réactionnel de cette deuxième PCR était composé du tampon de la polymérase concentré 1X, de 200 $\mu$ M de dNTP, 1 $\mu$ M d'amorce sens, 1 $\mu$ M d'amorce anti-sens, de 0,02u/ $\mu$ L de polymérase et des 10 $\mu$ L de la première PCR en matrice pour 50 $\mu$ L de volume final. Le même programme que précédemment a été utilisé avec 25 cycles d'amplification.

Le produit d'amplification a été purifié sur gel d'électrophorèse à l'aide du kit *Qiagen gel purification*. Cet amplicon a enfin été introduit dans le plasmide d'entrée *pDONR201* à l'aide du protocole de recombinaison de la BP clonase (*Thermo Fisher Scientific*), après une incubation d'une nuit à température ambiante dans le mélange réactionnel (Fig. 43). Ce vecteur a été amplifié à l'aide de bactéries thermocompétentes *E. coli* DH5 $\alpha$ , mises à croître sur un milieu sélectif adéquate (sélection: Kanamycine). Les colonies portant la construction voulue ont été identifiées par PCR sur colonie en utilisant les amorces AttB1 et AttB2 (mélange réactionnel: Tampon de la Taq polymérase (*Eurobio*) concentré 1X, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 400 $\mu$ M dNTP, 0,6 $\mu$ M amorce sens, 0,6 $\mu$ M amorce anti sens, Taq polymérase (*Eurobio*). Programme d'amplification: [95°C-5min; (95°C-30s; 55°C-30s; 72°C-3min15s) 30 cycles; 72°C-10min]). Des miniprep des colonies identifiées positives ont été réalisées à l'aide du kit *Qiagen Plasmid Miniprep Kit*. Enfin, l'intégrité de la séquence du promoteur a été vérifiée par séquençage (*GATC Biotech*) à l'aide des amorces n° 29-32 (Fig. 44).

Le promoteur a ensuite été introduit dans le vecteur de destination, par recombinaison entre les vecteurs *pDONR201:pMtMSL2.3* et *pKGWFS7* en utilisant le protocole de l'enzyme LR clonase (*Thermo Fisher Scientific*), après une incubation d'une nuit à température ambiante. Ce vecteur a été amplifié à l'aide de bactéries thermocompétentes *E. coli* DH5 $\alpha$ , mises à croître sur un milieu sélectif adéquate (sélection: Spectinomycine). Les colonies portant la construction voulue ont été identifiées par PCR sur colonie en utilisant les amorces n°27 et 28 (Fig. 44). Le mélange réactionnel et le programme d'amplification utilisés furent les mêmes que pour l'indentification du vecteur d'entrée, mise à part une température d'hybridation fixée à 60°C. La confirmation de la validité de la séquence a été faite selon le même principe que pour la validation la séquence de *pDONR201:pMtMSL2.3*.

– Clonage du promoteur *pMtMSL2.4*

Pour amplifier la région promotrice avant l'ajout des cassettes de recombinaison Gateway, la même stratégie a été employée que pour l'amplification de *pMtMSL2.3*. La première PCR a été préparée avec les amorces n°33 et 34 (Fig. 44), en utilisant le même mélange réactionnel et le même programme d'amplification que précédemment, à part la température d'hybridation qui a été fixée à 62°C. La deuxième PCR a été faite avec les amorces n° 35 et 36 (Fig. 44) selon le même protocole que précédemment en fixant la température d'hybridation à 55°C. Cependant, malgré l'ajout de cassettes de recombinaison Gateway et plusieurs tentatives, il n'a pas été possible d'introduire ce fragment dans un vecteur d'entrée. Une stratégie de digestion/ligation a donc été adoptée dans ce cas pour insérer *pMtMSL2.4* dans le vecteur *pENTR2B* (Fig. 43).

Les sites de restrictions BamHI et XhoI ont respectivement été ajoutés sur les extrémités 5' et 3' de *pMtMSL2.4*. Cet ajout a été réalisé à l'aide d'une PCR utilisant les amorces n°37 et 38 (Fig. 44). Le mélange réactionnel était composé du tampon de la polymérase haute-fidélité

concentrée 1X, de 200 $\mu$ M de dNTP, 0,5 $\mu$ M d'amorce sens, 0,5 $\mu$ M d'amorce anti-sens, de 0,01u/ $\mu$ L de polymérase et 30ng de matrice pour 60 $\mu$ L de mélange réactionnel. Le programme d'amplification a été fixé à [98°C-30s; (98°C-10s; 65°C-30s; 72°C-1min40s) 30 cycles; 72°C-5min]. Le produit d'amplification purifié à l'aide du kit *Qiagen PCR purification*, ainsi que le vecteur pENTR2B, ont ensuite été digérés avec les enzymes de restriction BamHI et XhoI (*FastDigest—Thermo Scientific*). Pour séparer les produits de digestion, les bandes de tailles attendues, obtenues après une électrophorèse, ont été purifiées sur gel dans les deux cas. Ces deux fragments ont enfin été ligués grâce une T4 DNA ligase (*Fermentas*). Les vecteurs obtenus ont enfin été amplifiés à l'aide de bactéries thermocompétentes *E. coli* DH5 $\alpha$ , mises à croître sur un milieu sélectif adéquate (sélection: Kanamycine). Pour sélectionner les colonies portant la bonne construction, une PCR sur colonies a été réalisée avec les amorces n°37 et 38 (Fig. 44) selon le même mélange réactionnel utilisé pour les PCR sur colonies présentées précédemment. Les plasmides purifiés, à l'aide de miniprep effectuées sur les colonies positives, ont été envoyés à séquencer avec les amorces n°35 et 42 (Fig. 44).

Comme le vecteur *pENTR2B* possède les cassettes de recombinaison attL1 et attL2, il a été possible d'introduire *pMtMSL2.4* dans le vecteur de destination *pKGFWS7*, à l'aide d'une recombinaison avec LR entre ce vecteur et le vecteur *pENTR2B:pMtMSL2.4*. Le même protocole que pour *pMtMSL2.3* a été utilisé pour faire cette recombinaison et pour amplifier les vecteurs obtenus. Pour vérifier les colonies portant les bonnes constructions, une PCR sur colonies a été réalisée avec les amorces n°37 et 38. Pour vérifier que l'intégralité de la séquence promotrice était présente, un séquençage a été fait avec les amorces n°39-42 (Fig. 44).

### – Clonage du promoteur *pMtMSL2.5*

Une stratégie semblable à celle utilisée pour *pMtMSL2.3* a été faite pour cloner

*pMtMSL2.5*. La première PCR a été effectuée dans les mêmes conditions avec les amorces n°43 et 44 (Fig. 44). Après une purification du mélange des produits d'amplification obtenus grâce à des températures d'hybridation différentes, une deuxième PCR a été réalisée avec les amorces n°45 et 46 (Fig. 44). Des températures d'hybridation de 50 et 55°C donnent des amplicons uniques d'après les observations faites par électrophorèse. Ces produits ont été purifiés avec le kit *Qiagen PCR purification*.

Pour rajouter les cassettes de recombinaison Gateway AttB1 et AttB2 respectivement en 5' et 3' de la région *pMtMLS2.5* ciblée, une PCR en deux temps, similaire à celle utilisée pour *pMtMSL2.3*, a été faite en utilisant les amorces n°47 et 48 et AttB1 et AttB2 (Fig. 44). Le produit d'amplification a été purifié sur gel et inséré dans le vecteur pDONR201 par une recombinaison Gateway avec une BP clonase (*Thermo Fisher Scientific*). Pour sélectionner les colonies portant le bon vecteur, des minipreps ont été faites sur certaines d'entre elles, choisies au hasard. Un profil de restriction avec les enzymes XbaI et HindIII (*FastDigest—Thermo Scientific*) a permis de mettre en évidence les colonies portant des plasmides positifs qui ont ensuite été envoyés séquencer avec les amorces n°49 – 52 pour vérifier l'intégrité du promoteur cloné (Fig. 44). Une recombinaison LR a enfin été réalisée afin d'introduire le promoteur *pMtMLS2.5* dans le vecteur *pKGWFS7*. Les vecteurs d'intérêt ont ici aussi été sélectionnés par des profils de restriction faits avec les enzymes XbaI et HindIII (*FastDigest—Thermo Scientific*), réalisés sur des plasmides extraits de colonies choisies au hasard. Pour confirmer que la séquence clonée ne porte pas de mutations, les plasmides ont enfin été envoyés à séquencer avec les amorces n°49 – 52.

### VIII.2.2. Vecteurs pour les fusions traductionnelles

Pour obtenir de telles constructions, les vecteurs de destination *pk7WGF2* et *pk7FWG2* ont été utilisés (Fig. 43) (Karimi *et al.*, 2007). Ils permettent de fusionner une GFP

respectivement en N-ter et en C-ter des séquences d'intérêt, mises sous le contrôle d'un promoteur *p35S*. Par la suite, la stratégie a été de remplacer ce promoteur par celui de *MtMSL2.4*.

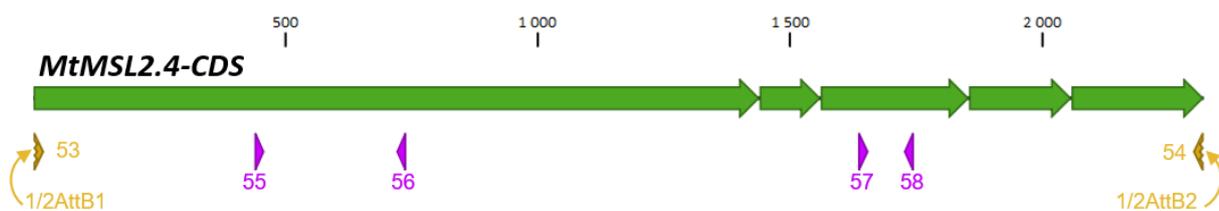
### VIII.2.2.a. Chimères *MtMSL2.4:GFP* et *GFPMtMSL2.4* sous contrôle d'un promoteur fort

#### – Construction de la chimère *GFP:MtMSL2.4*

Au début de cette thèse, la séquence codante (CDS) de l'ADNc de *MtMSL2.4* était déjà clonée dans le vecteur d'entrée pDONR201. Il a donc été aisé de transférer cette séquence dans le vecteur de destination *pk7WGF2* à l'aide d'une recombinaison LR. Les vecteurs obtenus ont été amplifiés à l'aide de bactéries thermocompétentes *E. coli* DH5 $\alpha$ , mises à croître sur un milieu sélectif adéquate (sélection: Spectinomycine). Pour vérifier la présence du vecteur attendu dans les colonies, une PCR sur colonies a été réalisée avec les amorces n°55 et 56 (Fig. 45). Le mélange réactionnel est identique aux autres PCR sur colonies faites précédemment. Le protocole d'amplification a été élaboré avec une température d'hybridation de 59°C et un temps d'élongation de 30s. Pour vérifier que la séquence du vecteur n'a pas subi de mutations, celui-ci a été extrait des colonies positives par une midiprep, puis a été envoyé à séquencer avec les amorces n°55-58.

#### – Construction de la chimère *MtMSL2.4:GFP*

Pour faire ce genre construction, il est d'abord nécessaire de retirer le codon d'arrêt de traduction se trouvant à la fin de la séquence codant pour une protéine d'intérêt. Pour cela,



**Figure 45. Sites d'hybridation des amorces utilisées pour le clonage du CDS de *MtMSL2.4***

La séquence codant pour *MtMSL2.4* est représentée proportionnellement à sa taille. Les flèches vertes indiquent les exons. Les flèches violettes en bas indiquent le site d'hybridation des amorces utilisées pour le séquençage. Les flèches jaunes indiquent le couple d'amorce utilisé pour amplifier le CDS sans le codon stop. Les numéros à côté de chaque flèche indiquent les numéros de l'amorce dans le tableau 6.

une PCR a été réalisée avec les amorces n°53 et 54, l'amorce n°54 s'hybridant juste en amont du codon stop dans le CDS de *MtMSL2.4*. Elles ajoutent également la moitié des cassettes AttB1 et AttB2 respectivement du côté 5' et 3' de cette séquence. Le vecteur *pDONR201:CDS-MtMSL2.4* a été utilisé comme matrice dans une PCR effectuée en deux temps. Le mélange réactionnel et le protocole utilisé furent les mêmes que pour l'amplification des promoteurs avec les séquences AttB1 et AttB2. Une température d'hybridation de 57°C et un temps d'élongation de 40s ont été utilisés. L'amplification étant unique d'après l'analyse des gels d'électrophorèse, les produits de PCR ont ensuite été purifiés avec le kit *Qiagen PCR purification*. Une recombinaison BP a enfin été faite entre ce produit de purification et le vecteur *pDONR201*. Après transformation de *E. coli* DH5 $\alpha$  thermocompétentes, les plasmides purifiés des colonies obtenues ont été séquencés afin de vérifier qu'ils étaient bien dépourvus du codon stop du CDS de *MtMSL2.4*. Le vecteur *pDONR201:CDS-MtMSL2.4- $\Delta$ Stop* a ensuite été recombiné avec le vecteur de destination *pk7FWG2* par une recombinaison Gateway LR. L'exactitude de la séquence de *MtMSL2.4* en phase avec la séquence codant pour la GFP a été vérifiée à l'aide d'un séquençage avec les amorces n°55-58.

#### VIII.2.2.b. Chimères *MtMSL2.4:GFP* et *GFPMtMSL2.4* sous contrôle d'un promoteur endogène

Pour obtenir de telles constructions, le vecteur *pENTR2B:pMtMSL2.4* a été utilisé comme matrice pour amplifier par PCR le promoteur de *MtMSL2.4*, en y ajoutant du côté 5' et 3' respectivement les sites de restriction de SacI et Sall grâce aux amorces n°59 et 60. Le mélange réactionnel était composé du tampon de la polymérase Phusion de haute-fidélité concentré 1X, de 200 $\mu$ M de dNTP, 0,5 $\mu$ M d'amorce n°59, 0,5 $\mu$ M d'amorce n°60, de 0,01u/ $\mu$ L de polymérase et 500pg de matrice pour 50 $\mu$ L de mélange réactionnel. Le programme d'amplification utilisé fut [98°C-30s; (98°C-10s; 69°C-30s; 72°C-1min40s) 30 cycles; 72°C-5min]. Les produits de PCR de la taille attendue ont ensuite été purifiés sur gel avec le kit *Qiagen gel purification*. Le fragment de PCR a ensuite été digéré par les enzymes SacI et Sall

(*FastDigest*—*Thermo Scientific*), ainsi que les vecteurs *pk7FWG2:CDS-MtMSL2.4-ΔStop* et *pk7WGF2:CDS-MtMSL2.4*. Les fragments de la taille attendue ont été purifiés sur gel puis ligués avec une T4 DNA ligase (*Fermentas*). Des minipreps ont été réalisées avec des colonies prises au hasard de *E. coli* DH5α transformées poussant sur milieu sélectif adéquate (sélection: spectinomycine). Les plasmides obtenus ont enfin été séquencés avec les amorces n° 37, 39-42 et 55-58 (Fig. 44 et 45).

### VIII.2.2.c. *MtMSL2.4* sous le contrôle d'un promoteur fort

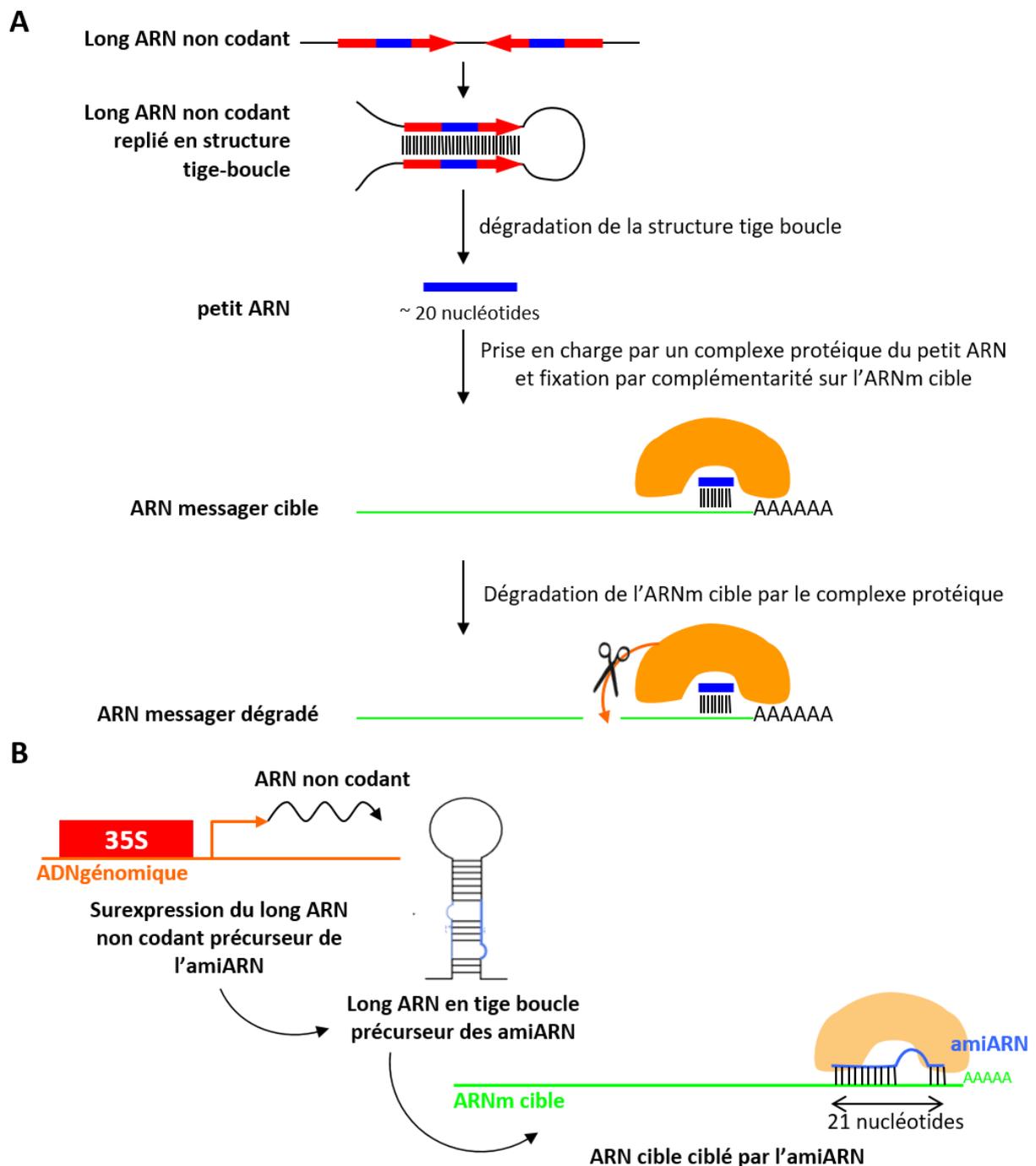
Cette construction a été utilisée pour surexprimer, sous le contrôle d'un double promoteur *p35S*, *MtMSL2.4* dans les protoplastes de *AtmslΔ5* et était déjà disponible au début de cette thèse. Pour obtenir cette construction, le vecteur *pDONR201:MtMSL2.4-CDS* a été utilisé pour faire une recombinaison Gateway LR avec le vecteur de destination *pAlligator2* (Fig. 43) (Bensmihen *et al.*, 2004).

### VIII.2.3. Vecteurs pour l'extinction de gènes par microARN artificiel

#### VIII.2.3.a. Principes de la stratégie

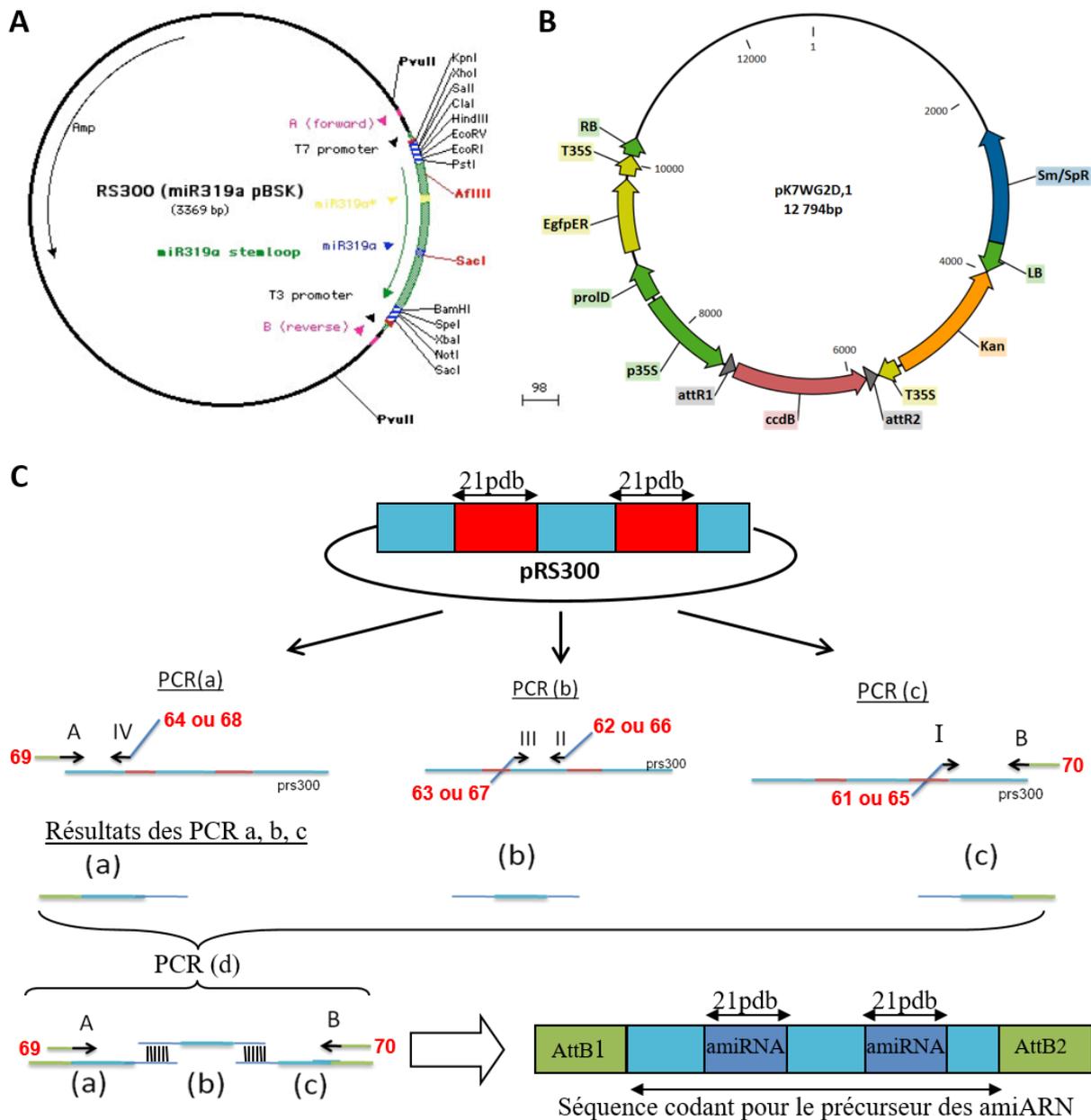
Ce principe se base sur le détournement d'un mécanisme de régulation de l'expression génique présent naturellement : les petits ARN interférants (ARNi). Les petits ARNi sont des ARN simple brin d'environ 20 nucléotides. Certains d'entre eux sont formés à partir de la transcription d'un gène non codant, entraînant la formation d'un ARN dont la séquence inclue celle des petits ARNi. Ces long ARN présentent la particularité de répéter une partie de leur séquence de manière inversée et complémentaire. Ceci entraîne la formation d'une structure en épingle à cheveux par repliement de l'ARN et hybridation par auto-complémentarité (Fig. 46A). Cette structure est ensuite reconnue par des protéines de la plante qui vont la dégrader pour ne retenir qu'une séquence d'environ 20 nucléotides. Suite à cette dégradation, les petits ARNi seront pris en charge par un autre complexe protéique. Grâce à la complémentarité des

petits ARNi avec l'ARNm ciblé, le complexe protéique pourra être également ciblé de manière spécifique sur ce complexe d'ARN double brin, pour entraîner la dégradation de l'ARNm et donc empêcher la traduction de celui-ci.



**Figure 46. Principe général simplifié de l'extinction de l'expression d'un gène par les petits ARN non codants et détournement de ce mécanisme pour éteindre artificiellement l'expression d'un gène**

**A.** Le long ARN transcrit se replie pour former une structure en tige boucle grâce à la complémentarité des séquences (bleue et rouge). Cette structure sera ensuite dégradée, ce qui conduit à libérer de petites séquences d'ARN (bleu). Cette séquence d'environ 20 nucléotides sera prise en charge par un complexe protéique pour permettre au précurseur de se fixer, par complémentarité de séquence, sur l'ARNm ciblé et le dégrader par la suite. Schéma extrait du rapport de stage de Mamitiana Ranoelison, 2015. **B.** Schéma présentant la stratégie utilisée pour éteindre l'expression d'un gène d'intérêt par la surexpression d'amiARN.



**Figure 47. Principe du protocole d'obtention des amiARN**

**A.** Carte du vecteur *pRS300* utilisé comme squelette de base pour prélever la structure du précurseur des amiARN (Schwab *et al.*, 2006). **B.** Carte du plasmide *pK7WG2D,1* utilisé comme vecteur de destination par la suite. **C.** Schéma résumant le protocole d'amplification du précurseur des amiARN selon la méthode de Schwab *et al.* (2006). Les séquences codant pour les précurseurs des amiARN sont construites à partir du plasmide *pRS300* qui constituera le squelette de base de ces précurseurs (en bleu clair). Les séquences qui nous intéressent (en bleu foncé) sont introduites dans ce squelette, en remplaçant les séquences indiquées en rouge, à l'aide des amorces IV, III, II et I. 3 PCR sont réalisées. La (a), utilisant les amorces A et IV, produit un fragment dont l'extrémité 5' possède le site de recombinaison attB1 et l'extrémité 3' possède la séquence de l'amiARN d'intérêt. La PCR (b), utilisant les amorces III et II, produit un fragment possédant aux extrémités 5' et 3' la séquence de l'amiARN d'intérêt. La PCR (c), utilisant les amorces I et B, produit un fragment dont l'extrémité 5' possède la séquence de l'amiARN d'intérêt et l'extrémité 3' le site de recombinaison attB2. L'extrémité 3' du fragment (a) a la particularité d'être complémentaire de l'extrémité 5' du fragment (b). De la même manière, l'extrémité 3' du fragment (b) est complémentaire de l'extrémité 5' du fragment (c). Cette complémentarité permet lors de la PCR (d), utilisant les amorces A et B, de fusionner les fragments (a), (b) et (c) en un seul fragment PCR. Le résultat final sera un fragment PCR avec des sites de recombinaisons Gateway attB1 et attB2 amenés par les amorces A et B. Schéma extrait du rapport de stage de Mamitiana Ranoelison, 2015. Les numéros rouges indiquent les numéros d'amorces présentés dans le tableau 6.

Plusieurs protocoles existent pour détourner ce système de régulation. Celui de (Schwab *et al.* (2006) a été choisi pour l'étude des MSL chez *Medicago*. Cette technique consiste à utiliser une séquence dont la transcription aboutit à la formation du long ARN précurseur se repliant en structure tige boucle. La dégradation de cette structure entraîne la formation de petits ARN interférants de 21 nucléotides appelés amiARN (micro ARN artificiels) (Fig. 46B). Ces amiARN présentent en plus la particularité d'avoir des mismatch (non complémentarité de séquence avec l'ARN cible) entre les positions 18 et 21 de la séquence de l'amiRNA. Selon les auteurs de ce protocole, ceci permettrait d'améliorer le rendement d'efficacité de l'extinction. Le but de la stratégie utilisée ici a été d'insérer, à la place de ces nucléotides, 21 nucléotides ciblant les transcrits du gène *MtMSL2.4*. Cette nouvelle construction a ensuite été insérée dans le vecteur *pk7WG2D* (Fig. 47B) (Karimi *et al.*, 2007). Ceci permettrait de la surexprimer dans les racines de *M. truncatula* après leur modification génétique par la technique du hairy root. De plus, la séquence codant pour une GFP exprimée de manière indépendante permettra de sélectionner les racines modifiées grâce à un criblage sur la fluorescence.

### VIII.2.3.b. Sélection et clonage des amiARN

#### – Sélection des amiARN à cloner

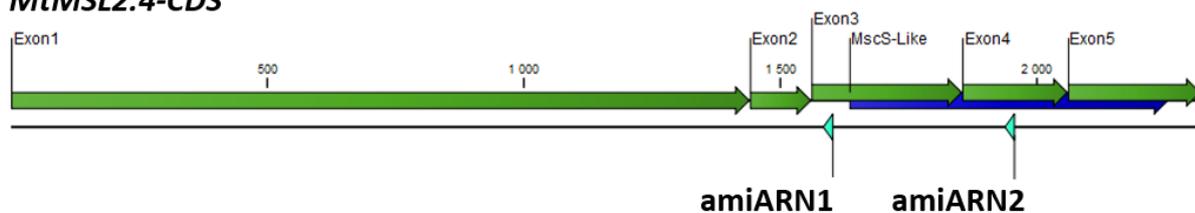
L'outil de design des amiARN disponible sur le site WMD3 (<http://wmd3.weigelworld.org/cgi-bin/webapp.cgi>) a été utilisé. La librairie de transcrit Mt3.5 (JCVI) a été utilisée pour rechercher des amiARN sur la séquence cible de *MtMSL2.4*, référencée "IMG|Medtr3g104940.1" dans cette base de données. Dans les paramètres de recherche, *MtMSL2.3* et *MtMSL2.5* ont été autorisés en tant que "off-target"\*. Seuls les 100 premiers amiARN candidats proposés par cette recherche ont été analysés par la suite. Pour sélectionner les amiARN à cloner, plusieurs critères ont été utilisés suivant les conseils

---

\* Un off-target est un transcrit, souvent issu de gènes homologues qui sera ciblé secondairement par les amiARN.

donnés par les auteurs de cet outil de design. Le premier est qu'il existe un ou deux mésappariement entre les positions 18 et 21 et que l'énergie d'hybridation doit être comprise entre -35 et -38 kcal/mole. Le deuxième est que la position d'hybridation de l'amiARN sur sa cible soit plutôt située de son côté 3'. Deux amiARN répondant à ces critères ont ainsi été sélectionnés. Pour le premier (amiARN1 - TTAAAGCGTGTGCCGGTCCTT), aucun off-target n'a été prédit. Les zones ciblées par ces amiARN sont indiquées dans la figure 48. Pour le second (amiARN2 - TGCTAATCGGTTTAGACGCGC), *MtMSL2.3* a été identifié comme un probable off-target. Les amorces pour cloner les amiARN ont enfin été dessinées à l'aide de l'outil disponible sur ce site, en utilisant le vecteur PRS300 21 mer (MIR319a *A. thaliana*) comme base pour leur structure (Fig. M47A).

### *MtMSL2.4-CDS*



**Figure 48. Sites ciblés par les amiARN sélectionnés**

La séquence codant pour *MtMSL2.4* est représentée proportionnellement à sa taille. Les flèches vertes indiquent les exons et la flèche bleu foncé la séquence codant pour le domaine MscS. Les flèches bleu clair en bas indiquent les sites d'hybridation ciblés par les amiARN clonés au cours de cette thèse.

### – Clonage des amiARN

Pour cloner les amiARN, le protocole disponible sur le site WMD3 a été utilisé. Le produit final est un fragment PCR contenant les séquences de 21 nucléotides des amiRNA insérées dans le squelette issu du plasmide *pRS300* (Fig. 47A). De plus, le produit de PCR final contient des sites de recombinaisons Gateway aux extrémités 5' et 3'. Le principe du protocole est schématisé dans la figure 47C.

Le mélange réactionnel des PCR a, b et c était composé d'eau milliQ qsp 50µL, du tampon de polymérase de haute-fidélité Pfu (*Promega*) 1 x, de dNTP à 5mM, de la polymérase Pfu à 0,03u/µL et de la matrice *pRS300* à 0,04 ng/µL. Les amorces utilisées, concentrées à 0,4µM,

étaient différentes selon la PCR (respectivement pour les amiARN1 ou 2: PCRa, amorces n°69 et 64 ou n°69 et 68; PCRb, amorces n°63 et 62 ou n°67 et 66; PCRc, amorces n°61 et 70 ou n°65 et 70). Le protocole d'amplification de PCR fut [95°C-2min; (95°C-30s; 52°C-30s; 72°C-40s) 24 cycles; 72°C-7min]. Les tailles des amplicons attendues pour les 3 PCR étaient respectivement de 271, 168 et 298 pb. Le produit de PCR a été mis à migrer dans un gel d'agarose de 2% (p/v) en raison de leurs petites tailles. La purification sur gel a donc été adaptée en conséquence selon les spécifications du kit *Qiagen gel purification*.

Le mélange réactionnel de la PCR d'était composé d'eau milliQ qsp 50µL, du tampon de polymérase Pfu 1x, de la polymérase Pfu à 0,03u/µL, de dNTP 5mM, de 0,4µM d'amorce n°69, de 0,4µM d'amorce 70 et de 0,5µL de chacune des PCR purifiées précédemment. Protocole de dénaturation: [95°C-2min; (95°C-30s; 55°C-30s; 72°C-1min35s) 35 cycles; 72°C-7min]. Le produit de PCR a enfin été purifié sur gel, puis inséré dans le vecteur *pDONR201* à l'aide d'une recombinaison BP. Pour contrôler les colonies de DH5α contenant la construction d'intérêt, une PCR sur colonie a été faite avec les amorces n°69 et 70, une température d'hybridation de 60°C et 3min50s de temps d'élongation. Les vecteurs extraits des colonies positives ont ensuite été envoyés à séquencer avec l'amorce n°69. Pour intégrer la séquence codant pour les précurseurs des amiARN dans le vecteur de destination *pk7WG2D*, une recombinaison LR a été réalisée avec les différents vecteurs donneurs créés. Les différentes vérifications, suivant la transformation des DH5α thermocompétentes avec cette construction, ont été faites de la même manière que lors de l'obtention des vecteurs donneurs.

La stratégie "amiARN" que j'ai commencé à développer dans cette thèse constituait une alternative à l'utilisation de mutants d'insertion Tnt1 de *Medicago*. Ayant pu par la suite isoler de tels mutants pour mes gènes candidats, j'ai favorisé ce dernier matériel qui permet de travailler sur des lignées stables. Ceci est un avantage par rapport à l'approche "amiARN" qui

oblige à travailler sur des racines transformées de manière non stable par la technique du Hairy-root.

### VIII.3. Matériel biologique

#### VIII.3.1. Lignées sauvages de *M. truncatula*

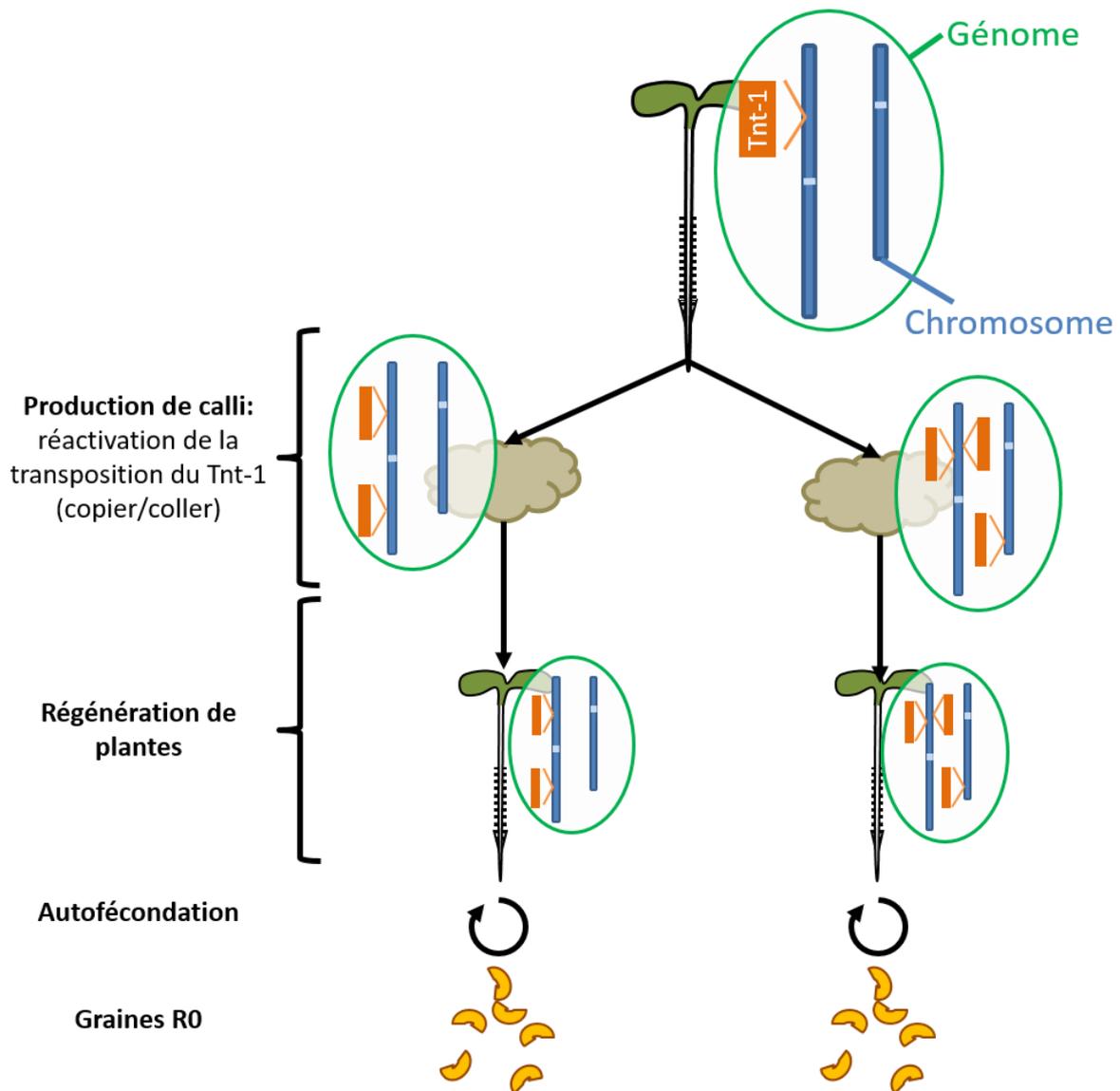
*M. truncatula* est une plante autogame\* originaire du bassin méditerranéen. Deux lignées sauvages ont été utilisées au cours de cette thèse. Le lot de graines de la première, Jemalong A17, a été produit à l'INRA de Montpellier en 2012 (Line ID: L000738). Le deuxième lot de sauvages, R108, a été produit en 2008 au même endroit (Line ID: L000729). Toutes les graines utilisées, y compris celles issues des lignées mutantes, ont été stockées à -20°C dans des tubes hermétiquement fermés et dont l'espace vide a été comblé par du coton hydrophile.

#### VIII.3.2. Lignées mutantes de *M. truncatula*

Les lignées de mutants ont été commandées auprès de la fondation Noble. Elles ont été développées grâce à l'insertion aléatoire d'un rétrotransposon de tabac (Tnt1) dans le génome de sauvages R108 (Tadege *et al.*, 2008). Le mécanisme de rétrotransposition, est initié lors de la génération de calli à partir de plantes portant ce Tnt1. Aussi, les différentes lignées mutantes ont été produites par la régénération de plantes à partir de ces calli, ayant chacun une combinaison d'insertion différente (Fig. 49). Comme les rétrotransposons sont copiés puis collés, une même plante peut contenir dans son génome plusieurs rétrotransposons. Les premières graines, obtenues par autofécondation des plantes régénérées, sont appelées les graines R0, et celles de la régénération suivante les graines R1. Ce sont ces deux générations de graines qui peuvent être envoyées par la fondation Noble (<https://medicago-mutant.noble.org/mutant/index.php>).

---

\* Reproduction par autofécondation



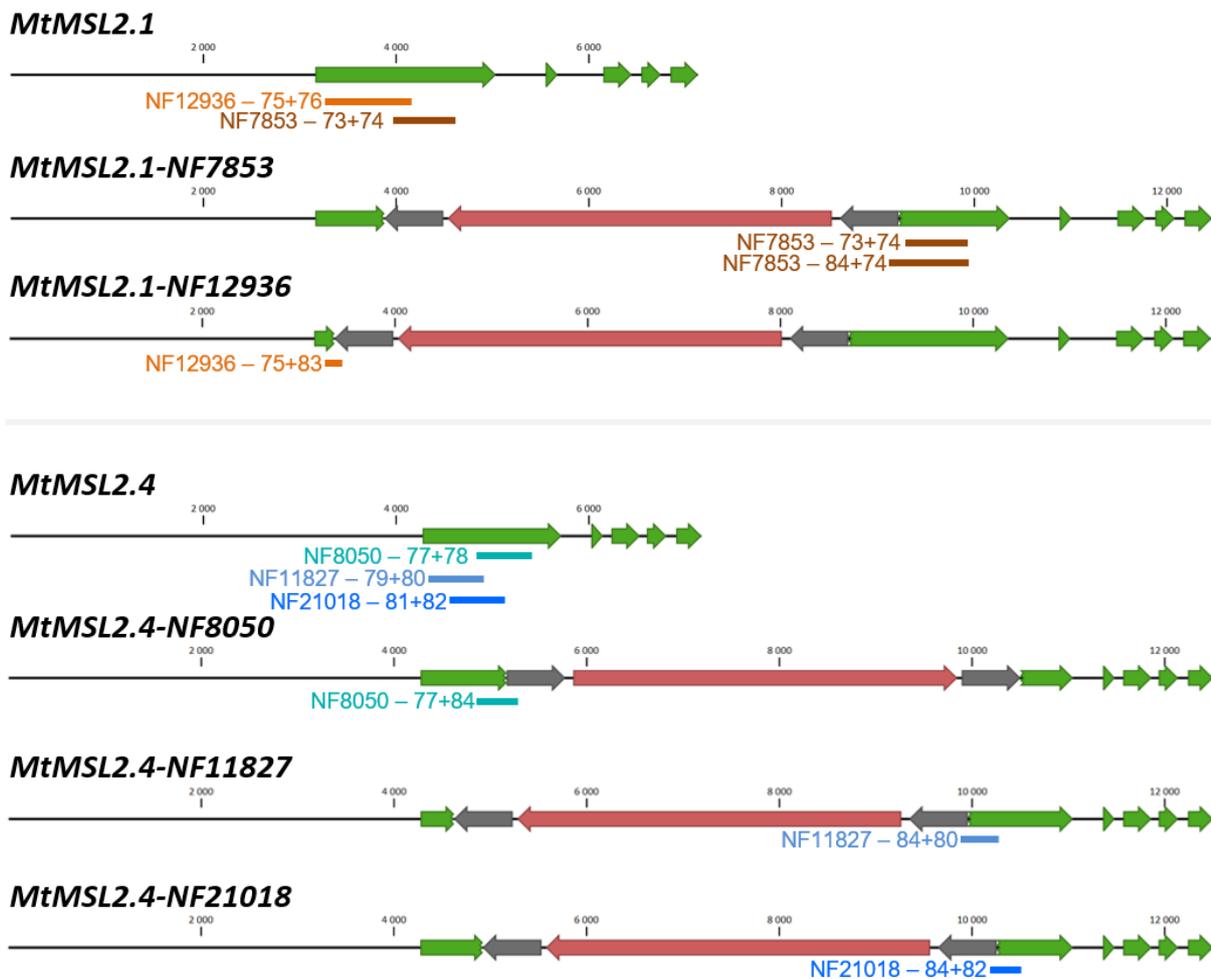
**Figure 49. Principe de l'obtention de la collection de mutants Tnt1 chez *M. truncatula***

Schéma présentant de manière simplifiée les étapes aboutissant à la production de mutants d'insertion Tnt1 chez *M. truncatula*. Pour chaque étape, le génome des plantes ou calli est schématisé.

### VIII.3.2.a. Description et génotypage des lignées

Trois et deux lignées portant respectivement une insertion dans les gènes *MtMSL2.4* ou *MtMSL2.1* ont été commandées. La position de ces insertions est présentée dans la figure 50. Ces lignées possèdent un nombre d'insertions supplémentaires variant de 11 à 54 (Tab. 7). Pour la production de graines, les plantes ont été mises à pousser en serre (cf. les conditions précises dans la partie "Culture et traitements divers").

Une feuille de chaque plante a été récoltée pour identifier leur génotype au locus d'intérêt à l'aide d'une PCR. L'ADNg a été extrait selon un protocole utilisé par l'équipe de



**Figure 50. Localisation des produits de PCR de génotypage sur les lignées Tnt1**

Les séquences génomiques de *MtMSL2.1*, *MtMSL2.4* et des lignées Tnt1 au même locus sont représentées proportionnellement à leur taille. Les flèches vertes indiquent les exons. Les flèches rouges et grises indiquent la position et l'orientation de l'insertion du rétrotransposon Tnt1. Les traits de couleur en dessous des séquences génomiques représentent les produits de PCR obtenus avec les amorces utilisées pour le génotypage. A gauche du trait de couleur est indiqué le numéro de ces amorces dans le tableau 6.

Florian Frugier (IPS2). Ces échantillons ont été congelés dans de l'azote liquide et broyés à l'aide d'un broyeur à billes (fréquence: 25/s, durée: deux fois 30s). 1mL de tampon d'extraction a ensuite été ajouté (composition du tampon d'extraction: Tris-HCl 100mM, NaCl 1,4M, EDTA 20mM, CTAB 2%, pH ajusté à 8 avec du NaOH). Les échantillons ont été incubés dans ce tampon pendant 30min à 65°C, en les mélangeant à l'aide d'un Thermomixer (*Eppendorf*) agitant les échantillons à 900rpm. 500µL de chloroformes ont ensuite été ajoutés, et les échantillons ont été laissés à incuber pendant 15 min à température ambiante en mélangeant les tubes par inversion tous les 2 à 3 minutes. Après cette incubation les tubes ont été mis à centrifuger pendant 10min à 12000rpm (~15000g). 600µL de surnageant ont été transférés

Lignée	NF7853	NF12936	NF8050	NF11827	NF21018
Gène ciblé	<i>MtMSL2.1</i>	<i>MtMSL2.1</i>	<i>MtMSL2.4</i>	<i>MtMSL2.4</i>	<i>MtMSL2.4</i>
Nom utilisé dans les résultats	/	/	Lignée 1	Lignée 2	/
Nombre total d'insertions en se basant sur l'annotation de haute confiance du génome <i>Mt4.0</i> <sup>a</sup>	11	26	29	23	54
Nombre total d'insertions en se basant sur l'annotation de faible confiance du génome <i>Mt4.0</i> <sup>a</sup>	15	30	33	23	58
Génération des graines réceptionnées	R1	R1	R1	R1	R0
Amorces utilisées <sup>b</sup>	73+74+84	75+76+83	77+78+84	79+80+84	81+82+84
Température d'hybridation	68°C	60°C	68°C	60°C	60°C
Allèle sauvage	658	918	585	585	599
Allèle mutant	839	198	431	409	344
homozygote sauvage	7	6	5	8	2
hétérozygote	4 <sup>c</sup>	2	4	5	11
homozygote mutant	0 <sup>c</sup>	5	2	2	0

**a.** Tang *et al.*, 2014. **b.** Les numéros correspondent aux amorces présentées dans le tableau 6. **c.** Résultats à confirmer avec un autre couple d'amorces

dans un nouveau tube, puis 500µL d'isopropanol y ont été ajoutés afin de précipiter l'ADN en les mélangeant par inversion. Pour collecter les culots d'ADN, une centrifugation a été faite pendant 1 min à 12000rpm. Le surnageant a été éliminé pour pouvoir rincer le culot d'ADN avec 1mL d'éthanol à 70%. Les tubes ont été centrifugés 5min à 12000rpm pour pouvoir ensuite éliminer l'éthanol, puis sécher les culots d'ADN en laissant les tubes ouverts sous une sorbonne pendant environ 15min. Les culots ont enfin été resuspendus dans 100µL d'eau milliQ préchauffée à 40°C.

Une PCR a ensuite été faite sur ces échantillons d'ADN. Le mélange réactionnel de PCR était composé du tampon de la DreamTaq (*ThermoFisher*) concentré 1X, de 200µM de dNTP, 0,6µM de chaque amorce, de 0,025u/µL de polymérase et de 2µL de matrice pour 25µL de mélange réactionnel. Le programme d'amplification utilisé fut [95°C-3min; (95°C-30s; X°C-30s; 72°C-40s à 1min) 30 cycles; 72°C-10min], X correspondant aux températures d'hybridation utilisées pour les trios d'amorces indiqués dans le tableau 7. Ces trois amorces ont été utilisées

dans le même mélange réactionnel afin de pouvoir différencier en une seule réaction les locus homozygotes sauvages, homozygotes mutants ou hétérozygotes. Les régions amplifiées de l'ADNg selon les amorces utilisées sont présentées dans la figure 50. Par exemple, pour la lignée NF8050, si l'insertion est présente dans le gène *MtMSL2.4* sur les deux chromosomes homologues, on s'attend à n'obtenir qu'une seule amplification, entre les amorces n°77 et 84, d'une taille de 431pdb. De même, si aucune insertion n'est présente, seule une amplification de 585pdb se fera entre les amorces n°77 et 78. Par contre, si l'insertion ne se trouve que sur un des deux chromosomes, une amplification se fera entre les amorces n°77 et 84 et une autre entre les n°77 et 78. On peut cependant noter que le trio d'amorces utilisé pour la lignée NF7853 ne permet pas de différencier les plantes hétérozygotes des plantes homozygotes mutantes. Il faudrait donc redessiner des couples d'amorces sur une autre localisation et retester le génotype de ces plantes.

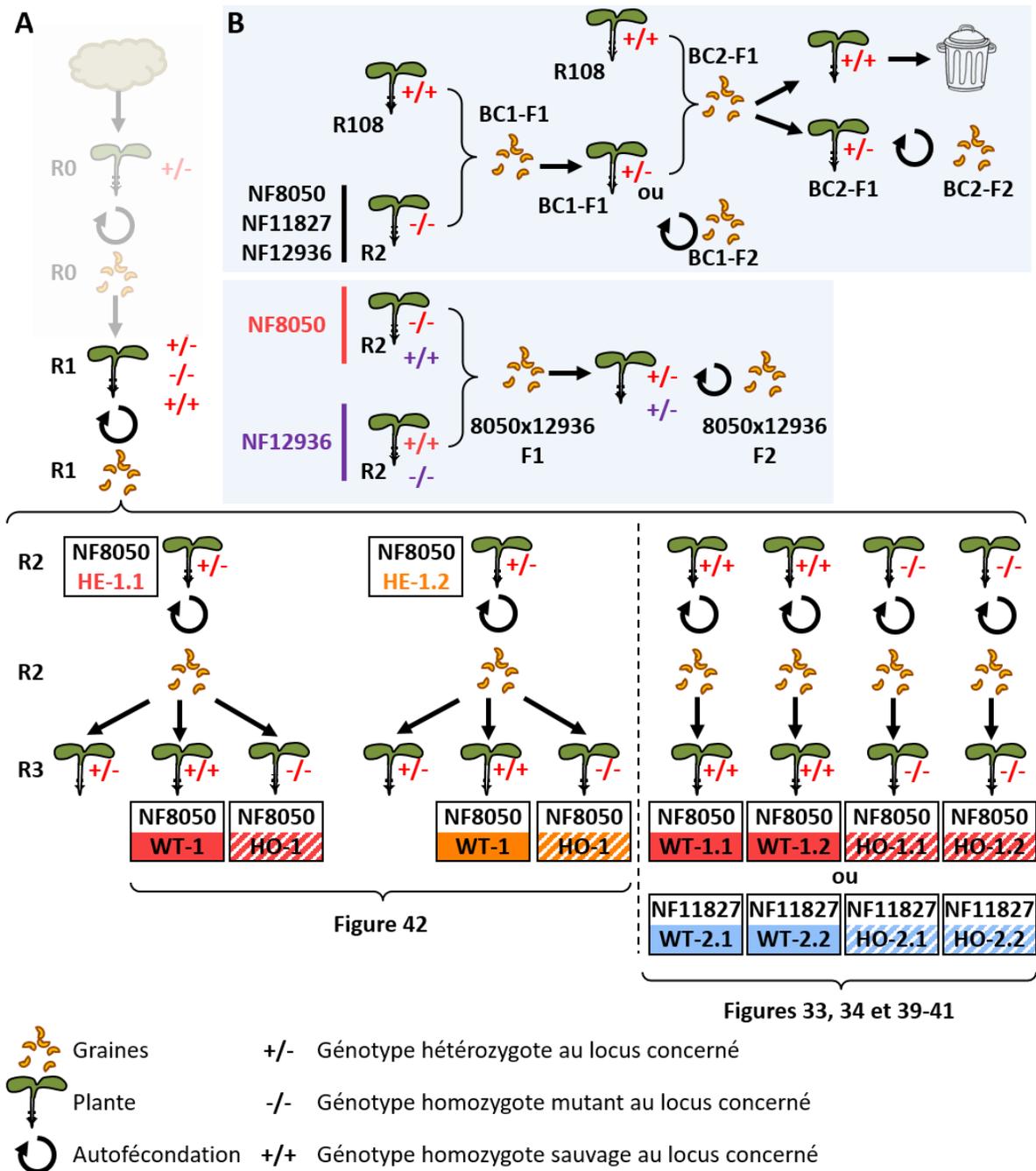
Pour les études phénotypiques des conséquences de l'absence de *MtMSL2.4*, seules les lignées NF8050 et NF11827 ont été utilisées. En effet, il n'a pas été possible d'obtenir d'homozygotes mutants sur le locus *MtMSL2.4* de la lignée NF21018. Les relations existant entre les différents lots de graines utilisées sont présentées dans la figure 51A.

### **VIII.3.2.b. Nettoyage du fond génétique et obtention de doubles mutants *Mtmsl2.1, Mtmsl2.4***

Tous les croisements ont été effectués selon la méthode décrite par Veerappan *et al.* (2014) sur des plantes poussant en enceinte de culture dans des pots de terreau préparés de la même manière que pour les plantes poussant en serre (cf. partie VIII.4.5). La sélection des fleurs fournissant le pollen ou des fleurs à émasculer s'est faite de manière aléatoire, selon leurs stades de développement aux jours où les croisements ont été obtenus. Pour protéger les fleurs croisées de la dessiccation, celles-ci ont été entourées d'un pochon de film plastique (Saran) qui a été retiré dès que le succès du croisement a été avéré. Dans le cas contraire,

laisser le pochon trop longtemps entraîne le développement de champignons. Pour mieux visualiser les relations existant entre les différents lots de graines ici générés, la figure 51 a été réalisée.

Pour nettoyer le fond génétique des lignées NF8050, NF11827, et NF12936, des croisements d'homozygotes mutants sur les locus *MtMSL2.4* ou *MtMSL2.1* ont été faits avec



**Figure 51. Matériel biologique, utilisé ou généré, basé sur les mutants d'insertion Tnt1**

**A.** Schématisation des processus ayant permis l'obtention des plantes analysées pour les divers phénotypes. Les premières étapes en filigrane ont été réalisées par les équipes ayant généré la collection de mutants Tnt1. **B.** Schématisation des étapes de rétrocroisement (panneau du haut) et croisement (panneau du bas) effectués pour nettoyer le fond génétique des mutants ou pour obtenir un double mutant *Mtmsl2.1, Mtmsl2.4*.

la plante sauvage R108. A l'issue de cette première série de rétrocroisements, les graines obtenues ont été mises à pousser en enceinte de culture afin d'effectuer une deuxième série de rétrocroisements avec des plantes R108. Avant d'effectuer ces croisements, ces plantes ont été génotypées de la même manière que précédemment afin de vérifier qu'elles possédaient bien les allèles attendus à l'état hétérozygote aux locus étudiés. Un récapitulatif de cette première série de croisements est présenté dans le tableau 8. Après la deuxième série de croisements, les graines obtenues ont été mises à pousser en serre. Comme les plantes mères sont hétérozygotes et homozygotes sauvages sur les locus concernés, on s'attendait à ce que la descendance soit pour moitié homozygote sauvage et pour moitié hétérozygote sur un locus donné. Cette descendance a donc été génotypée afin de pouvoir sélectionner les plantes hétérozygotes sur les locus d'intérêt. Les résultats de cette deuxième série de croisements sont présentés dans le tableau 9.

Des croisements entre les lignées NF8050 ou NF11827 avec la lignée NF12936 ont aussi été faits dans le but d'obtenir des doubles mutants *Mtmsl2.1, Mtmsl2.4*. Les graines obtenues ont été mises à pousser en serre afin de les laisser s'auto-féconder. Un génotypage a également été fait afin de vérifier que ces plantes étaient bien, comme attendu, hétérozygotes à la fois sur les locus *MtMSL2.1* et *MtMSL2.4*. Un récapitulatif de ces croisements est présenté dans le tableau 8.

### VIII.3.3. Microbiologie: souches de bactéries et culture

#### VIII.3.3.a. Rhizobia

La souche de rhizobia *Sinorhizobium meliloti* - 1021 a été utilisée pour inoculer les plantes transformées par hairy root. Cette souche de rhizobium a été cultivée sur du milieu YEB solide ou liquide (5 g/L d'extrait de boeuf; 1 g/L d'extrait de levure; 5 g/L de peptone; 5 g/L de saccharose; 0,5 g/L de MgCl<sub>2</sub>) complémenté en Streptomycine à 200µg/mL.

*Sinorhizobium medicae* – WSM419 a été utilisée pour inoculer les lignées mutantes Tnt1. Elle a été cultivée sur du milieu YEB liquide ou solide additionné de 12,5µg/mL de chloramphénicol. Pour les deux souches de rhizobia utilisées, les cultures ont été faites à 30°C.

### VIII.3.3.b. *Agrobacterium rhizogenes*

La souche d'*A. rhizogenes* ARqua 1 a été utilisée pour modifier génétiquement des racines de *M. truncatula* A17 par la technique du hairy root (Boisson-Dernier *et al.*, 2001). Cette souche a été cultivée à 30°C sur du milieu YEB liquide ou solide, additionné de Streptomycine à 100µg/mL.

Des bactéries électrocompétentes ont été utilisées pour être transformées avec les différents vecteurs d'expression obtenus précédemment. Pour rendre les bactéries électrocompétentes, celles-ci ont été cultivées, à partir d'une seule colonie, toute une nuit à 30°C dans 10mL de milieu YEB supplémenté en antibiotique. Elles ont ensuite été collectées par centrifugation à 14000rpm pendant 2 min à 4°C. Sans casser la chaîne du froid, le surnageant a été retiré pour être remplacé par 1mL d'eau milliQ stérile froide. Après avoir été remises en suspension, les bactéries ont été collectées par une centrifugation de 2min à 14000rpm à 4°C. Après élimination du surnageant, 1mL d'eau milliQ stérile froide a de nouveau été ajouté, puis les bactéries centrifugées après remise en suspension. 500µL d'eau ont alors été ajoutés après élimination du surnageant, puis le culot bactérien a été remis en suspension. Cette solution a de nouveau été centrifugée pendant 2min à 14000rpm à 4°C. Enfin, 200µL d'eau milliQ ont été ajoutés. Les bactéries peuvent être transformées sur un aliquot de 100µL de cette préparation. Au maximum 50ng de plasmides peuvent alors être ajoutés à cette suspension cellulaire. Après avoir laissé ce mélange dans la glace pendant 1min, celui-ci a été transféré dans une cuve à électroporation. Un choc électrique a été réalisé dans les conditions suivantes: 2,5kV-25µF-200Ω. 900µL de YEB ont ensuite été

**Tableau 8. Bilan sur les croisements réalisés - 1ère série**

Objectif	Nettoyage du fond génétique				Obtention de double mutants			
	R108	NF12936	NF8050	NF11827	NF8050	NF11827	NF11827	NF11827
Génération du lot de graines	?	R2	R2	R2	R2	R2	R2	R2
Plante fournissant le pistil	/	2	7	18	7	18	18	18
	n° du lot dans le couple Lignée/génération							
Génotype <sup>c</sup>	MtMSL2.1	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
	MtMSL2.4	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Génération du lot de graines	NF12936	R108	R108	R108	NF12936	NF12936	NF12936	NF12936
Plante fournissant le pollen	R2	?	?	?	R2	R2	R2	R2
	n° du lot dans le couple Lignée/génération							
Génotype <sup>c</sup>	MtMSL2.1	-/-	+/+	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-
	MtMSL2.4	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
Système de culture utilisé lors des croisements	Enceinte	Enceinte	Enceinte	Enceinte	Enceinte	Enceinte	Enceinte	Enceinte
Nom donné au lot de graines obtenues	BC1F1_ NF12936_1	BC1F1_ NF12936_2	BC1F1_ NF8050_1	BC1F1_ NF11827_1	F1_ 8050x12936_1	F1_ 11827x12936_1	F1_ 11827x12936_2	F1_ 11827x12936_2
	3	1	6	4	5	1	5	5
Bilan sur les plantes issues du croisement	Enceinte	/	Enceinte	Enceinte	Serre	Serre	/	/
	Système de culture utilisé pour faire pousser les graines							
Nombre de plantes survivant	1	/	2	3	4	0	/	/
	Génotype <sup>c</sup>	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	/	/
	+/+	/	+/+	+/+	+/+	/	/	/

**a.** Autofécondation et backcross avec des plantes R108. **b.** Autofécondation. **c.** +/+ correspond à un homozygote sauvage, +/- un hétérozygote et -/- à un homozygote mutant.

**Tableau 9. Bilan sur les croisements réalisés - 2ème série**

		Nettoyage du fond génétique			
Objectif		R108	R108	R108	R108
Plante fournissant le pistil	Lot de graines utilisé	/	/	/	/
	Nom de la plante mère issue du lot de graines	+/+	+/+	+/+	+/+
	Génotype <sup>a</sup>	+/+	+/+	+/+	+/+
		MtMSL2.1	MtMSL2.4	MtMSL2.1	MtMSL2.4
Plante fournissant le pollen	Lot de graines utilisé	BC1F1_NF12936_1_1_1	BC1F1_NF8050_1_1_1	BC1F1_NF11827_1_1_1	BC1F1_NF11827_1_1_2
	Nom de la plante mère issue du lot de graines	+/+	+/+	+/+	+/+
	Génotype <sup>a</sup>	+/+	+/+	+/+	+/+
		MtMSL2.1	MtMSL2.4	MtMSL2.1	MtMSL2.4
Système de culture utilisé lors des croisements		Enceinte	Enceinte	Enceinte	Enceinte
Nom donné au lot de graines obtenues		BC2F1_NF12936_1	BC2F1_NF8050_1	BC2F1_NF11827_1	BC2F1_NF11827_2
Nombre des graines issues du croisement		8	7	5	4
Système de culture utilisé		Serre	Serre	Serre	Serre
Nombre de plantes survivant		2 sur 5 semées	6	5	3
Nb de graines avec le génotype donné <sup>a</sup>		0	NT	NT	NT
		MtMSL2.1	NT	NT	NT
		+/+	NT	NT	NT
		+/+	1	3	2
		+/+	5	2	1
Croisements futures		Autofécondation	Autofécondation	Autofécondation	Autofécondation

a. +/+ correspond à un homozygote sauvage, +/- un hétérozygote et -/- à un homozygote mutant, NT : non testé.

immédiatement ajoutés dans la cuve. Le YEB inoculé avec les *A. rhizogenes* a été transféré dans un tube Eppendorf de 2mL, puis laissé à incuber pendant 2h à 30°C sans agitation. Ce milieu inoculé a enfin été étalé sur du milieu YEB solide, supplémenté de Streptomycine à 100µg/mL et du marqueur de sélection porté par le vecteur d'intérêt (dans ce cas, il s'agissait de Spectinomycine à 100µg/mL).

### VIII.3.3.c. *E. coli*

La souche d'*E. coli* DH5α a été utilisée pour amplifier les différents vecteurs dépourvus de la cassette de suicide Gateway. La souche DB3.1 a elle été utilisée pour propager les vecteurs vides, portant la cassette de suicide Gateway. Ces bactéries ont été cultivées sur du milieu LB (Bacto-tryptone 10g/L ; Bacto-yeast extract 5g/L et NaCl 10g/L ; 15g/L d'Agar si besoin) additionné en antibiotique selon le marqueur de sélection porté par le vecteur d'intérêt. Pour transformer ces bactéries, un protocole basé sur le choc thermique a été utilisé. 150ng de plasmides ont été ajoutés à un aliquot de 100µL de bactéries thermocompétentes. Ce mélange a été laissé sur la glace pendant 30min. Le choc thermique a été réalisé pendant 30s à 42°C. Les bactéries ont ensuite été remises dans la glace pendant 5min. 900µL de milieu 2YT liquide (Bacto-tryptone 16g/L ; Bacto-yeast extract 10g/L et NaCl 5g/L; 15g/L d'Agar si besoin) ont été ajoutés. Ce mélange a été laissé à incuber pendant 1h à 37°C avec une agitation d'environ 120rpm. 100µL de ce mélange ont enfin été étalés sur une boîte contenant du milieu LB solide additionné en antibiotique selon le marqueur de sélection porté par le plasmide utilisé.

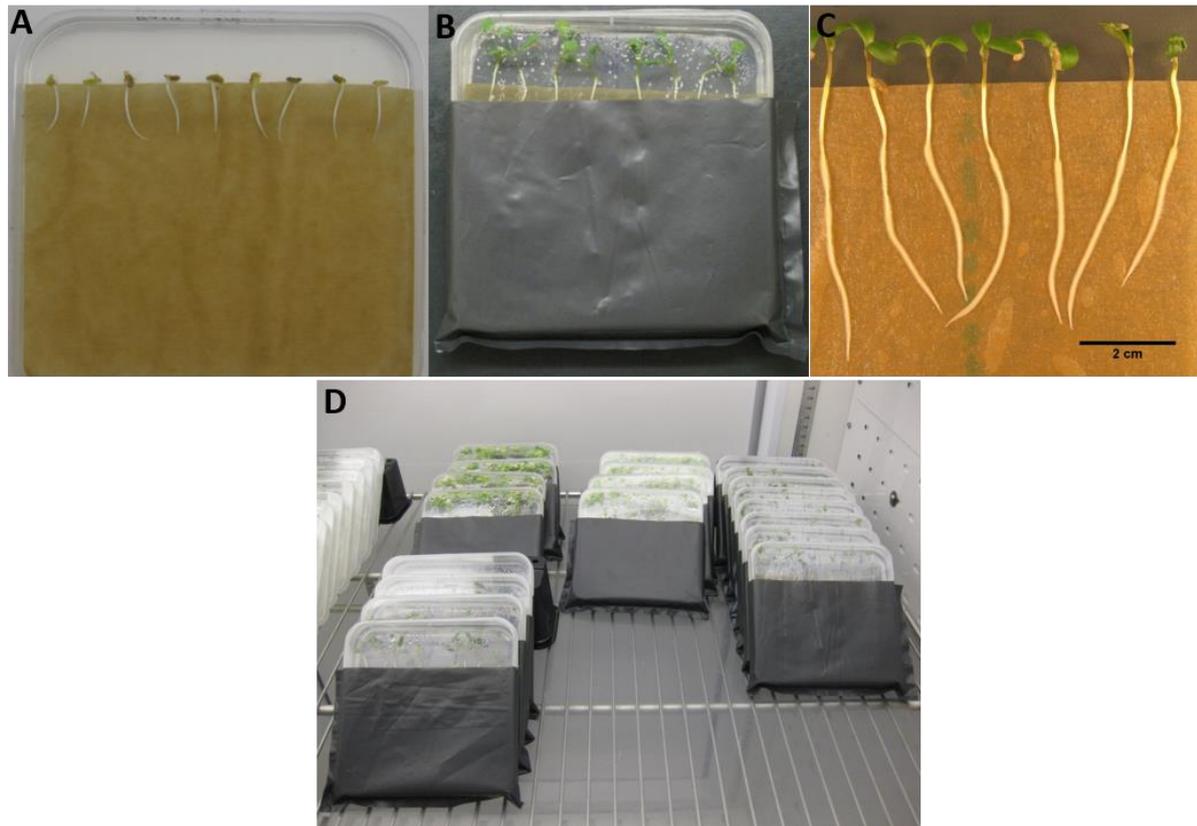
## VIII.4. Culture et traitements divers

Quelles que soit les conditions testées, les graines de *M. truncatula* ont été scarifiées avec du papier de verre (granulométrie : P80). Cette étape permet la fragilisation du tégument de la graine, facilitant ainsi la pénétration de l'eau pendant la germination. Par la suite, les

graines ont été stérilisées dans une solution composée d'un mélange d'eau de Javel et de liquide vaisselle (1/4 de pastille d'une solution commerciale pour 250mL d'eau, additionné d'une goutte de liquide vaisselle). Les graines ont ainsi été agitées pendant 30 min à 120 rpm sous une hotte à flux laminaire, puis ont été rincées à l'eau stérile jusqu'à disparition de la mousse du liquide vaisselle (soit environ 3 séries de rinçages de 5 minutes avec un volume environ deux fois supérieur à celui utilisé pour stériliser). Après les étapes de rinçages, l'eau a été retirée en partie pour en laisser une petite quantité, afin que les graines puissent gonfler pendant 1h d'incubation à température ambiante. Les graines ont ensuite été mises à stratifier sur un substrat gélosé pendant 3 à 4 jours, à l'envers, à une température de 4°C et dans l'obscurité. Sauf mention contraire, elles ont enfin été mises à germer toute une nuit, à température ambiante, à l'envers et dans l'obscurité.

### **VIII.4.1. Conditions de culture pour l'extraction des poils racinaires, la mesure de la taille des poils et le traitement des racines aux NFs.**

Au maximum huit plantules germées ont été mises à croître par boîte de Petri carrée (12cmx12cm) contenant du milieu gélosé recouvert d'un papier support absorbant (*Mega International, Minneapolis, USA*), afin d'éviter la pénétration des racines dans la gélose (Fig. 52A). Ces boîtes contenaient du milieu Fahraeus modifié selon Sauviac *et al.* (2005) ( $\text{CaCl}_2$  1mM ;  $\text{MgSO}_4$  0,5mM ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,4mM ;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,8mM Fe EDTA 50 $\mu\text{M}$  ; 0,1mg.L<sup>-1</sup> des microéléments suivants :  $\text{MnSO}_4$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  et  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  ; pH ajusté à 7,5 avec du KOH ; Agar HP 696 Kalys 1,3%). 125 $\mu\text{L}$  d'eau miliQ stérile ont été ajoutés sur chacune des radicules transférées afin d'éviter leur dessèchement le temps de leur adaptation aux changements de conditions. Après avoir été refermées avec un scotch micropore, les boîtes de Petri ont été recouvertes sur leur partie basse par une pochette en plastique noir afin de protéger les racines de la lumière (Fig. 52B). Les boîtes ont enfin été placées, légèrement inclinées par rapport à la verticale, dans des enceintes de culture stabilisant les conditions à



**Figure 52. Présentation des plantes cultivées dans des conditions in vitro.**

**A.** Photo de plantules germées prise juste après leur transfert dans une boîte de Petri carrée (12cmx12cm). **B.** Photo de la boîte de Petri recouverte de la pochette en plastique noir. **C.** Photo de racines une semaine après le début de la culture. **D.** Photo des boîtes mises en place dans l'enceinte de culture.

24°C, 60% d'humidité et une photopériode de 16h de jour - 8h de nuit (Fig. 52D).

Les plantes utilisées pour extraire les poils racinaires non traités ont été prélevées 4j après transfert. Pour celles dont les poils racinaires traités aux NFs ont été extraits, l'inoculation s'est faite 3j après le transfert. Le NF utilisé (gracieusement donné par Fabienne Maillet, LIPM – CNRS/INRA – Toulouse) a été extrait de la bactérie *S. meliloti*. Les boîtes ont été mises à l'horizontal afin d'immerger les plantules dans 20mL d'eau stérile contenant du NF à  $10^{-8}$  M final (ou d'eau stérile seule pour les contrôles). Après une heure d'immersion, l'excès de liquide a été éliminé et les boîtes ont été remises à la verticale en chambre de culture. Les prélèvements de poils ont été effectués à 3h et 16h après le début du traitement pour l'étude des transcrits de *MtMSL* par qPCR.

Pour les plantes dont les poils racinaires ont été mesurés, les acquisitions ont été faites 3j après le transfert, la petite taille des racines facilitant ainsi le montage entre lame et lamelle.

Concernant les plantes dont les racines ont été traitées à l'auxine ou au NF pour ensuite mesurer les poils racinaires, les traitements ont été pratiqués 2j après le repiquage. Le traitement au NF a été appliqué de manière similaire au protocole expliqué précédemment. Les poils déformés ont été comptés sur les images acquises pour mesurer la taille des poils racinaires, ce qui a permis d'explorer les différents plans focaux. Ce comptage s'est fait environ 19h après le traitement, et seuls les poils présentant un gonflement surmonté d'une structure allongée ont été considérés. Pour les plantes traitées à l'auxine, le protocole adopté était également le même. De l'Indole-3-acetic acid (*IAA*) a cependant été ajouté à une concentration finale de 10 $\mu$ M à la place du NF.

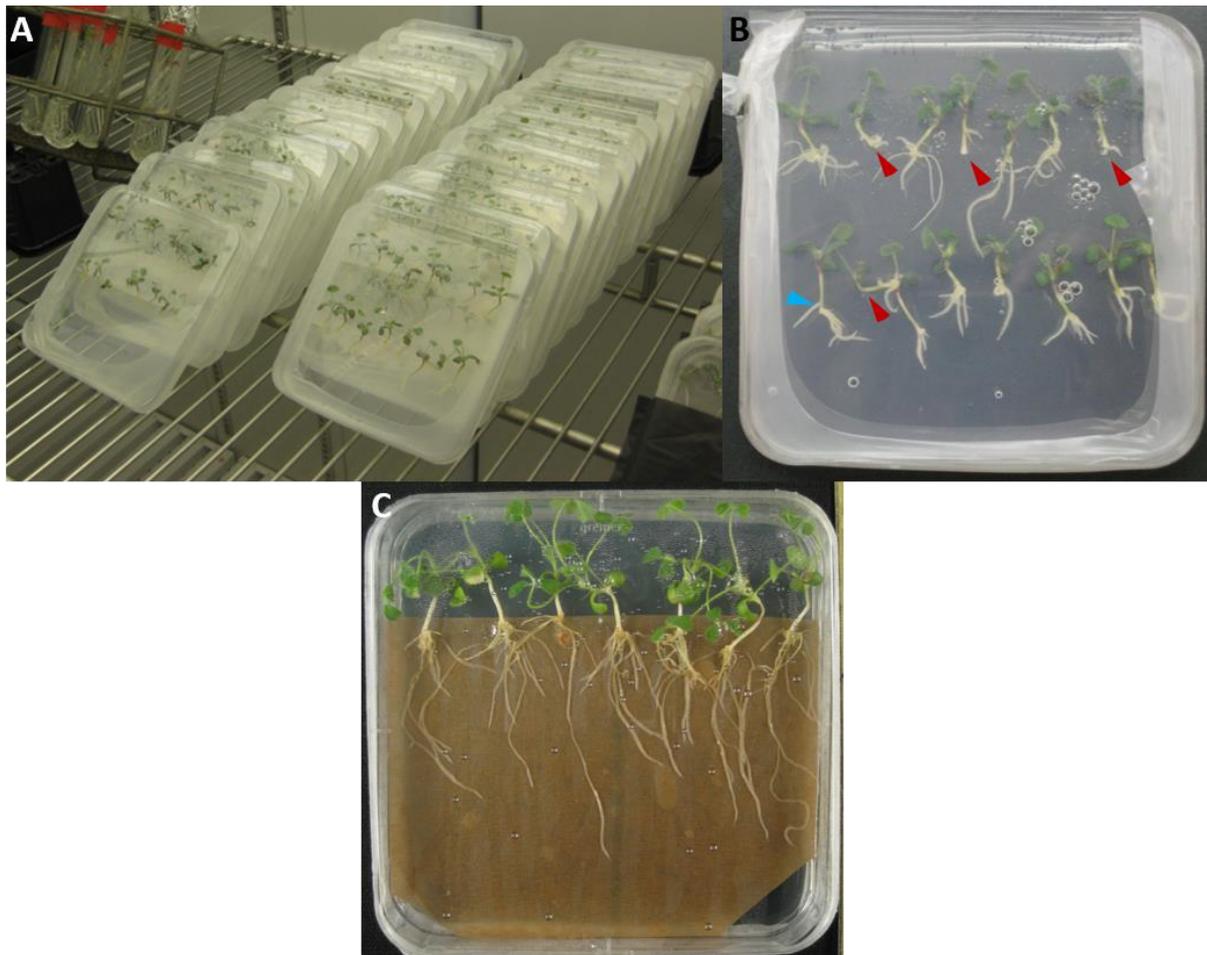
### **VIII.4.2. Production de racines génétiquement modifiées par hairy root**

Le hairy root est une méthode mise en place par Boisson-Dernier *et al.* (2001) permettant de modifier génétiquement les racines de *Medicago truncatula*. Cette transformation est permise par l'utilisation des souches de bactéries phytopathogènes *A. rhizogenes*, sélectionnées pour être moins pathogènes que les souches naturelles. Elles restent cependant capables d'insérer aléatoirement dans le génome de la plante, des séquences nucléiques situées entre les régions left border (LB) et right border (RB) des plasmides avec lesquels elles ont été modifiées. Sous l'action de ces bactéries, les tissus génétiquement modifiés forment, par divisions cellulaires successives, de nouvelles racines qui sont elles aussi génétiquement modifiées. Ce protocole a été utilisé pour modifier les racines avec les fusions transcriptionnelles et traductionnelles décrites précédemment. Pour les témoins négatifs, des bactéries portant le plasmide *pkGWF57* vide ont été utilisées pour les expériences de coloration GUS. Pour les observations au microscope confocal, des racines de plante A17 non transformées ont été utilisées.

## Chapitre VIII

---

24h avant la transformation des plantes, 100µL d'une préculture liquide d'*A. rhizogenes* modifiées sont étalés sur une boîte de Petri contenant le même milieu sous forme gélifiée avec les antibiotiques appropriés. Le but est d'obtenir un tapis bactérien pour l'inoculation des plantes. Le jour de la transformation, les racines de plantules A17 mises à germer sur la nuit sont découpées transversalement aux deux-tiers de leur longueur pour éliminer leur pointe racinaire. La section racinaire est raclée sur le tapis bactérien afin de former une petite boule de bactéries à la pointe de la section. Les plantules inoculées sont déposées sur du milieu Fahraeus complémenté en azote (1mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) et en kanamycine (25mg/mL) afin de favoriser la croissance des racines transformées et celles d'éliminer non transformées. 16 plantules sont déposées sur deux rangées de 8 par boîte 12cmx12cm. Pour refermer les boîtes,



**Figure 53. Présentation des plantes transformées par la méthode du hairy root.**

**A.** Photo de plantes cultivées dans des enceintes de culture, une semaine après transfert à 24°C. **B.** Exemple de plantes chimères obtenues avant le transfert sur milieu Fahraeus. Les flèches rouges indiquent les plantes qui n'ont pas été transférées, leurs racines n'étant pas suffisamment développées. La flèche bleue indique une racine adventive à retirer avant le transfert de milieu. **C.** Exemple de hairy root observé 14j après transfert sur milieu Fahraeus et 7j après inoculation avec des *S. meliloti* - 1021.

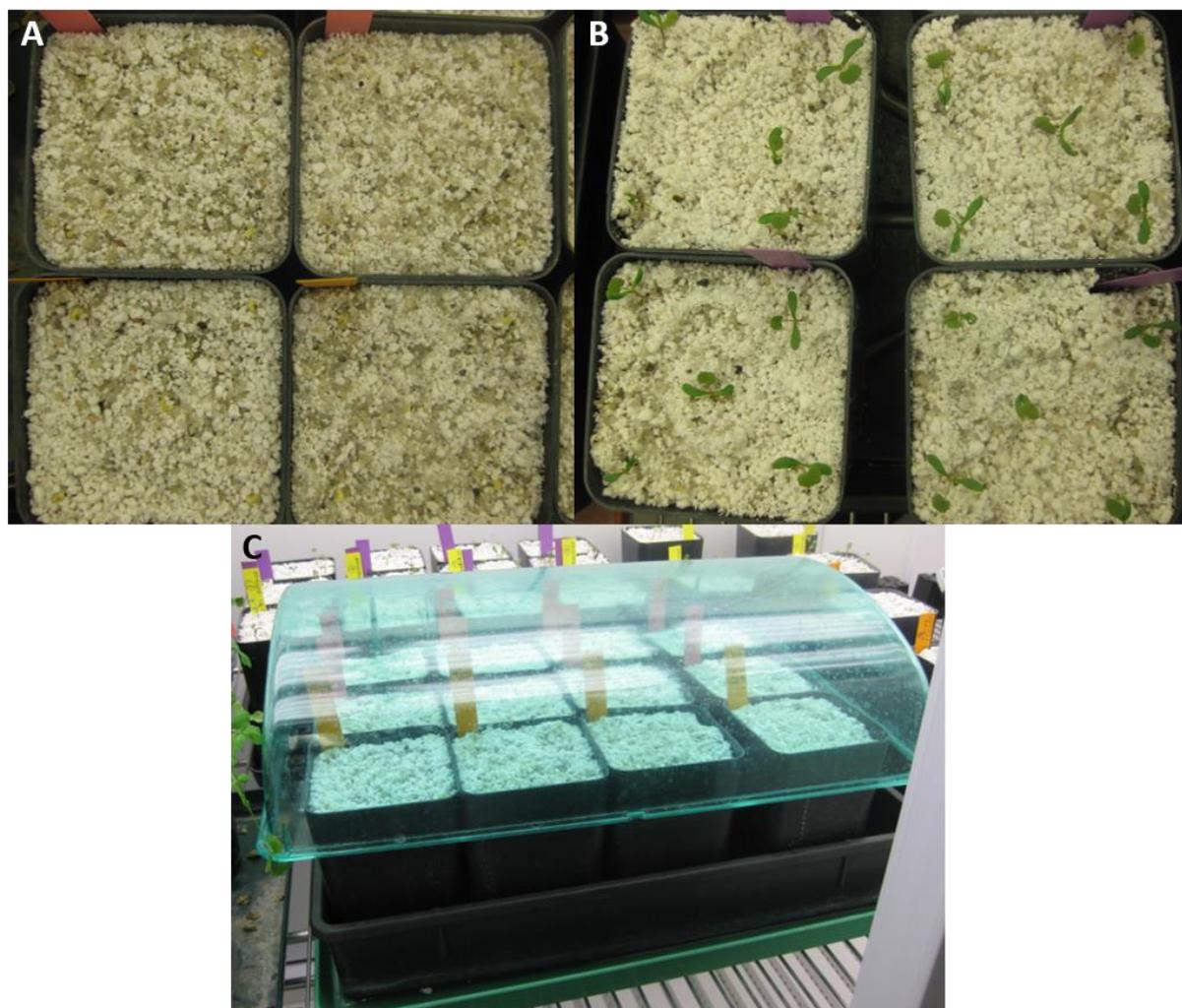
une bande de parafilm a été étirée sur leurs bords, en laissant le bord supérieur à nu. La culture a ensuite eu lieu à 20°C avec une photopériode de 16h, en mettant les boîtes en position inclinée. Au bout d'une semaine, les boîtes ont été transférées dans une enceinte de culture à 24°C, 60% d'humidité, photopériode de 16h (Fig. 53A). Par la suite, les plantes dont les racines se sont le plus développées (Fig. 53B) ont été transférées sur milieu Fahraeus, au-dessus d'un papier absorbant à raison de 8 plantes par boîte. Un cal doit s'être formé sur la zone où la plante a été inoculée et seules les racines sortant de ce cal sont génétiquement modifiées. Aussi, les racines adventives (celles sortant de l'hypocotyle), se développant malgré la présence de l'antibiotique, sont retirées au moment du transfert. Les plantes transférées sont remises en culture à 24°C pendant une semaine. Le but de cette étape est d'épuiser les réserves en azote de la plante afin de pouvoir étudier la mise en place de la symbiose par la suite.

Pour les racines non inoculées avec les rhizobia, les observations au microscope confocal ou les colorations GUS ont été réalisées une semaine après transfert sur milieu Fahareus. Pour les racines inoculées avec les rhizobia, une culture de bactéries *S. meliloti* – 1021 a été initiée et maintenue jusqu'à atteindre une absorbance à 600nm de 0,4. Une fois l'absorbance atteinte, le milieu a été remplacé par de l'eau stérile en centrifugeant la culture à 2779g pendant 10 minutes. Le tout a enfin été dilué jusqu'à obtenir une absorbance à 600nm de 0,05 dans le but de ne pas saturer les racines avec des bactéries. Sous une hotte à flux laminaire, les racines ont été mises en contact avec 20mL de milieu bactérien, puis laissées à incuber pendant 1h avant de se débarrasser du milieu à la pipette.

### **VIII.4.3. Inoculation des plantes pour le comptage des nodules**

Les plantes germées ont été transférées en pots contenant un mélange 3:1 de perlite : sable imbibé d'eau du robinet (Fig. 54A). Ces pots ont dans un premier temps été recouverts

d'une cloche afin de préserver leur l'humidité (Fig. 54C). Ils ont ensuite été mis à croître dans des enceintes de cultures à 24°C, 60% d'humidité et une photopériode de 16h. Une semaine après le repiquage, la cloche a été retirée des pots et chaque plante a été inoculée avec 10mL d'une solution d'eau contenant des *S. medicae* – WSM419 à une  $DO_{600nm}$  de 0,09 (Fig. 54B). Dans chaque pot, 10mL supplémentaires de cette solution ont été répartis de manière homogène. Pendant les deux premières semaines de croissance, chaque pot a été arrosé une fois par semaine avec 100mL de milieu Faraheus liquide. Pour les semaines restantes avant la récolte des nodules, chaque pot a été arrosé avec 100mL de milieu Faraheus liquide en début



**Figure 54. Présentation de la culture pour le phénotypage du nombre de nodules chez les mutants Tnt1**

**A.** Photo de pots après repiquage des plantules mises à germer sur une nuit dans des conditions *in vitro*. 5 plantules ont été transférées aux quatre coins et au centre de chaque pot. **B.** Photos des plantes une semaine après transfert. **C.** Photo des pots recouverts d'une cloche afin de limiter l'évaporation de l'eau pendant la première semaine après transfert des plantes en pots.

de semaine et 50mL de cette solution en fin de semaine. Au bout de 37 jours après inoculation, les plantes ont été déterrées afin de compter les nodules et peser la masse fraîche du système racinaire de chaque plante. A titre informatif, les racines ont aussi été mises à dessécher dans une étuve afin de pouvoir déterminer leur masse sèche.

#### **VIII.4.4. Etude de la croissance racinaire et de l'émergence des racines secondaires**

Pour étudier la croissance des racines et l'émergence des racines secondaires sur milieu pauvre, les plantes ont été semées et mises à germer directement sur le milieu d'étude composé d'agar Kalys concentré à 0,9%, sans papier absorbant. Les graines ayant du mal à germer sur le milieu LRIM, celles-ci ont d'abord été mises à germer sur un milieu gélosé avant d'avoir été transférées sur le milieu d'étude sans papier absorbant. Il comporte un demi volume de solution nutritive Soluplant 18.6.26 (*Duclos International*), 3% de saccharose, le pH a été ajusté à 5,8 avec du HCl et 0,9% d'agar Kalys ont été ajoutés (Gonzalez-Rizzo *et al.*, 2006). Dans les deux cas, les boîtes de Petri ont été mises à croître dans une enceinte de culture selon les mêmes conditions qu'énoncées précédemment. Les boîtes ont ensuite été prises en photo de manière régulière afin de réaliser une cinétique de croissance de racines. Pour mesurer la taille des racines, l'outil "Simple neurite tracer" du logiciel ImageJ a été utilisé. Le nombre de racines secondaires observées sur les photos a également été compté.

#### **VIII.4.5. Condition de croissance des plantes poussant en serre**

Pour la production de graines, les plantes ont été mises à pousser en serre. Dans un premier temps, les plantes ont été mises à croître pendant une semaine en enceintes de culture dans un milieu composé d'Agar Kalys à 0,9%. Des pots ont été préparés en y disposant dans leur fond un lit de billes d'argiles. Ils ont ensuite été remplis avec du terreau (mélange de 7 volumes de tourbe pour 12 volumes de sable en hiver, et 7 de tourbe pour 7 de sable en été). Un mélange d'engrais a été ajouté (*Osmocote exact tablet - Scotts*), puis le terreau a été



**Figure 55. Croissance de *M. truncatula* en serre**

**A.** Photo de pots protégés par des sacs à autoclave afin d'éviter le dessèchement du terreau au moment du transfert de jeunes plants de *M. truncatula* dans les pots. **B.** Aspect des plantes de *M. truncatula* au moment où les sacs à autoclave ont été retirés.

traité avec des nématodes pour limiter le développement de larves de thrips. Pour limiter le développement d'oïdium, des lampes à soufre ont été utilisées. Les logettes utilisées ont été maintenues à 24°C. Dans les premiers temps après le repiquage, un sac à autoclave a été placé au-dessus des pots afin de limiter l'évaporation de l'eau (Fig. 55A). Quand les premières feuilles ont commencé à émerger, ce sac a enfin été retiré (Fig. 55B).

### VIII.5. Analyses de l'expression des *MtMSL*

#### VIII.5.1. Analyse des transcrits de poils racinaires par qPCR ou RNAseq

Les protocoles présentés ici ont été utilisés pour réaliser les figures 23, 24 et 25C. Pour les données de transcriptomique obtenues par nos collaborateurs, se référer au protocole énoncé dans la publication de Damiani *et al.* (2016).

##### VIII.5.1.a. Extraction des poils racinaires

La méthode utilisée est tirée de Sauviac *et al.*, (2005). Ce même protocole a été utilisé pour extraire les poils racinaires pour les analyses transcriptomique (Damiani *et al.*, 2016). Le papier support avec les plantules a été retiré de la boîte et déposé sur un papier absorbant afin de retirer l'excès d'eau. Les pointes racinaires étant fragiles, celles-ci ont été retirées afin d'éviter la contamination de l'extrait de poils racinaires. Les racines de chaque plantule ont été transférées dans un pot à fond plat immergé dans de l'azote liquide afin de figer l'état des

transcrits. 10 de ces racines ont ensuite été déplacées dans un tube Falcon de 50mL également immergé dans l'azote liquide. Le tube a été vortexé deux à trois fois 15s avec ré-immersion dans l'azote liquide entre deux vortex. Cette étape permet le décrochage des poils racinaires en cours ou en fin de croissance : ceux répondant le plus au facteur Nod. Les poils ont ensuite été ramenés dans le fond du tube Falcon en tapant celui-ci doucement sur une surface plane. A l'aide d'une longue pince fine, les racines sans poils ont été retirées. L'extraction des poils a enfin été répétée avec les racines restantes par lot de 10 en réutilisant le même tube Falcon.

### **VIII.5.1.b. Extraction d'ARN de poils racinaires et de racines et production d'ADNc**

Les extractions d'ARN des échantillons de poils et de racines sans poils ont été réalisées au TRIzol (*Thermo Fisher*). Les poils représentant une plus faible quantité de matériel, les volumes de réactifs ont été adaptés pour ces extraits selon les recommandations énoncées dans la fiche technique associée au TRIzol, *Invitrogen*, juin 2007. Le maximum des poils a été ramené au fond du tube Falcon en le tapant sur la paillasse et en raclant ses parois à l'aide d'une spatule refroidie dans de l'azote liquide. 800µL de TRIzol ont ensuite été ajoutés dans le fond du tube Falcon froid : le TRIzol refroidi forme alors une pâte. A l'aide de cette pâte, les parois du tube ont été raclées afin de récupérer le maximum de poils. A température ambiante, le Trizol redevient liquide. Celui-ci peut alors être transféré avec les poils dans un tube Eppendorf de 2mL, pour ensuite être vortexé immédiatement. Ce tube est laissé à température ambiante le temps de faire de même avec les autres échantillons si besoin. La suite du protocole est commune, au volume de réactifs près, à celui utilisé pour l'extraction des ARN des racines.

Pour extraire l'ARN des racines, celles-ci ont été broyées dans un mortier refroidi dans de l'azote liquide afin d'avoir l'équivalent d'un volume de 500µL de poudre. Cette poudre a ensuite été transférée dans un tube Eppendorf de 2mL refroidi dans de l'azote liquide. 1mL

## Chapitre VIII

---

de TRIzol a alors été ajouté, puis le tube vortexé immédiatement. Celui-ci a été laissé à température ambiante le temps de faire de même avec les autres échantillons si besoin. Pour la suite du protocole, les volumes utilisés pour les échantillons de poils racinaires sont indiqués, suivis des volumes utilisés pour les échantillons de racines entre parenthèse. Les tubes contenant les échantillons ont été incubés dans le TRIzol 5min à température ambiante puis 5min à 30°C. 160µL (300µL) de chloroforme ont ensuite été ajoutés, puis les tubes ont immédiatement été vortexés et laissés à incuber 3min à 30°C. Ceux-ci ont ensuite été centrifugés 15min à 12000rpm à 4°C. 400µL (500µL) de la phase supérieure obtenue ont ensuite été transférés dans des tubes Eppendorf de 1,5mL, puis 400µL (750µL) d'isopropanol ont été ajoutés. Les échantillons ont alors été laissés à incuber 5min à 55°C afin de laisser précipiter l'ARN. Pour collecter l'ARN précipité, les tubes ont été centrifugés 10min à 12000rpm à 4°C. Le surnageant a ensuite été complètement éliminé. Les étapes suivantes ont été réalisées sur la glace. Pendant 10min, le reste d'isopropanol a été mis à évaporer, les tubes étant laissés ouverts sous une sorbonne. 800µL (1,5mL) d'éthanol 70% froids ont été ajoutés afin de rincer les culots d'ARN par inversion des tubes. Ceux-ci ont ensuite été centrifugés 10min à 12000rpm à 4°C et le surnageant éliminé. L'étape de rinçage peut être répétée une deuxième fois, mais cela peut être facultatif. Pour laisser évaporer le restant d'éthanol les tubes ont été laissés ouverts quelques minutes sous une sorbonne. Afin de remettre les culots d'ARN en suspension, ceux-ci ont été repris dans 20µL (50µL) d'eau ultra-pure préchauffée à 55°C. Afin de quantifier les ARN, un nanodrop (Thermo Scientific) a été utilisé.

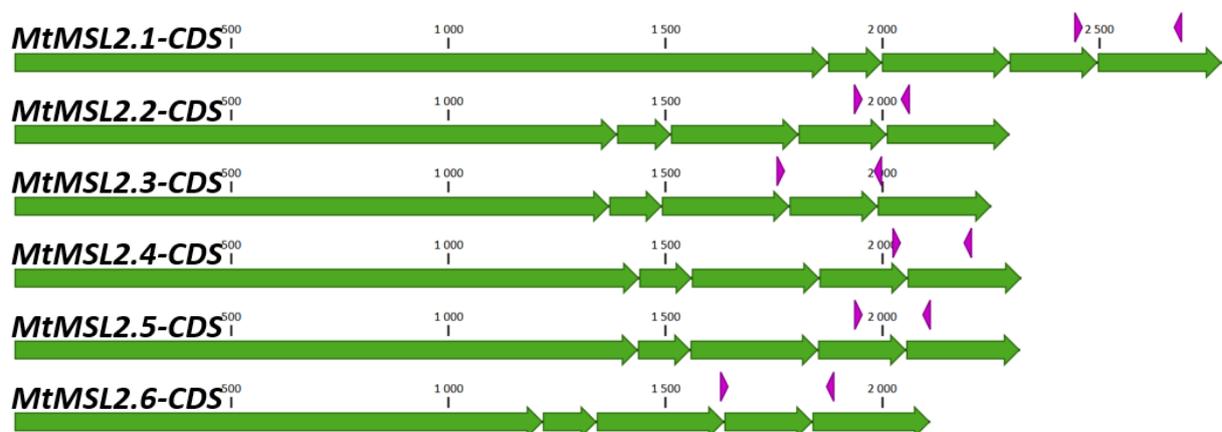
Pour produire les ADN complémentaires aux ARN (ADNc), 1,5 à 2µg d'ARN ont été traités avec de la DNase I, RNase-free, (*Fermentas*) afin d'éliminer les traces d'ADN. La quantité d'ARN a ensuite été dosée au nanodrop et la qualité contrôlée par électrophorèse sur gel d'agarose 1% additionné de bromure d'éthidium (BET). La transcription inverse a été effectuée sur 1µg d'ARN traité à la DNase avec l'enzyme SuperScript III RT (*Invitrogen*) et des amorces

oligo(dT)20 pour cibler la rétro-transcription des ARNm.

### VIII.5.1.c. Analyse des transcrits par qPCR

Des amorces ont été dessinées afin que les membres de chaque couple s'hybrident sur deux exons différents du côté 3' des ADNc des gènes testés (Fig. 56). Les amorces pour les qPCR sont listées dans le tableau 6. Le mélange pour une réaction de PCR est composé de 1 $\mu$ M d'amorce sens, 1 $\mu$ M d'amorce anti sens, 5 $\mu$ L de mélange réactionnel LightCycler 480 DNA SYBR Green I Master (Roche) et 2,5 $\mu$ L de matrice, pour un volume final de 10 $\mu$ L. Le programme de PCR [95°C-10min; (95°C-15s; 60°C-15s; 72°C-15s) 45 cycles. Courbe de fusion: 95°C-10s; 65°C-1min; 37°C- $\infty$ ] a été effectué à l'aide d'un lecteur de plaque en temps réel, (Roche). Pour chaque réaction PCR testée, le système retourne une valeur *Ct* correspondant au nombre de cycles de PCR à partir duquel le signal fluorescent dépasse le bruit de fond. Pour chaque couple amorce/échantillon testé, la moyenne des *Ct* de deux répliques techniques a été utilisée afin d'effectuer les calculs qui seront énoncés plus bas.

Afin de tester les amorces, de l'ADNc issu de racines a été dilué 5, 10 et 30 fois ou 5, 10 et 20 fois. Ces dilutions ont été ajoutées en tant que matrice dans le mélange réactionnel de qPCR, puis le programme détaillé plus haut a été utilisé. Afin de vérifier la spécificité des amorces, la courbe de fusion obtenue pour chaque couple a été analysée. Les couples



**Figure 56. Sites d'hybridation des amorces utilisées pour la qPCR sur les ADNc des MtMSL**

Les séquences codant pour les six *MtMSL* de la classe II sont représentées proportionnellement à leurs tailles. Les flèches vertes indiquent la position des exons. Les flèches violettes indiquent la position et le sens d'hybridation des amorces sur la séquence des CDS des *MtMSL*.

d'amorces pour lesquels cette courbe présentait 2 maximums locaux ont été éliminés. De plus, les produits de PCR résultants ont été purifiés à l'aide du kit « QIAquick PCR Purification » (Qiagen), et envoyés à séquencer (*GATC Biotech*), afin de s'assurer que ces produits d'amplification correspondaient bien aux séquences attendues. Pour calculer l'efficacité des amorces, la pente de la droite d'équation [5] a été calculée. Cette pente a permis de définir l'efficacité des amorces selon l'équation [6], une amorce optimale ayant une efficacité de 2.

$$Ct = pente \times \log_{10}(\text{facteur de dilution}) \quad [5]$$

$$Efficacité_{\text{amorce}} = 2^{-\frac{1}{pente}} \quad [6]$$

Pour l'étude des transcrits dans les échantillons d'intérêt, de l'ADNc dilué de façon adéquat a été utilisé comme matrice (dilution 5 fois pour *MtMSL2.2*, *2.3*, *2.5* et *2.6*, et dilution 10 fois pour *MtMSL2.1*, *2.4*, *MtPR10* (Medtr2g035105) et *MtSUNN* (Medtr4g070970)). Pour chaque dilution utilisée, des qPCR ont aussi été réalisées sur les mêmes échantillons avec les amorces des gènes de ménage *MtACT* (Medtr2g008050, codant pour l'actine), *MtH3L* (Medtr4g097170 – codant pour un histone) et *MtRBP* (Medtr6g034835 – codant pour une protéine associée aux ribosomes). Le modèle de calcul de Pfaffl (2001) permet de faire une quantification relative de l'expression d'un gène entre deux échantillons, en comparaison de l'expression d'un gène de ménage. De ce modèle a été déduite l'expression d'un gène d'intérêt, relativement à l'expression d'un gène de ménage dans un seul échantillon donné:

$$\frac{Efficacité_{\text{amorce gène de ménage}}^{Ct_{\text{gène de ménage}}}}{Efficacité_{\text{amorce gène d'intérêt}}^{Ct_{\text{gène d'intérêt}}}} \quad [7]$$

## VIII.5.2. Analyse des données de transcriptomique

**Tableau 10. Sondes révélant l'expression des MtMSL de la classe II grâce aux puces Affymetrix Medicago Gene Chip®**

Gènes	Sondes
<i>MtMSL2.2</i>	<b><i>Mtr.31153.1.S1_at</i></b>
	<i>Mtr.26195.1.S1_at</i>
<i>MtMSL2.3</i>	<b><i>Mtr.35040.1.S1_at</i></b>
	<b><i>Mtr.3490.1.S1_x_at</i></b>
<i>MtMSL2.5</i>	<b><i>Mtr.27950.1.S1_at</i></b>
	<i>Mtr.5781.1.S1_at</i>
	<b><i>Mtr.1692.1.S1_at</i></b>
	<i>Mtr.9831.1.S1_at</i>
	<b><i>Mtr.32024.1.S1_at</i></b>

Les sondes en gras représentent celles ayant fourni les données présentées dans les figures des résultats. Elles correspondent aux sondes donnant le signal le plus fort dans la plupart des analyses présentées.

Pour les transcriptômes obtenus par RNAseq, les données ont été extraites des tableaux supplémentaires des publications concernées (Damiani *et al.*, 2016; Jardinaud *et al.*, 2016).

Pour les transcriptômes issus de puces Affymetrix Medicago Gene Chip®, les données ont été extraites de la base de données MtGEA (Benedito *et al.*, 2008). Les

sondes disponibles pour chaque gène, et celles utilisées pour extraire les données, sont listées dans le tableau 10.

## VIII.5.3. Analyse des transcrits par coloration GUS

La coloration GUS a été faite selon le protocole utilisé au LIPM de Toulouse (fourni par Sandra Bensmihen). Le tampon de coloration GUS est composé de tampon phosphate à 0,1M – pH7, de 0,5mM de ferricyanure de potassium, de 0,5mM de ferrocyanure de potassium, de 10mM d'EDTA, et de X-gluc (*Duchefa*) à 0,05% (le X-gluc en poudre a été dilué dans du DMF). Les échantillons ont été préfixés dans une solution fraîche de para-formaldéhyde à 0,5% diluée dans du tampon phosphate 0,1M. Pour infiltrer la solution dans les tissus, ceux-ci ont été incubés pendant 10min dans une cloche à vide, en cassant et refaisant le vide au bout de 5min d'infiltration. Les échantillons ont ensuite été laissés à incuber 30min à température ambiante. Pour éliminer la solution de para-formaldéhyde, trois rinçages avec du tampon phosphate ont été pratiqués. Le tampon de coloration a ensuite été ajouté sur les échantillons, et la coloration a été faite à 37°C, dans l'obscurité. La coloration a été vérifiée à intervalles réguliers

afin de retirer du tampon les racines présentant une coloration bleue apparaissant de manière nette. La coloration a été arrêtée au bout d'un jour d'incubation pour les dernières racines. Pour arrêter la coloration, les échantillons ont été rincés dans du tampon phosphate 0,1M. La coloration a enfin été fixée dans du tampon phosphate à 0,1M supplémenté en glutaraldéhyde frais à 1,25%. Les échantillons ont été infiltrés sous vide pendant 10min avec cette solution, puis incubés pendant une heure à température ambiante. La solution de fixation a enfin été rincée avec du tampon phosphate, puis les échantillons ont été conservés dans cette solution à 4°C.

Pour observer les racines et les nodules en coupe transversale, ceux-ci ont été inclus dans de l'agarose à 3%. Les coupes ont été réalisées à l'aide d'un vibratome *Leica VT 1200S*. La vitesse d'avancée de la lame de rasoir a été fixée à 0,5mm/s, pour une amplitude de vibration de 1mm. Les épaisseurs de coupe ont varié entre 40 et 80µm.

### VIII.6. Observations microscopiques et macroscopiques

#### VIII.6.1. Observations en microscopie confocale

Pour observer la fluorescence des racines modifiées, celles-ci ont été montées entre lame et lamelle dans une solution liquide de milieu Fahraeus. Pour plasmolyser les cellules, les tissus ont été observés dans du milieu Fahraeus supplémenté de 350mM de sorbitol. Un microscope confocal inversé *Leica-SP8* a été utilisé pour faire les acquisitions (Statif *Leica* DMI 6000 inversé; Lampe à fluorescence Métal Halide (120 W, *Leica*); Lampe halogène (*Leica*); Laser blanc White light laser 2 (470 - 670 nm); Objectif 20x PLAN APO multi-immersion (huile, glycérol, eau) + DIC (NA : 0.7) (*Leica*); Cube filtre I3 : BP 460/20, DM 510 nm, LP 515 (*Leica*); détecteur GaAsP Hybride (*Hamamatsu*); logiciel LAS-X). Pour sélectionner les zones à analyser en microscopie confocale, les racines ont dans un premier temps été observées par microscopie à épifluorescence dans les oculaires du statif. Pour les acquisitions, le laser blanc

a été réglé à 491nm pour une puissance entre 20 et 50% afin d'exciter les échantillons. Pour détecter le signal fluorescent à l'aide d'un détecteur hybride, une fenêtré d'émission réglée entre 500 et 550nm a été utilisée. De plus, un gating\* de 1 à 6ms a été ajouté afin de réduire la détection du signal d'auto-fluorescence émise par la paroi. La transmission du signal fluorescent a enfin été détectée à l'aide d'un PMT de transmission.

Pour les spectres d'émission de fluorescence, le laser a été réglé à 470 nm avec une puissance de 100%, afin de pouvoir observer plus facilement le pic majoritaire d'émission de la GFP (autour de 510nm). Le signal d'émission a été détecté sur le détecteur hybride entre 480 et 600nm, avec une bande de détection de 20nm et des pas de 10nm. Le gating a été réglé entre 0,3 et 6ms.

### **VIII.6.2. Observation en microscopie et macroscopie à éclairage diascopique**

Pour la mesure des poils racinaires, le microscope et les paramètres utilisés sont détaillés dans le chapitre VI.

Pour les observations en vue latérale, des racines traitées par la méthode de coloration GUS, ont été montées entre lame et lamelle dans du tampon phosphate à 0,1M. Les nodules ont eux été laissés en suspension dans ce tampon. Les acquisitions ont été réalisées, dans le cas des racines, en éclairage diascopique, avec un contraste interférentiel différentiel (DIC), à l'aide d'un microscope *Nikon* AZ100 MultiZoom (Objectif AZ-Plan Fluor 5X NA 0.5 WD 15 mm (*Nikon*) + DIC; Lampe halogène (*Nikon*); Caméra couleur Ds-Ri, Nikon, (taille de pixel : 6.45 x 6.45  $\mu\text{m}$ ); Logiciel NIS-Elements D (*Nikon*) + Extended Depth of Focus). Les nodules ayant été placés sur un fond noir, un éclairage épiscopique a été utilisé pour ceux-ci. Une acquisition en Z a été faite dans tous les cas afin d'obtenir une image reconstituée nette sur toute la zone

---

\* La fluorescence de la GFP est émise avec un léger retard après son excitation, contrairement à l'autofluorescence de la paroi. Le gating permet donc ici d'acquérir le signal émis dans une certaine fenêtré de temps après l'excitation.

d'observation grâce à l'outil "Extended Depth of Focus" du logiciel d'acquisition.

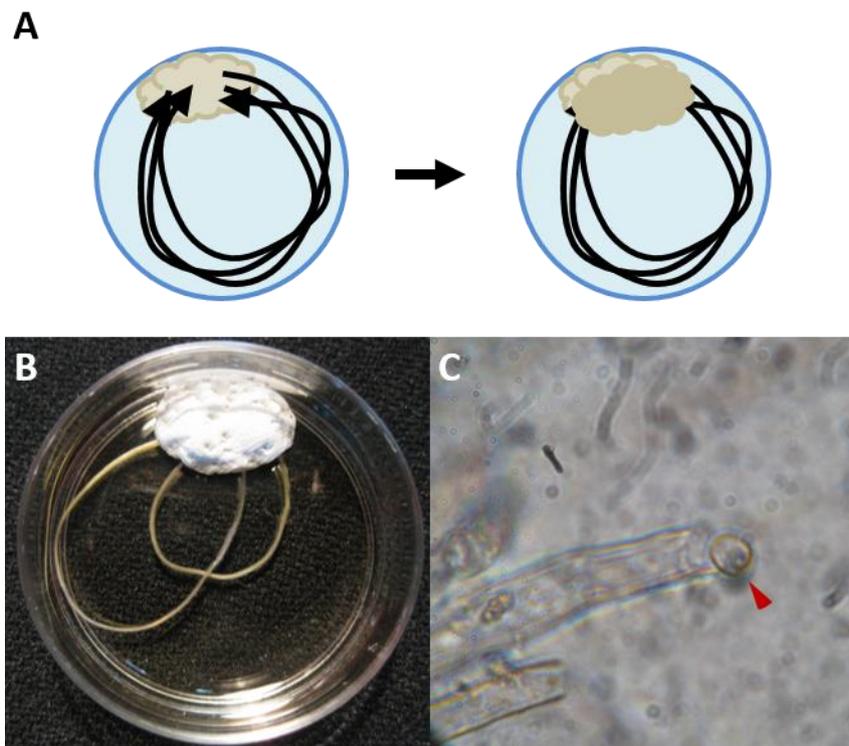
Pour les observations des coupes transversales de nodules ou de racines, les échantillons ont été laissés dans l'agarose de découpe afin de faciliter leur manipulation. Ces coupes ont été déposées sur une lame, mais aucune lamelle n'a été ajoutée afin de ne pas les abimer. De l'eau a été rajoutée de manière régulière afin de maintenir l'hydratation des échantillons. Pour réaliser les acquisitions, un microscope *Nikon Eclipse 80-i* droit a été utilisé (Lampe halogène (*Nikon*); 10x PLAN FLUOR sec (NA : 0.3) (*Nikon*); Logiciel NIS-Elements). Pour avoir une image nette sur toute la surface d'acquisition, une acquisition en Z a été faite manuellement. Ces images ont ensuite été regroupées dans un même stack à l'aide du logiciel ImageJ, puis une image nette reconstituée a été obtenue à l'aide de l'outil "Extended Depth of Focus" du logiciel de pilotage du microscope *Nikon AZ100 MultiZoom*.

### VIII.7. Etudes électrophysiologiques

#### VIII.7.1. Extraction des protoplastes

##### VIII.7.1.a. Protoplastes de poils racinaires de *M. truncatula*

Les protoplastes de poils de *M. truncatula*-A17 ont été extraits 10 jours après le transfert des plantes germées sur du milieu Faraheus recouvert de papier absorbant. Le protocole d'obtention est inspiré du travail de Bouteau *et al.*, (1999). Les racines principales d'une dizaine de plantes ont été déposées dans une boîte de Petri de 3,5cm de diamètre, de façon à ce que les pointes racinaires et la partie coupée des racines reposent sur une plateforme de Patafix posée au fond et au bord de la boîte (Fig. 57A). Une couche de Patafix a ensuite été déposée par-dessus les pointes et les sections de racines (Fig. 57A et B). Ce système évite ainsi de rendre ces deux zones, sensibles à la digestion enzymatique, accessibles au tampon de digestion. Ce tampon est composé de 25mM MES-KOH (pH 5,5), 1mM CaSO<sub>4</sub>, 250mM D-sorbitol, 10mg/mL de cellulase RS (*Onozuka RS, Yakult Honsha Co.*), 5mg/mL de macérozyme



**Figure 57. Focus sur certaines étapes de l'obtention de protoplastes de poils racinaires de *M. truncatula***

**A.** Schéma présentant l'étape de dépôt des racines (lignes noires dont la flèche symbolise la pointe racinaire) dans la boîte de Petri où aura lieu la digestion enzymatique. Les pointes et sections de racines sont déposées sur une plateforme de Patafix préalablement déposée (forme beige) (panneau de Gauche). Une deuxième couche de Patafix est ensuite déposée par-dessus les pointes et les sections racinaires (panneau de droite). **B.** Photo du montage présenté en A. **C.** Photo acquise au microscope optique d'un protoplaste (flèche rouge) sorti de l'extrémité d'un poil racinaire.

R10 (*Yakult*) et 1mg/mL de Pectolyase Y23 à (*Kikkoman Corporation*). 3,5mg/mL de BSA (Bovin Serum Albumin) ont été ajoutés à cette solution, après filtration de celle-ci dans un filtre de 0,45µm, afin de protéger les membranes des protoplastes pendant la digestion. Au moment de la digestion, de l'acide ascorbique a aussi été ajouté au tampon de digestion, à une concentration finale de 1mM. 2mL de ce mélange ont été versés dans le montage décrit plus haut. Les racines flottant à la surface du tampon de digestion, celles-ci ont été plongées de telle sorte qu'elles soient totalement recouvertes de liquide. Les racines ont été digérées à 28°C sur un agitateur horizontal réglé à 100rpm pendant 1h à 1h30. La libération de quelques protoplastes peut être observée lors de cette étape (Fig. 57C). Le liquide a alors doucement été récupéré à l'aide d'une pipette P1000 munie d'un cône coupé à la pointe, pour ne pas dégrader les protoplastes. Ce mélange a ensuite délicatement été déposé sur un filtre en nylon

de 60µm pré-imbibé de la solution de base de la digestion (solution enzymatique sans les enzymes). Pour récupérer un maximum de protoplastes, 2mL de cette solution ont été ajoutés dans la boîte de Petri, puis le liquide a été récupéré et filtré sur la même membrane que précédemment. La solution filtrée a ensuite été mise à centrifuger pendant 5min à 110g à 4°C, en enlevant le frein de la centrifugeuse. Le surnageant a ensuite été éliminé en laissant environ 100µL de liquide au fond du tube. Ce mélange a été rincé deux fois par l'ajout de la solution de base, suivi d'une centrifugation sans frein pendant 5 min à 100g à 4°C. Le surnageant a été éliminé à la fin de chaque étape en laissant 100µL de liquide au fond du tube.

### **VIII.7.1.b. Préparation et transformation des protoplastes de calli de mutants *Atms1Δ5***

Pour réaliser cette transformation, le protocole présenté dans l'article de Tran *et al.* (en cours de publication) a été utilisé (cf. article 2). Des *calli* du mutant *Atms1Δ5* ont été digérés pendant 15min à 22°C dans 1mL d'une solution hyperosmotique (2mM CaCl<sub>2</sub>, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM KCl, 10mM MES (pH 5,5), 2mg/mL cellulysine (*Calbochem*), 2mg/mL cellulase RS (*Onozuka RS, Yakult Honsha Co.*), 0,04mg/mL pectolyase Y23 (*Kikkoman Corporation*), 0,35% BSA, du mannitol pour ajuster l'osmolarité à 600 mOsmol et d'1µM acide ascorbique ajouté au dernier moment). Pour favoriser l'accès des enzymes aux *calli*, ceux-ci ont été écrasés sur les parois du tube de digestion à l'aide d'une spatule. Pour rincer les enzymes, une centrifugation pendant 3min à 800rpm a été faite, le surnageant retiré, puis 1mL d'une solution de rinçage a été ajouté (2mM CaCl<sub>2</sub>, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM MES (pH 5,5) et mannitol pour ajuster l'osmolarité à 600mOsmol). Après centrifugation et élimination du surnageant, les protoplastes ont été libérés par un choc hypoosmotique de 10min à 22°C avec la même solution que précédemment, mais ajustée à 280mOsmol. Cette suspension a été filtrée dans une membrane de nylon de 80µm. Ce filtra peut être conservé à 4°C jusqu'à utilisation pour effectuer des mesures électrophysiologiques, ou pour réaliser une transformation.

Une co-transformation a été faite sur les protoplastes de *Atmsl/Δ5*. Le premier plasmide utilisé fut *pAlligator2:MtMSL2.4-CDS*. Le deuxième, *psmRSGFP* (Tair: stock CD3-327), a permis de surexprimer une GFP soluble afin de sélectionner les protoplastes transformés. Le tube contenant la solution B et les protoplastes a été centrifugé puis le surnageant a été retiré de façon à ne laisser qu'environ 100μL de liquide. 10μg de plasmide *pAlligator2:MtMSL2.4-CDS* et 2,5μg de plasmide *psmRSGFP* ont ensuite été ajoutés, puis la solution mélangée en tournant doucement le tube à l'horizontal. 150μL de PEG6000, ayant une texture de sorbet, ont été ajoutés en le laissant couler le long de la paroi du tube et en homogénéisant la solution par la suite. Le tout a été laissé à incuber pendant 20 à 25 minutes à 22°C et dans l'obscurité. Pour rincer le PEG6000, 800μL de Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> ont été ajoutés, puis la solution a été centrifugée 5 min à 800rpm pour éliminer le surnageant. Cette étape a été répétée une seconde fois. 500μL d'une solution JPL 0,34 Gluc/Man ont enfin été ajoutés pour laisser le tout à incuber pendant toute une nuit à 22°C dans l'obscurité. Composition du milieu JPL 0,34 Gluc/Man: KNO<sub>3</sub> 19,49mM ; CaCl<sub>2</sub>-2H<sub>2</sub>O 0,9mM ; MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O 0,45mM ; Fe-EDTA 5μM ; Microéléments (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 30μM ; KI 1,5μM ; MnSO<sub>4</sub>-1H<sub>2</sub>O 30μM ; ZnSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O 9μM ; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>-2H<sub>2</sub>O 0,3μM ; CuSO<sub>4</sub>-5H<sub>2</sub>O 0,03μM ; CoCl<sub>2</sub>-6H<sub>2</sub>O 0,03μM); Hydrolysate caséine 0,1g/L ; Myo-inositol 550μM ; Glycine 26,6μM ; Solution vitamines (Thiamine HCl 1,18μM ; Acide nicotinique 4,06μM ; Pyridoxine HCl 2,43μM) ; Hormone ANA 1,07μM ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,375mM ; Solution A (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,03mM) ; Solution B (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,06mM) ; glucose 30,5g/L ; mannitol 30,5g/L; pH ajusté à 5,8 avec du HCl ou du KOH (Jouanneau et Péaud-Lenoël, 1967).

### VIII.7.2. Enregistrements électrophysiologiques

#### VIII.7.2.a. Matériel

Pour identifier les protoplastes transformés, le poste d'électrophysiologie était équipé d'un microscope inversé Zeiss Axiovert 35 couplé à un éclairage halogène (*Zeiss*).

Des capillaires de borosilicate (*Kimax-51, Kimble Glass*) ont été étirés à l'aide d'une étireuse horizontale (*Sutter Instrument Co. P-97 Flaming/Brown Micropipette puller*) afin d'obtenir les pipettes. Leur extrémité a été polie à l'aide d'une microforge (*List Medical L/M-CPZ 101*). Celle-ci a enfin été recouverte de Sylgard (*General Electric*) afin de diminuer la capacité des pipettes. Une fois la pipette remplie de la solution adéquate, le contact électrique est réalisé au moyen d'un fil d'argent chloruré. Ces microélectrodes ont été manipulées à l'aide d'un micromanipulateur (*Scientifica*). L'électrode de référence est un capillaire en plastique, rempli d'une solution de KCl 3M, dont l'extrémité en contact avec le bain est bouchée à l'aide d'un gel d'agarose 1% additionné de KCl 3M. Le contact électrique de cette référence est également obtenu à l'aide d'un fil d'argent chloruré.

Un amplificateur (modèle 200A, *Axon Instruments, Foster City, CA*) et une interface Digidata 1322A (*Axon Instruments*) ont été utilisés pour enregistrer le courant. Les pressions dans les protoplastes, ont été appliquées soit manuellement à l'aide d'une seringue reliée à la pipette (contrôle de la pression avec un manomètre – *Worl Precision Instrument, PM01R*), soit automatiquement avec un système HSPC (High Speed Pressure-Clamp) (*ALA Scientific Instrument, NY*). Ce système permet l'application de pressions précises et contrôlées.

### VIII.7.2.b. Conditions expérimentales

Les solutions utilisées pour le bain et les pipettes sont présentées dans le tableau 11. Dans ces conditions, la résistance des pipettes dans le bain variait de 0,8 à 1,6M $\Omega$ . Les déséquilibres ioniques existant entre les solutions de bain, de pipette et d'électrode de référence génèrent un petit potentiel électrique nommé Potentiel de Jonction Liquide (PJJL). Il est donc nécessaire d'ajouter la valeur de ce potentiel à celui qui a été appliqué par la suite sur les membranes. Dans ces conditions, le PJJL mesuré est de -6mV. Enfin, pour l'enregistrement des courants de *MtMSL2.4*, les données ont été filtrées de 2 à 5kHz pour un

**Tableau 11. Conditions ioniques utilisées pour la mesure du courant MS dans les protoplastes du mutant *AtmslΔ5* et dans les protoplastes de poils racinaires de *Medicago***

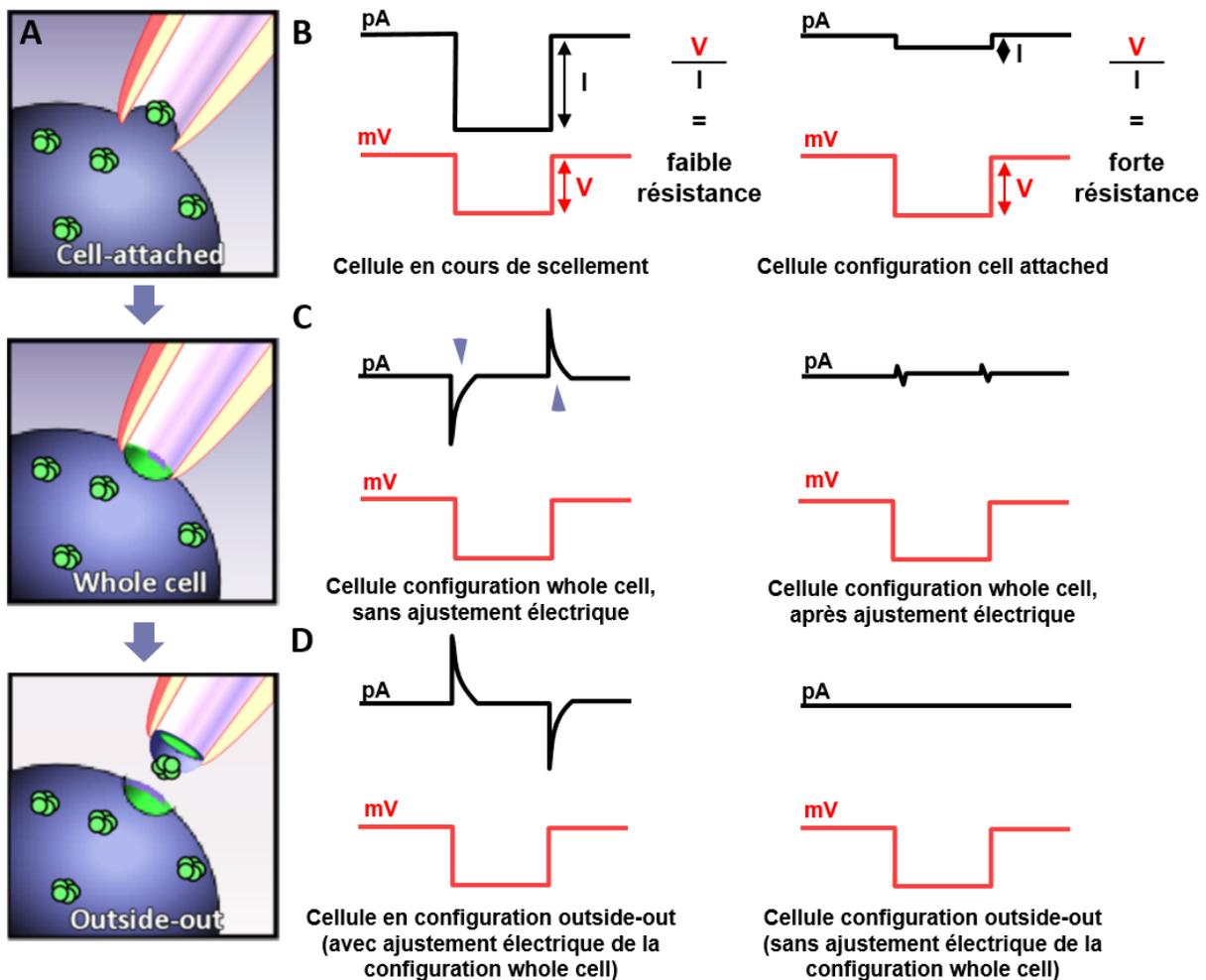
	Protoplastes extraits de cals du mutant d' <i>Arabidopsis mslΔ5</i>		Protoplastes extraits de poils absorbant de <i>Medicago</i> (A17)	
	Solution de pipette	Solution de bain	Solution de pipette	Solution de bain
MgCl <sub>2</sub>	2 mM	5 mM	2 mM	5 mM
CaCl <sub>2</sub>	4,2 mM	50 mM	4,2 mM	50 mM
Hepes	10 mM	/	10 mM	/
MES	/	10 mM	/	10 mM
EGTA	5 mM	/	5 mM	/
Mg-ATP	5 mM	/	5 mM	/
CsCl	150 mM	/	150 mM	/
LaCl <sub>3</sub> <sup>a</sup>	/	250 μM	/	250 μM
pH (ajusté au Tris)	7,4	5,6	7,4	5,6
Osmolarité (Ajustée avec du Mannitol)	460 mOsmol	450 mOsmol	340 mOsmol	330 mOsmol

a. Le Lantane est utilisé pour faciliter l'étape de scellement de la membrane du protoplaste à la pipette.

échantillonnage de 3,3 à 33,3kHz. Les enregistrements de courants des poils racinaires ont été filtrés de 1 à 2kHz pour un échantillonnage de 20kHz. Pour gérer les différents paramètres de mesure, le logiciel pCLAMP8.1 a été utilisé.

### VIII.7.2.c. Etapes vers l'obtention des configurations souhaitées

Avant que la pipette entre en contact avec le protoplaste, l'offset a été ajusté à 0. Pour réaliser le scellement de la membrane sur la pipette (seal en anglais), une légère succion a été appliquée à l'aide d'une seringue reliée à la microélectrode, au moment où celle-ci a été mise en contact avec la membrane. Cette succion a été maintenue en continue, puis diminuée progressivement jusqu'à revenir à une valeur nulle. En parallèle, le potentiel basal appliqué sur la membrane a été diminué progressivement jusqu'à atteindre une valeur seuil de -150mV. Si toutes les conditions non contrôlables et inconnues sont réunies de manière favorable (c.à.d composition de la membrane et autre), le scellement peut être observé électriquement grâce à une résistance mesurée de l'ordre du GigaΩ (Fig. 58B). Le système est alors en configuration cellule attachée (cell attached) (Fig. 58A). Pour passer en configuration cellule entière (whole cell), une succion modérée et brève a été appliquée à la bouche, en induisant



**Figure 58. Les différentes configurations du patch-clamp et leurs profils électriques**

**A.** Schéma présentant les différentes configurations de patch clamp utilisées lors de cette thèse (extrait de Peyronnet *et al.* (2014)). **B-D.** Représentation schématique des courants mesurés (en noir) lors de pulses réguliers de voltages (en rouge), afin de contrôler la configuration des cellules patchées. **B.** Profil des courants lors du scellement des cellules pour aboutir à une configuration cell attached. **C.** Profil des courants en configuration whole cell, avec et sans ajustement électrique pour compenser les pics capacitifs caractéristiques de cette configuration (flèches violettes). **D.** Profil des courants en configuration outside-out, avec et sans ajustements électriques ajoutés lors de l'étape en configuration whole cell.

simultanément un choc électrique de 0,5ms. Dans cette configuration, la membrane de la cellule peut être considérée comme un condensateur. Aussi, des pics capacitifs peuvent être observés lors de pulses de potentiel, propriété caractéristique de ce type de composant électrique (Fig. 58C). Afin de ne pas induire ces pics lors de l'enregistrement de nos courants d'intérêt, ceux-ci ont été compensés électriquement (Fig. 58C). Cet ajustement permet de mesurer en même temps la résistance d'accès et la capacité électrique du système. On peut noter que les protoplastes d'*Arabidopsis* surexprimant *MtMSL2.4* ont une capacité de 7 à 10pF, tandis que les protoplastes de poils racinaires de *M. truncatula* ont une capacité de 2 à

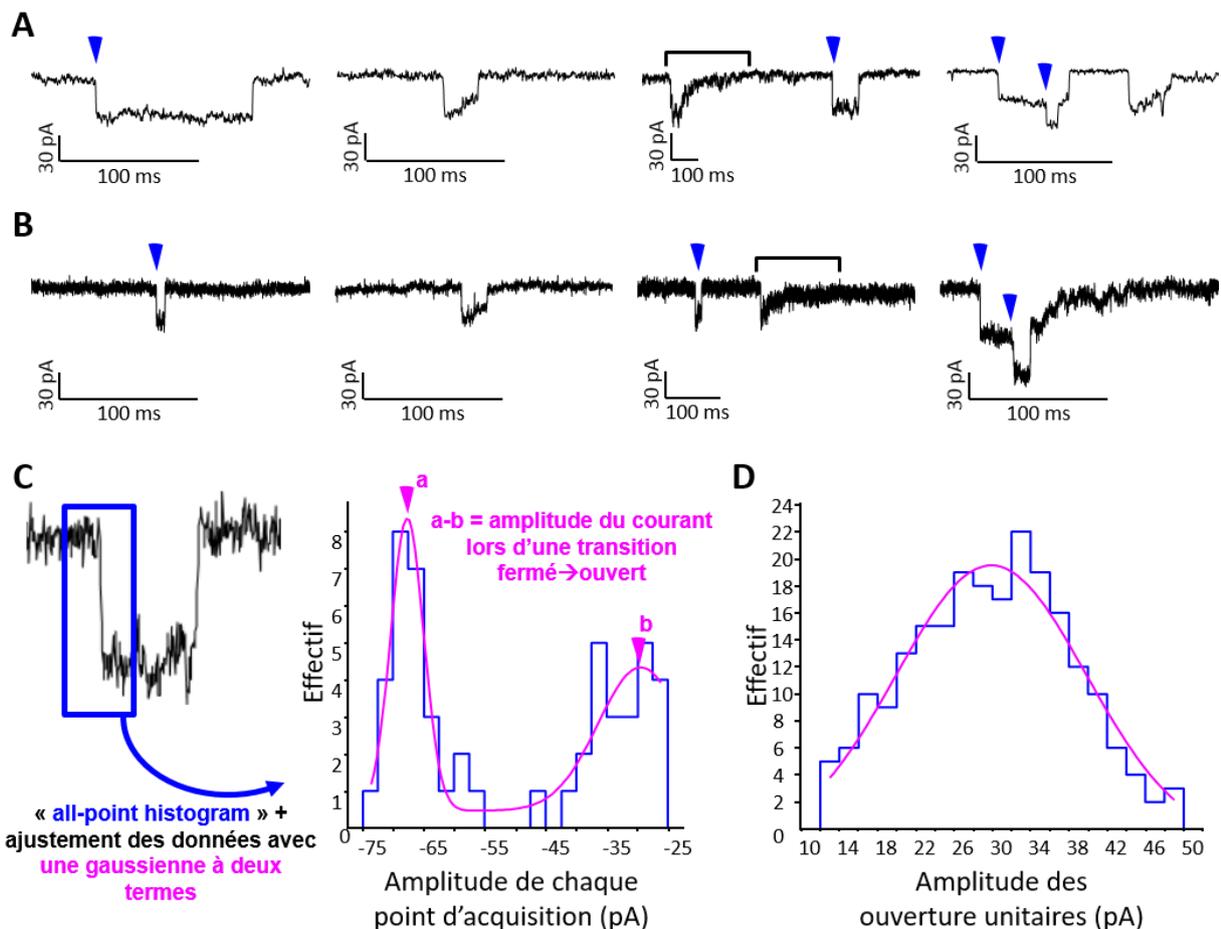
5pF. La capacité d'une cellule étant proportionnelle à sa taille, ces valeurs témoignent de la plus petite taille des protoplastes de poils racinaires, comparés à ceux analysés dans les cellules surexprimant *MtMSL2.4*. La résistance d'accès permet, elle, de s'assurer de la bonne continuité électrique entre la pipette et l'intérieur du protoplaste. Cette résistance doit être en théorie proche de celle mesurée lorsque la pipette était dans le bain. Si cette valeur devient supérieure, une partie du potentiel appliqué à la membrane sera dissipée dans cette résistance. Il est donc important de contrôler régulièrement la résistance d'accès et de s'assurer qu'elle reste à peu près stable.

Pour passer en configuration outside out, on effectue l'excision du protoplaste en plaçant celui-ci dans un fort courant de solution de bain, généré par une macropipette reliée à une seringue. L'objectif est de décrocher la cellule de la micropipette, n'y laissant plus qu'un simple fragment de membrane (Fig. 58A). Le système perd alors ses propriétés capacitives. Ainsi, si la correction faite en configuration whole cell est toujours présente, on observera un signal électrique inverse de celui observé dans cette précédente configuration (Fig. 58D).

### VIII.7.3. Quantification de l'amplitude des courants unitaires

Pour analyser les données obtenues précédemment, le logiciel Clampfit a été utilisé. La fréquence d'ouverture des canaux étant faible, il n'a pas été possible d'obtenir une analyse des amplitudes de courants par quantification des différentes classes d'amplitudes sur l'ensemble d'un enregistrement (all-point histogram – APH). En effet, le courant de base prenait une très grande importance dans cette analyse, empêchant de distinguer les classes de courants d'ouverture des canaux. Pour remédier à ce problème, une analyse ouverture par ouverture a été faite.

Les canaux unitaires des enregistrements obtenus comportaient plusieurs profils, que ce soit pour les protoplastes de *Atmsl/Δ5* transformés avec la construction *p35S:MtMSL2.4*, ou



**Figure 59. Méthode de mesures des amplitudes de courants unitaires**

**A** et **B** mettent en avant les différents profils de courants unitaires observés dans les protoplastes de *Atms1Δ5* transformés avec *p35S:MtMSL2.4* (**A**) et dans les protoplastes de poils racinaires (**B**). De gauche à droite, les graphes présentent: 1<sup>er</sup> profil : une ouverture et une fermeture carrées; 2<sup>ème</sup> profil : une ouverture carrée et une fermeture semi-oblique; 3<sup>ème</sup> profil : une ouverture carrée et une fermeture oblique, mises en évidence par un crochet; 4<sup>ème</sup> profil : deux ouvertures unitaires quasi-simultanées. Remarque: dans le 3<sup>ème</sup> profil, un canal unitaire à fermeture carrée a été présenté en plus, afin de témoigner de la validité du système de mesure. Les flèches bleues indiquent les ouvertures qui ont été considérées pour les analyses d'amplitudes de courant. **C-D**. Description de la méthode de mesure des courants unitaires. **C**. Mesure de l'amplitude d'ouverture d'un seul canal par une analyse en "all-point histogram", suivie d'un ajustement avec une gaussienne. **D**. Répartition de toutes les amplitudes d'ouverture d'un enregistrement, mesurées à l'aide de la méthode présentée en C.

pour les protoplastes de poils racinaires (Fig. 59A et B). Seuls les profils avec une ouverture et une fermeture rapide (ou carrée) ont été pris en compte. Pour chacune de ces ouvertures, une analyse APH a été faite. Une courbe Gaussienne à deux termes (d'équation [8]) a ensuite été ajustée sur l'histogramme obtenu (Fig. 59C). La différence entre les deux amplitudes maximales, déduites de cette Gausse, correspond à l'amplitude de courant lors d'une transition canal fermé à canal ouvert.

$$f(x) = \sum_{i=1}^n A_i \frac{e^{-(x-\mu_i)^2/2\sigma_i^2}}{\sigma_i\sqrt{2\pi}} + C \quad [8]$$

L'ensemble des amplitudes unitaires ainsi mesurées sont réparties selon une Gausse permettant de déterminer le courant caractéristique (au pic de la gaussienne) (Fig. 59D). Cependant, certains enregistrements ne présentaient pas suffisamment d'ouvertures pour être ajustés par une Gausse. La valeur moyenne des courants unitaires mesurés pour chaque protoplaste a donc été préférée.



# Bibliographie

- Akkerman M, Franssen-Verheijen M a. W, Immerzeel P, Hollander LDEN, Schel JHN, Emons AMC** (2012) Texture of cellulose microfibrils of root hair cell walls of *Arabidopsis thaliana*, *Medicago truncatula*, and *Vicia sativa*. *J Microsc* **247**: 60–67
- Anishkin A, Sukharev S** (2004) Water Dynamics and Dewetting Transitions in the Small Mechanosensitive Channel MscS. *Biophys J* **86**: 2883–2895
- Bass RB, Strop P, Barclay M, Rees DC** (2002) Crystal structure of *Escherichia coli* MscS, a voltage-modulated and mechanosensitive channel. *Science* **298**: 1582–1587
- Battle AR, Petrov E, Pal P, Martinac B** (2009) Rapid and improved reconstitution of bacterial mechanosensitive ion channel proteins MscS and MscL into liposomes using a modified sucrose method. *FEBS Lett* **583**: 407–412
- Bechinger null, Giebel null, Schnell null, Leiderer null, Deising null, Bastmeyer null** (1999) Optical measurements of invasive forces exerted by appressoria of a plant pathogenic fungus. *Science* **285**: 1896–1899
- Benedito VA, Torres-Jerez I, Murray JD, Andriankaja A, Allen S, Kakar K, Wandrey M, Verdier J, Zuber H, Ott T, et al** (2008) A gene expression atlas of the model legume *Medicago truncatula*. *Plant J Cell Mol Biol* **55**: 504–513
- Benikhlef L, L'haridon F, Abou-Mansour E, Serrano M, Binda M, Costa A, Lehmann S, Métraux J-P** (2013) Perception of soft mechanical stress in Arabidopsis leaves activates disease resistance. *BMC Plant Biol* **13**: 133
- Beningo KA, Wang Y** (2002) Fc-receptor-mediated phagocytosis is regulated by mechanical properties of the target. *J Cell Sci* **115**: 849–856
- Bensmihen S, To A, Lambert G, Kroj T, Giraudat J, Parcy F** (2004) Analysis of an activated ABI5 allele using a new selection method for transgenic Arabidopsis seeds. *FEBS Lett* **561**: 127–131
- Boisson-Dernier A, Chabaud M, Garcia F, Bécard G, Rosenberg C, Barker DG** (2001) Agrobacterium rhizogenes-transformed roots of *Medicago truncatula* for the study of nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations. *Mol Plant-Microbe Interact* **14**: 695–700
- Bouteau F, Pennarun A-M, Kurkdjian A, Convert M, Cornel D, Monestiez M, Rona J-P, Bousquet U** (1999) Ion channels of intact young root hairs from *Medicago sativa*. *Plant Physiol Biochem* **37**: 889–898
- Breakspear A, Liu C, Roy S, Stacey N, Rogers C, Trick M, Morieri G, Mysore KS, Wen J, Oldroyd GED, et al** (2014) The Root Hair “Infectome” of *Medicago truncatula* Uncovers Changes in Cell Cycle Genes

## Bibliographie

---

and Reveals a Requirement for Auxin Signaling in Rhizobial Infection. *Plant Cell Online* tpc.114.133496

**Browse J** (2009) Jasmonate Passes Muster: A Receptor and Targets for the Defense Hormone. *Annu Rev Plant Biol* **60**: 183–205

**Cárdenas L** (2009) New findings in the mechanisms regulating polar growth in root hair cells. *Plant Signal Behav* **4**: 4–8

**Charpentier M, Sun J, Vaz Martins T, Radhakrishnan GV, Findlay K, Soumpourou E, Thouin J, Véry A-A, Sanders D, Morris RJ, et al** (2016) Nuclear-localized cyclic nucleotide-gated channels mediate symbiotic calcium oscillations. *Science* **352**: 1102–1105

**Charron D, Pingret J-L, Chabaud M, Journet E-P, Barker DG** (2004) Pharmacological Evidence That Multiple Phospholipid Signaling Pathways Link Rhizobium Nodulation Factor Perception in *Medicago truncatula* Root Hairs to Intracellular Responses, Including Ca<sup>2+</sup> Spiking and Specific ENOD Gene Expression. *Plant Physiol* **136**: 3582–3593

**Chehab EW, Yao C, Henderson Z, Kim S, Braam J** (2012) Arabidopsis touch-induced morphogenesis is jasmonate mediated and protects against pests. *Curr Biol* **22**: 701–706

**Coste B** (2012) The Cellular Feeling of Pressure. *Science* **338**: 59–59

**Coste B, Mathur J, Schmidt M, Earley TJ, Ranade S, Petrus MJ, Dubin AE, Patapoutian A** (2010) Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels. *Science* **330**: 55–60

**Crook MJ, Ennos AR** (1996) Mechanical Differences Between Free-standing and Supported Wheat Plants, *Triticum aestivum* L. *Ann Bot* **77**: 197–202

**Czaja LF, Hogekamp C, Lamm P, Maillet F, Martinez EA, Samain E, Dénarié J, Küster H, Hohnjec N** (2012) Transcriptional responses toward diffusible signals from symbiotic microbes reveal MtNFP- and MtDMI3-dependent reprogramming of host gene expression by arbuscular mycorrhizal fungal lipochitooligosaccharides. *Plant Physiol* **159**: 1671–1685

**Damiani I, Drain A, Guichard M, Balzergue S, Boscari A, Boyer J-C, Brunaud V, Cottaz S, Rancurel C, Da Rocha M, et al** (2016) Nod Factor Effects on Root Hair-Specific Transcriptome of *Medicago truncatula*: Focus on Plasma Membrane Transport Systems and Reactive Oxygen Species Networks. *Front Plant Sci*. doi: 10.3389/fpls.2016.00794

**Dixon R, Kahn D** (2004) Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nat Rev Microbiol* **2**: 621–631

**Ehrhardt DW, Wais R, Long SR** (1996) Calcium spiking in plant root hairs responding to Rhizobium nodulation signals. *Cell* **85**: 673–681

**Eliasson L, Bertell G, Bolander E** (1989) Inhibitory Action of Auxin on Root Elongation Not Mediated by Ethylene. *Plant Physiol* **91**: 310–314

**Emanuelsson O, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H** (2007) Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nat Protoc* **2**: 953–971

- Esseling JJ, Lhuissier FGP, Emons AMC** (2004) A nonsymbiotic root hair tip growth phenotype in NORK-mutated legumes: implications for nodulation factor-induced signaling and formation of a multifaceted root hair pocket for bacteria. *Plant Cell* **16**: 933–944
- Esseling JJ, Lhuissier FGP, Emons AMC** (2003) Nod Factor-Induced Root Hair Curling: Continuous Polar Growth towards the Point of Nod Factor Application. *Plant Physiol* **132**: 1982–1988
- Farmer EE, Gasperini D, Acosta IF** (2014) The squeeze cell hypothesis for the activation of jasmonate synthesis in response to wounding. *New Phytol* **204**: 282–288
- Felle HH, Kondorosi É, Kondorosi Á, Schultze M** (1998) The role of ion fluxes in Nod factor signalling in *Medicago sativa*. *Plant J* **13**: 455–463
- Finn RD, Clements J, Arndt W, Miller BL, Wheeler TJ, Schreiber F, Bateman A, Eddy SR** (2015) HMMER web server: 2015 update. *Nucleic Acids Res* **43**: W30–W38
- Forster B, Van De Ville D, Berent J, Sage D, Unser M** (2004) Complex wavelets for extended depth-of-field: A new method for the fusion of multichannel microscopy images. *Microsc Res Tech* **65**: 33–42
- Fournier J, Timmers ACJ, Sieberer BJ, Jauneau A, Chabaud M, Barker DG** (2008) Mechanism of Infection Thread Elongation in Root Hairs of *Medicago truncatula* and Dynamic Interplay with Associated Rhizobial Colonization. *Plant Physiol* **148**: 1985–1995
- Furuichi T, Iida H, Sokabe M, Tatsumi H** (2012) Expression of Arabidopsis MCA1 enhanced mechanosensitive channel activity in the *Xenopus laevis* oocyte plasma membrane. *Plant Signal Behav* **7**: 1022–1026
- Gage DJ** (2004) Infection and Invasion of Roots by Symbiotic, Nitrogen-Fixing Rhizobia during Nodulation of Temperate Legumes. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 280–300
- Gamini R, Sotomayor M, Chipot C, Schulten K** (2011) Cytoplasmic domain filter function in the mechanosensitive channel of small conductance. *Biophys J* **101**: 80–89
- Genre A, Chabaud M, Faccio A, Barker DG, Bonfante P** (2008) Prepenetration apparatus assembly precedes and predicts the colonization patterns of arbuscular mycorrhizal fungi within the root cortex of both *Medicago truncatula* and *Daucus carota*. *Plant Cell* **20**: 1407–1420
- Genre A, Chabaud M, Timmers T, Bonfante P, Barker DG** (2005) Arbuscular Mycorrhizal Fungi Elicit a Novel Intracellular Apparatus in *Medicago truncatula* Root Epidermal Cells before Infection. *Plant Cell Online* **17**: 3489–3499
- Genre A, Ortu G, Bertoldo C, Martino E, Bonfante P** (2009) Biotic and abiotic stimulation of root epidermal cells reveals common and specific responses to arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Physiol* **149**: 1424–1434
- Gonzalez-Rizzo S, Crespi M, Frugier F** (2006) The *Medicago truncatula* CRE1 Cytokinin Receptor Regulates Lateral Root Development and Early Symbiotic Interaction with *Sinorhizobium meliloti*. *Plant Cell Online* **18**: 2680–2693
- Goodstein DM, Shu S, Howson R, Neupane R, Hayes RD, Fazo J, Mitros T, Dirks W, Hellsten U, Putnam N, et al** (2012) Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Res* **40**: D1178–1186

## Bibliographie

---

- Gopalakrishnan S, Sathya A, Vijayabharathi R, Varshney RK, Gowda CLL, Krishnamurthy L** (2015) Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities. *3 Biotech* **5**: 355–377
- Gough C, Cullimore J** (2011) Lipo-chitooligosaccharide signaling in endosymbiotic plant-microbe interactions. *Mol Plant-Microbe Interact MPMI* **24**: 867–878
- Guharay F, Sachs F** (1984) Stretch-activated single ion channel currents in tissue-cultured embryonic chick skeletal muscle. *J Physiol* **352**: 685–701
- Gutjahr C, Parniske M** (2013) Cell and developmental biology of arbuscular mycorrhiza symbiosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* **29**: 593–617
- Hamant O, Heisler MG, Jönsson H, Krupinski P, Uyttewaal M, Bokov P, Corson F, Sahlin P, Boudaoud A, Meyerowitz EM, et al** (2008) Developmental Patterning by Mechanical Signals in Arabidopsis. *Science* **322**: 1650–1655
- Hamilton ES, Haswell ES** (2017) The Tension-sensitive Ion Transport Activity of MSL8 is Critical for its Function in Pollen Hydration and Germination. *Plant Cell Physiol*. doi: 10.1093/pcp/pcw230
- Hamilton ES, Jensen GS, Maksaev G, Katims A, Sherp AM, Haswell ES** (2015) Mechanosensitive channel MSL8 regulates osmotic forces during pollen hydration and germination. *Science* **350**: 438–441
- Hardham AR, Takemoto D, White RG** (2008) Rapid and dynamic subcellular reorganization following mechanical stimulation of Arabidopsis epidermal cells mimics responses to fungal and oomycete attack. *BMC Plant Biol* **8**: 63
- Haswell ES** (2007) MscS-Like Proteins in Plants. In Owen P. Hamill, ed, *Curr. Top. Membr. Academic Press*, pp 329–359
- Haswell ES, Meyerowitz EM** (2006) MscS-like proteins control plastid size and shape in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Biol CB* **16**: 1–11
- Haswell ES, Peyronnet R, Barbier-Brygoo H, Meyerowitz EM, Frachisse J-M** (2008) Two MscS homologs provide mechanosensitive channel activities in the Arabidopsis root. *Curr Biol CB* **18**: 730–734
- Hoch HC, Staples RC, Whitehead B, Comeau J, Wolf ED** (1987) Signaling for growth orientation and cell differentiation by surface topography in uromyces. *Science* **235**: 1659–1662
- Hörger AC, Fones HN, Preston GM** (2013) The current status of the elemental defense hypothesis in relation to pathogens. *Front Plant Sci*. doi: 10.3389/fpls.2013.00395
- Hou C, Tian W, Kleist T, He K, Garcia V, Bai F, Hao Y, Luan S, Li L** (2014) DUF221 proteins are a family of osmosensitive calcium-permeable cation channels conserved across eukaryotes. *Cell Res* **24**: 632–635
- Jaffe MJ** (1973) Thigmomorphogenesis: The response of plant growth and development to mechanical stimulation. *Planta* **114**: 143–157
- Jardinaud M-F, Boivin S, Rodde N, Catrice O, Kisiala A, Lepage A, Moreau S, Roux B, Cottret L, Sallet E, et al** (2016) A Laser Dissection-RNAseq Analysis Highlights the Activation of Cytokinin Pathways by Nod Factors in the *Medicago truncatula* Root Epidermis. *Plant Physiol* **171**: 2256–2276

- Jayaraman D, Gilroy S, Ané J-M** (2014) Staying in touch: mechanical signals in plant-microbe interactions. *Curr Opin Plant Biol* **20**: 104–109
- Jensen GS, Haswell ES** (2012) Functional analysis of conserved motifs in the mechanosensitive channel homolog MscS-Like2 from *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* **7**: e40336
- Jouanneau J-P, Péaud-Lenoël C** (1967) Croissance et synthèse des protéines de suspensions cellulaires de Tabac sensibles à la kinétine. *Physiol Plant* **20**: 834–850
- Käll L, Krogh A, Sonnhammer ELL** (2004) A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. *J Mol Biol* **338**: 1027–1036
- Karimi M, Depicker A, Hilson P** (2007) Recombinational Cloning with Plant Gateway Vectors. *Plant Physiol* **145**: 1144–1154
- Ketelaar T, de Ruijter NCA, Emons AMC** (2003) Unstable F-actin specifies the area and microtubule direction of cell expansion in Arabidopsis root hairs. *Plant Cell* **15**: 285–292
- Kim DW, Lee SH, Choi S-B, Won S-K, Heo Y-K, Cho M, Park Y-I, Cho H-T** (2006) Functional conservation of a root hair cell-specific cis-element in angiosperms with different root hair distribution patterns. *Plant Cell* **18**: 2958–2970
- Kocsis E, Trus BL, Steer CJ, Bisher ME, Steven AC** (1991) Image averaging of flexible fibrous macromolecules: the clathrin triskelion has an elastic proximal segment. *J Struct Biol* **107**: 6–14
- Kubeš M, Yang H, Richter GL, Cheng Y, Młodzińska E, Wang X, Blakeslee JJ, Carraro N, Petrášek J, Zažímalová E, et al** (2012) The Arabidopsis concentration-dependent influx/efflux transporter ABCB4 regulates cellular auxin levels in the root epidermis. *Plant J* **69**: 640–654
- Kurusu T, Kuchitsu K, Nakano M, Nakayama Y, Iida H** (2013) Plant mechanosensing and Ca<sup>2+</sup> transport. *Trends Plant Sci* **18**: 227–233
- Lee CP, Makshev G, Jensen GS, Murcha MW, Wilson ME, Fricker M, Hell R, Haswell ES, Millar AH, Sweetlove LJ** (2016) MSL1 is a mechanosensitive ion channel that dissipates mitochondrial membrane potential and maintains redox homeostasis in mitochondria during abiotic stress. *Plant J Cell Mol Biol* **88**: 809–825
- Levina N, Totemeyer S, Stokes NR, Louis P, Jones MA, Booth IR** (1999) Protection of *Escherichia coli* cells against extreme turgor by activation of MscS and MscL mechanosensitive channels: identification of genes required for MscS activity. *EMBO J* **18**: 1730–1737
- Libault M, Brechenmacher L, Cheng J, Xu D, Stacey G** (2010) Root hair systems biology. *Trends Plant Sci* **15**: 641–650
- Maathuis FJM** (2011) Vacuolar two-pore K<sup>+</sup> channels act as vacuolar osmosensors. *New Phytol* **191**: 84–91
- 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 lipochitoooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. *Nature* **469**: 58–63

## Bibliographie

---

- Maksaev G, Haswell ES** (2012) MscS-Like10 is a stretch-activated ion channel from *Arabidopsis thaliana* with a preference for anions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 19015–19020
- Malcolm HR, Blount P** (2015) Mutations in a Conserved Domain of *E. coli* MscS to the Most Conserved Superfamily Residue Leads to Kinetic Changes. *PLoS One* **10**: e0136756
- Malcolm HR, Heo Y-Y, Elmore DE, Maurer JA** (2011) Defining the role of the tension sensor in the mechanosensitive channel of small conductance. *Biophys J* **101**: 345–352
- Marhavý P, Montesinos JC, Abuzeineh A, Damme DV, Vermeer JEM, Duclercq J, Rakusová H, Nováková P, Friml J, Geldner N, et al** (2016) Targeted cell elimination reveals an auxin-guided biphasic mode of lateral root initiation. *Genes Dev* **30**: 471–483
- Martin L, Leblanc-Fournier N, Julien J-L, Moulia B, Coutand C** (2010) Acclimation kinetics of physiological and molecular responses of plants to multiple mechanical loadings. *J Exp Bot* **61**: 2403–2412
- Mendrinna A, Persson S** (2015) Root hair growth: it's a one way street. *F1000Prime Rep*. doi: 10.12703/P7-23
- Mercury F, May B, Deacon J, Taylor R, EMI G** (1991) The show must go on. *Innuendo* **B**: 7
- Miller DD, De Ruijter NCA, Bisseling T, Emons A, Mie C** (1999) The role of actin in root hair morphogenesis: studies with lipochito-oligosaccharide as a growth stimulator and cytochalasin as an actin perturbing drug. *Plant J* **17**: 141–154
- Mirabet V, Das P, Boudaoud A, Hamant O** (2011) The Role of Mechanical Forces in Plant Morphogenesis. *Annu Rev Plant Biol* **62**: 365–385
- Monshausen GB, Bibikova TN, Messerli MA, Shi C, Gilroy S** (2007) Oscillations in extracellular pH and reactive oxygen species modulate tip growth of Arabidopsis root hairs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 20996–21001
- Monshausen GB, Messerli MA, Gilroy S** (2008) Imaging of the Yellow Cameleon 3.6 indicator reveals that elevations in cytosolic Ca<sup>2+</sup> follow oscillating increases in growth in root hairs of Arabidopsis. *Plant Physiol* **147**: 1690–1698
- Mousavi SAR, Chauvin A, Pascaud F, Kellenberger S, Farmer EE** (2013) GLUTAMATE RECEPTOR-LIKE genes mediate leaf-to-leaf wound signalling. *Nature* **500**: 422–426
- Nakagawa Y, Katagiri T, Shinozaki K, Qi Z, Tatsumi H, Furuichi T, Kishigami A, Sokabe M, Kojima I, Sato S, et al** (2007) Arabidopsis plasma membrane protein crucial for Ca<sup>2+</sup> influx and touch sensing in roots. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 3639–3644
- Nakayama Y, Fujii K, Sokabe M, Yoshimura K** (2007) Molecular and electrophysiological characterization of a mechanosensitive channel expressed in the chloroplasts of *Chlamydomonas*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 5883–5888
- Nakayama Y, Yoshimura K, Iida H** (2012) Organellar mechanosensitive channels in fission yeast regulate the hypo-osmotic shock response. *Nat Commun* **3**: 1020
- Nomura T, Sokabe M, Yoshimura K** (2006) Lipid-protein interaction of the MscS mechanosensitive channel examined by scanning mutagenesis. *Biophys J* **91**: 2874–2881

- Oldroyd GED** (2013) Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nat Rev Microbiol* **11**: 252–263
- Paredes AR, Somerville CR, Ehrhardt DW** (2006) Visualization of cellulose synthase demonstrates functional association with microtubules. *Science* **312**: 1491–1495
- Perozo E** (2006) Gating prokaryotic mechanosensitive channels. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**: 109–119
- Perrine-Walker FM, Lartaud M, Kouchi H, Ridge RW** (2014) Microtubule array formation during root hair infection thread initiation and elongation in the Mesorhizobium-Lotus symbiosis. *Protoplasma* **251**: 1099–1111
- Peyronnet R, Haswell ES, Barbier-Brygoo H, Frachisse J-M** (2008) AtMSL9 and AtMSL10: Sensors of plasma membrane tension in Arabidopsis roots. *Plant Signal Behav* **3**: 726–729
- Peyronnet R, Tran D, Girault T, Frachisse J-M** (2014) Mechanosensitive channels: feeling tension in a world under pressure. *Front Plant Sci* **5**: 558
- Pfaffl MW** (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic Acids Res* **29**: e45
- Pivetti CD, Yen M-R, Miller S, Busch W, Tseng Y-H, Booth IR, Saier MH Jr** (2003) Two families of mechanosensitive channel proteins. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR* **67**: 66–85, table of contents
- Pliotas C, Naismith JH** (2017) Spectator no more, the role of the membrane in regulating ion channel function. *Curr Opin Struct Biol* **45**: 59–66
- Ramos J, Bisseling T** (2003) A method for the isolation of root hairs from the model legume *Medicago truncatula*. *J Exp Bot* **54**: 2245–2250
- Rech P, Grima-Pettenati J, Jauneau A** (2003) Fluorescence microscopy: a powerful technique to detect low GUS activity in vascular tissues. *Plant J Cell Mol Biol* **33**: 205–209
- Rival P, de Billy F, Bono J-J, Gough C, Rosenberg C, Bensmihen S** (2012) Epidermal and cortical roles of NFP and DMI3 in coordinating early steps of nodulation in *Medicago truncatula*. *Dev Camb Engl* **139**: 3383–3391
- Rowe I, Anishkin A, Kamaraju K, Yoshimura K, Sukharev S** (2014) The cytoplasmic cage domain of the mechanosensitive channel MscS is a sensor of macromolecular crowding. *J Gen Physiol* **143**: 543–557
- Saddhe AA, Kumar K** (2015) In silico identification and expression analysis of MscS like gene family in rice. *Plant Gene* **1**: 8–17
- Sampathkumar A, Krupinski P, Wightman R, Milani P, Berquand A, Boudaoud A, Hamant O, Jönsson H, Meyerowitz EM** (2014) Subcellular and supracellular mechanical stress prescribes cytoskeleton behavior in Arabidopsis cotyledon pavement cells. *eLife* **3**: e01967
- Sauviac L, Niebel A, Boisson-Dernier A, Barker DG, de Carvalho-Niebel F** (2005) Transcript enrichment of Nod factor-elicited early nodulin genes in purified root hair fractions of the model legume *Medicago truncatula*. *J Exp Bot* **56**: 2507–2513

## Bibliographie

---

- Schnabel E, Karve A, Kassaw T, Mukherjee A, Zhou X, Hall T, Frugoli J** (2012) The *M. truncatula* SUNN gene is expressed in vascular tissue, similarly to RDN1, consistent with the role of these nodulation regulation genes in long distance signaling. *Plant Signal Behav* **7**: 4–6
- Schroeder JI, Keller BU** (1992) Two types of anion channel currents in guard cells with distinct voltage regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 5025–5029
- Schwab R, Ossowski S, Riester M, Warthmann N, Weigel D** (2006) Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in Arabidopsis. *Plant Cell* **18**: 1121–1133
- Shaikh S, Cox CD, Nomura T, Martinac B** (2014) Energetics of gating MscS by membrane tension in azolectin liposomes and giant spheroplasts. *Channels Austin Tex* **8**: 321–326
- Shaw SL, Dumais J, Long SR** (2000) Cell surface expansion in polarly growing root hairs of *Medicago truncatula*. *Plant Physiol* **124**: 959–970
- Sieberer B, Emons AMC** (2000) Cytoarchitecture and pattern of cytoplasmic streaming in root hairs of *Medicago truncatula* during development and deformation by nodulation factors. *Protoplasma* **214**: 118–127
- Sieberer BJ, Chabaud M, Fournier J, Timmers ACJ, Barker DG** (2012) A switch in Ca<sup>2+</sup> spiking signature is concomitant with endosymbiotic microbe entry into cortical root cells of *Medicago truncatula*. *Plant J Cell Mol Biol* **69**: 822–830
- Sukharev SI, Blount P, Martinac B, Blattner FR, Kung C** (1994) A large-conductance mechanosensitive channel in *E. coli* encoded by mscl alone. *Nature* **368**: 265–268
- Sukharev SI, Martinac B, Arshavsky VY, Kung C** (1993) Two types of mechanosensitive channels in the *Escherichia coli* cell envelope: solubilization and functional reconstitution. *Biophys J* **65**: 177–183
- Tadege M, Wen J, He J, Tu H, Kwak Y, Eschstruth A, Cayrel A, Endre G, Zhao PX, Chabaud M, et al** (2008) Large-scale insertional mutagenesis using the Tnt1 retrotransposon in the model legume *Medicago truncatula*. *Plant J Cell Mol Biol* **54**: 335–347
- Takemoto D, Jones DA, Hardham AR** (2003) GFP-tagging of cell components reveals the dynamics of subcellular re-organization in response to infection of Arabidopsis by oomycete pathogens. *Plant J Cell Mol Biol* **33**: 775–792
- Tang H, Krishnakumar V, Bidwell S, Rosen B, Chan A, Zhou S, Gentzbittel L, Childs KL, Yandell M, Gundlach H, et al** (2014) An improved genome release (version Mt4.0) for the model legume *Medicago truncatula*. *BMC Genomics* **15**: 312
- Telewski FW** (2006) A unified hypothesis of mechanoperception in plants. *Am J Bot* **93**: 1466–1476
- Timmers AC, Auriac MC, Truchet G** (1999) Refined analysis of early symbiotic steps of the Rhizobium-Medicago interaction in relationship with microtubular cytoskeleton rearrangements. *Dev Camb Engl* **126**: 3617–3628
- Vanholme B, Vanholme R, Turumtay H, Goeminne G, Cesarino I, Goubet F, Morreel K, Rencoret J, Bulone V, Hooijmaijers C, et al** (2014) Accumulation of N-acetylglucosamine oligomers in the plant cell wall affects plant architecture in a dose-dependent and conditional manner. *Plant Physiol* **165**: 290–308

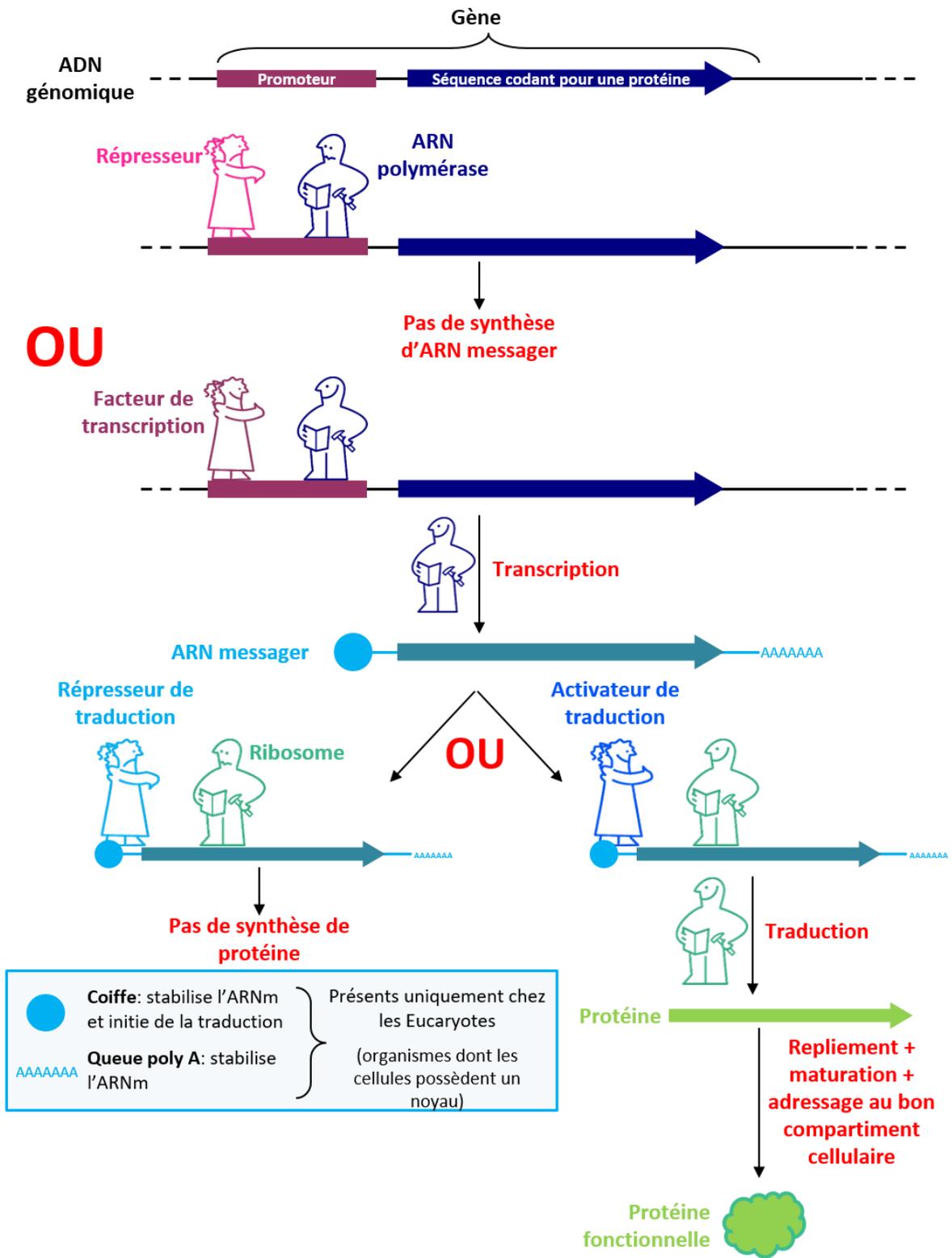
- Veerappan V, Kadel K, Alexis N, Scott A, Kryvoruchko I, Sinharoy S, Taylor M, Udvardi M, Dickstein R** (2014) Keel petal incision: a simple and efficient method for genetic crossing in *Medicago truncatula*. *Plant Methods* **10**: 11
- Veley KM, Maksaev G, Frick EM, January E, Kloepper SC, Haswell ES** (2014) Arabidopsis MSL10 Has a Regulated Cell Death Signaling Activity That Is Separable from Its Mechanosensitive Ion Channel Activity[C][W]. *Plant Cell* **26**: 3115–3131
- Veley KM, Marshburn S, Clure CE, Haswell ES** (2012) Mechanosensitive channels protect plastids from hypoosmotic stress during normal plant growth. *Curr Biol* **22**: 408–413
- Wang W, Black SS, Edwards MD, Miller S, Morrison EL, Bartlett W, Dong C, Naismith JH, Booth IR** (2008) The structure of an open form of an E. coli mechanosensitive channel at 3.45 Å resolution. *Science* **321**: 1179–1183
- Weerasinghe RR, Collings DA, Johannes E, Allen NS** (2003) The distributional changes and role of microtubules in Nod factor-challenged *Medicago sativa* root hairs. *Planta* **218**: 276–287
- Wilson ME, Jensen GS, Haswell ES** (2011) Two mechanosensitive channel homologs influence division ring placement in Arabidopsis chloroplasts. *Plant Cell* **23**: 2939–2949
- Xu XZ** (2016) Demystifying Mechanosensitive Piezo Ion Channels. *Neurosci Bull* **32**: 307–309
- Yamanaka T, Nakagawa Y, Mori K, Nakano M, Imamura T, Kataoka H, Terashima A, Iida K, Kojima I, Katagiri T, et al** (2010) MCA1 and MCA2 That Mediate Ca<sup>2+</sup> Uptake Have Distinct and Overlapping Roles in Arabidopsis. *Plant Physiol* **152**: 1284–1296
- Yuan F, Yang H, Xue Y, Kong D, Ye R, Li C, Zhang J, Theprungsirikul L, Shrift T, Krichilsky B, et al** (2014) OSCA1 mediates osmotic-stress-evoked Ca<sup>2+</sup> increases vital for osmosensing in Arabidopsis. *Nature* **514**: 367–371
- Zepeda I, Sánchez-López R, Kunkel JG, Bañuelos LA, Hernández-Barrera A, Sánchez F, Quinto C, Cárdenas L** (2014) Visualization of highly dynamic F-actin plus ends in growing phaseolus vulgaris root hair cells and their responses to Rhizobium etli nod factors. *Plant Cell Physiol* **55**: 580–592
- Zhang X, Wang J, Feng Y, Ge J, Li W, Sun W, Iscla I, Yu J, Blount P, Li Y, et al** (2012) Structure and molecular mechanism of an anion-selective mechanosensitive channel of small conductance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 18180–18185
- Zou Y, Chintamanani S, He P, Fukushige H, Yu L, Shao M, Zhu L, Hildebrand DF, Tang X, Zhou J-M** (2016) A gain-of-function mutation in Msl10 triggers cell death and wound-induced hyperaccumulation of jasmonic acid in Arabidopsis. *J Integr Plant Biol* **58**: 600–609



# Annexes

<b>Annexe 1.</b>	<b>Représentation simplifiée de la transcription d'un gène et de la traduction d'un ARN messenger .....</b>	<b>218</b>
<b>Annexe 2.</b>	<b>Classification simplifiée de la lignée verte .....</b>	<b>219</b>
<b>Annexe 3.</b>	<b>Histologie d'une racine de <i>M. truncatula</i> .....</b>	<b>219</b>
<b>Annexe 4.</b>	<b>Localisation subcellulaire des <i>MtMSL:GFP</i> en protoplastes d'<i>A. thaliana</i> ...</b>	<b>220</b>
<b>Annexe 5.</b>	<b>Localisation subcellulaire des <i>MtMSL:GFP</i> dans des cellules épidermiques de feuilles de <i>Nicotiana benthamiana</i> .....</b>	<b>221</b>

# Annexe 1. Représentation simplifiée de la transcription d'un gène et de la traduction d'un ARN messager



## Annexe 2. Classification simplifiée de la lignée verte

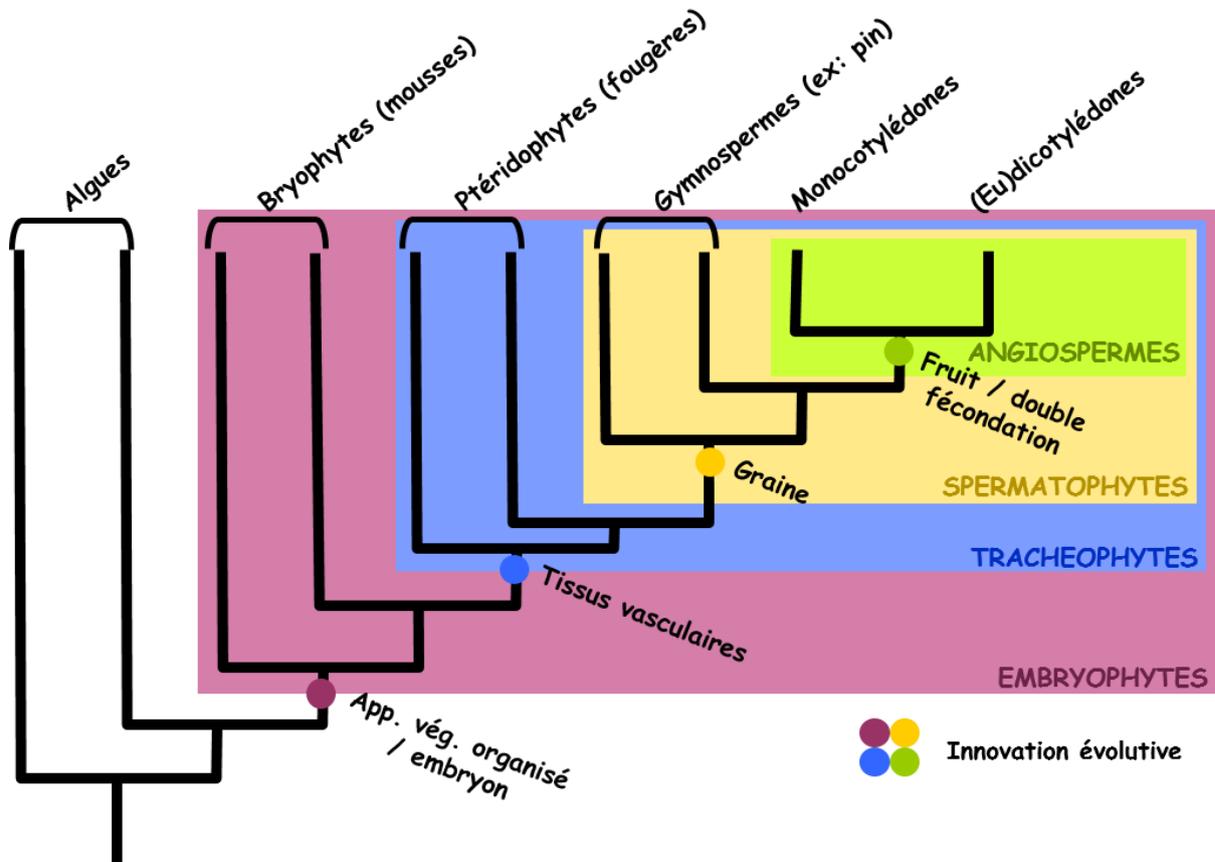
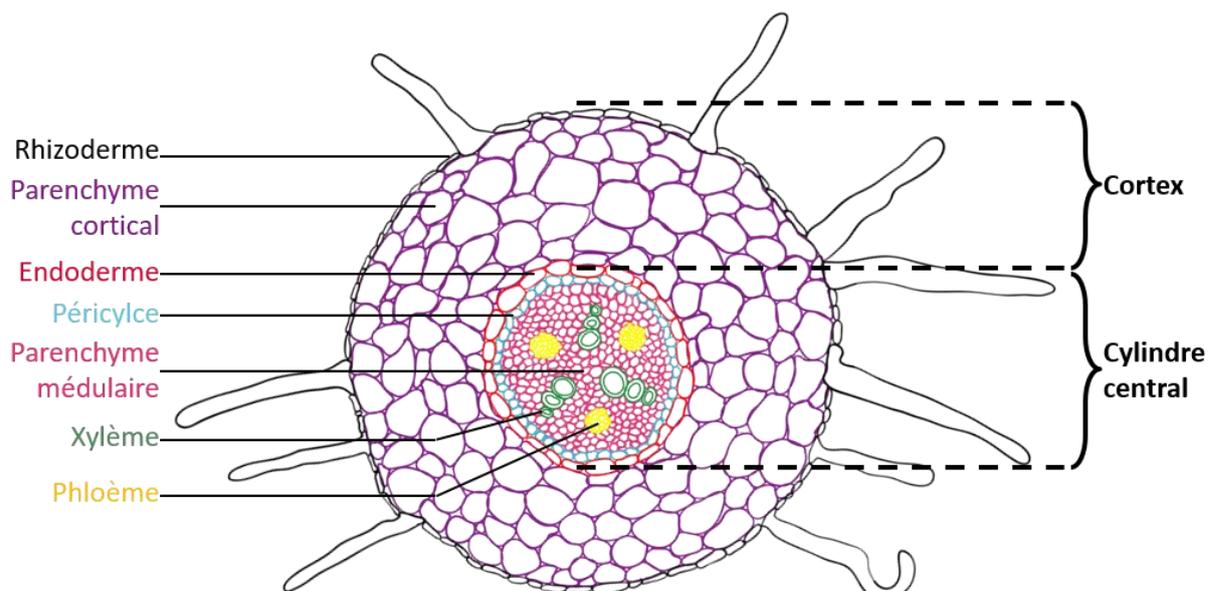
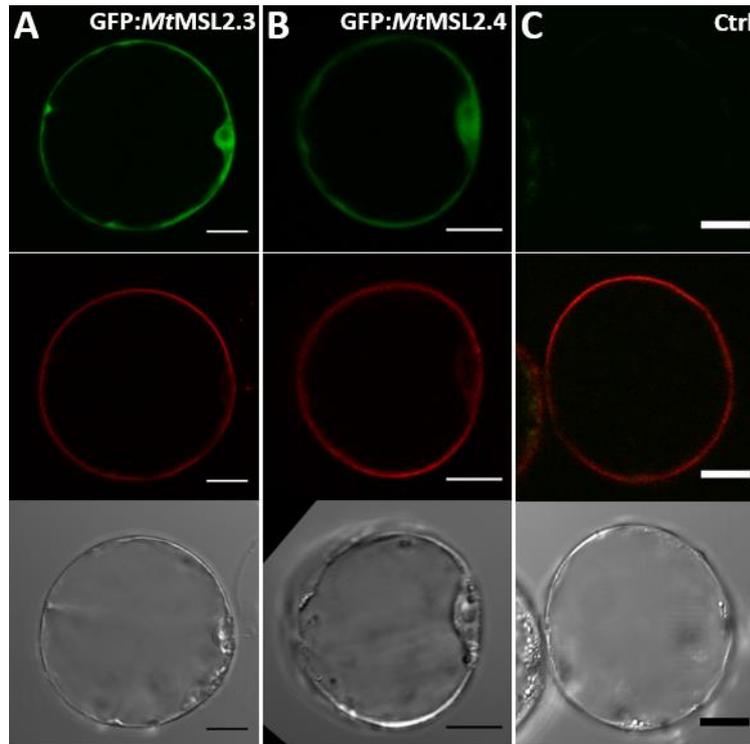


Schéma représentant une classification simplifiée des différents groupes composant la lignée verte, ainsi que les principales innovations évolutives associées à l'émergence de certains groupes. App. vég.: appareil végétatif.

Annexe 3. Histologie d'une racine de *M. truncatula*

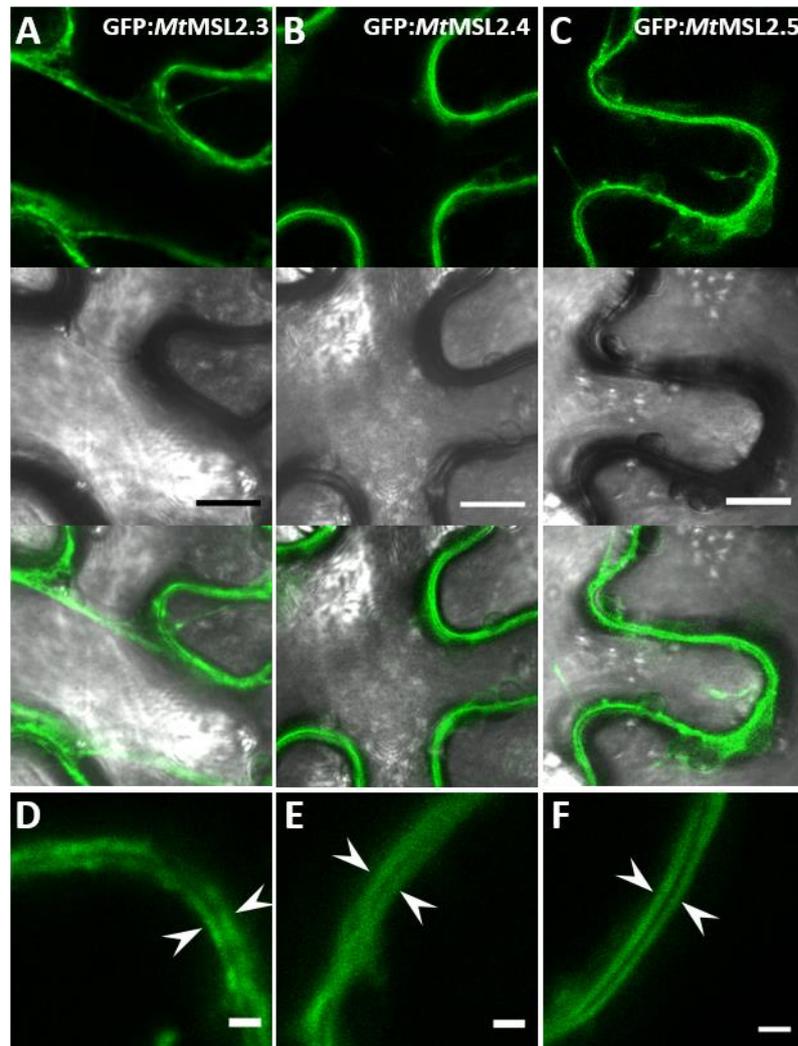
Dessin représentant les différents tissus observés dans une coupe transversale de jeune racine de *M. truncatula*.

#### Annexe 4. Localisation subcellulaire des *MtMSL*:GFP en proto- plastes d'*A. thaliana*



Des protoplastes d'*A. thaliana* ont été transformés ou non avec 10 $\mu$ g de plasmides portant la construction *35S::GFP::MtMSL2.3* ou *35S::GFP::MtMSL2.4* (squelette du vecteur: pMDC43). 48h après transformation, la fluorescence de la GFP des chimères GFP:*MtMSL2.3* (A – panneau du haut) et GFP:*MtMSL2.4* (B – panneau du haut) a été suivie par microscopie confocale. Une coloration au FM4-64 a été utilisée pour visualiser la membrane plasmique (panneaux du milieu). Le panneau du bas correspond à l'image obtenue en transmission. Les mêmes conditions ont été utilisées pour observer des protoplastes non transformés (C). échelle: 15 $\mu$ m. Stage Master 2 : Marjorie Guichard

## Annexe 5. Localisation subcellulaire des *MtMSL*:GFP dans des cellules épidermiques de feuilles de *Nicotiana benthamiana*



Des feuilles de *Nicotiana* ont été agroinfiltrées avec des agrobactéries contenant des plasmides portant les constructions *p35S::GFP::MtMSL2.3*, *35S::GFP::MtMSL2.4* ou *p35S::GFP::MtMSL2.5* (squelette du vecteur: pMDC43). 4j après agroinfiltration, la fluorescence de la GFP des chimères *GFP::MtMSL2.3* (A – panneau du haut et D), *GFP::MtMSL2.4* (B – panneau du haut et E) et *GFP::MtMSL2.5* (C – panneau du haut et F) a été suivie par microscopie confocale. Les panneaux du milieu présentent les images obtenues en transmission. Les panneaux du bas ont été obtenus en fusionnant les images des deux panneaux supérieurs. Echelle: 20 $\mu$ m. D-F. Focalisation de l'observation sur la paroi des cellules épidermiques. Les flèches encadrent la région correspondant à la paroi cellulaire. Echelle: 2 $\mu$ m. Stage Master 2 : Marjorie Guichard



# Articles

## **Article 1. Nod Factor Effects on Root Hair - specific Transcriptome of *Medicago truncatula*: Focus on Plasma Membrane Transport Systems and Reactive Oxygen Species Networks**

### Auteurs:

I. Damiani, A. Drain, **M. Guichard**, S. Balzergue, A. Boscari, J.-C. Boyer, V. Brunaud, S. Cottaz, C. Rancurel, M. Da Rocha, C. Fizames, S. Fort, I. Gaillard, V. Maillol, E. G.J. Danchin, H. Rouached, E. Samain, Y.H. Su, J. Thouin, B. Touraine, A. Puppo, J.M. Frachisse, N. Pauly and H. Sentenac

### Date de publication:

7 Juin 2016

### Revue:

*Frontiers in Plant Science*

Volume 7, article 794

DOI: 10.3389/fpls.2016.00794



# Nod Factor Effects on Root Hair-Specific Transcriptome of *Medicago truncatula*: Focus on Plasma Membrane Transport Systems and Reactive Oxygen Species Networks

OPEN ACCESS

**Edited by:**

Janin Riedelsberger,  
University of Talca, Chile

**Reviewed by:**

Erik Limpens,  
Wageningen University, Netherlands  
Jeremy Dale Murray,  
John Innes Centre, UK  
Joachim Schulze,  
University Goettingen, Germany

**\*Correspondence:**

Nicolas Pauly  
nicolas.pauly@sophia.inra.fr  
Hervé Sentenac  
hervé.sentenac@supagro.inra.fr

†These authors have contributed  
equally to this work.

**Specialty section:**

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

**Received:** 31 March 2016

**Accepted:** 22 May 2016

**Published:** 07 June 2016

**Citation:**

Damiani I, Drain A, Guichard M,  
Balzergue S, Boscari A, Boyer J-C,  
Brunaud V, Cottaz S, Rancurel C, Da  
Rocha M, Fizames C, Fort S,  
Gaillard I, Maillol V, Danchin EGJ,  
Rouached H, Samain E, Su Y-H,  
Thouin J, Touraine B, Puppo A,  
Frachisse J-M, Pauly N and  
Sentenac H (2016) Nod Factor Effects  
on Root Hair-Specific Transcriptome  
of *Medicago truncatula*: Focus on  
Plasma Membrane Transport Systems  
and Reactive Oxygen Species  
Networks. *Front. Plant Sci.* 7:794.  
doi: 10.3389/fpls.2016.00794

Isabelle Damiani<sup>1†</sup>, Alice Drain<sup>2†</sup>, Marjorie Guichard<sup>3</sup>, Sandrine Balzergue<sup>4,5</sup>,  
Alexandre Boscari<sup>1</sup>, Jean-Christophe Boyer<sup>2</sup>, Véronique Brunaud<sup>4,5</sup>, Sylvain Cottaz<sup>6,7</sup>,  
Corinne Rancurel<sup>1</sup>, Martine Da Rocha<sup>1</sup>, Cécile Fizames<sup>2</sup>, Sébastien Fort<sup>6,7</sup>,  
Isabelle Gaillard<sup>2</sup>, Vincent Maillol<sup>6,8</sup>, Etienne G. J. Danchin<sup>1</sup>, Hatem Rouached<sup>2</sup>,  
Eric Samain<sup>6,7</sup>, Yan-Hua Su<sup>9</sup>, Julien Thouin<sup>2</sup>, Bruno Touraine<sup>2</sup>, Alain Puppo<sup>1</sup>,  
Jean-Marie Frachisse<sup>3</sup>, Nicolas Pauly<sup>1\*</sup> and Hervé Sentenac<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Centre National de la Recherche Scientifique, Institut National de la Recherche Agronomique, UMR 1355-7254 Institut Sophia Agrobiotech, Université Nice Sophia Antipolis, Sophia Antipolis, France, <sup>2</sup> Biochimie and Physiologie Moléculaire des Plantes, UMR 5004 Centre National de la Recherche Scientifique/386 Institut National de la Recherche Agronomique/SupAgro Montpellier/Université de Montpellier, Campus SupAgro-Institut National de la Recherche Agronomique, Montpellier, France, <sup>3</sup> Institute for Integrative Biology of the Cell, CEA, Centre National de la Recherche Scientifique, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Gif sur Yvette, France, <sup>4</sup> POPS Transcriptomic Platform, Centre National de la Recherche Scientifique, Institute of Plant Sciences Paris-Saclay, Institut National de la Recherche Agronomique, Université Paris-Sud, Université Evry, Université Paris-Saclay, Orsay, France, <sup>5</sup> POPS Transcriptomic Platform, Institute of Plant Sciences Paris-Saclay, Paris Diderot, Orsay, France, <sup>6</sup> Université Grenoble Alpes, CERMAV, Grenoble, France, <sup>7</sup> Centre National de la Recherche Scientifique, CERMAV, Grenoble, France, <sup>8</sup> Laboratoire d'Informatique, de Robotique et de Microélectronique de Montpellier and Institut de Biologie Computationnelle, Centre National de la Recherche Scientifique and Université Montpellier, Montpellier, France, <sup>9</sup> State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing, China

Root hairs are involved in water and nutrient uptake, and thereby in plant autotrophy. In legumes, they also play a crucial role in establishment of rhizobial symbiosis. To obtain a holistic view of *Medicago truncatula* genes expressed in root hairs and of their regulation during the first hours of the engagement in rhizobial symbiotic interaction, a high throughput RNA sequencing on isolated root hairs from roots challenged or not with lipochitooligosaccharides Nod factors (NF) for 4 or 20 h was carried out. This provided a repertoire of genes displaying expression in root hairs, responding or not to NF, and specific or not to legumes. In analyzing the transcriptome dataset, special attention was paid to pumps, transporters, or channels active at the plasma membrane, to other proteins likely to play a role in nutrient ion uptake, NF electrical and calcium signaling, control of the redox status or the dynamic reprogramming of root hair transcriptome induced by NF treatment, and to the identification of papilionoid legume-specific genes expressed in root hairs. About 10% of the root hair expressed genes were significantly up- or down-regulated by NF treatment, suggesting their involvement in remodeling

plant functions to allow establishment of the symbiotic relationship. For instance, NF-induced changes in expression of genes encoding plasma membrane transport systems or disease response proteins indicate that root hairs reduce their involvement in nutrient ion absorption and adapt their immune system in order to engage in the symbiotic interaction. It also appears that the redox status of root hair cells is tuned in response to NF perception. In addition, 1176 genes that could be considered as “papilionoid legume-specific” were identified in the *M. truncatula* root hair transcriptome, from which 141 were found to possess an ortholog in every of the six legume genomes that we considered, suggesting their involvement in essential functions specific to legumes. This transcriptome provides a valuable resource to investigate root hair biology in legumes and the roles that these cells play in rhizobial symbiosis establishment. These results could also contribute to the long-term objective of transferring this symbiotic capacity to non-legume plants.

**Keywords:** *Medicago truncatula*, root hairs, deep-RNA sequencing, Nod factors (lipochitooligosaccharides), legume-rhizobium symbiosis, plasma membrane transport systems, reactive oxygen species

## INTRODUCTION

Root hairs are long tubular outgrowths that project into the soil from root epidermal cells named trichoblasts. Together with the pollen tube in plants, axons in animals, and hyphae in filamentous fungi, they provide one of the very rare models of cell types displaying polarized “tip” growth. Root hair elongation results in an increased area of the root-soil interface. At this interface, root hairs contribute to plant autotrophy by taking up nutrient ions and water from the soil solution.

Root hairs are also involved in beneficial interactions with soil microorganisms. They exudate compounds that act as a chemotactic signal or promote the growth of symbiotic fungi and bacteria (Bais et al., 2006). Moreover, they are directly involved in the formation of nitrogen-fixing nodules in legumes. The plant secretes signaling flavonoid compounds that are perceived by the rhizobial symbiont, which responds to this message by secreting specific lipochitooligosaccharides, named Nod factors (NF; Oldroyd and Downie, 2008). NF are signal molecules whose binding to root hair receptors triggers complex signaling events leading the root hair to curl and thereby to entrap rhizobia. Then, an infection thread develops, allowing rhizobia to migrate through the root cortex toward the nodule primordium.

With respect to the initial signals triggered by NF perception, the earliest events that have been reported so far involve reactive oxygen species (ROS) and ion fluxes across the cell membrane. ROS signals have been recorded within seconds after addition of NF on growing root hairs (Cardenas et al., 2008). In contrast, several minutes after NF perception, the production of hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) appears to be inhibited (Shaw and Long, 2003; Lohar et al., 2007). Several hours later, a gradual increase in ROS production occurs in root cortical cells of inoculated plants, which peaks at 24 h after rhizobial inoculation and remains high 48 h after inoculation (Ramu et al., 2002; Peleg-Grossman et al., 2007, 2012). Thus, ROS play a role in the early signaling leading to establishment of the symbiotic partnership (Montiel et al., 2012) as well as later on, when rhizobia invade the root hair via

progression of the infection thread (for review, see Puppo et al., 2013).

Ions whose transport across the root hair plasma membrane has been shown to be rapidly modulated during the initial root hair response to NF are  $H^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cl^-$ , and  $K^+$  (Felle et al., 1996, 1998, 1999; Kurkdjian et al., 2000). In summary, the present model is that NF perception leads to a transient inhibition of plasma membrane  $H^+$ -ATPases (proton pumps), an activation of  $Ca^{2+}$  channels, allowing a depolarizing influx of  $Ca^{2+}$ , immediately followed by an activation of anion ( $Cl^-$  permeable) channels, mediating an efflux of anions that further depolarizes the cell membrane. In turn, this depolarization activates voltage-gated  $K^+$  channels, giving rise to a repolarizing efflux of  $K^+$ . This series of events is thought to generate electrical and calcium signals that play a major role in the initial dialogue between root hairs and rhizobia (Felle et al., 1996, 1998, 1999; Kurkdjian et al., 2000). It might be connected to the first ROS signals triggered by NF perception since ROS production by NADPH oxidases has been shown to stimulate plasma membrane  $Ca^{2+}$  channel activity in Arabidopsis root hairs (Foreman et al., 2003). Also, based on results obtained in Arabidopsis, ROS could play a role in control of  $K^+$  channel activity involved in electrical signaling (Garcia-Mata et al., 2010; Tran et al., 2013) as well as in control of annexins involved in  $Ca^{2+}$  signaling (Richards et al., 2014). The decision of the plant to engage in rhizobial symbiosis is strongly dependent on the availability of nutrient ions in the soil solution, in particular of nitrate and ammonium (Barbulova et al., 2007). Hence, by routing nutrient ions, transport systems are likely to impact the plant decision to establish symbiosis. ROS signals are likely to play a role in this process since nutrient ion deprivation has been shown to lead to altered levels of ROS in Arabidopsis and *M. truncatula* roots (Schachtman and Shin, 2007; Bonneau et al., 2013), and NADPH oxidases genes are necessary for up-regulation of genes in response to nutrient deficiency (Shin and Schachtman, 2004).

The multiple and essential functions of the root hair clearly establish this cell type as a system biology model to investigate

plant cell development, uptake of water and nutrients, and response to abiotic and biotic signals. Indeed, a number of genome-wide studies have been published using root hairs from several model and crop plants (Hossain et al., 2015; Wang et al., 2016). The present paper is conceived as a contribution to improved understanding of the molecular mechanisms underpinning the roles of root hairs in legumes. We used *M. truncatula* as a model legume. A detailed analysis of gene expression in *M. truncatula* root hairs from young seedlings (without lateral roots) and of their responses to NF treatments for 4 h (to get information on early NF signaling events) or 20 h has been carried out using a high throughput RNA sequencing strategy (RNA-seq). This is likely to provide the first RNA-seq dataset from *M. truncatula* root hairs, thereby the most exhaustive transcriptome available to date for this cell type, and thus a valuable resource to investigate root hair functions in legumes. Expert gene analyses have been focused in order to uncover ROS networks and pump, transporter and channel machineries likely to play a role in two major functions of root hairs, namely nutrient ion uptake and early molecular dialogue with rhizobia following NF perception. Moreover, using whole genome comparisons, we identified legume-specific genes expressed in root hairs, responding or not to NF. Altogether, these results constitute a promising dataset for researchers interested in plant mineral nutrition, rhizobial symbiosis, and legume specificities.

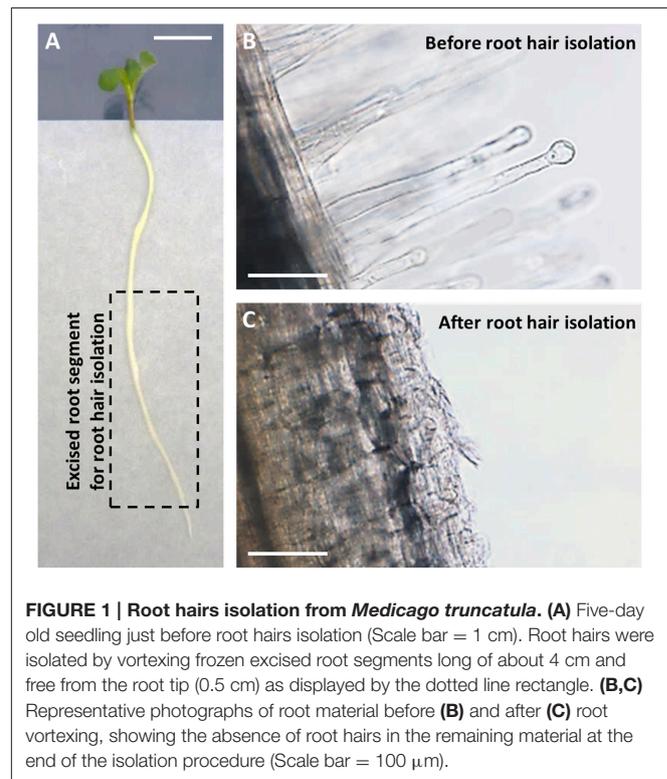
## RESULTS

### Preparation of Root Hair Libraries

Root hairs were obtained from excised root segments (Figure 1). Before excision, the root systems were treated with 10 nM NF solution for 4 or 20 h, or with pure H<sub>2</sub>O as a control treatment (NF 4 h, NF 20 h, and control treatments, respectively). Microscopic observation of root segment samples before root hair isolation indicated that the two NF treatments had actually induced the expected root hair morphological changes, i.e., root hair tip swelling in the case of the NF 4 h treatment, and reoriented root hair growth and branching in the case of the NF 20 h treatment (Figure 2A). Root hairs in the H<sub>2</sub>O treated control plants did not display such features (Figure 2A). RT-PCR analyses performed on root segments free from root hairs (material remaining after root hair isolation) provided further evidence that the NF treatments had been effective by showing a strong accumulation of *MtENOD11* transcripts (Figure 2B), one of the earliest markers induced by NF perception in root epidermal cells (Journet et al., 2001). Finally, absence of transcripts from the *MtSUNN* gene, which is known to be specifically expressed in root stele tissues (Schnabel et al., 2005), indicated that the root hair RNA pools were not substantially contaminated by RNA from inner root cells, and thus from whole root segments.

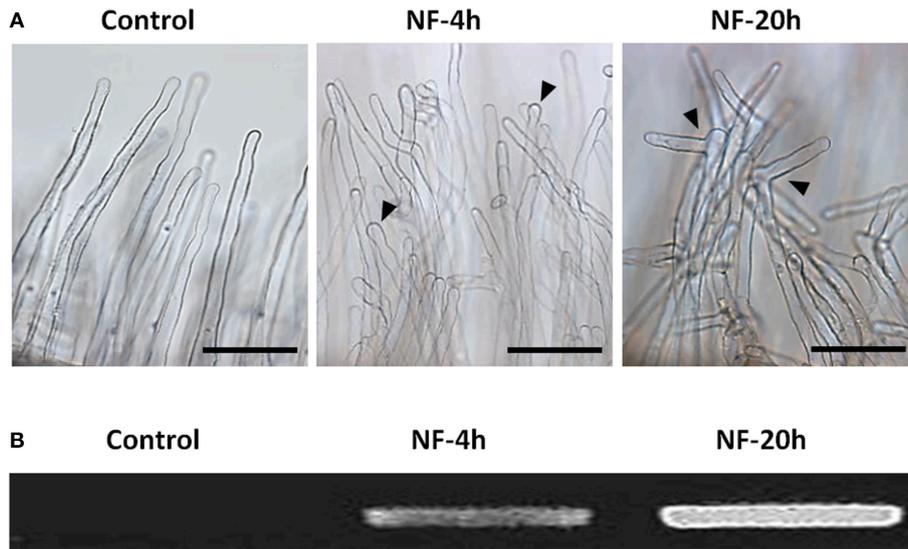
### General Features of the *M. truncatula* Root Hair Transcriptome

RNA sequencing was carried out on two independent biological replicates for each of the three treatments (H<sub>2</sub>O, NF 4 h,



NF 20 h), yielding six root hair transcriptomic datasets. We generated ~366 million high-quality paired-end reads, which were mapped to the *M. truncatula* predicted transcriptome (Mt4.0v1). About 266 million (ca. 73%) of paired-end reads were unambiguously mapped (Table S1). In order to assess the experimental variability, the two replicates obtained for a given treatment were compared by plotting the expression levels (expressed in Count per Million Reads) found in one dataset against those found in the second dataset (Figure S1). Linear regression analysis yielded  $R^2$  coefficient of 0.99, 0.99, and 0.97 for the control, NF 4 h, and NF 20 h treatments, respectively. For a large majority of genes ( $\geq 65\%$  whatever the treatment), the fold change in expression level between the two repetitions was lower than 1.5. As could be anticipated, we noticed that the biological variability in terms of expression level fold change was larger for genes displaying low expression levels. In order to further assess consistency among biological replicates for the transcriptome datasets, we subjected the expression data derived from the six datasets to principal component analysis (PCA; Figure S2). The first component (Dim1) clearly separated the control from the NF treated samples (Figure S2A) and the overall distribution confirmed that there was no biological repetition bias (Figure S2B).

To validate RNA-seq based differential gene expression in response to NF treatments, quantitative real-time RT-PCR (RT-qPCR) tests were also carried out. A set of 20 genes was selected (Table S11), amongst which receptors, pumps, and ion channels differing in their levels of expression. The expression level provided by the RT-qPCR experiments for the NF 4 h and



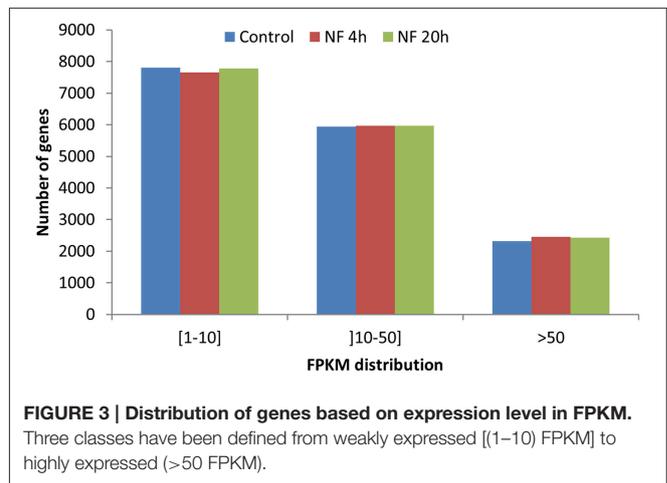
**FIGURE 2 | Root responses to Nod factor treatments. (A)** Root hair morphological responses. Representative photographs of root hairs from roots subjected to a control treatment with pure H<sub>2</sub>O or treated with 10 nM Nod factors (NF) for 4 h or 20 h (left, middle, and right panel, respectively; Scale bar = 100 μm). **(B)** Gene expression response to NF highlighted by increased *MtENOD11* transcript accumulation. Differences in *MtENOD11* transcript levels were revealed by RT-PCR experiments performed in parallel on control roots or roots pretreated by Nod factors for 4 or 20 h (left, middle, and right lane of the electrophoresis gel, respectively).

NF 20 h treated samples were divided by the level of expression determined for the control samples, and the resulting ratios were compared to those obtained from the corresponding data derived from the RNA-seq experiments (from Table S2). The resulting plots (Figure S3) reveal some variability between the RNA-seq and RT-qPCR results, but no conflicting discrepancy.

To describe the *M. truncatula* root hair transcriptome and to explore the relative expression levels of the different genes, the expression level of each gene was calculated in FPKM (Fragments Per Kilobase of exons per Million fragments mapped) values, from alignment of the paired-end reads to the improved *M. truncatula* genome release (Tang et al., 2014). For these analyses, only the longest transcript isoform has been considered. The genes with a FPKM higher than or equal to 1 were considered as expressed in root hairs. Sorting these genes into three classes of expression level (1–10, 10–50, and >50 FPKM) resulted in a similar distribution for the three treatments (Figure 3). In absence of NF treatment, 16,069 transcripts were identified as expressed in root hairs (Table S2), representing 31.5% of the predicted genes in the Mt4.0v1 genome assembly. The total number of expressed genes was only slightly affected by the NF treatments (16,077 and 16,170 for NF 4 h and NF 20 h, respectively; Table S2). Compiling the data from the three different treatments leads to a total of 16,810 non-redundant genes identified as expressed in *M. truncatula* root hairs in at least one of the tested conditions (Table S2).

## Impact of the NF Treatments on Gene Expression

Transcriptional reprogramming in response to the NF 4 h and NF 20 h treatments was studied by assessing statistically significant



differential gene expression between conditions, using EdgeR tool (Robinson et al., 2010). About 10% of the genes expressed in *M. truncatula* root hairs were thereby identified as significantly responding to NF, either being up- or down-regulated (with an adjusted  $p < 0.05$ ; Table S3) 4 h and/or 20 h after the onset of the NF treatments. When compared with the expression data observed in the control root hairs, about 779 genes (614 up-regulated and 165 down-regulated) responded to the NF 4 h treatment, and 1525 genes (896 up-regulated and 629 down-regulated) to the NF 20 h treatment (Table S3). Among the genes identified as significantly responding to the 4 or 20 h NF treatments, 184 were specifically sensitive to the shorter treatment, 128 displaying up-regulation and 56 down-regulation, and 867 were specifically sensitive to the longer treatment, 349

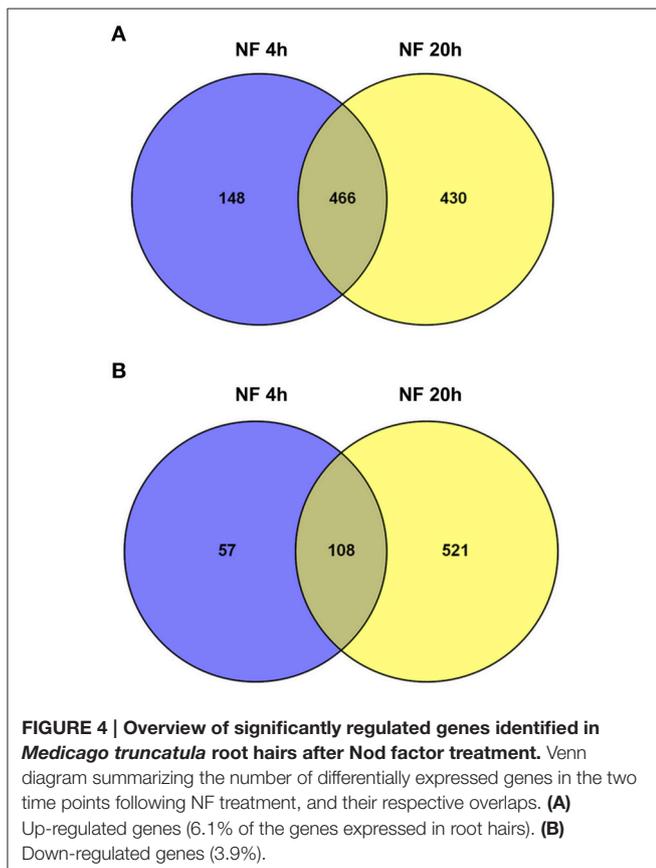
displaying up-regulation and 518 down-regulation (Table S3). Thus, amongst the genes identified as responding to the NF 4 h treatment, a large majority (about 80%) displayed up-regulation. Amongst the genes identified as responsive to the NF 20 h treatment, up-regulation was again the more frequent case, but the corresponding percentage was then lower (60%). The Venn diagrams shown in **Figure 4** indicate that about 45% of the genes were significantly up-regulated at both time points, 4 and 20 h, and that there is less overlap (ca. 16%) for the down-regulated genes.

A Single Enrichment Analysis (SEA) of GO terms (Du et al., 2010) within the list of NF-responsive genes was performed (Table S4). Considering the “biological process” category (**Figure 5**), we noticed some common enriched terms in response to NF 4 h and NF 20 h treatments such as “oxidoreduction,” “transmembrane transport,” and “anion/inorganic anion transport.” It is also worth to note that for both treatments (NF 4 h and NF 20 h), the analysis of the down-regulated gene list gave rise to about twice more significantly enriched GO terms than the up-regulated gene list. Over-represented semantic terms in the description of differentially expressed genes list was generated using the Gene Cloud software (Krouk et al., 2015). This analysis also identified the words “transporters” (or transport, uniport, symport) and “redox” (or oxydation, reduction, oxydoreductase) as amongst the enriched terms, especially in the description list of down-regulated genes at

time 4 h with respect to the terms related to membrane transport (Figure S4).

## Plasma Membrane Transport Systems Involved in Macro-Nutrients Uptake

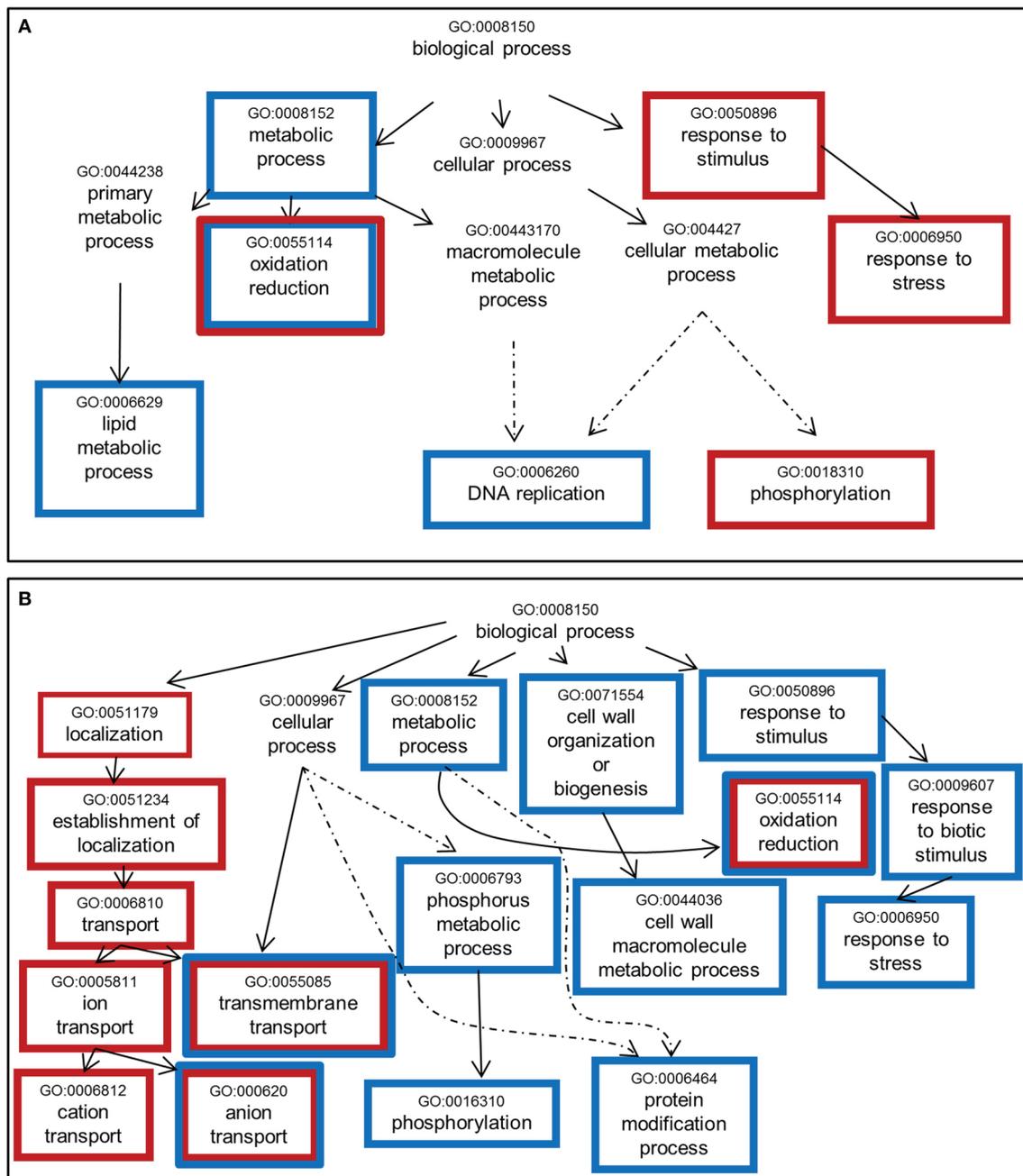
Many homologs of genes identified in *Arabidopsis thaliana* or other species as playing a role in membrane transport of macronutrient ions were found to be expressed in *M. truncatula* root hairs. Candidate genes potentially involved in nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ), ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ), orthophosphate (Pi), sulfate ( $\text{SO}_4^{2-}$ ), or potassium ( $\text{K}^+$ ) transport are indicated in **Figure 6**. The *A. thaliana*–*M. truncatula* phylogenetic relationships of the corresponding gene families or subfamilies, named NPF (Nitrate transporter 1/Peptide transporter Family), NRT2, and NRT3 for  $\text{NO}_3^-$ , AMT (ammonium transporter) for  $\text{NH}_4^+$ , PHO1, and PHT1 for Pi, SULTR for  $\text{SO}_4^{2-}$ , HAK/KUP/KT, AKT1 (Shaker  $\text{K}^+$  channel subfamily 1), and AtKC1 (Shaker subfamily 4) for  $\text{K}^+$  are shown in Figures S5–S12, respectively. The expression level of these genes in the three conditions (control, NF 4 h and NF 20 h) are provided in Table S5. Interestingly almost half of the genes, expressed in root hair and potentially involved in nutrition functions, are regulated by NF 4 h or 20 h after NF treatment (17 up- and 10 down-regulated; Table S5). This proportion is significantly higher than that observed at the whole transcriptome level (ca. 10%; see above), indicating that the expression of the macronutrient transport machinery is especially reprogrammed following NF perception.



## Ion Channels and Pumps Likely to Play a Role in Early Electrical and Calcium Signaling Following NF Perception

Early events triggered by NF perception are changes in ion fluxes through the root hair plasma membrane, resulting in electrical and calcium signals (Ehrhardt et al., 1992; Felle et al., 1998; Kurkdjian et al., 2000). The first events observed are an inhibition of  $\text{H}^+$  secretion and an activation of  $\text{Ca}^{2+}$  influx and  $\text{Cl}^-$  efflux, resulting in plasma membrane depolarization. Candidate proton pumps, calcium channels, anion channels, and potassium channels that could play a role in these early signaling events (see Discussion) are indicated in **Figure 7**.

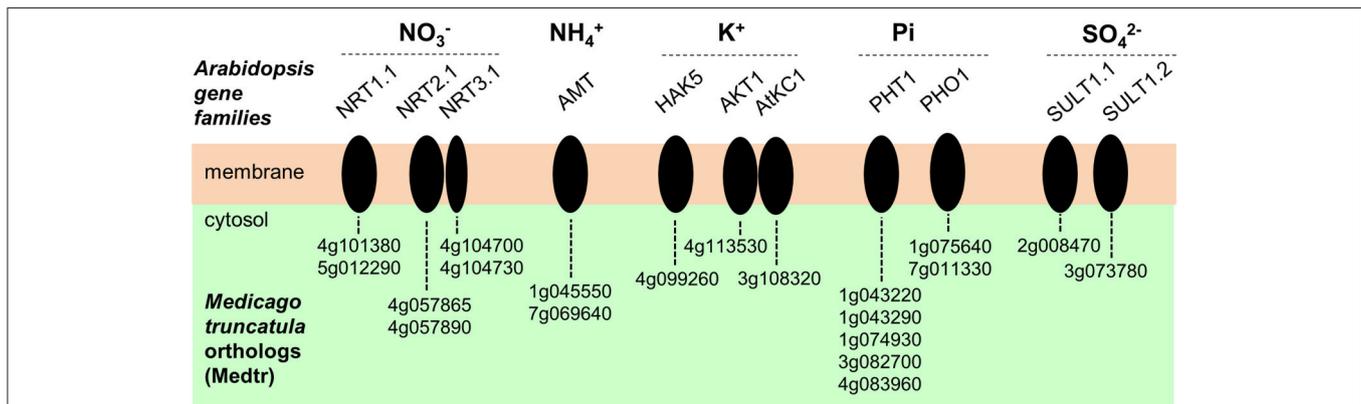
In *M. truncatula* as well as in *Arabidopsis* and probably in all plant species, the plasma membrane proton pumps ( $\text{H}^+$ -ATPase) are encoded by the AHA family (Falhof et al., 2016). Regarding the ion channel candidates, presently available information on gene families encoding such transport systems in plants, essentially gained in *Arabidopsis*, would lead to the following hypotheses:  $\text{K}^+$  channels could be encoded by the Shaker family, anion channels by the SLAC (Slow Anion Channels), ALMT (ALuminium-induced Malate Transporter), and/or MSL (mechano-sensitive MscS-like channels) families, and calcium-permeable channels by the CNGC (Cyclic Nucleotide-Gated Channels), GLR (Glutamate Receptor-Like), ANN (Annexin), MCA (Mid1-Complementing Activity), and CSC/OSCA (reduced hyperosmolarity-induced  $\text{Ca}^{2+}$  increase/Calcium permeable Stress-gated cation Channel). Genes belonging to these families and displaying expression in *M. truncatula* root



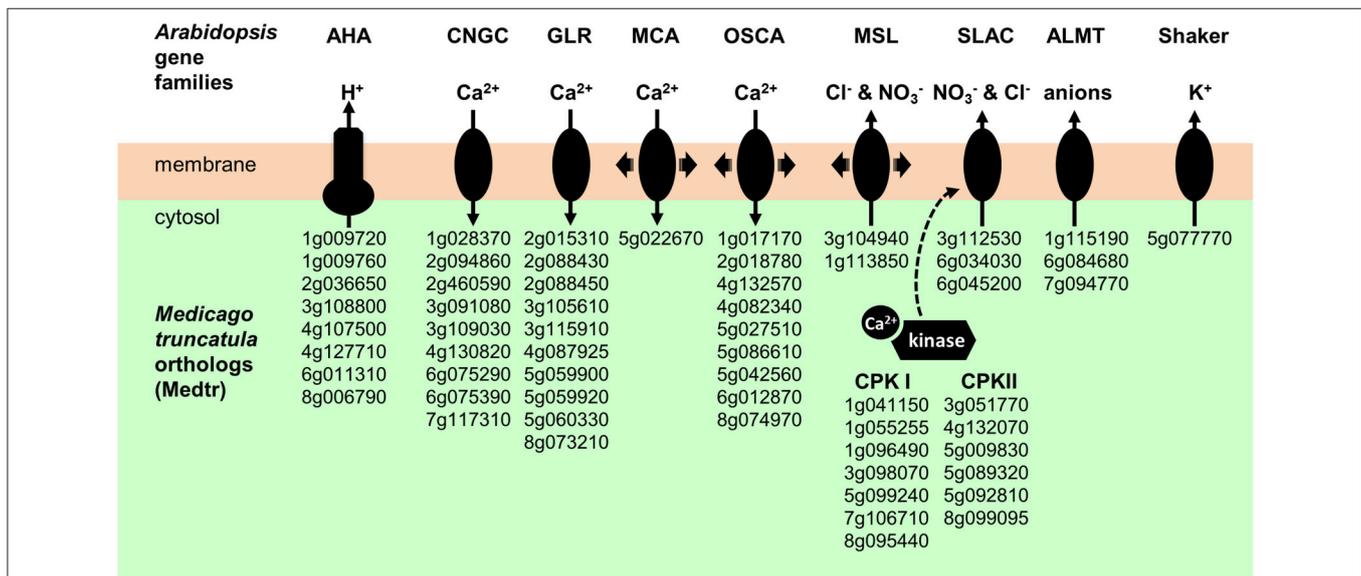
**FIGURE 5 | Significantly enriched GO terms among genes whose expression is sensitive to Nod factor treatment. (A)** Up-regulated genes. **(B)** Down-regulated genes. One thousand seventy genes were annotated using agriGO toolkit (<http://bioinfo.cau.edu.cn/agriGO/index.php>). GO terms identified with an adjusted  $p < 0.05$  are enclosed into boxes. Red and blue boxes refer to the changes in expression levels induced by the NF 4 h and NF 20 h treatments, respectively. Dashed arrow indicates that all the GO levels have not been represented.

hairs are listed in Table S5. Arabidopsis–Medicago phylogenetic relationships obtained for the Shaker, AHA, SLAC, ALMT, MSL, MCA, CSC/OSCA, CNGC, GLR, and ANN families are displayed in panel A of Figures S12–S19, respectively. The expression levels (in FPKM, obtained from the control root hair dataset) of genes belonging to these families are provided

in panel B of these figures. It is noteworthy that among the 60 candidate genes selected as likely to encode membrane transport systems playing a role in early electrical and calcium NF signaling in root hairs following NF perception, only a few of them are found to be induced (10) or repressed (5) by the NF treatments (Table S5). Thus, these 60 candidate proteins are already present



**FIGURE 6 | Plasma membrane transport systems likely to play a role in transport of macronutrient ions in *Medicago truncatula* root hairs.** Candidate genes potentially involved in nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), orthophosphate (Pi), potassium (K<sup>+</sup>) or sulfate (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) transport are represented. The corresponding acronyms in Arabidopsis are provided. NRT, NitRate Transporter. AMT, AMmonium Transporter. HAK, High Affinity K<sup>+</sup> transporter. AKT, Arabidopsis K<sup>+</sup> transport system (from the Shaker channel family). AtKC1, *Arabidopsis thaliana* K<sup>+</sup> channel 1 (member from the Shaker channel family). PHO1, PHOsphate 1. PHT1, PHosphate Transporter 1. SULT, SULfate Transporter.



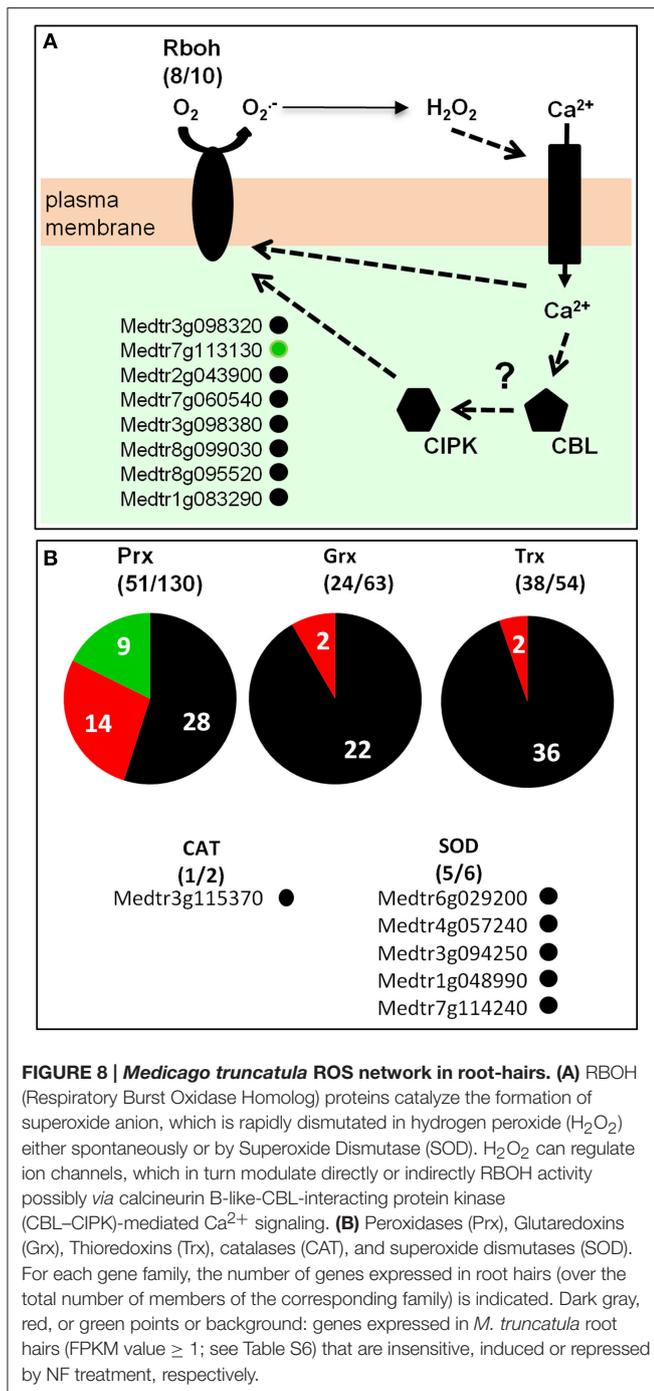
**FIGURE 7 | Plasma membrane transport systems and regulatory kinases likely to play a role in early electrical and calcium signals triggered by NF perception.** AHA, Autoinhibited H<sup>+</sup>-ATPase. CNGC, Cyclic Nucleotide-Gated Channels. GLR, Glutamate Receptor-Like. MCA, Mid1-Complementing Activity. OSCA; Reduced hyperosmolarity-induced Ca<sup>2+</sup> increase. MSL, Mechano-Sensitive MscS-Like channel. SLAC, Slow Anion Channel. ALMT, ALuminium-induced Malate Transporter. CPKI and CPKII, Calcium-dependant Protein Kinase I and II.

in root hairs before NF perception and their contribution (if any) to the signaling events triggered by NF perception would involve direct modifications of their transport activity rather than transcriptional responses.

## A Repertoire of the Root Hair Redox Network

Genes involved in redox buffering or ROS synthesis/detoxification, according to the ROS network described by Mittler et al. (2004), were identified in the *M.*

*truncatula* root hair transcriptome (Table S6; Figure 8). Among the well documented ROS producing systems, NADPH oxidases and peroxidases have been described as major sources of O<sub>2</sub><sup>-</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, respectively, during plant development and in response to biotic and abiotic stresses (Marino et al., 2012; O'brien et al., 2012). Plant NADPH oxidases are named Respiratory Burst Oxidase Homologs (*Rboh*s). In *M. truncatula*, the *Rboh* family comprises 10 genes, among which eight are expressed in root hairs (Figure 8A; Figure S20). The most highly expressed gene is *RbohD* (FPKM > 200; Table S6). One member of this family, *RbohG*, is slightly down-regulated following 20 h NF treatment.



In the *M. truncatula* genome (Mt4.0v1), 130 genes have been annotated as peroxidases (Figure 8B), among which 54 are expressed in the root hair transcriptome including 14 (9 up and 5 down) and 20 (12 up and 8 down) responding to the 4 h and 20 h NF treatments, respectively (Table S6).

Enzymes involved in ROS detoxification, namely superoxide dismutases (SODs) and catalases, are also expressed in *M. truncatula* root hairs. Indeed, five out of the six SOD genes present in the *M. truncatula* genome, together with one of the two

catalase genes (Table S6), are found as expressed in the control root hair transcriptome.

## Legume Specific Genes Expressed in Root Hairs

We investigated whether part of the ca. 16,000 *M. truncatula* genes identified as expressed in root hairs were specific to legume plant species. We defined legume-specific genes as protein-coding genes that have no predicted ortholog in any of the 25 non-legume species considered in our comparative analysis (Table S7). It should be noted that all the legume species included in this comparative analysis belong to the papilionid subfamily, which is the largest and most widespread legume family (Wojciechowski et al., 2004). We used the OrthoMCL software (Li et al., 2003; Fischer et al., 2011) to define groups of orthologous proteins among the predicted whole protein sets from 31 plant genomes (Table S7), including six legume genomes (three from the Phaseoloid clade, i.e., tropical or warm season legumes, and three from the Galeoid clade, i.e., temperate or cool season legumes). We identified 1176 *M. truncatula* genes expressed in root hairs and specific to legume species (Table S8). Among them, 138 genes were conserved in all the six considered legume species genomes. Comparison of the control, NF 4 h and NF 20 h transcriptomes identifies 26 and 74 legume-specific root hair expressed genes as responsive to the 4 and 20 h NF treatments, respectively, with a fold change  $>2$  and an adjusted  $p < 0.05$  (Table S8). Up-regulation was observed in a large majority (84%) of the genes identified as displaying sensitivity to the NF 4 h treatment, and in only 43% of the genes displaying sensitivity to the NF 20 h treatment.

## DISCUSSION

### A Valuable Resource to Investigate Root Hair Functions in Legumes

Polarized tip growth, nutrient uptake, and communication with microsymbionts are three interconnected aspects of legume root hair biology. For instance, curling of the root hair upon NF perception involves re-orientation of polarized tip growth (Esseling et al., 2003). Also, root hair elongation can be stimulated by reduction in nutrient ion availability (Giehl and Von Wieren, 2014), inoculation with rhizobacteria (Vacheron et al., 2013) or addition of isolated lipochitooligosaccharides (Dazzo et al., 1996).

The present study has been mainly focused on the roles of legume root hairs in mineral nutrition and communication with symbiotic rhizobia. It is well-known that proteins likely to play a role in these functions, like ion channels, can be expressed at very low levels. In the case of ion channels, low expression levels are likely to result from the fact that such proteins mediate very high transport rates. In this context, our objective has been to get a deep description of the root hair transcriptome by carrying out RNA-seq analyses since this methodology allows detection of very lowly expressed transcripts (Wang et al., 2009). RNA-seq analyses have previously been reported for several *M. truncatula* tissues, including roots (Boscari et al., 2013; Camps

et al., 2015; Larrainzar et al., 2015) and nodules (Boscari et al., 2013; Cabeza R., et al., 2014; Cabeza R. A., et al., 2014; Roux et al., 2014; Avenhaus et al., 2015). To our knowledge, the present report is likely to provide the first RNA-seq transcriptome for *M. truncatula* root hairs and thereby the most exhaustive transcriptome available to date for this cell type. The effects of NF perception on root hair gene expression have been investigating at 4 and 20 h post-NF application.

We identify more than 16,000 genes expressed in *M. truncatula* root hairs (FPKM  $\geq 1$ ; Table S2), i.e., about 55 and 60% of the number of genes expressed in nodule tissues (ca. 30,000) or in whole root tissues (25,000–27,000; Boscari et al., 2013; Roux et al., 2014), respectively. Although, an FPKM cutoff value of one as a threshold to assess expression might be questionable, it is interesting to note that a similar proportion between the numbers of genes expressed in root hairs and in whole roots has been reported in Arabidopsis (Becker et al., 2014). About 10% of the  $\sim 16,000$  genes expressed in root hairs were found to be significantly responsive to the NF treatments (787 and 1533 genes to the NF 4 h and NF 20 h treatments, respectively). In another legume model, *Glycine max*, Libault et al. (2010b) have investigated root hair responses to the symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* using two complementary transcriptomic strategies (gene chip and RNAseq). This work led to the identification of 1973 genes that were differentially expressed in response to bacterial inoculation (Libault et al., 2010b). We also compared the present data with previous analyses of gene expression in *M. truncatula* roots (Czaja et al., 2012) or root hairs (Breakspear et al., 2014) carried out at 24 h post-NF application and performed using gene chip method (Table S10). From the 1050 and 849 genes identified as sensitive to NF treatment by Czaja et al. (2012) and Breakspear et al. (2014), respectively, about 35 and 42% display the same expression profile in our transcriptome analysis. Further, comparison with the single previous report on root hairs (Breakspear et al., 2014) is not straightforward since both the transcriptomic methods (gene chips vs. RNA-seq) and plant culture conditions were different. Indeed, Breakspear et al. (2014) used culture medium supplemented with aminoethoxyvinylglycine (AVG), an inhibitor of ethylene biosynthesis, probably leading to changes in hormone balance and root growth when compared with our experimental conditions. For instance, the two cytokinin response regulator genes *MtRR4* (*Medtr5g036480*) and *MtRR9* (*Medtr3g015490*) have been recently shown to be induced by NF treatment in presence of AVG, while only *MtRR9* is induced in absence of AVG (Van Zeijl et al., 2015). In agreement with this result, only *MtRR9* is identified as induced by NF in our transcriptome dataset (Table S2).

From the 1814 candidate genes proposed to play a role in polarized tip growth in Arabidopsis root hairs (Becker et al., 2014), we identified 1339 orthologous counterparts in the *M. truncatula* genome, among which 1089 are expressed in root hairs (Table S9). This suggests that the mechanisms underlying root hair tip growth are strongly conserved between *M. truncatula* and Arabidopsis. Providing further support to this hypothesis, 36 genes identified as crucial for root hair development and/or growth in Arabidopsis (Kwasniewski

et al., 2013) are also found to be expressed in the present *M. truncatula* root hair transcriptomes. This includes genes involved in cell wall dynamics (e.g., expansin, pectate lyase, pectinesterase), in transcription regulation (bHLH) or in signaling (LRR-RLK, protein kinase; Table S10). It is also worth to note that *M. truncatula* root hairs expressed two homologs (*Medtr6g034030* and *Medtr6g045200*) of an Arabidopsis anion channel (AtSLAH3) known to play a role in pollen tube tip growth (Gutermuth et al., 2013). Altogether, these results provide evidence that the present transcriptome datasets constitute a valuable resource to further investigate major functions of root hair biology in *M. truncatula*.

## A Panoply of Nutrient Ion Transporters that Includes Unexpected Systems

*In silico* mining of the transcriptome dataset in order to identify plasma membrane transport systems likely to play a role in plant mineral nutrition revealed candidate genes displaying significant expression levels in root hairs, whatever the nutrient ion we considered. The present results complete previous analyses establishing a genomic inventory of *M. truncatula* transporters (Benedito et al., 2010). Altogether, the results indicate that the *M. truncatula* root hair is a cell type particularly dedicated to plant mineral nutrition. Candidate genes likely to play a role in uptake from the soil solution of the macronutrients potassium, nitrate, ammonium, phosphate, and sulfate are listed in Figure 7; Table S5.

Two families of  $K^+$  transport systems, named Shaker and HAK/KUP/KT, have been identified in Arabidopsis as playing a major role in  $K^+$  uptake from the soil solution (Véry and Sentenac, 2003). The Shaker  $K^+$  channel family is strongly conserved in plants, as well as its regulatory network that comprises protein kinase from the CIPK (CBL-Interacting Protein Kinase) family (Cuellar et al., 2013; Sharma et al., 2013; Véry et al., 2014). In Arabidopsis, two Shaker inward  $K^+$  channel genes are expressed in root hairs, *AtAKT1* and *AtKC1*, giving rise to heteromeric  $K^+$  channels involved in passive “low affinity”  $K^+$  uptake from the soil solution (Sharma et al., 2013). The present transcriptome datasets indicate that only two inward Shaker channel genes are expressed in *M. truncatula* root hairs too, *Medtr4g113530* and *Medtr3g108320*, which are the closest relatives of the Arabidopsis *AtAKT1* and *AtKC1* (Figure S11). This suggests that these two genes encode Shaker subunits able to form heteromeric  $K^+$  channels like in Arabidopsis. It has also been shown that phosphorylation of AtAKT1 channel subunits plays a crucial activating role in regulation of inward  $K^+$  channel activity in roots (Sharma et al., 2013). The two calcineurin B-like calcium sensors CBL1 and CBL9 bind to the CBL-interacting protein kinase CIPK23, which then in turn phosphorylates AKT1 (Sharma et al., 2013). Interestingly, close homologs of these proteins (MtCIPK23: *Medtr2g049790*; MtCBL1: *Medtr3g091440*; MtCBL9: *Medtr4g099210*) are expressed in *M. truncatula* root hairs (Table S2). Regarding the HAK/KUP/KT transporter family, phylogenetic and transcriptome analyses (Figure S12) identify one gene, *Medtr4g099260*, that encodes a close homolog of the  $K^+$  transporter AtHAK5, shown to be a major contributor to

active “high affinity”  $K^+$  uptake in Arabidopsis roots (Gierth et al., 2005). Thus, in our experimental conditions (0.7 mM external  $K^+$ ), *M. truncatula* root hairs seem to express both passive low affinity and active high affinity  $K^+$  uptake systems. Last, regarding  $K^+$  transport, *in silico* analyses reveal that *M. truncatula* root hairs express a transport system dedicated to  $K^+$  secretion into the external medium, *Medtr5g077770*, which is, within the *M. truncatula* Shaker family, the single ortholog of the two Arabidopsis outwardly rectifying  $K^+$  channels GORK and SKOR (Figure S12), the latter one being known as displaying activation by ROS (Garcia-Mata et al., 2010). Potential involvement of the *Medtr5g077770* Shaker channel in establishment of nitrogen-fixing symbiosis will be discussed below.

Three families of membrane transport systems, named NPF (Nitrate transporter 1/Peptide transporter Family; Leran et al., 2014), NRT2 (Orsel et al., 2002), and NRT3 (Okamoto et al., 2006) in Arabidopsis, have been identified as playing a major role in nitrate uptake from the soil solution. The extensively studied AtNRT1.1/NPF6.3 “transceptor” is a dual affinity, bidirectional  $NO_3^-$  transporter (Liu et al., 1999; Leran et al., 2013) as well as a  $NO_3^-$  sensor mediating  $NO_3^-$  regulated auxin transport, which thereby plays an important role in root development (Krouk et al., 2010a). In the root stele, AtNRT1.1/NPF6.3 is also involved in  $NO_3^-$  secretion into the xylem sap toward the shoots (Leran et al., 2013), together with other NPF members (Lin et al., 2008; Taochy et al., 2015). A close homolog of AtNRT1.1/NPF6.3, *Medtr5g012290*, is the most highly expressed NPF member in *M. truncatula* root hair (Figure 7; Figure S5). Within the same NPF family, *Medtr5g093170* (MtNRT1.3/MtNPF6.8), which encodes a dual-affinity nitrate transporter similar to AtNRT1.1/NPF6.3 and demonstrated to play a role in control of root growth under N limitation (Morere-Le Paven et al., 2011), does not display expression in root hairs in our experimental conditions. NIP/LATD (*Medtr1g009200*), another NPF member from *M. truncatula*, is a high affinity  $NO_3^-$  transporter (Bagchi et al., 2012) involved in lateral root and nodule development as well as primary root meristem maintenance (Bright et al., 2005). NIP/LATD is required for ROS homeostasis and cell elongation in roots (Zhang et al., 2014). We found this gene expressed in *M. truncatula* root hairs, although at a level ~6 times lower than that of *Medtr5g012290* (Figure S5B). *Medtr5g093170*/MtNRT1.3, which is a dual-affinity  $NO_3^-$  transporter able to transport ABA and to mediate  $NO_3^-$  inhibitory effects on primary root growth (Morere-Le Paven et al., 2011; Pellizzaro et al., 2014), was not expressed in root hairs in our experimental conditions.

In the NRT2 family, AtNRT2.1 is a  $NO_3^-$  inducible-, high affinity  $NO_3^-$  transporter (Li et al., 2007) and plays a key role in coordinating root development with  $NO_3^-$  availability (Remans et al., 2006). *Medtr4g057890* and *Medtr4g057865*, close homologs to AtNRT2.1 (Pellizzaro et al., 2014), are expressed in *M. truncatula* root hairs (Figure 7; Figure S6). Within the Arabidopsis NRT3 family, AtNRT3.1 has been shown to physically interact with AtNRT2.1 to form functional heteromeric transport systems that provide the major contribution to high affinity  $NO_3^-$  uptake from the soil (Yong et al., 2010). *Medtr4g104730*/MtNAR2.1 and

*Medtr104700*/MtNAR2.2, the two Medicago homologs of AtNRT3.1, were by far most highly  $NO_3^-$  transport-related genes expressed in Medicago root hairs in our study, suggesting a major role for these genes in  $NO_3^-$  transport in *M. truncatula* root hairs.

Within the *M. truncatula* ammonium transporter family named AMT, the two members recently shown to have the highest levels of expression in roots as well as in shoots, *MtAMT1;1*/*Medtr1g045550* and *MtAMT2;1*/*Medtr7g069640* (Straub et al., 2014), are both expressed in root hairs (Figure 6; Figure S8). In contrast, the ammonium transporter *MtAMT2;3* (*Medtr8g074750*), which has been proposed to play a role in the uptake of  $NH_4^+$  ions released by the fungus in plants engaged in arbuscular mycorrhizal (AM) symbiosis with *Glomus intraradices* (Breuillin-Sessoms et al., 2015), is not expressed in root hairs.

Evidence is available that root Pi uptake and transport is mainly mediated by transporters belonging to the PHT1 family (Nussaume et al., 2011). At least five members from the PHT1 family (out of 13) are expressed in *M. truncatula* root hairs (Figure 6; Table S5). This is in agreement with the hypothesis that root hairs play an essential role in plant Pi nutrition. It should also be noted that root hairs do not express *MtPT4*/*Medtr1g028600* and *MtPT8*/*Medtr5g068140*, two members from the PHT family shown to be induced upon AM symbiosis and then to contribute to the uptake of Pi ions released by the fungal membrane (Javot et al., 2011; Breuillin-Sessoms et al., 2015). Thus, it is tempting to speculate that, within large families of membrane transport systems such as the AMT and PHT families, some members have been specialized, maybe in terms of sensitivity to external pH, membrane polarization, or substrate concentration, in order to cope with the external conditions prevailing in either the soil solution or the apoplastic medium at the plant-microorganism interface.

*M. truncatula* root hairs can be assumed to also provide a major contribution to sulfate nutrition since they express *MtSULTR1.1*/*Medtr2g008470* and *MtSULTR1.2*/*Medtr3g073780*, which encode the closest homologs of the Arabidopsis *AtSult1;1* and *AtSult1;2* (Figure 7; Figure S10), the major contributors to high affinity sulfate uptake from the soil in Arabidopsis roots (Rouached et al., 2009). It is worth to note that while these genes are down-regulated in root hairs following NF treatment (Table S5), they are highly induced in mycorrhizal *M. truncatula* roots as compared to non-mycorrhizal roots whatever the growth medium S content (Gao et al., 2014; Wipf et al., 2014). In contrast, *MtSULTR3.4b*/*Medtr4g011970*, which has not been considered as expressed in control root hairs (FPKM < 1), is highly induced following NF treatment by almost 20 times. Thus, the route for sulfate nutrition appears different under normal condition or upon mycorrhiza or nitrogen-fixing symbiosis.

Two families of genes encoding membrane transporters, PHO1 and HKT, comprise members whose expression in *M. truncatula* root hairs could not be anticipated based on the present knowledge available in Arabidopsis or other plant species. The corresponding genes for the PHO1 family are *Medtr7g011330* and *Medtr1g075640* (Figure 6; Figure S9). Indeed, in Arabidopsis members from the PHO1 family (11

members), mainly PHO1 and PHO1; H1, are involved in Pi translocation into the xylem sap toward the shoots (Poirier et al., 1991; Hamburger et al., 2002; Stefanovic et al., 2007). Furthermore, direct evidence has been obtained that PHO1 is endowed with the capacity to mediate Pi secretion into the external (apoplasm) medium (Stefanovic et al., 2011; Arpat et al., 2012). It is thus tempting to speculate that the close homologs of PHO1 that are expressed in *M. truncatula* root hairs mediate secretion of Pi ions previously taken up by members from the PHT phosphate transporter family.

The HKT family comprises a single member in Arabidopsis, like in poplar and many dicots (Véry et al., 2014). Electrophysiological characterization of the Arabidopsis HKT, AtHKT1, the founder of plant HKT subfamily 1, has revealed a strong selectivity for Na<sup>+</sup> against K<sup>+</sup> and other cations, and no current rectification (Berthomieu et al., 2003). In other words, this transporter has the capacity to mediate Na<sup>+</sup> uptake as well as secretion. It has been shown to be expressed in the plant vasculature, where it plays a role in desalinization of the ascending xylem sap in roots and recirculation of Na<sup>+</sup> ions from shoots to roots via the phloem sap. Loss of function of this transporter results in increased plant sensitivity to salinity (Berthomieu et al., 2003). It is intriguing that the dicot *M. truncatula* possesses 4 HKT transporters, one of which displays expression in root hairs (*Medtr6g092840*; **Figure 6**; Figure S21). One may wonder whether such a number of HKT transporters contribute to *M. truncatula* tolerance to salt stress. This raises also the question of the actual roles of HKT transporters in root hairs and whether these roles involve Na<sup>+</sup> uptake or secretion.

Finally, regarding nutrient ion transport in *M. truncatula* root hairs, it is worth to note that the equipment of this cell type in plasma membrane transporters or channels is likely to confer on it the capacity to secrete all the above considered nutrient ions, including Pi. Secretion of K<sup>+</sup> and NO<sub>3</sub><sup>-</sup> into the external medium could play a role in the control of transmembrane electrical gradient and/or of internal water potential or pH upon abiotic stresses (Ivashikina et al., 2001; Segonzac et al., 2007). The physiological meaning of Pi secretion toward the external medium is however more difficult to decipher. A hypothesis would be that such equipment in secretion systems plays a direct role in the overall process allowing translocation of nutrient ions toward the inner tissues. This would involve polarized localization (or polarized activity) of the systems dedicated to secretion of nutrient ions, allowing root hairs to secrete ions into the root apoplasm toward neighboring cortical cells and not toward the external solution. Such an apoplastic step in the migration of ions toward the stele and xylem sap would make sense if diffusion through root hair plasmodesmata toward the cortical cells was a limiting step in the overall radial transport process.

## A Repertoire of Plasma Membrane Transport Systems Likely to Play a Role in Early NF Signaling

Early signaling events triggered by NF perception are changes in ion fluxes across the cell membrane, resulting in electrical and

calcium signaling. The current model is that NF perception by root hair membrane receptors leads to an inhibition of the rate of H<sup>+</sup> excretion by plasma membrane proton pumps and to an activation of calcium and anion channels, allowing Ca<sup>2+</sup> influx and anion efflux. These events induce a strong depolarization of the cell membrane. This depolarization activates voltage-sensitive K<sup>+</sup> channels, giving rise to an efflux of K<sup>+</sup> ions, which results in membrane repolarization (Felle et al., 1996, 1998, 1999; Bouteau et al., 1999; Kurkdjian et al., 2000; for review, Oldroyd, 2013). At the molecular level, the present knowledge about the systems involved in these early NF signaling events is very low. Candidate genes listed in **Figure 7** would however deserve to be tested by genetic and physiological analyses for a role in this signaling.

Plant plasma membrane proton pumps are encoded by the AHA gene family (Nguyen et al., 2015), which comprises five subfamilies in higher plants (Falhof et al., 2016). Eleven AHA genes are present in Arabidopsis and 13 in *M. truncatula*. Our data indicate that *M. truncatula* express five from these 13 genes in root hairs (Figure S13). Three genes, *Medtr4g127710*, *Medtr2g036650*, and *Medtr6g011310*, which have been recently named *MtAHA4*, *MtAHA5*, and *MtAHA6* (Nguyen et al., 2015), respectively, display much higher expression levels than the others. Interestingly, phosphoproteomic analyses of *M. truncatula* whole roots have revealed that 1 h treatment with NF leads to an increase in the phosphorylation status of the auto-inhibitory C-terminal domain of *MtAHA5* pumps (Rose et al., 2012). Further, analyses have revealed that such a phosphorylation is likely to result in an increase in H<sup>+</sup> pumping activity of these proteins (Nguyen et al., 2015). This could play a role in repolarization of the cell membrane following the initial NF-induced depolarization. On the other hand, this report does not provide information about the molecular mechanisms underpinning the initial inhibition of H<sup>+</sup> secretion and membrane depolarization triggered by NF perception (Felle et al., 1996, 1998). Since the depolarization has been shown to occur very rapidly after NF perception, within a few minutes, it should essentially involve post-translational regulation. It is however worth to note that the present transcriptome data reveal a significant inhibition of *MtAHA5* expression (5 fold) as well as an increase in *MtAHA1* expression (80 fold) in response to NF treatment. *MtAHA1* had already been reported to be induced by both NFs and *S. meliloti* (Breakspear et al., 2014). *MtAHA1* has been shown to be specifically expressed in arbuscule-containing root cells and to be required for development of functional arbuscules (Krajinski et al., 2002, 2014; Wang et al., 2014). In our analyses, *MtAHA1* is not expressed in the control condition but strongly induced in the NF conditions (with a strongest induction at 4 h). Clearly, further genetic and biochemical analyses of the regulation and roles of the AHA pumps displaying expression in root hairs would be very useful. For instance, constitutively hyper-active AHA mutant pumps (genetically engineered based on the knowledge available in the Arabidopsis AHA family: Merlot et al., 2007) could be expressed in *M. truncatula* root hairs to assess the role of cell membrane depolarization in the early NF transduction pathway.

Regarding Ca<sup>2+</sup>, several gene families, amongst which the CNGC, GLR, ANN, MCA, and CSC/OSCA families, might

encode channels involved in the initial  $\text{Ca}^{2+}$  influx and signals. The fact that, in animals, the CNGC, and GLR families play central roles in major signaling pathways has constituted a strong stimulus motivating extensive investigations of the roles of these systems in plants (Hedrich, 2012). Unfortunately, expression and functional characterization of plant CNGC and GLR has remained difficult or even unsuccessful in classical heterologous systems such as *Xenopus* oocytes, and the present knowledge about the transport activities of these systems is still quite unsatisfactory (Hedrich, 2012). It is thus very likely that progress in their functional characterization will essentially come from *in planta* investigations based on (electro) physiological and cell imaging analyses in mutant plants. Nonetheless, the fact that the plant CNGC and GLR families are relatively large, e.g., 20 CNGC and 20 GLR in *Arabidopsis*, 22 and 18 in *M. truncatula*, is likely to result in strong redundancy, at least in standard environmental conditions, and thus to render such analyses highly challenging. For instance, our present data identify 8 CNGC and 10 GLR (Table S5) genes as significantly expressed in *M. truncatula* root hairs. Interestingly however, for each of these two families, the expression levels of the genes expressed in this cell type vary within a very large range, by two orders of magnitude. It should also be mentioned that only few of them are regulated following 20 h NF treatment and none at the early time point. In this context, reverse genetics approaches to decipher the roles of these channels in early electrical signaling following NF treatment could be targeted to the genes displaying the highest levels of expression in root hairs. In plants, annexins are described as potential  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable channels involved in  $\text{Ca}^{2+}$  and ROS signaling (Laohavisit et al., 2010, 2012). In addition, annexins displayed phospholipid and F-actin binding activity suggesting a role in cytoskeleton rearrangements, membrane trafficking processes, and cell expansion. The *Medicago* genome contains 20 *Ann* genes, and about half of them are expressed in root hairs (Figure S19). Our data indicate that four from these genes are up-regulated by NF and one (*Medtr8g038210/MtAnn1*) is specifically expressed under NF treatment (Table S5) as it has already been reported (Breakspear et al., 2014). Interestingly, a close association between ANN1 expression and rhizobial infection has been previously shown (De Carvalho Niebel et al., 1998). *MtAnn1* protein displays a cytoplasmic localization but preferentially accumulates at the nuclear periphery of rhizobia-activated outer cortical cells, suggesting a role in the induction of  $\text{Ca}^{2+}$  spiking observed in rhizobial symbiosis (De Carvalho-Niebel et al., 2002).

With respect to the depolarizing efflux of anions, two candidate gene families can be thought about, the SLAC (Figure S14) and ALMT (Figure S15) families (Hedrich, 2012). Two members from the SLAC family, *Medtr6g045200* and *Medtr6g034030*, display high levels of expression in *M. truncatula* root hairs (Figure S14B) and they both are close homologs of the *Arabidopsis* AtSLAH3, which has been proposed to mediate anion efflux in *Arabidopsis* pollen tubes (Gutermuth et al., 2013). It is worthy to note that the genes encoding their regulatory kinases CPKI and II are also expressed in the root hair (Figure 7). In *Arabidopsis*, SLAC anion channels are activated by kinases from CPK ( $\text{Ca}^{2+}$ -Dependent Protein Kinase) subfamilies I and

II (Negi et al., 2008; Geiger et al., 2010). At least 13 CPK (7 from the CPK I subfamily and 6 from CPK II subfamily) potentially involved in SLAC channels activation are expressed in *M. truncatula* root hairs (Figure 7). Three ALMT genes are expressed in *M. truncatula* root hairs. In *Arabidopsis*, the ALMT family comprises 14 members, which are distributed into four clades, as also found in *M. truncatula* (Figure S15). ALMT are active either at the plasma membrane or at the vacuolar membrane (Barbier-Brygou et al., 2011). In our study we found three ALMT genes expressed in root hairs, two of these, *Medtr7g094770* and *Medtr1g115190*, are up-regulated at 20 h post-NF application. They are homologous to AtALMT12 which is shown to encode a component of the R-type/QUAC anion current involved in guard cell signaling and requiring malate for activation (Meyer et al., 2010).

$\text{K}^{+}$  channel activity encoded by the Shaker family is thought to dominate the plasma membrane conductance to  $\text{K}^{+}$  in most cell types in *Arabidopsis* (Lebaudy et al., 2007). Although this family is highly conserved in plants (Véry et al., 2014), the *M. truncatula* genome harbors a single outwardly rectifying Shaker  $\text{K}^{+}$  channel gene, *Medtr5g077770*, while two channels of this functional type have been identified in *Arabidopsis*, GORK, and SKOR. GORK is expressed in guard cells, where it mediates  $\text{K}^{+}$  efflux involved in stomatal closure (Hosy et al., 2003). It is also expressed in *Arabidopsis* root hairs, where its physiological role is still rather mysterious (Ivashikina et al., 2001). SKOR is expressed in root stele tissues where it contributes to  $\text{K}^{+}$  secretion into the xylem sap toward the shoots (Gaymard et al., 1998). Thus, the  $\text{K}^{+}$  channel encoded by *Medtr5g077770* is the single candidate from the Shaker family that can be proposed to play a role in cell membrane repolarization during the early electrical response to NF, besides being involved in stomatal movements and in  $\text{K}^{+}$  secretion into the xylem sap.

The presence of mechanosensors (MS) channels in the root hair plasma membrane, able to rapidly transduce mechanical forces into ion fluxes and electrical signals, is worth considering since adhesion of the microsymbiont and curling of root hair might elicit local mechanical constraints. In plants, MS channels are encoded by at least four small gene families, MscS-like (MSL; Haswell and Meyerowitz, 2006), Mid1-Complementing Activity (MCA; Kurusu et al., 2013), Piezo (Coste et al., 2012), and one larger family, CSC/OSCA (Hou et al., 2014; Yuan et al., 2014). *Arabidopsis* displays 10 MSL genes, which are distributed into two clades. Clade I comprises genes encoding proteins localized in endomembranes while clade II comprises proteins predicted or shown to be targeted to the plasma membrane (Haswell and Meyerowitz, 2006; Haswell et al., 2008). Two *MtMSL* of clade II are expressed in *M. truncatula* root hairs (Figure S16), *Medtr3g104940* and *Medtr1g113850*. They encode close relatives of the well-described *Arabidopsis* AtMSL10 and AtMSL8, which have been shown to be gated by membrane stretching. AtMSL10 is more permeable to anions ( $\text{Cl}^{-}$  and  $\text{NO}_3^{-}$ ) than to cations (Haswell et al., 2008; Mksaev and Haswell, 2012). The pollen-specific AtMSL8 channel has been proposed to be involved in sensing of mechanical stress induced by hypoosmotic shock (Hamilton et al., 2015).

MCA channels have been initially identified in Arabidopsis and exhibit 10% identity to yeast Mid1 (Nakagawa et al., 2007). *M. truncatula*, like Arabidopsis, possesses two MCA genes, and one of them (*Medtr5g022670*) is expressed in root hairs (Figure S16). Available information on plant MCA provides support to a model wherein these proteins either are themselves MS Ca<sup>2+</sup> channels or are closely associated with the activity of an MS calcium channel (Nakagawa et al., 2007; Yamanaka et al., 2010; Kurusu et al., 2012). It is noteworthy that the Arabidopsis MCA1 is likely to play a role in root mechanosensing and growth as suggested by a defect in root entry into hard agar of *mca1* mutant plants (Nakagawa et al., 2007; Yamanaka et al., 2010).

The present knowledge on the CSC/OSCA family (Hou et al., 2014; Yuan et al., 2014), which comprises 15 members in Arabidopsis and 13 members in *M. truncatula*, is still rather low. The two members identified in Arabidopsis, AtCSC1 (Hou et al., 2014), and AtOSAC1 (Yuan et al., 2014), have been shown to be activated upon hyperosmotic shocks and then to behave as poorly selective cation channels permeable to Ca<sup>2+</sup>. Among the 13 members of this family in *M. truncatula*, nine are expressed in root hairs (Figure S16; Table S5). Finally, the functional properties and physiological roles of Piezo family are still unknown in plant. The Piezo channel protein initially identified in mouse is an essential component of a cationic non-selective MS channel (Coste et al., 2012). *M. truncatula* has two homologs of the mouse Piezo, both expressed in root hairs (Figure S20) while only one homolog is present in Arabidopsis.

## A Promising View of the ROS Network in Root-Hairs

NADPH oxidases (RBOHs) have been shown to be important actors involved in ROS production in plants (Marino et al., 2012; O'Brien et al., 2012). In *M. truncatula*, 8 out of its 10 *Rboh* genes are expressed in root hairs (Figure 8; Figure S21; Table S6), including the highly expressed gene (FPKM > 200) *MtRbohD*, which is the closest ortholog of Arabidopsis *AtRbohC* (Foreman et al., 2003), and *MtRbohF*, whose expression in root hairs was already reported (Marino et al., 2011). *MtRbohF* is the closest homolog of the two Arabidopsis NADPH oxidases *AtRbohH* and *AtRbohJ*. In Arabidopsis tip-growing pollen tubes, these two NADPH oxidases generate pulsating tip-localized H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production that functions, possibly through Ca<sup>2+</sup> channel activation, to maintain a steady tip-focused Ca<sup>2+</sup> gradient during growth (Boisson-Dernier et al., 2013). Loss of function of *AtRbohC* in Arabidopsis (Foreman et al., 2003) and of a monocot-specific *Rboh* gene in maize plants (Nestler et al., 2014) has been reported to result in root-hairless phenotype. In *M. truncatula*, none of the investigations performed so far into the effects of loss-of-function mutations in *Rboh* genes (*RbohA*, Marino et al., 2011; *RbohC*, Zhang et al., 2014; *RbohE*, Belmonto et al., 2016) has revealed any root hair phenotype, suggesting strong gene redundancy. However, such analyses have not yet targeted the two genes, *MtRbohD* and *MtRbohF*, which are identified by our transcriptome data as the most highly expressed in root hairs.

In addition to NADPH oxidases, other enzymes, namely class III peroxidases (PRXs), are involved in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production during plant-pathogen interaction (Kadota et al., 2015). PRXs that are mainly localized in cell wall have been shown to play a role in cell wall remodeling (Francoz et al., 2015). The present transcriptome data identify more than 50 PRX genes as displaying expression in root hairs (Figure 8; Table S6). Sensitivity of such peroxidases to NF treatment in our experimental conditions is discussed later.

Transcription factors regulating the expression of peroxidases have been identified (Tsukagoshi et al., 2010; Sundaravelpandian et al., 2013). UPBEAT1, a basic helix-loop-helix (bHLH) root transcription factor, has been shown to regulate the expression of several peroxidases that fine-tune ROS accumulation between the zone of cell proliferation and cell elongation where differentiation begins (Tsukagoshi et al., 2010). A putative ortholog of UPBEAT1 is found in *M. truncatula* (*Medtr1g096530*), and our transcriptome data reveal expression of this gene in root hairs (Table S2). More recently, mutations in the Mediator subunit *MED25/PFT1* gene, which encodes part of a complex that docks transcription factors bound to enhancers with core promoter components, have been shown to result in compromised root hair development, due to altered expression of a set of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-producing class III peroxidases (Sundaravelpandian et al., 2013). An *M. truncatula* PFT1 ortholog, *Medtr5g054680*, is expressed in root hairs (Table S2). With *UPBEAT/Medtr1g096530*, *MtPFT1/Medtr5g054680* may be another transcription factor playing a role in controlling peroxidase expression, and thus ROS levels, in *M. truncatula* root hairs.

Many genes encoding enzymes involved in ROS detoxification, namely superoxide dismutases (SODs) and catalases, are expressed in *M. truncatula* root hairs (Figure 8; Table S6). The present data indicate that almost all SOD genes are expressed in root hairs. This result, together with the fact that the NADPH oxidases, which synthesize O<sub>2</sub><sup>-</sup>, are also almost all expressed in root hairs, suggest that the management of O<sub>2</sub><sup>-</sup> production and detoxification is of major importance and highly complex. Furthermore, it is now well established that ROS are important signals (Apel and Hirt, 2004) playing an essential role in Ca<sup>2+</sup> channel activation in root hairs (Foreman et al., 2003; Takeda et al., 2008; Monshausen et al., 2009). Considering that the root hair is the entrance of the rhizobial symbiosis, these *M. truncatula* genes may be involved in steady state control of a tip-focused cytosolic Ca<sup>2+</sup> gradient allowing fine tuning of calcium-regulated proteins, modification of the cytoskeleton, and localized vesicle exocytosis.

Finally, the presence in *M. truncatula* root hair transcriptome of sequences from at least 24 glutaredoxin (out of 63 in the genome) and 38 thioredoxin (out of 54) genes (Table S6) also provides evidence of the importance of redox control in root hair biology. Many Grxs and Trxs are present in plant genomes, but only a few of them have been shown to be expressed and characterized in root hairs among which the thioredoxin h5 (*At1g45145*) has been shown to be induced by pathogens and oxidative stress (Reichheld et al., 2002; Laloi et al., 2004).

## NF Effects on Expression of Plasma Membrane Ion Transport Systems and ROS Network

As discussed above, it makes sense that NADPH oxidases and most transport systems listed in **Figure 7** as likely to play a role in the early electrical and calcium responses to NF are already significantly expressed in root hairs before NF arrival, *i.e.* that their expression in root hairs pre-exists to NF perception. However, enrichment analysis of GO terms indicates that, at a global level, NF treatments impact the transcription of genes belonging to categories related to membrane transport and redox activity (**Figures 7, 8**).

Various candidate genes encoding transport systems likely to contribute to nutrient ion uptake from the soil solution by root hairs, as hypothesized in **Figure 6**, are rapidly down-regulated at the transcriptional level upon NF perception (Table S5). For instance, this is the case for the two high affinity sulfate transporter genes *SULTR1;1* (*Medtr2g008470*) and *SULTR1;2* (*Medtr3g073780*) as indicated above, and of the high affinity phosphate transporter genes *MtPT1* (*Medtr1g043220*) and *MtPT6* (*Medtr3g082700*). Such results suggest that the root hair rapidly reduces its contribution to plant mineral nutrition a few hours after NF perception, at least regarding the uptake of nutrient ions such as phosphate and sulfate.

In contrast, *M. truncatula* homologs of Arabidopsis major representatives from the three families of  $\text{NO}_3^-$  transport systems in Arabidopsis (*NPF*, *NRT2*, and *NRT3*) are not down-regulated upon NF treatments in *M. truncatula* root hairs, some of them being even up-regulated. This may suggest that nitrate fluxes are involved in plant response to NF. However, it is also worth to note that, in addition to their nitrate transport capacity, some Arabidopsis homologs of these *M. truncatula* transporters display other activities, leading to reprogramming of root architecture and modification of hormone fluxes or signaling events that may be of importance in the plant response to NF. For instance, both  $\text{NO}_3^-$  transporters *AtNRT1.1* and *AtNRT2.1* are involved in  $\text{NO}_3^-$  sensing and coordination of root development with  $\text{NO}_3^-$  availability (Little et al., 2005; Remans et al., 2006; Krouk et al., 2010b). Interestingly, *AtNRT1.1*, the closest homolog in Arabidopsis of the *Medtr5g012290* transporter, also transports auxin (Krouk et al., 2010b), and control of auxin transport and accumulation is known to be involved in early nodule development (Mathesius et al., 1998; De Billy et al., 2001). Data on *Pseudomonas syringae*/Arabidopsis interactions suggest that *AtNRT2.1* also participates in down-regulating biotic stress (salicylic acid-dependent) defense mechanisms through modifications in hormone pathways and sensitivity to the bacterial effector (Camanes et al., 2012). In addition, *AtNRT2.1* was recently found to play a major role in control of root hydraulic activity (Li et al., 2016), a function which, in *M. truncatula*, may facilitate root hair development upon NF perception. In this context, it is worth noting that the two *M. truncatula* *AtNRT2.1* homologs (*Medtr4g057865*/*MtNRT2.2* and *Medtr4g057890*/*MtNRT2.1*) are highly expressed in root hairs and significantly stimulated by NF treatments (Figure

S6). Since *MtNRT2.2* was found hardly detectable in total roots even by RT-qPCR (Pellizzaro et al., 2015), it is likely that *M. truncatula* root hairs are particularly enriched in *MtNRT2.2*, suggesting a specific role of this transporter in this cell type.

Seven out of eight *Rboh* genes expressed in root hairs display no significant transcriptional regulation upon NF perception (**Figure 8**; Table S6). One root hair expressed *Rboh*, *MtRbohG*, is weakly repressed (**Figure 8**; Table S6). On the other hand, several RBOH proteins, including *MtRBOHD*, have been found to be phosphorylated after NF application (Rose et al., 2012). In Arabidopsis, RBOHD is controlled by  $\text{Ca}^{2+}$  via direct binding to EF-hand motifs and phosphorylation by  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent protein kinases (Kadota et al., 2014, 2015; Li et al., 2014). Moreover, as mentioned above for *AtAKT1* (Sharma et al., 2013), a direct interconnection between CBL–CIPK-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  signaling and ROS signaling in plants provides evidence for a synergistic activation of the NADPH oxidase RBOHF. This activation would occur by direct  $\text{Ca}^{2+}$ -binding to its EF-hands and  $\text{Ca}^{2+}$ -induced phosphorylation by CBL1/9–CIPK26 complexes (Drerup et al., 2013). It is tempting to speculate that similar regulation mechanisms occur in *M. truncatula* root hairs too, giving rise to interactions between ROS and  $\text{Ca}^{2+}$  signaling pathways, since close homologs of Arabidopsis *CBL1/9* and *CIPK26* can be identified in the present transcriptome dataset (Table S2; **Figure 8A**). This would make sense with the fact that ROS signals and  $\text{Ca}^{2+}$  influx are very rapidly induced upon NF treatment, within a few seconds and then decreased (for review, see Felle et al., 1998; Puppo et al., 2013).

Except within the peroxidase family, only few genes involved in the ROS network as described by Mittler et al. (2004) are identified by the present data as sensitive to NF treatment (Table S6). The previous transcriptome data identified 10 “Rhizobially Induced Peroxidases” (*RIP1* to *RIP10*) genes, shown to be induced in root hairs by both *S. meliloti* and NF (Breakspear et al., 2014). One of these, *MtRip1*, was shown to be induced by  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Ramu et al., 2002). Interestingly, the expression patterns of these genes overlap with the sites of production of superoxide in infected root hairs, in nodules and roots (Chen et al., 2015). The present data (Table S6) reveal a set of 16 peroxidases genes displaying up-regulation upon NF perception, amongst which are 8 of the 10 previously identified RIP genes (Breakspear et al., 2014). All 16 of these peroxidases have a predicted secretion signal peptide, providing further support to the hypothesis of increased production of ROS in root hair apoplast during early NF signaling (Breakspear et al., 2014).

## Papilionoid Legume Specific Genes Expressed in *Medicago truncatula* Root Hairs: Roles in Symbiosis Initiation?

We identified 1176 papilionoid legume-specific genes (LSGs) expressed in *M. truncatula* root hairs (Table S8). Previously, only 861 EST contigs had been identified as legume-specific in *M. truncatula* (Graham et al., 2004). Several classes of LSGs have been identified in *M. truncatula* including over 300 cysteine cluster proteins, 63 proline-rich proteins, and 21 glycine-rich

proteins (Benedito et al., 2008). Within the present list of LSGs expressed in root-hairs (Table S8), about 4% (i.e., 46 genes), encode putative disease resistance proteins. Furthermore, most of the papilionoid legume-specific genes displaying high levels of expression in root hairs (FPKM > 50) are putatively involved in defense mechanisms. It is noteworthy that many of these papilionoid legume-specific defense genes, such as *Medtr5g088770* and *Medtr7g093820*, which encode a cysteine protease inhibitor (cystatin) and a disease resistance response protein, respectively, are down-regulated following NF treatment (Table S8). Such a down-regulation of defense genes might be required to allow the initiation of symbiosis. With respect to this hypothesis, GO analysis indicates that the semantic categories “response to stimulus” and “response to stress” are over-represented within the set of genes displaying up-regulation in response to the 4 h NF treatment (Figure 5; Table S4). In contrast, later on, 20 h after NF application, these categories are over-represented within the set of down-regulated genes. Altogether, these results provide further support to the hypothesis that the plant cannot straightforwardly welcome rhizobia as beneficial partners and engage in symbiosis without rapidly altering and adapting its immune/defense system. Also supporting this hypothesis are transcriptomic and phosphoproteomic studies that have revealed rapid induction of defense related genes and phosphorylation of proteins known to be involved in plant immune system (Libault et al., 2010a; Rose et al., 2012; Nguyen et al., 2015). Interestingly, about 50% of the legume specific disease resistance genes expressed in *M. truncatula* root hairs possess orthologs in all the legume genomes selected for the present analysis. It is thus tempting to assume that such genes contribute to central root hair functions common to all legumes, and that some of them play a role in rhizobial symbiosis.

Actin nucleation facilitated by the ARP2/3 complex plays a central role in plant cell shape development where the SCAR/WAVE complex is shown to be an essential upstream activator of ARP2/3 function in plants (Jorgens et al., 2010). The Suppressor of cyclic AMP receptor/WASP family verprolin homologous (SCAR/WAVE) complex is conserved from animals to plants and, generally, is composed of the five subunits SCAR/WAVE, PIR121 (p53-inducible protein-121), NAP125 (NCK-associated protein-125), BRICK, and ABI (Abl-interacting protein). Recently, several studies have shown the importance of these proteins in legumes (NAP1: NCK-ASSOCIATED PROTEIN, (Miyahara et al., 2010); PIR1: 121F-SPECIFIC P53 INDUCIBLE RNA, Yokota et al., 2009; LjSCARN, Qiu et al., 2015). *Medtr7g116710* gene, encoding an ABI-like protein (ABIL1) is early induced by NF (Table S10). This gene has also been reported to be induced by rhizobia (Breakspear et al., 2014). Interestingly, this gene has also been shown to be regulated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Andrio et al., 2013) and was found to be specific to papilionoid legumes in our OrthoMCL comparative genomics analysis (Table S3). It may be speculated that this ABIL1-like protein could have a function in linking SCAR/WAVE-dependent actin nucleation with ROS during the establishment of the rhizobial symbiosis.

## CONCLUSION

The present RNA-seq data provide the most exhaustive information available so far about gene expression in *M. truncatula* root hairs, before and after NF perception. These data have been analyzed by focusing mainly on genes likely to play a role in macronutrient ion transport across the root hair plasma membrane or in ROS signaling and early communication with rhizobia. These processes are of major importance for plant growth in natural ecosystems, when nutrient availability is limited. Hypotheses derived from the present transcriptome data identify candidate genes for reverse genetics investigation of a possible role in these processes and, more generally, provide a valuable resource for root hair systems biology.

## MATERIALS AND METHODS

### Plant Growth and Nod Factor Treatments

The whole experimental procedure was adapted from Sauviac et al. (2005). *M. truncatula* (ecotype Jemalong A17) seeds were scarified with sulfuric acid (99%) for 10 min and sterilized in 6% sodium hypochlorite solution for 3 min. After 3 h imbibition in sterile water, seed coats were removed and seeds were disposed on inverted 0.8% agar plates. The plates were kept for 48 h in the dark at 4°C. They were thereafter transferred at 21°C during 15 h for germination. Seedlings with a radicle long of about 2 cm were then transferred onto a sterile sheet (12 × 8.5 cm) of chromatography paper (Rogo-Sampaic, France) laid on solid Fahraeus medium in a Petri dish (12 × 12 cm, for 10 seedlings). Plantlets were grown in a growth chamber (70% humidity, 70 μE.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> light intensity) with a photoperiod of 16 h light (25°C) and 8 h dark (21°C) for 5 days in total before root hair isolation. Treatments with synthetic NF (Rasmussen et al., 2004) were performed either 4 or 20 h before root hair isolation (NF 4 h and NF 20 h treatments, respectively), by using 50 μl of 10 nM Nod factor solution per plant NodSm-IV(C16:2, Ac, S), gently deposited along of the root hair region (Figure 1A). Control roots were similarly treated with 50 μl of sterile water (Control Treatment). Root hairs were collected during the 7th hour of the light period on day 5. Two independent biological repeats were performed for all treatments, in each case with 100 plants.

### Root Hairs Isolation and RNA Extraction

Root hairs were obtained from 4 cm-long root segments (Figure 1A) corresponding to the youngest part of the root hair zone. The root tip (ca. 0.5 cm) was excised to avoid contamination by root cap cells. Root hairs were isolated by freezing and vortexing the root segments in liquid nitrogen (Sauviac et al., 2005). About 60 mg of root hairs were obtained from 100 root segments.

RNA was extracted using the Qiagen RNeasy Plant Mini kit according to the supplier's instructions. DNA was removed using RNase-free DNase I (Qiagen) added directly onto the spin column. About 2.5–3 μg of RNA (measured using NanoDrop 1000 spectrophotometer, Thermo Scientific) were obtained from each root hair sample prepared from 100 plants. Total RNA were

checked for their integrity on RNANano chip, using Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies, Waldbroon, Germany).

## Transcriptome Studies

RNA-seq experiments were carried out at the POPS-transcriptomic platform (IPS2-Saclay, France) using an IG-CNS Illumina Hiseq2000 machine to perform paired-end 100 bp sequencing on cDNA libraries performed by TruSeq\_Stranded\_mRNA\_SamplePrep\_Guide\_15031047\_D protocol (Illumina<sup>®</sup>, California, USA). The 6 libraries have been sequenced in paired-end (PE) with a sizing of 260 bp and a read length of 100 bases. The multiplexing rate was three libraries per lane of Hiseq2000 machine (two lanes in total) to obtain around 50 million reads per sample.

## RNA-seq Bioinformatic Treatment and Analysis

Each RNA-seq sample was subject to the same pipeline from trimming to count of transcript abundance as follows. The raw data (fastq) were trimmed to keep only bases with Phred Quality Score >20 and sequence read length >30 bases. Bowtie v2 was used to map reads to the *M. truncatula* transcriptome (Mt4.0v1 with—local option). The abundance of mRNAs was calculated by a local script which parses SAM files and counts only paired-end reads for which both reads map unambiguously to the same gene (i.e., reads mapping to multiple positions were discarded). According to these rules, around 73% of PE reads aligned to transcripts, in each RNA seq sample (Table S1). Differential gene expression across samples was analyzed using the EdgeR package (Version 2.4.6) in the statistical software “R” (Version 2.15.0). Raw read counts normalization was carried out with the EdgeR (v 2.4.6) software [with the Counts Per Million (CPM) function]. This method allows normalizing the data as a function of the size of the library. For each experimental treatment (control, NF 4 h, and NF 20 h) the libraries corresponding to the two replicates were normalized together, both libraries having the same normalization factor. For variability analyses, only genes with an average CPM >0 were considered. To control the false discovery rate, adjusted *p*-values were calculated using the Benjamini and Hochberg procedure (Storey and Tibshirani, 2003). Genes with an adjusted *p* < 0.05 were considered as being differentially expressed. In a complementary, we also wanted to explore the relative expression levels of the different genes with FPKM values. To achieve this, we aligned the quality checked reads to the *M. truncatula* annotated genome (Mt4.0v1) using TopHat (version tophat-2.0.10). Here again, reads mapping to multiple positions were discarded. As many as 85% of the read pairs aligned unambiguously to the genome. We then used Cufflinks (Trapnell et al., 2012) to estimate transcript abundance and generate FPKM values for all the corresponding genes (Table S2).

Assignment of Gene Ontology (GO) terms to differentially expressed genes was performed using agriGO (<http://bioinfo.cau.edu.cn/agriGO/index.php>) toolkit (Du et al., 2010). GO enrichment analysis of differentially expressed genes at 4 and 20 h following NF treatment was implemented using Singular Enrichment Analysis (SEA) with default parameters

and *M. truncatula* genome locus (v4) as a background (Du et al., 2010). Briefly, a Fisher's exact test with a Benjamini-Yekutieli (FDR under dependency) adjustment method was used to classify the GO categories (Table S4). The significant GO terms were defined as having an adjusted *p* < 0.05.

## Orthomcl Analyses

Predicted proteins from 31 fully sequenced plant genomes were collected from different sources (Table S7). This collection of plant proteomes included six legume species (*Medicago truncatula*, *Cicer arietinum* L., *Lotus japonicus*, *Glycine max*, *Phaseolus vulgaris*, and *Cajanus cajan*) as well as 23 other angiosperms (including monocots and dicots), one gymnosperm and a spikemoss (*Selaginella moellendorffii*) as an outgroup. An all against all comparison of all these 31 proteomes was performed using BLASTp (Altschul et al., 1997) with an *e*-value cutoff of 1e-5 and no SEG filter. The results of the all-against-all BLASTp analysis were fed to OrthoMCL v2.0 (Li et al., 2003; Fischer et al., 2011), which was run with a percentMatchCutoff of 50 and an inflation value of 1.5 for clustering granularity to create clusters of orthologous and in-paralogous plant proteins. Raw results of the OrthoMCL clustering analysis were parsed to identify clusters specific to legume species (clusters containing only legume genes). This list of legume-specific genes was crossed with the list of *M. truncatula* genes shown to be expressed in the root hairs. We then checked whether some of these legume-specific genes were conserved in all 6 legume species (included in our comparative proteome analysis).

## Phylogeny Analyses

Except for the MSL family, polypeptide sequences were first aligned with Muscle (V3.8.31) and phylogenetic tree was generated with PhyML software (substitution model, LG matrix) using maximum-likelihood method and 1000 bootstrap replicates on Mobyly Pasteur website (<http://mobyly.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py#welcome>). For MSL family, sequences were first aligned with Muscle using the conserved MscS domain as template to force the alignment around it (Jensen and Haswell, 2012). Phylogenetic trees were drawn with Dendroscope (<http://ab.inf.uni-tuebingen.de/software/dendroscope/>). Bootstrap values are indicated in gray at the corresponding nodes. The length of scale bar indicates the number of nucleotide substitutions per site.

## Data Deposition

RNA-seq data from this article were deposited at Gene Expression Omnibus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>, accession no. GSE67921) and at CATdb (<http://urgv.evry.inra.fr/CATdb/>; Project: NGS2013\_04\_POIL) according to the “Minimum Information About a Microarray Experiment” standards.

## RT-qPCR Validation

For RT-qPCR validation, cDNA were obtained from root hair RNA extracted and treated as described above. The experiments were performed using three independent samples (biological replicates) for each treatment (control, NF 4 h,

and NF 20 h), different from the samples used for the RNA-seq analyses and obtained in another laboratory than the one having prepared the latter RNA samples. The integrity of RNA was checked on agarose gel and RNA quantity and quality was assessed using NanoDrop 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific). Total RNA (500 ng) was reverse-transcribed by Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen, Paisley, UK) according to the manufacturer's instructions. Real-time RT-qPCR was carried out using the GoTaq master mix (Promega; www.promega.com) according to the manufacturer's instructions. Reactions were run on the Chromo4 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad; www.qiagen.com), and quantification was performed with the Opticon Monitor analysis software version 3.1 (Bio-Rad). Data were analyzed with RqPCRBase, an R package working in the R computing environment (Hilliou and Tran, 2013). The mRNA levels were normalized against two constitutively expressed endogenous genes (a38: *Medtr4g109650*; a39: *Medtr4g046877*). PCR for each biological replicate was performed in three technical replicates. For each reaction, 5  $\mu$ l of 60-fold-diluted cDNA and 0.3  $\mu$ M primers were used. The initial denaturing time was 10 min, followed by 40 cycles at 95°C for 10 s and 60°C for 1 min. Specificity of amplification was confirmed by observing a single peak in the dissociation curves at the end of the PCR procedure. The gene-specific primers used are listed in Table S11.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

ID, AD, MG, SB, VB carried out the experimental research. SC, SF, ER performed the chemo-enzymatic synthesis of NF. ID, AD, MG, IG, AB, AP, JMF, NP, HS evaluated the results, and contributed to writing the manuscript. MG, AB, SB, JCB, VB, ED, MD, VM, CF, CR, HR, YS, JT, BT contributed to RNA-seq analyses and biocomputing. ID, AD, AP, NP, HS wrote the paper. AP, JF, NP, HS conceived the project, participated in its

design and coordination. All authors read and approved the final manuscript.

## FUNDING

This work was funded by an Agence Nationale de la Recherche (ANR) project (CAROLS—Channels and Reactive Oxygen species in Legume root hair: role in Symbiosis with Rhizobium—ANR-11-BSV7-010-02). This work was supported by the “Institut National de la Recherche Agronomique,” the “Centre National de la Recherche Scientifique,” the University of Nice Sophia Antipolis and the French Government (National Research Agency, ANR) through the LABEX SIGNALIFE program (ANR-11-LABX-0028-01). ID was supported by a post-doctoral fellowship from the ANR (CAROLS: ANR-11-BSV7-010-02). AD was supported by doctoral fellowship (PER, Prix d'Encouragement à la Recherche) from the “Province Sud de la Nouvelle-Calédonie.” SC, SF, ER are grateful to the Labex Arcane (ANR-11-LABX-0003-01) and the Carnot Polynat Institute for partial support of this study and the NMR and Mass Spectrometry Platforms of the ICMG (FR 2607).

## ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the ANR (Agence Nationale de la Recherche). We are grateful to Marie Le Gleuher-Pacoud for helpful lab assistance and Hugues Driguez for providing initial Nod factors preparation. We are grateful to the Genotoul bioinformatics platform Toulouse Midi-Pyrenees (Bioinfo Genotoul) for providing computing resources.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2016.00794>

## REFERENCES

- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., et al. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389–3402. doi: 10.1093/nar/25.17.3389
- Andrio, E., Marino, D., Marmeys, A., De Segonzac, M. D., Damiani, I., Genre, A., et al. (2013). Hydrogen peroxide-regulated genes in the *Medicago truncatula*-Sinorhizobium meliloti symbiosis. *New Phytol.* 198, 179–189. doi: 10.1111/nph.12120
- Apel, K., and Hirt, H. (2004). REACTIVE OXYGEN SPECIES: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, 373–399. doi: 10.1146/annurev-arplant.55.031903.141701
- Arpat, A. B., Magliano, P., Wege, S., Rouached, H., Stefanovic, A., and Poirier, Y. (2012). Functional expression of PHO1 to the Golgi and trans-Golgi network and its role in export of inorganic phosphate. *Plant J.* 71, 479–491. doi: 10.1111/j.1365-3113x.2012.05004.x
- Avenhaus, U., Cabeza, R. A., Liese, R., Lingner, A., Dittert, K., Salinas-Riester, G., et al. (2015). Short-Term molecular acclimation processes of legume nodules to increased external oxygen concentration. *Front. Plant Sci.* 6:1133. doi: 10.3389/fpls.2015.01133
- Bagchi, R., Salehin, M., Adeyemo, O. S., Salazar, C., Shulaev, V., Sherrier, D. J., et al. (2012). Functional assessment of the *Medicago truncatula* NIP/LATD protein demonstrates that it is a high-affinity nitrate transporter. *Plant Physiol.* 160, 906–916. doi: 10.1104/pp.112.196444
- Bais, H. P., Weir, T. L., Perry, L. G., Gilroy, S., and Vivanco, J. M. (2006). The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 233–266. doi: 10.1146/annurev-arplant.57.032905.105159
- Barbier-Brygoo, H., De Angeli, A., Filleur, S., Frachisse, J. M., Gambale, F., Thomine, S., et al. (2011). Anion channels/transporters in plants: from molecular bases to regulatory networks. *Annu. Rev. Plant Biol.* 62, 25–51. doi: 10.1146/annurev-arplant-042110-103741
- Barbulova, A., Rogato, A., D'apuzzo, E., Omrane, S., and Chieruzzi, M. (2007). Differential effects of combined N sources on early steps of the Nod factor-dependent transduction pathway in *Lotus japonicus*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 20, 994–1003. doi: 10.1094/MPMI-20-8-0994
- Becker, J. D., Takeda, S., Borges, F., Dolan, L., and Feijo, J. A. (2014). Transcriptional profiling of Arabidopsis root hairs and pollen defines an apical cell growth signature. *BMC Plant Biol.* 14:197. doi: 10.1186/s12870-014-0197-3

- Belmondo, S., Calcagno, C., Genre, A., Puppo, A., Pauly, N., and Lanfranco, L. (2016). The *Medicago truncatula* MtrBohE gene is activated in arbusculated cells and is involved in root cortex colonization. *Planta* 243, 251–262. doi: 10.1007/s00425-015-2407-0
- Benedito, V. A., Li, H., Dai, X., Wandrey, M., He, J., Kaundal, R., et al. (2010). Genomic inventory and transcriptional analysis of *Medicago truncatula* transporters. *Plant Physiol.* 152, 1716–1730. doi: 10.1104/pp.109.148684
- Benedito, V. A., Torres-Jerez, I., Murray, J. D., Andriankaja, A., Allen, S., Kakar, K., et al. (2008). A gene expression atlas of the model legume *Medicago truncatula*. *Plant J.* 55, 504–513. doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03519.x
- Berthomieu, P., Conejero, G., Nublát, A., Brackenbury, W. J., Lambert, C., Savio, C., et al. (2003). Functional analysis of AtHKT1 in Arabidopsis shows that Na<sup>+</sup> recirculation by the phloem is crucial for salt tolerance. *EMBO J.* 22, 2004–2014. doi: 10.1093/emboj/cdg207
- Boisson-Dernier, A., Lituiev, D. S., Nestorova, A., Franck, C. M., Thirugnanarajah, S., and Grossniklaus, U. (2013). ANXUR receptor-like kinases coordinate cell wall integrity with growth at the pollen tube tip via NADPH oxidases. *PLoS Biol.* 11:e1001719. doi: 10.1371/journal.pbio.1001719
- Bonneau, L., Hugué, S., Wipf, D., Pauly, N., and Truong, H. N. (2013). Combined phosphate and nitrogen limitation generates a nutrient stress transcriptome favorable for arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Medicago truncatula*. *New Phytol.* 199, 188–202. doi: 10.1111/nph.12234
- Boscari, A., Del Giudice, J., Ferrarini, A., Venturini, L., Zaffini, A. L., Delle Donne, M., et al. (2013). Expression dynamics of the *Medicago truncatula* transcriptome during the symbiotic interaction with *Sinorhizobium meliloti*: which role for nitric oxide? *Plant Physiol.* 161, 425–439. doi: 10.1104/pp.112.208538
- Bouteau, F., Pennarun, A. M., Kurkdjian, A., Convert, M., Cornel, D., Monestiez, M., et al. (1999). Ion channels of intact young root hairs from *Medicago sativa*. *Plant Physiol. Biochem.* 37, 889–898. doi: 10.1016/S0981-9428(99)00101-1
- Breakspear, A., Liu, C., Roy, S., Stacey, N., Rogers, C., Trick, M., et al. (2014). The root hair “infectome” of *Medicago truncatula* uncovers changes in cell cycle genes and reveals a requirement for Auxin signaling in rhizobial infection. *Plant Cell* 26, 4680–4701. doi: 10.1105/tpc.114.133496
- Breullin-Sessoms, F., Floss, D. S., Gomez, S. K., Pumplin, N., Ding, Y., Levesque-Tremblay, V., et al. (2015). Suppression of arbuscule degeneration in *Medicago truncatula* phosphate transporter4 mutants is dependent on the ammonium transporter 2 family protein AMT2;3. *Plant Cell* 27, 1352–1366. doi: 10.1105/tpc.114.131144
- Bright, L. J., Liang, Y., Mitchell, D. M., and Harris, J. M. (2005). The LATD gene of *Medicago truncatula* is required for both nodule and root development. *Mol. Plant Microbe Interact.* 18, 521–532. doi: 10.1094/MPMI-18-0521
- Cabeza, R. A., Liese, R., Lingner, A., Von Stieglitz, L., Neumann, J., Salinas-Riester, G., et al. (2014). RNA-seq transcriptome profiling reveals that *Medicago truncatula* nodules acclimate N<sub>2</sub> fixation before emerging P deficiency reaches the nodules. *J. Exp. Bot.* 65, 6035–6048. doi: 10.1093/jxb/eru341
- Cabeza, R., Koester, B., Liese, R., Lingner, A., Baumgarten, V., Dirks, J., et al. (2014). An RNA sequencing transcriptome analysis reveals novel insights into molecular aspects of the nitrate impact on the nodule activity of *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.* 164, 400–411. doi: 10.1104/pp.113.228312
- Camanas, G., Pastor, V., Cerezo, M., Garcia-Andrade, J., Vicedo, B., Garcia-Agustin, P., et al. (2012). A deletion in NRT2.1 attenuates *Pseudomonas syringae*-induced hormonal perturbation, resulting in primed plant defenses. *Plant Physiol.* 158, 1054–1066. doi: 10.1104/pp.111.184424
- Camps, C., Jardinaud, M. F., Rengel, D., Carrere, S., Herve, C., Debelle, F., et al. (2015). Combined genetic and transcriptomic analysis reveals three major signalling pathways activated by Myc-LCOs in *Medicago truncatula*. *New Phytol.* 208, 224–240. doi: 10.1111/nph.13427
- Cardenas, L., Martinez, A., Sanchez, F., and Quinto, C. (2008). Fast, transient and specific intracellular ROS changes in living root hair cells responding to Nod factors (NFs). *Plant J.* 56, 802–813. doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03644.x
- Chen, D. S., Liu, C. W., Roy, S., Cousins, D., Stacey, N., and Murray, J. D. (2015). Identification of a core set of rhizobial infection genes using data from single cell-types. *Front. Plant Sci.* 6:575. doi: 10.3389/fpls.2015.00575
- Coste, B., Xiao, B., Santos, J. S., Syeda, R., Grandl, J., Spencer, K. S., et al. (2012). Piezo proteins are pore-forming subunits of mechanically activated channels. *Nature* 483, 176–181. doi: 10.1038/nature10812
- Cuellar, T., Azeem, F., Andrianteranagna, M., Pascaud, F., Verdeil, J. L., Sentenac, H., et al. (2013). Potassium transport in developing fleshy fruits: the grapevine inward K<sup>+</sup> channel VvK1.2 is activated by CIPK-CBL complexes and induced in ripening berry flesh cells. *Plant J.* 73, 1006–1018. doi: 10.1111/tpj.12092
- Czaja, L. F., Hogeekamp, C., Lamm, P., Maillet, F., Martinez, E. A., Samain, E., et al. (2012). Transcriptional responses toward diffusible signals from symbiotic microbes reveal MtNFP- and MtDMI3-dependent reprogramming of host gene expression by arbuscular mycorrhizal fungal lipochitoooligosaccharides. *Plant Physiol.* 159, 1671–1685. doi: 10.1104/pp.112.195990
- Dazzo, F. B., Orgambide, G. G., Philip-Hollingsworth, S., Hollingsworth, R. I., Ninke, K. O., and Salzwedel, J. L. (1996). Modulation of development, growth dynamics, wall crystallinity, and infection sites in white clover root hairs by membrane chitolipooligosaccharides from *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii. *J. Bacteriol.* 178, 3621–3627.
- De Billy, F., Grosjean, C., May, S., Bennett, M., and Cullimore, J. V. (2001). Expression studies on AUX1-like genes in *Medicago truncatula* suggest that auxin is required at two steps in early nodule development. *Mol. Plant Microbe Interact.* 14, 267–277. doi: 10.1094/MPMI.2001.14.3.267
- De Carvalho Niebel, F., Lescure, N., Cullimore, J. V., and Gamas, P. (1998). The *Medicago truncatula* MtAnn1 gene encoding an annexin is induced by Nod factors and during the symbiotic interaction with *Rhizobium meliloti*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 11, 504–513. doi: 10.1094/MPMI.1998.11.6.504
- De Carvalho-Niebel, F., Timmers, A. C., Chabaud, M., Defaux-Petras, A., and Barker, D. G. (2002). The Nod factor-elicited annexin MtAnn1 is preferentially localised at the nuclear periphery in symbiotically activated root tissues of *Medicago truncatula*. *Plant J.* 32, 343–352. doi: 10.1046/j.1365-313X.2002.01429.x
- Drerup, M. M., Schlucking, K., Hashimoto, K., Manishankar, P., Steinhorst, L., Kuchitsu, K., et al. (2013). The Calcineurin B-like calcium sensors CBL1 and CBL9 together with their interacting protein kinase CIPK26 regulate the Arabidopsis NADPH oxidase RBOHF. *Mol. Plant* 6, 559–569. doi: 10.1093/mp/sst009
- Du, Z., Zhou, X., Ling, Y., Zhang, Z., and Su, Z. (2010). agriGO: a GO analysis toolkit for the agricultural community. *Nucleic Acids Res.* 38, W64–W70. doi: 10.1093/nar/gkq310
- Ehrhardt, D. W., Atkinson, E. M., and Long, S. R. (1992). Depolarization of alfalfa root hair membrane potential by *Rhizobium meliloti* Nod factors. *Science* 256, 998–1000. doi: 10.1126/science.10744524
- Esseling, J. J., Lhuissier, F. G. P., and Emons, A. M. C. (2003). Nod factor-induced root hair curling: continuous polar growth towards the point of Nod factor application. *Plant Physiol.* 132, 1982–1988. doi: 10.1104/pp.103.021634
- Falhof, J., Pedersen, J. T., Fuglsang, A. T., and Palmgren, M. (2016). Plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase regulation in the center of plant physiology. *Mol. Plant* 9, 323–337. doi: 10.1016/j.molp.2015.11.002
- Felle, H. H., Kondorosi, E., Kondorosi, A., and Schultze, M. (1996). Rapid alkalization in alfalfa root hairs in response to rhizobial lipochitoooligosaccharide signals. *Plant J.* 10, 295–301. doi: 10.1046/j.1365-313x.1996.10020295.x
- Felle, H. H., Kondorosi, E., Kondorosi, A., and Schultze, M. (1998). The role of ion fluxes in Nod factor signalling in *Medicago sativa*. *Plant J.* 13, 455–463. doi: 10.1046/j.1365-313x.1998.00041.x
- Felle, H. H., Kondorosi, E., Kondorosi, A., and Schultze, M. (1999). Elevation of the cytosolic free [Ca<sup>2+</sup>] is indispensable for the transduction of the Nod factor signal in alfalfa. *Plant Physiol.* 121, 273–280. doi: 10.1104/pp.121.1.273
- Fischer, S., Brunk, B. P., Chen, F., Gao, X., Harb, O. S., Iodice, J. B., et al. (2011). Using OrthoMCL to assign proteins to OrthoMCL-DB groups or to cluster proteomes into new ortholog groups. *Curr. Protoc. Bioinform. Chapter 6:Unit 6.12.1–19*. doi: 10.1002/0471250953.bi0612s35
- Foreman, J., Demidchik, V., Bothwell, J. H., Mylona, P., Miedema, H., Torres, M. A., et al. (2003). Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* 422, 442–446. doi: 10.1038/nature01485
- Francoz, E., Ranocha, P., Nguyen-Kim, H., Jamet, E., Burlat, V., and Dunand, C. (2015). Roles of cell wall peroxidases in plant development. *Phytochemistry* 112, 15–21. doi: 10.1016/j.phytochem.2014.07.020
- Gao, Y., Tian, Q., and Zhang, W. H. (2014). Systemic regulation of sulfur homeostasis in *Medicago truncatula*. *Planta* 239, 79–96. doi: 10.1007/s00425-013-1958-1

- Garcia-Mata, C., Wang, J., Gajdanowicz, P., Gonzalez, W., Hills, A., Donald, N., et al. (2010). A minimal cysteine motif required to activate the SKOR K<sup>+</sup> channel of Arabidopsis by the reactive oxygen species H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *J. Biol. Chem.* 285, 29286–29294. doi: 10.1074/jbc.M110.141176
- Gaymard, F., Pilot, G., Lacombe, B., Bouchez, D., Bruneau, D., Boucherez, J., et al. (1998). Identification and disruption of a plant shaker-like outward channel involved in K<sup>+</sup> release into the xylem sap. *Cell* 94, 647–655. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81606-2
- Geiger, D., Scherzer, S., Mumm, P., Marten, I., Ache, P., Matschi, S., et al. (2010). Guard cell anion channel SLAC1 is regulated by CDPK protein kinases with distinct Ca<sup>2+</sup> affinities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 8023–8028. doi: 10.1073/pnas.0912030107
- Giehl, R. F. H., and Von Wiren, N. (2014). Root nutrient foraging. *Plant Physiol.* 166, 509–517. doi: 10.1104/pp.114.245225
- Gierth, M., Maser, P., and Schroeder, J. I. (2005). The potassium transporter AtHAK5 functions in K(+) deprivation-induced high-affinity K(+) uptake and AKT1 K(+) channel contribution to K(+) uptake kinetics in Arabidopsis roots. *Plant Physiol.* 137, 1105–1114. doi: 10.1104/pp.104.057216
- Graham, M. A., Silverstein, K. A., Cannon, S. B., and Vandenbosch, K. A. (2004). Computational identification and characterization of novel genes from legumes. *Plant Physiol.* 135, 1179–1197. doi: 10.1104/pp.104.037531
- Gutermuth, T., Lassig, R., Portes, M. T., Maierhofer, T., Romeis, T., Borst, J. W., et al. (2013). Pollen tube growth regulation by free anions depends on the interaction between the anion channel SLAH3 and calcium-dependent protein kinases CPK2 and CPK20. *Plant Cell* 25, 4525–4543. doi: 10.1105/tpc.113.118463
- Hamburger, D., Rezzonico, E., Macdonald-Comber Petetot, J., Somerville, C., and Poirier, Y. (2002). Identification and characterization of the Arabidopsis PHO1 gene involved in phosphate loading to the xylem. *Plant Cell* 14, 889–902. doi: 10.1105/tpc.000745
- Hamilton, E. S., Jensen, G. S., Maskaev, G., Katims, A., Sherp, A. M., and Haswell, E. S. (2015). Mechanosensitive channel MSL8 regulates osmotic forces during pollen hydration and germination. *Science* 350, 438–441. doi: 10.1126/science.aac6014
- Haswell, E. S., and Meyerowitz, E. M. (2006). MscS-like proteins control plastid size and shape in *Arabidopsis thaliana*. *Curr. Biol.* 16, 1–11. doi: 10.1016/j.cub.2005.11.044
- Haswell, E. S., Peyronnet, R., Barbier-Brygoo, H., Meyerowitz, E. M., and Frachis, J. M. (2008). Two MscS homologs provide mechanosensitive channel activities in the Arabidopsis root. *Curr. Biol.* 18, 730–734. doi: 10.1016/j.cub.2008.04.039
- Hedrich, R. (2012). Ion channels in plants. *Physiol. Rev.* 92, 1777–1811. doi: 10.1152/physrev.00038.2011
- Hilliou, F., and Tran, T. (2013). “RqPCRAnalysis: analysis of quantitative real-time PCR data,” in *Bioinformatics 2013: Proceedings of the International Conference on Bioinformatics Models, Methods and Algorithms* (Barcelona), 202–211.
- Hossain, M. S., Joshi, T., and Stacey, G. (2015). System approaches to study root hairs as a single cell plant model: current status and future perspectives. *Front. Plant Sci.* 6:363. doi: 10.3389/fpls.2015.00363
- Hosy, E., Vavasseur, A., Mouline, K., Dreyer, L., Gaymard, F., Poree, F., et al. (2003). The Arabidopsis outward K<sup>+</sup> channel GORK is involved in regulation of stomatal movements and plant transpiration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 5549–5554. doi: 10.1073/pnas.0733970100
- Hou, C., Tian, W., Kleist, T., He, K., Garcia, V., Bai, F., et al. (2014). DUF221 proteins are a family of osmosensitive calcium-permeable cation channels conserved across eukaryotes. *Cell Res.* 24, 632–635. doi: 10.1038/cr.2014.14
- Ivashikina, N., Becker, D., Ache, P., Meyerhoff, O., Felle, H. H., and Hedrich, R. (2001). K(+) channel profile and electrical properties of Arabidopsis root hairs. *FEBS Lett.* 508, 463–469. doi: 10.1016/S0014-5793(01)03114-3
- Javot, H., Penmetsa, R. V., Breuillin, F., Bhattarai, K. K., Noar, R. D., Gomez, S. K., et al. (2011). *Medicago truncatula* mtp4 mutants reveal a role for nitrogen in the regulation of arbuscule degeneration in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant J.* 68, 954–965. doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04746.x
- Jensen, G. S., and Haswell, E. S. (2012). Functional analysis of conserved motifs in the mechanosensitive channel homolog MscS-Like2 from *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* 7:e40336. doi: 10.1371/journal.pone.0040336
- Jorgens, C. I., Grunewald, N., Hulskamp, M., and Uhrig, J. F. (2010). A role for ABL3 in plant cell morphogenesis. *Plant J.* 62, 925–935. doi: 10.1111/j.1365-313x.2010.04210.x
- Journet, E. P., El-Gachtouli, N., Vernoud, V., De Billy, F., Pichon, M., Dedieu, A., et al. (2001). *Medicago truncatula* ENOD11: a novel RPRP-encoding early nodulin gene expressed during mycorrhization in arbuscule-containing cells. *Mol. Plant Microbe Interact.* 14, 737–748. doi: 10.1094/MPMI.2001.14.6.737
- Kadota, Y., Shirasu, K., and Zipfel, C. (2015). Regulation of the NADPH oxidase RBOHD during plant immunity. *Plant Cell Physiol.* 56, 1472–1480. doi: 10.1093/pcp/pcv063
- Kadota, Y., Sklenar, J., Derbyshire, P., Stransfeld, L., Asai, S., Ntoukakis, V., et al. (2014). Direct regulation of the NADPH oxidase RBOHD by the PRR-associated kinase BIK1 during plant immunity. *Mol. Cell* 54, 43–55. doi: 10.1016/j.molcel.2014.02.021
- Krajinski, F., Courty, P. E., Sieh, D., Franken, P., Zhang, H., Bucher, M., et al. (2014). The H<sup>+</sup>-ATPase HA1 of *Medicago truncatula* is essential for phosphate transport and plant growth during arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Cell* 26, 1808–1817. doi: 10.1105/tpc.113.120436
- Krajinski, F., Hause, B., Gianinazzi-Pearson, V., and Franken, P. (2002). *Mtha1*, a plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase gene from *Medicago truncatula*, shows arbuscule-specific induced expression in mycorrhizal tissue. *Plant Biol.* 4, 754–761. doi: 10.1055/s-2002-37407
- Krouk, G., Carre, C., Fizames, C., Gojon, A., Ruffel, S., and Lacombe, B. (2015). GeneCloud reveals semantic enrichment in lists of gene descriptions. *Mol. Plant* 8, 971–973. doi: 10.1016/j.molp.2015.02.005
- Krouk, G., Crawford, N. M., Coruzzi, G. M., and Tsay, Y. F. (2010a). Nitrate signaling: adaptation to fluctuating environments. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13, 266–273. doi: 10.1016/j.cpb.2009.12.003
- Krouk, G., Lacombe, B., Bielach, A., Perrine-Walker, F., Malinska, K., Mounier, E., et al. (2010b). Nitrate-regulated auxin transport by NRT1.1 defines a mechanism for nutrient sensing in plants. *Dev. Cell* 18, 927–937. doi: 10.1016/j.devcel.2010.05.008
- Kurkdjian, A., Bouteau, F., Pennarun, A. M., Convert, M., Cornel, D., Rona, J. P., et al. (2000). Ion currents involved in early Nod factor response in *Medicago sativa* root hairs: a discontinuous single-electrode voltage-clamp study. *Plant J.* 22, 9–17. doi: 10.1046/j.1365-313x.2000.00714.x
- Kurusu, T., Kuchitsu, K., Nakano, M., Nakayama, Y., and Iida, H. (2013). Plant mechanosensing and Ca<sup>2+</sup> transport. *Trends Plant Sci.* 18, 227–233. doi: 10.1016/j.tplants.2012.12.002
- Kurusu, T., Yamanaka, T., Nakano, M., Takiguchi, A., Ogasawara, Y., Hayashi, T., et al. (2012). Involvement of the putative Ca(2+)-permeable mechanosensitive channels, NtMCA1 and NtMCA2, in Ca(2+)-uptake, Ca(2+)-dependent cell proliferation and mechanical stress-induced gene expression in tobacco (*Nicotiana tabacum*) BY-2 cells. *J. Plant Res.* 125, 555–568. doi: 10.1007/s10265-011-0462-6
- Kwasniewski, M., Nowakowska, U., Szumera, J., Chwialkowska, K., and Szarejko, I. (2013). iRootHair: a comprehensive root hair genomics database. *Plant Physiol.* 161, 28–35. doi: 10.1104/pp.112.206441
- Laloi, C., Mestres-Ortega, D., Marco, Y., Meyer, Y., and Reichheld, J. P. (2004). The Arabidopsis cytosolic thioredoxin h5 gene induction by oxidative stress and its W-box-mediated response to pathogen elicitor. *Plant Physiol.* 134, 1006–1016. doi: 10.1104/pp.103.035782
- Laohavisit, A., Brown, A. T., Cicuta, P., and Davies, J. M. (2010). Annexins: components of the calcium and reactive oxygen signaling network. *Plant Physiol.* 152, 1824–1829. doi: 10.1104/pp.109.145458
- Laohavisit, A., Shang, Z., Rubio, L., Cui, T. A., Véry, A. A., Wang, A., et al. (2012). Arabidopsis annexin1 mediates the radical-activated plasma membrane Ca(2+)- and K+-permeable conductance in root cells. *Plant Cell* 24, 1522–1533. doi: 10.1105/tpc.112.097881
- Larrainzar, E., Riely, B. K., Kim, S. C., Carrasquilla-Garcia, N., Yu, H. J., Hwang, H. J., et al. (2015). Deep sequencing of the *Medicago truncatula* root transcriptome reveals a massive and early interaction between nodulation factor and ethylene signals. *Plant Physiol.* 169, 233–265. doi: 10.1104/pp.15.00350
- Lebaudy, A., Véry, A. A., and Sentenac, H. (2007). K<sup>+</sup> channel activity in plants: genes, regulations and functions. *FEBS Lett.* 581, 2357–2366. doi: 10.1016/j.febslet.2007.03.058

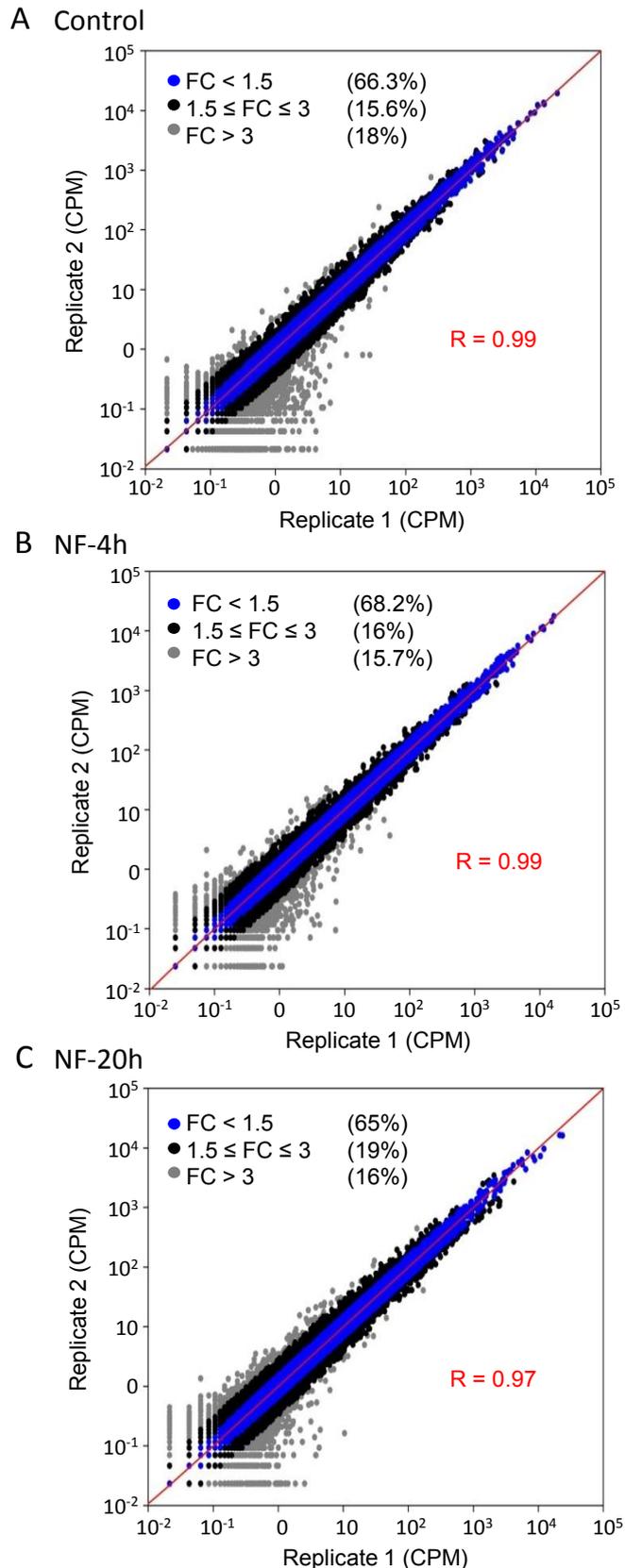
- Leran, S., Munos, S., Brachet, C., Tillard, P., Gojon, A., and Lacombe, B. (2013). Arabidopsis NRT1.1 is a bidirectional transporter involved in root-to-shoot nitrate translocation. *Mol. Plant* 6, 1984–1987. doi: 10.1093/mp/sst068
- Leran, S., Varala, K., Boyer, J. C., Chiuazzini, M., Crawford, N., Daniel-Vedele, F., et al. (2014). A unified nomenclature of NITRATE TRANSPORTER 1/PEPTIDE TRANSPORTER family members in plants. *Trends Plant Sci.* 19, 5–9. doi: 10.1016/j.tplants.2013.08.008
- Li, G., Tillard, P., Gojon, A., and Maurel, C. (2016). Dual regulation of root hydraulic conductivity and plasma membrane aquaporins by plant nitrate accumulation and high-affinity nitrate transporter NRT2.1. *Plant Cell Physiol.* 57, 733–742. doi: 10.1093/pcp/pcw022
- Li, L., Li, M., Yu, L., Zhou, Z., Liang, X., Liu, Z., et al. (2014). The FLS2-associated kinase BIK1 directly phosphorylates the NADPH oxidase RbohD to control plant immunity. *Cell Host Microbe* 15, 329–338. doi: 10.1016/j.chom.2014.02.009
- Li, L., Stoeckert, C. J. Jr., and Roos, D. S. (2003). OrthoMCL: identification of ortholog groups for eukaryotic genomes. *Genome Res.* 13, 2178–2189. doi: 10.1101/gr.1224503
- Li, W., Wang, Y., Okamoto, M., Crawford, N. M., Siddiqi, M. Y., and Glass, A. D. (2007). Dissection of the AtNRT2.1:AtNRT2.2 inducible high-affinity nitrate transporter gene cluster. *Plant Physiol.* 143, 425–433. doi: 10.1104/pp.106.091223
- Libault, M., Brechenmacher, L., Cheng, J., Xu, D., and Stacey, G. (2010a). Root hair systems biology. *Trends Plant Sci.* 15, 641–650. doi: 10.1016/j.tplants.2010.08.010
- Libault, M., Farmer, A., Brechenmacher, L., Drnevich, J., Langley, R. J., Bilgin, D. D., et al. (2010b). Complete transcriptome of the soybean root hair cell, a single-cell model, and its alteration in response to Bradyrhizobium japonicum infection. *Plant Physiol.* 152, 541–552. doi: 10.1104/pp.109.148379
- Lin, S. H., Kuo, H. F., Canivenc, G., Lin, C. S., Lepetit, M., Hsu, P. K., et al. (2008). Mutation of the Arabidopsis NRT1.5 nitrate transporter causes defective root-to-shoot nitrate transport. *Plant Cell* 20, 2514–2528. doi: 10.1105/tpc.108.060244
- Little, D. Y., Rao, H., Oliva, S., Daniel-Vedele, F., Krapp, A., and Malamy, J. E. (2005). The putative high-affinity nitrate transporter NRT2.1 represses lateral root initiation in response to nutritional cues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 13693–13698. doi: 10.1073/pnas.0504219102
- Liu, K. H., Huang, C. Y., and Tsay, Y. F. (1999). CHL1 is a dual-affinity nitrate transporter of Arabidopsis involved in multiple phases of nitrate uptake. *Plant Cell* 11, 865–874. doi: 10.1105/tpc.11.5.865
- Lohar, D. P., Haridas, S., Gantt, J. S., and Vandenbosch, K. A. (2007). A transient decrease in reactive oxygen species in roots leads to root hair deformation in the legume-rhizobia symbiosis. *New Phytol.* 173, 39–49. doi: 10.1111/j.1469-8137.2006.01901.x
- Maksaev, G., and Haswell, E. S. (2012). MscS-Like10 is a stretch-activated ion channel from *Arabidopsis thaliana* with a preference for anions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 19015–19020. doi: 10.1073/pnas.1213931109
- Marino, D., Andrio, E., Danchin, E. G. J., Oger, E., Gucciardo, S., Lambert, A., et al. (2011). A *Medicago truncatula* NADPH oxidase is involved in symbiotic nodule functioning. *New Phytol.* 189, 580–592. doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03509.x
- Marino, D., Dunand, C., Puppo, A., and Pauly, N. (2012). A burst of plant NADPH oxidases. *Trends Plant Sci.* 17, 9–15. doi: 10.1016/j.tplants.2011.10.001
- Mathesius, U., Schlaman, H. R., Spaink, H. P., of Sautter, C., Rolfe, B. G., and Djordjevic, M. A. (1998). Auxin transport inhibition precedes root nodule formation in white clover roots and is regulated by flavonoids and derivatives of chitin oligosaccharides. *Plant J.* 14, 23–34. doi: 10.1046/j.1365-313X.1998.00090.x
- Merlot, S., Leonhardt, N., Fenzi, F., Valon, C., Costa, M., Piette, L., et al. (2007). Constitutive activation of a plasma membrane H(+)-ATPase prevents abscisic acid-mediated stomatal closure. *EMBO J.* 26, 3216–3226. doi: 10.1038/sj.emboj.7601750
- Meyer, S., Mumm, P., Imes, D., Endler, A., Weder, B., Al-Rasheid, K. A., et al. (2010). AtALMT12 represents an R-type anion channel required for stomatal movement in Arabidopsis guard cells. *Plant J.* 63, 1054–1062. doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04302.x
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., and Van Breusegem, F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.* 9, 490–498. doi: 10.1016/j.tplants.2004.08.009
- Miyahara, A., Richens, J., Starker, C., Morieri, G., Smith, L., Long, S., et al. (2010). Conservation in function of a SCAR/WAVE component during infection thread and root hair growth in *Medicago truncatula*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 23, 1553–1562. doi: 10.1094/MPMI-06-10-0144
- Monshausen, G. B., Bibikova, T. N., Weisenseel, M. H., and Gilroy, S. (2009). Ca<sup>2+</sup> regulates reactive oxygen species production and pH during mechanosensing in Arabidopsis roots. *Plant Cell* 21, 2341–2356. doi: 10.1105/tpc.109.068395
- Montiel, J., Nava, N., Cardenas, L., Sanchez-Lopez, R., Arthikala, M. K., Santana, O., et al. (2012). A *Phaseolus vulgaris* NADPH Oxidase gene is required for root infection by rhizobia. *Plant Cell Physiol.* 53, 1751–1767. doi: 10.1093/pcp/pcs120
- Morere-Le Paven, M. C., Viau, L., Hamon, A., Vandecasteele, C., Pellizzaro, A., Bourdin, C., et al. (2011). Characterization of a dual-affinity nitrate transporter MtNRT1.3 in the model legume *Medicago truncatula*. *J. Exp. Bot.* 62, 5595–5605. doi: 10.1093/jxb/err243
- Nakagawa, Y., Katagiri, T., Shinozaki, K., Qi, Z., Tatsumi, H., Furuichi, T., et al. (2007). Arabidopsis plasma membrane protein crucial for Ca<sup>2+</sup> influx and touch sensing in roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 3639–3644. doi: 10.1073/pnas.0607703104
- Negi, J., Matsuda, O., Nagasawa, T., Oba, Y., Takahashi, H., Kawai-Yamada, M., et al. (2008). CO<sub>2</sub> regulator SLAC1 and its homologues are essential for anion homeostasis in plant cells. *Nature* 452, 483–486. doi: 10.1038/nature06720
- Nestler, J., Liu, S., Wen, T. J., Paschold, A., Marcon, C., Tang, H. M., et al. (2014). Roothairless5, which functions in maize (*Zea mays* L.) root hair initiation and elongation encodes a monocot-specific NADPH oxidase. *Plant J.* 79, 729–740. doi: 10.1111/tpj.12578
- Nguyen, T. T., Volkening, J. D., Rose, C. M., Venkateshwaran, M., Westphall, M. S., Coon, J. J., et al. (2015). Potential regulatory phosphorylation sites in a *Medicago truncatula* plasma membrane proton pump implicated during early symbiotic signaling in roots. *FEBS Lett.* 589, 2186–2193. doi: 10.1016/j.febslet.2015.06.035
- Nussaume, L., Kanno, S., Javot, H., Marin, E., Pochon, N., Ayadi, A., et al. (2011). Phosphate Import in Plants: Focus on the PHT1 Transporters. *Front. Plant Sci.* 2:83. doi: 10.3389/fpls.2011.00083
- O'Brien, J. A., Daudi, A., Finch, P., Butt, V. S., Whitelegge, J. P., Souda, P., et al. (2012). A peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in cultured Arabidopsis cells functions in MAMP-elicited defense. *Plant Physiol.* 158, 2013–2027. doi: 10.1104/pp.111.190140
- Okamoto, M., Kumar, A., Li, W., Wang, Y., Siddiqi, M. Y., Crawford, N. M., et al. (2006). High-affinity nitrate transport in roots of Arabidopsis depends on expression of the NAR2-like gene AtNRT3.1. *Plant Physiol.* 140, 1036–1046. doi: 10.1104/pp.105.074385
- Oldroyd, G. E. (2013). Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 252–263. doi: 10.1038/nrmicro2990
- Oldroyd, G. E., and Downie, J. A. (2008). Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59, 519–546. doi: 10.1146/annurev.plant.59.032607.092839
- Orsel, M., Krapp, A., and Daniel-Vedele, F. (2002). Analysis of the NRT2 nitrate transporter family in Arabidopsis. Structure and gene expression. *Plant Physiol.* 129, 886–896. doi: 10.1104/pp.005280
- Peleg-Grossman, S., Melamed-Book, N., and Levine, A. (2012). ROS production during symbiotic infection suppresses pathogenesis-related gene expression. *Plant Signal. Behav.* 7, 409–415. doi: 10.4161/psb.19217
- Peleg-Grossman, S., Volpin, H., and Levine, A. (2007). Root hair curling and *Rhizobium* infection in *Medicago truncatula* are mediated by phosphatidylinositol-regulated endocytosis and reactive oxygen species. *J. Exp. Bot.* 58, 1637–1649. doi: 10.1093/jxb/erm013
- Pellizzaro, A., Clochard, T., Cukier, C., Bourdin, C., Juchaux, M., Montrichard, F., et al. (2014). The nitrate transporter MtNPF6.8 (MtNRT1.3) transports abscisic acid and mediates nitrate regulation of primary root growth in *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.* 166, 2152–2165. doi: 10.1104/pp.114.250811
- Pellizzaro, A., Clochard, T., Planchet, E., Limami, A. M., and Morere-Le Paven, M. C. (2015). Identification and molecular characterization of *Medicago truncatula* NRT2 and NAR2 families. *Physiol. Plant.* 154, 256–269. doi: 10.1111/ppl.12314
- Poirier, Y., Thoma, S., Somerville, C., and Schiefelbein, J. (1991). Mutant of Arabidopsis deficient in xylem loading of phosphate. *Plant Physiol.* 97, 1087–1093. doi: 10.1104/pp.97.3.1087

- Puppo, A., Pauly, N., Boscari, A., Mandon, K., and Brouquisse, R. (2013). Hydrogen peroxide and nitric oxide: key regulators of the Legume-Rhizobium and mycorrhizal symbioses. *Antioxid. Redox Signal.* 18, 2202–2219. doi: 10.1089/ars.2012.5136
- Qiu, L., Lin, J. S., Xu, J., Sato, S., Parniske, M., Wang, T. L., et al. (2015). SCARN a novel class of SCAR Protein That Is Required for Root-Hair Infection during Legume nodulation. *PLoS Genet.* 11:e1005623. doi: 10.1371/journal.pgen.1005623
- Ramu, S. K., Peng, H. M., and Cook, D. R. (2002). Nod factor induction of reactive oxygen species production is correlated with expression of the early nodulin gene rip1 in *Medicago truncatula*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 15, 522–528. doi: 10.1094/MPMI.2002.15.6.522
- Rasmussen, M. O., Hogg, B., Bono, J. J., Samain, E., and Driguez, H. (2004). New access to lipo-chitoooligosaccharide nodulation factors. *Org. Biomol. Chem.* 2, 1908–1910. doi: 10.1039/b403575e
- Reichheld, J. P., Mestres-Ortega, D., Laloi, C., and Meyer, Y. (2002). The multigenic family of thioredoxin h in *Arabidopsis thaliana*: specific expression and stress response. *Plant Physiol. Biochem.* 40, 685–690. doi: 10.1016/S0981-9428(02)01406-7
- Remans, T., Nacry, P., Pervent, M., Girin, T., Tillard, P., Lepetit, M., et al. (2006). A central role for the nitrate transporter NRT2.1 in the integrated morphological and physiological responses of the root system to nitrogen limitation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 140, 909–921. doi: 10.1104/pp.105.075721
- Richards, S. L., Laohavisit, A., Mortimer, J. C., Shabala, L., Swarbrick, S. M., Shabala, S., et al. (2014). Annexin 1 regulates the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced calcium signature in *Arabidopsis thaliana* roots. *Plant J.* 77, 136–145. doi: 10.1111/tpj.12372
- Robinson, M. D., Mccarthy, D. J., and Smyth, G. K. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26, 139–140. doi: 10.1093/bioinformatics/btp616
- Rose, C. M., Venkateshwaran, M., Volkening, J. D., Grimsrud, P. A., Maeda, J., Bailey, D. J., et al. (2012). Rapid phosphoproteomic and transcriptomic changes in the rhizobia-legume symbiosis. *Mol. Cell. Proteomics* 11, 724–744. doi: 10.1074/mcp.M112.019208
- Rouached, H., Secco, D., and Arpat, A. B. (2009). Getting the most sulfate from soil: regulation of sulfate uptake transporters in *Arabidopsis*. *J. Plant Physiol.* 166, 893–902. doi: 10.1016/j.jplph.2009.02.016
- Roux, B., Rodde, N., Jardinaud, M. F., Timmers, T., Sauviac, L., Cottret, L., et al. (2014). An integrated analysis of plant and bacterial gene expression in symbiotic root nodules using laser-capture microdissection coupled to RNA sequencing. *Plant J.* 77, 817–837. doi: 10.1111/tpj.12442
- Sauviac, L., Niebel, A., Boisson-Dernier, A., Barker, D. G., and De Carvalho-Niebel, F. (2005). Transcript enrichment of Nod factor-elicited early nodulin genes in purified root hair fractions of the model legume *Medicago truncatula*. *J. Exp. Bot.* 56, 2507–2513. doi: 10.1093/jxb/eri244
- Schachtman, D. P., and Shin, R. (2007). Nutrient sensing and signaling: NPKS. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58, 47–69. doi: 10.1146/annurev.arplant.58.032806.103750
- Schnabel, E., Journet, E. P., De Carvalho-Niebel, F., Duc, G., and Frugoli, J. (2005). The *Medicago truncatula* SUNN gene encodes a CLV1-like leucine-rich repeat receptor kinase that regulates nodule number and root length. *Plant Mol. Biol.* 58, 809–822. doi: 10.1007/s11103-005-8102-y
- Segonzac, C., Boyer, J. C., Ipotesi, E., Szponarski, W., Tillard, P., Touraine, B., et al. (2007). Nitrate efflux at the root plasma membrane: identification of an *Arabidopsis* excretion transporter. *Plant Cell* 19, 3760–3777. doi: 10.1105/tpc.106.048173
- Sharma, T., Dreyer, I., and Riedelsberger, J. (2013). The role of K(+) channels in uptake and redistribution of potassium in the model plant *Arabidopsis thaliana*. *Front. Plant Sci.* 4:224. doi: 10.3389/fpls.2013.00224
- Shaw, S. L., and Long, S. R. (2003). Nod factor inhibition of reactive oxygen efflux in a host legume. *Plant Physiol.* 132, 2196–2204. doi: 10.1104/pp.103.021113
- Shin, R., and Schachtman, D. P. (2004). Hydrogen peroxide mediates plant root cell response to nutrient deprivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 8827–8832. doi: 10.1073/pnas.0401707101
- Stefanovic, A., Arpat, A. B., Bigny, R., Gout, E., Vidoudez, C., Bensimon, M., et al. (2011). Over-expression of PHO1 in *Arabidopsis* leaves reveals its role in mediating phosphate efflux. *Plant J.* 66, 689–699. doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04532.x
- Stefanovic, A., Ribot, C., Rouached, H., Wang, Y., Chong, J., Belbahri, L., et al. (2007). Members of the PHO1 gene family show limited functional redundancy in phosphate transfer to the shoot, and are regulated by phosphate deficiency via distinct pathways. *Plant J.* 50, 982–994. doi: 10.1111/j.1365-313X.2007.03108.x
- Storey, J. D., and Tibshirani, R. (2003). Statistical methods for identifying differentially expressed genes in DNA microarrays. *Methods Mol. Biol.* 224, 149–157. doi: 10.1385/1-59259-364-x:149
- Straub, D., Ludewig, U., and Neuhauser, B. (2014). A nitrogen-dependent switch in the high affinity ammonium transport in *Medicago truncatula*. *Plant Mol. Biol.* 86, 485–494. doi: 10.1007/s11103-014-0243-4
- Sundaravelpandian, K., Chandrika, N. N., and Schmidt, W. (2013). PFT1, a transcriptional Mediator complex subunit, controls root hair differentiation through reactive oxygen species (ROS) distribution in *Arabidopsis*. *New Phytol.* 197, 151–161. doi: 10.1111/nph.12000
- Takeda, S., Gapper, C., Kaya, H., Bell, E., Kuchitsu, K., and Dolan, L. (2008). Local positive feedback regulation determines cell shape in root hair cells. *Science* 319, 1241–1244. doi: 10.1126/science.1152505
- Tang, H., Krishnakumar, V., Bidwell, S., Rosen, B., Chan, A., Zhou, S., et al. (2014). An improved genome release (version Mt4.0) for the model legume *Medicago truncatula*. *BMC Genomics* 15:312. doi: 10.1186/1471-2164-15-312
- Taochy, C., Gaillard, I., Ipotesi, E., Oomen, R., Leonhardt, N., Zimmermann, S., et al. (2015). The *Arabidopsis* root stele transporter NPF2.3 contributes to nitrate translocation to shoots under salt stress. *Plant J.* 83, 466–479. doi: 10.1111/tpj.12901
- Tran, D., El-Maarouf-Bouteau, H., Rossi, M., Biligui, B., Briand, J., Kawano, T., et al. (2013). Post-transcriptional regulation of GORK channels by superoxide anion contributes to increases in outward-rectifying K(+) currents. *New Phytol.* 198, 1039–1048. doi: 10.1111/nph.12226
- Trapnell, C., Roberts, A., Goff, L., Pertea, G., Kim, D., Kelley, D. R., et al. (2012). Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and cufflinks. *Nat. Protoc.* 7, 562–578. doi: 10.1038/nprot.2012.016
- Tsukagoshi, H., Busch, W., and Benfey, P. N. (2010). Transcriptional regulation of ROS controls transition from proliferation to differentiation in the root. *Cell* 143, 606–616. doi: 10.1016/j.cell.2010.10.020
- Vacheron, J., Desbrosses, G., Bouffaud, M. L., Touraine, B., Moenne-Loccoz, Y., Muller, D., et al. (2013). Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Front. Plant Sci.* 4:356. doi: 10.3389/fpls.2013.00356
- Van Zeijl, A., Op Den Camp, R. H., Deinum, E. E., Charnikhova, T., Franssen, H., Op Den Camp, H. J., et al. (2015). Rhizobium lipo-chitoooligosaccharide signaling triggers accumulation of cytokinins in *Medicago truncatula* roots. *Mol. Plant* 8, 1213–1226. doi: 10.1016/j.molp.2015.03.010
- Véry, A. A., Nieves-Cordones, M., Daly, M., Khan, I., Fizames, C., and Sentenac, H. (2014). Molecular biology of K<sup>+</sup> transport across the plant cell membrane: what do we learn from comparison between plant species? *J. Plant Physiol.* 171, 748–769. doi: 10.1016/j.jplph.2014.01.011
- Véry, A. A., and Sentenac, H. (2003). Molecular mechanisms and regulation of K<sup>+</sup> transport in higher plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54, 575–603. doi: 10.1146/annurev.arplant.54.031902.134831
- Wang, E., Yu, N., Bano, S. A., Liu, C., Miller, A. J., Cousins, D., et al. (2014). A H<sup>+</sup>-ATPase that energizes nutrient uptake during mycorrhizal symbioses in rice and *Medicago truncatula*. *Plant Cell* 26, 1818–1830. doi: 10.1105/tpc.113.120527
- Wang, H., Lan, P., and Shen, R. F. (2016). Integration of transcriptomic and proteomic analysis towards understanding the systems biology of root hairs. *Proteomics* 16, 877–893. doi: 10.1002/pmic.201500265
- Wang, Z., Gerstein, M., and Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.* 10, 57–63. doi: 10.1038/nrg2484
- Wipf, D., Mongelard, G., Van Tuinen, D., Gutierrez, L., and Casieri, L. (2014). Transcriptional responses of *Medicago truncatula* upon sulfur deficiency stress and arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Front. Plant Sci.* 5:680. doi: 10.3389/fpls.2014.00680
- Wojciechowski, M. F., Lavin, M., and Sanderson, M. J. (2004). A phylogeny of legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid matK gene resolves

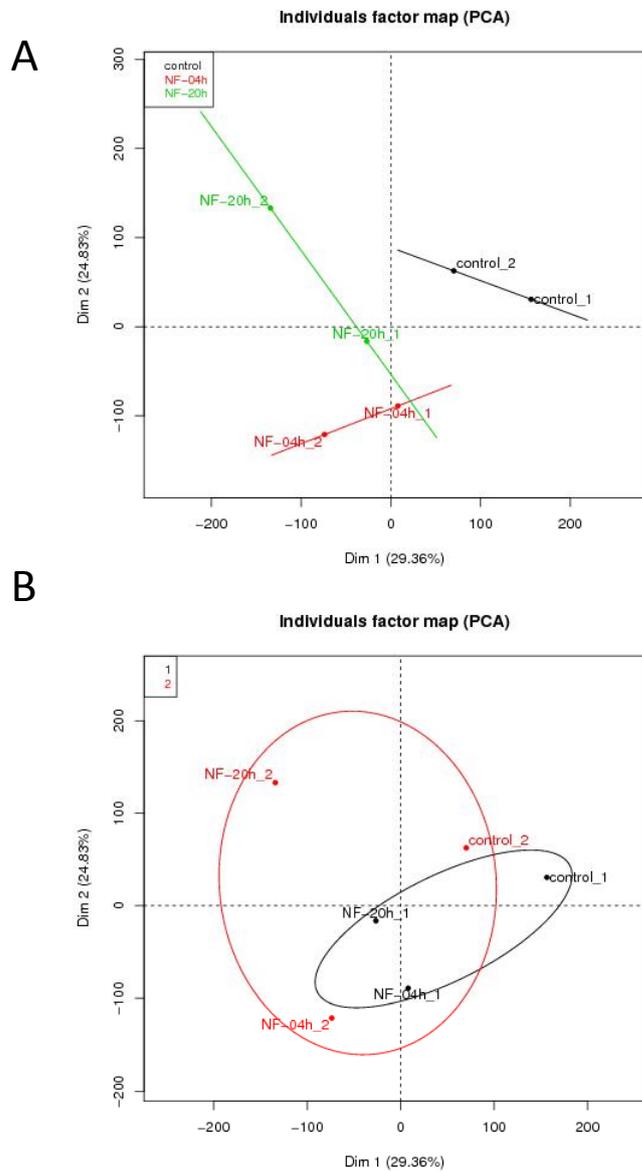
- many well-supported subclades within the family. *Am. J. Bot.* 91, 1846–1862. doi: 10.3732/ajb.91.11.1846
- Yamanaka, T., Nakagawa, Y., Mori, K., Nakano, M., Imamura, T., Kataoka, H., et al. (2010). MCA1 and MCA2 that mediate Ca<sup>2+</sup> uptake have distinct and overlapping roles in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 152, 1284–1296. doi: 10.1104/pp.109.147371
- Yokota, K., Fukai, E., Madsen, L. H., Jurkiewicz, A., Rueda, P., Radutoiu, S., et al. (2009). Rearrangement of actin cytoskeleton mediates invasion of *Lotus japonicus* roots by *Mesorhizobium loti*. *Plant Cell* 21, 267–284. doi: 10.1105/tpc.108.063693
- Yong, Z., Kotur, Z., and Glass, A. D. (2010). Characterization of an intact two-component high-affinity nitrate transporter from *Arabidopsis* roots. *Plant J.* 63, 739–748. doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04278.x
- Yuan, F., Yang, H., Xue, Y., Kong, D., Ye, R., Li, C., et al. (2014). OSCA1 mediates osmotic-stress-evoked Ca<sup>2+</sup> increases vital for osmosensing in *Arabidopsis*. *Nature* 514, 367–371. doi: 10.1038/nature13593
- Zhang, C., Bousquet, A., and Harris, J. M. (2014). Abscisic acid and LATERAL ROOT ORGAN DEFECTIVE/NUMEROUS INFECTIONS AND POLYPHENOLICS modulate root elongation via reactive oxygen species in *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.* 166, 644–658. doi: 10.1104/pp.114.248542

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

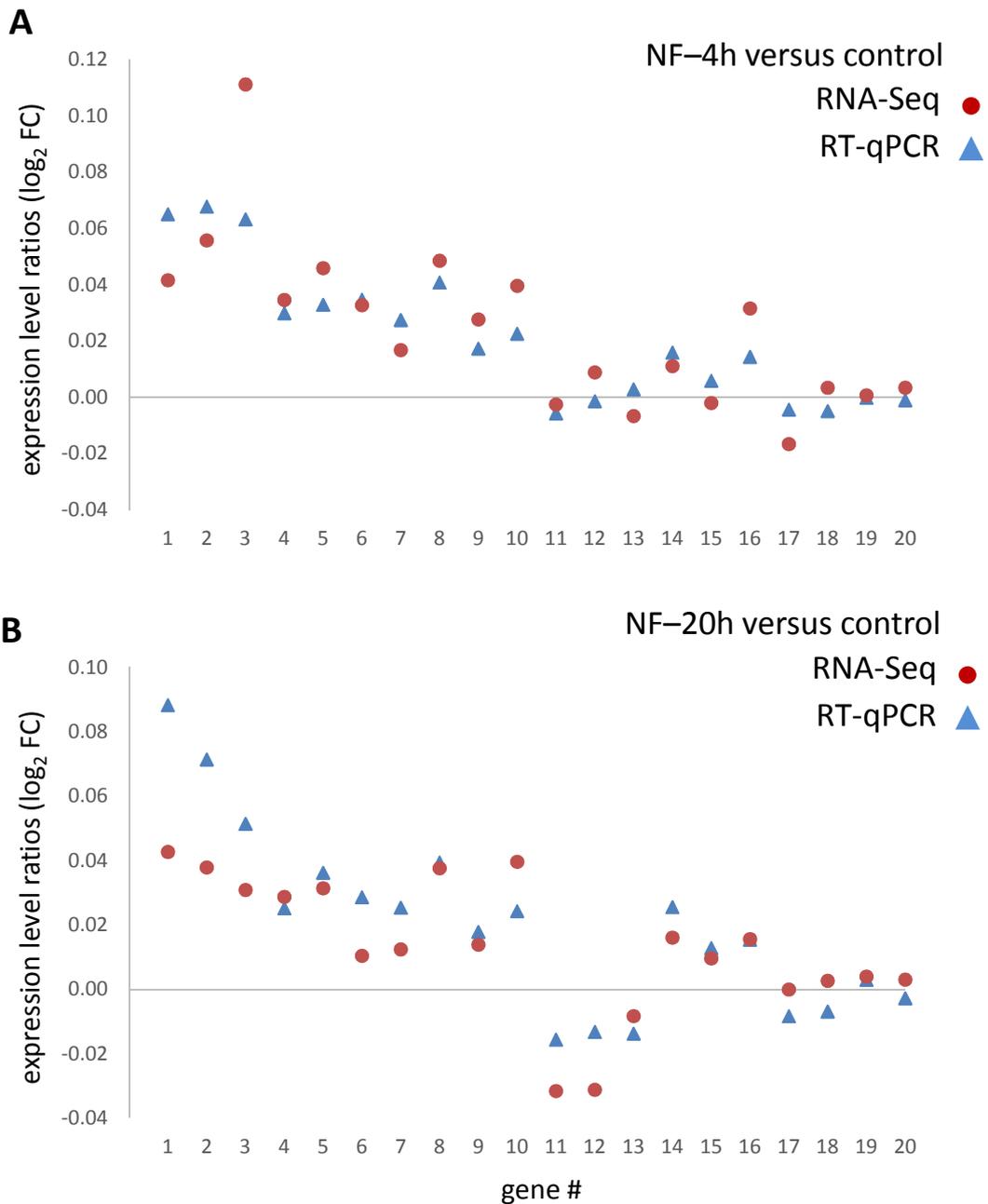
Copyright © 2016 Damiani, Drain, Guichard, Balzergue, Boscari, Boyer, Brunaud, Cottaz, Rancurel, Da Rocha, Fizames, Fort, Gaillard, Maillol, Danchin, Rouached, Samain, Su, Thouin, Touraine, Puppo, Frachisse, Pauly and Sentenac. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



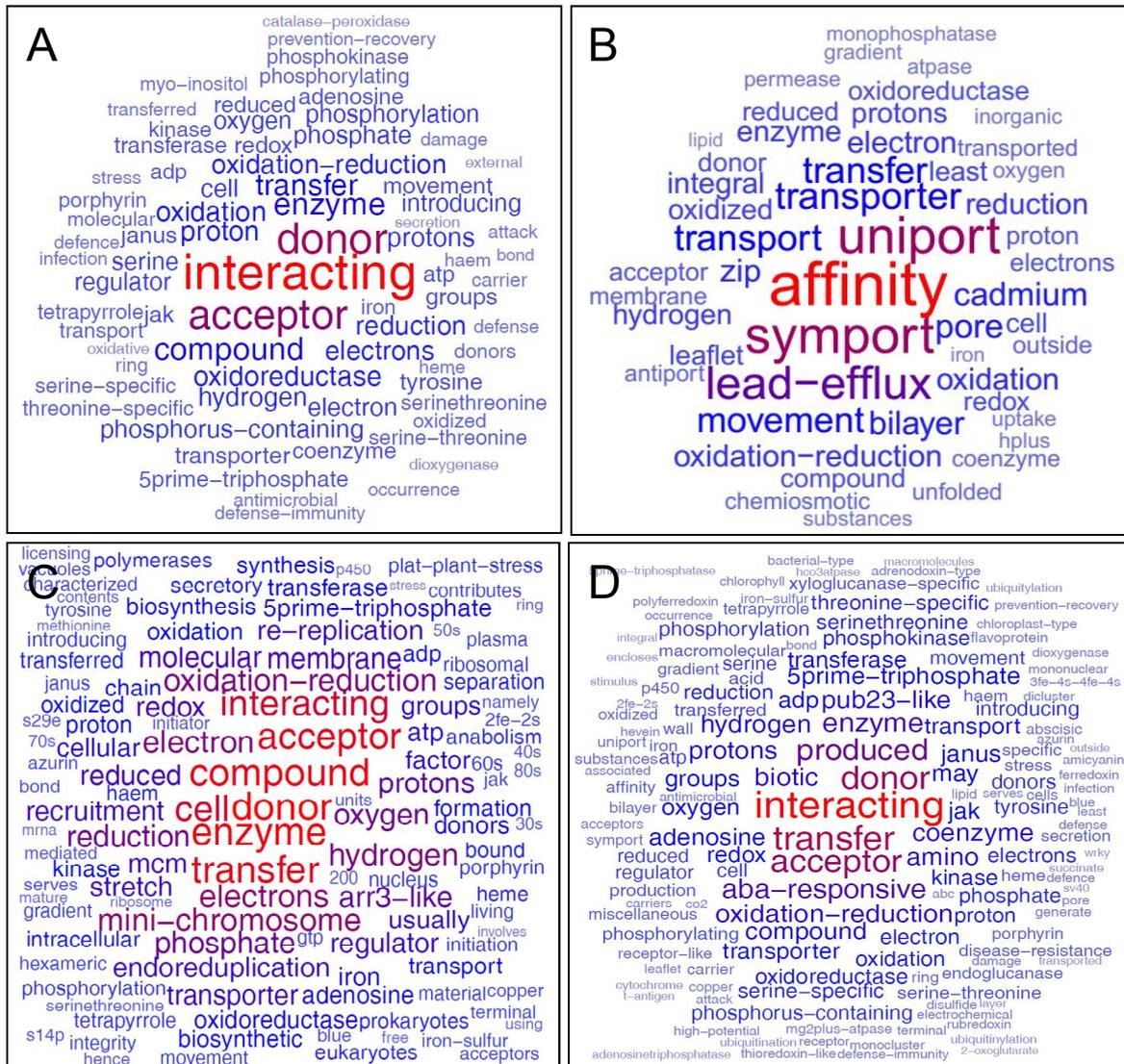
**Figure S1: Analysis of the variability between the two biological replicates of the control and NF treatments. (A) Control treatment. (B) NF-4h treatment. (C) NF-20h treatment.** The levels of transcript accumulation are provided in CPM (Counts Per Million of mapped paired reads) using a common logarithmic scale. The experimental points corresponding to genes with a fold change between the two replicates lower than 1.5, or between 1.5 and 3 or higher than 3 are spotted in blue, black or grey, respectively. The percentage of genes in each of these 3 categories is indicated in brackets. The linear regression line and the correlation coefficient  $R$  are provided in red on the graph.



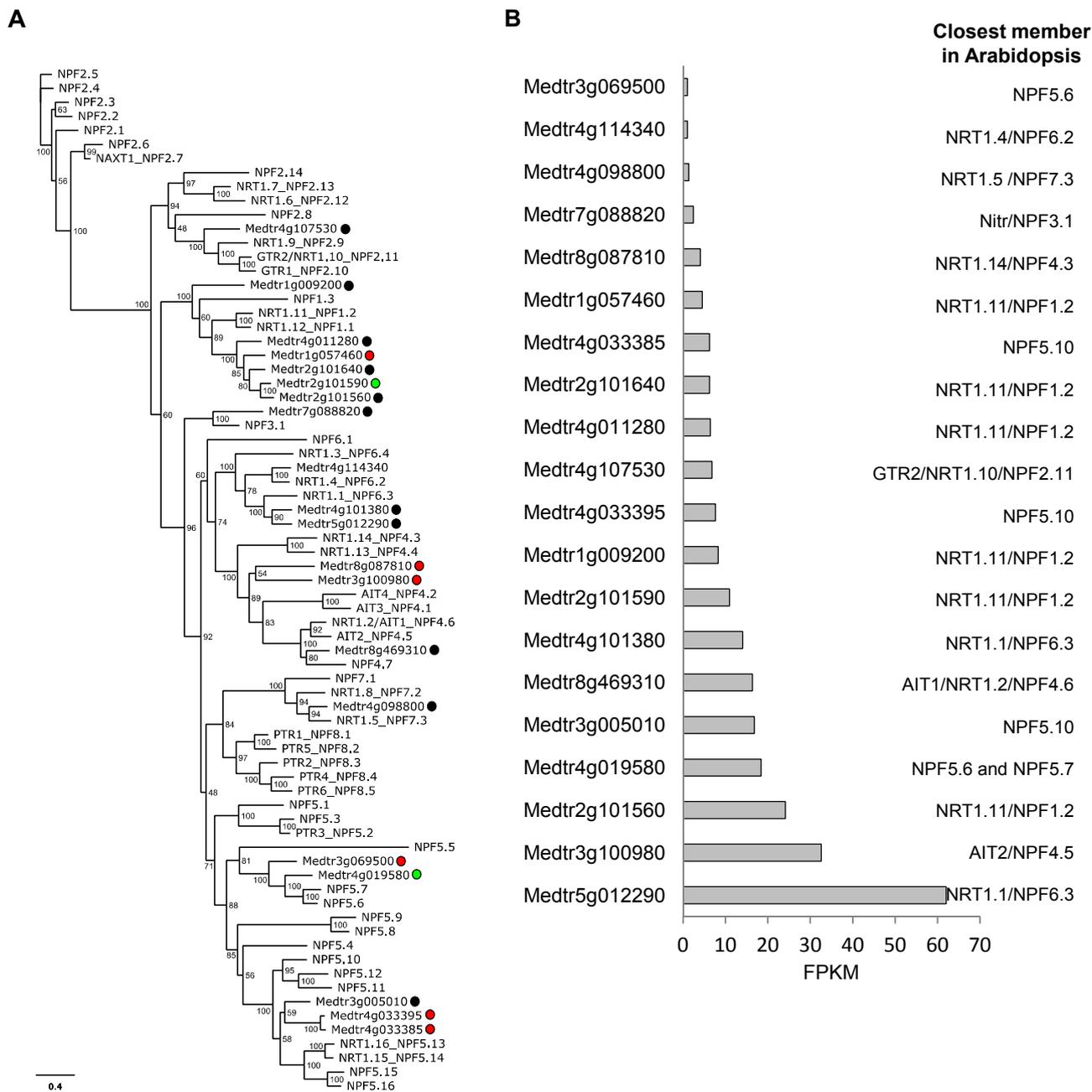
**Figure S2: Principal component analysis of RNAseq data.** Gene expression values from each biological repetition are projected onto the first two principal components (Dim1 and Dim2). **(A)** PCA of sample treatments before data normalization showing a clear separation between controls (black) and treated samples (NF-04h, red; NF-20h, green). **(B)** PCA of biological repetitions before normalization showing a homogeneous distribution meaning that there is no biological repetition bias. Lines indicate a confidence ellipse at 95%. Samples are colored according to the 2 biological replicates: replicate 1 (black), replicate 2 (red).



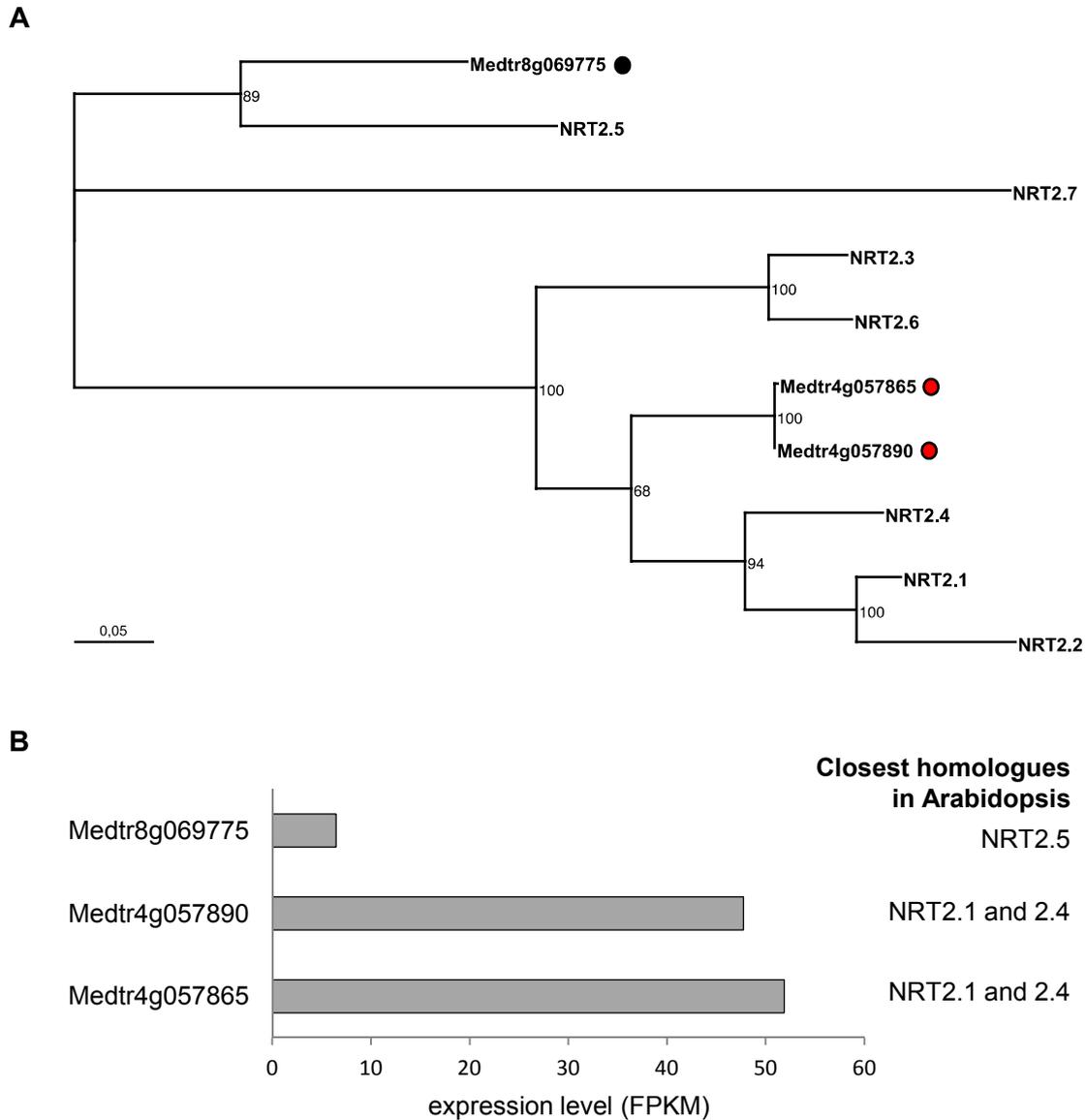
**Figure S3: Comparison of RNA-Seq and RT-qPCR data for a representative set of 20 genes.** X axis: the selected genes are numbered from 1 to 20. This selection (Supplemental table S11) comprises genes encoding receptors, pumps or channels differing in their levels of expression and representing different expression patterns in response to NF treatments. Y axes (note the logarithmic scale): relative fold changes in expression levels. For each gene from the selection and each set of data (RNA-Seq or RT-qPCR), the expression level in the NF-4h treatment (Panel A) or NF-20h treatment (Panel B) has been divided by the corresponding data in the control treatment. Red circles: ratios computed from the RNA-Seq datasets. Blue triangles: same ratios but computed from the RT-qPCR data. Selected genes (supplemental table S11): (1) Medtr5g011960 (Lipid transfer protein); (2) Medtr5g033490 (LysM-RLK); (3) Medtr4g081190 (ABC transporter B family protein); (4) Medtr8g020840 (GRAS family transcription factor); (5) Medtr4g129010 (tyrosine kinase family protein); (6) Medtr1g086550 (plant gibberellin 2-oxidase); (7) Medtr3g096500 (gibberellin 20-oxidase); (8) Medtr4g011970 (sulfate/bicarbonate/oxalate exchanger and transporter sat-1); (9) Medtr6g007697 (potassium transporter-like protein); (10) Medtr2g023890 (MAP kinase kinase kinase); (11) Medtr7g113130 (respiratory burst oxidase-like protein); (12) Medtr2g035190 (ABA-responsive protein); (13) Medtr3g069500 (peptide/nitrate transporter plant); (14) Medtr3g110405 (Serine/Threonine-kinase aurora-like protein); (15) Medtr3g105610 (glutamate receptor 3.2); (16) Medtr5g071560 (MAP kinase kinase kinase); (17) Medtr4g027040 (NF-X1-type zinc finger protein NFXL1); (18) Medtr3g104940 (mechanosensitive ion channel family protein); (19) Medtr7g06254 (auxin response factor 2); (20) Medtr5g077770 (potassium outward rectifying channel protein).



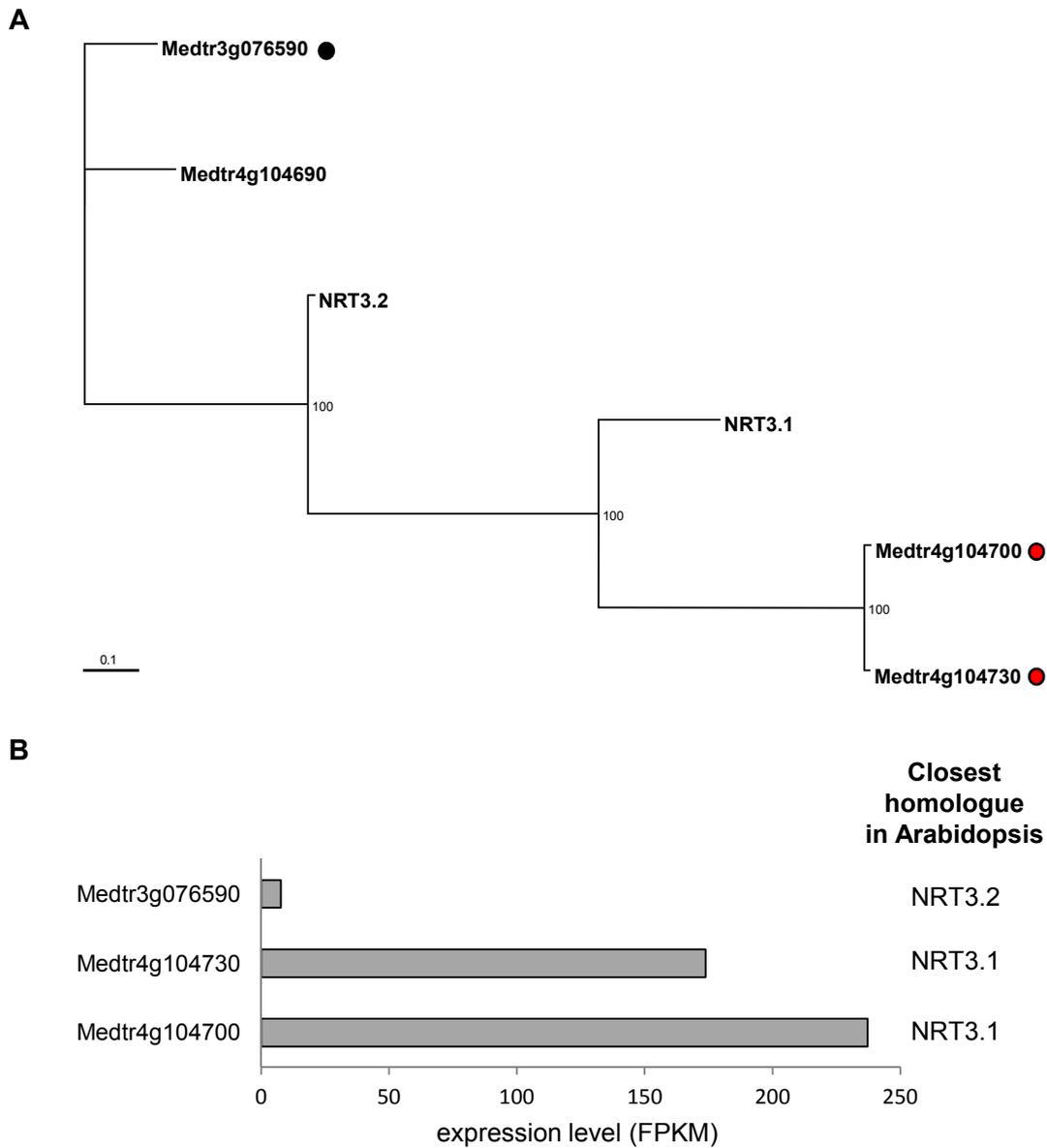
**Figure S4: GeneCloud – semantic terms over-represented in the description list of differentially expressed root hair genes following NF treatments.** The list of genes significantly induced (**A, C**) or repressed (**B, D**) by NF treatment at 4 h (**A, B**) and 20 h (**C, D**) were submitted to <https://www.m2sb.org/> using the following parameters: “keep terms occurring in at least 3 genes”, “FDR threshold ( $\alpha$ ) 1%”, “p.adjust method Bonferroni”).



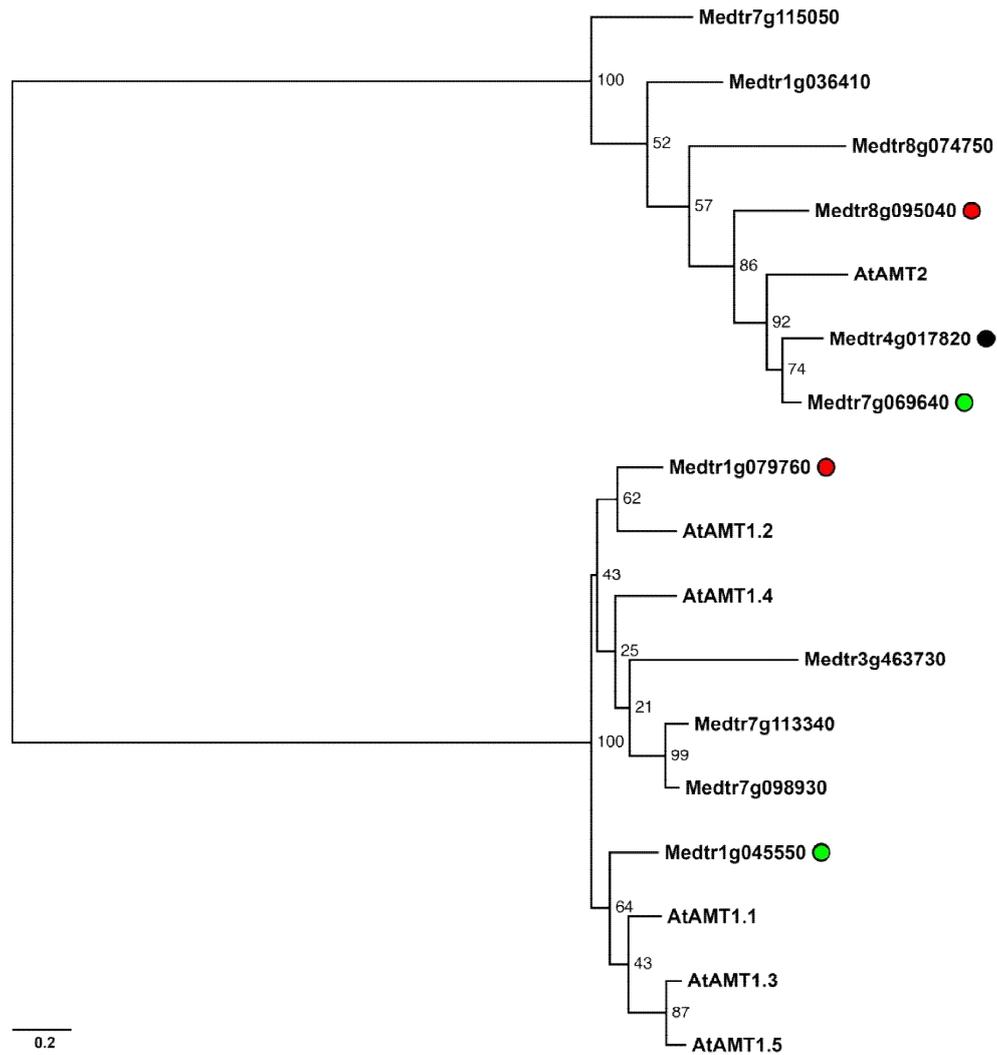
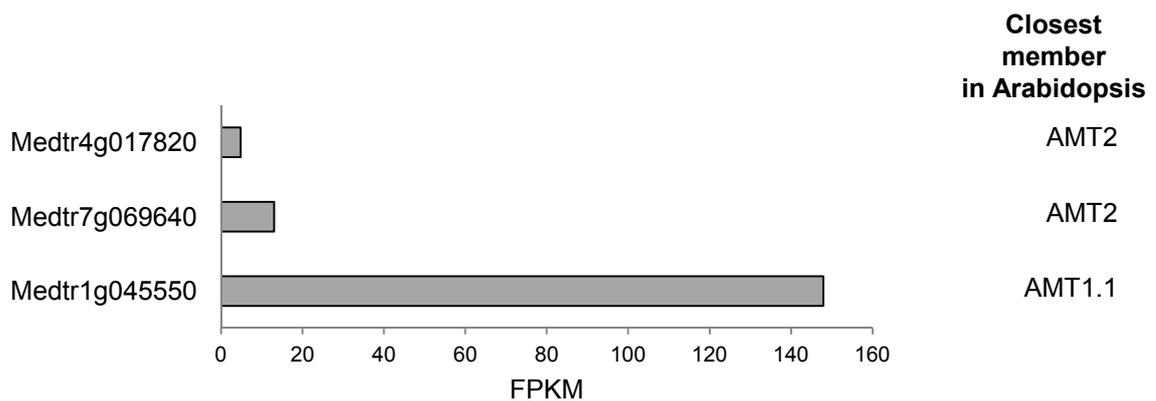
**Figure S5: Members of the Nitrate Transporter 1/Peptide Transporter family (NPF) expressed in *Medicago truncatula* root hairs. (A) Phylogenetic relationship of *A. thaliana* and *M. truncatula* NPF proteins. When available, alternative names are provided. For the sake of clarity, *M. truncatula* NPF members whose genes are not expressed in root hairs (FPKM value < 1; see Table S2) were not included in this phylogenetic tree. Genes expressed in root hairs (FPKM value  $\geq$  1; see Table S2) are labeled with colored circles: red, green and black circles correspond to genes induced, repressed or not regulated by the NF treatments, respectively. (B) Relative expression (in FPKM) of *M. truncatula* NPF genes in control root hairs.**



**Figure S6: The NRT2 nitrate transporter family in *Medicago truncatula* and its members displaying expression in root hairs. (A)** Phylogenetic relationship of *A. thaliana* and *M. truncatula* NRT2 proteins. Genes expressed in root hairs (FPKM value  $\geq 1$ ; see Table S2) are labeled with colored circles: red and black circles correspond to genes induced or not regulated by NF treatments, respectively. **(B)** Relative expression (in FPKM) of *M. truncatula* NRT2 genes in control root hairs.

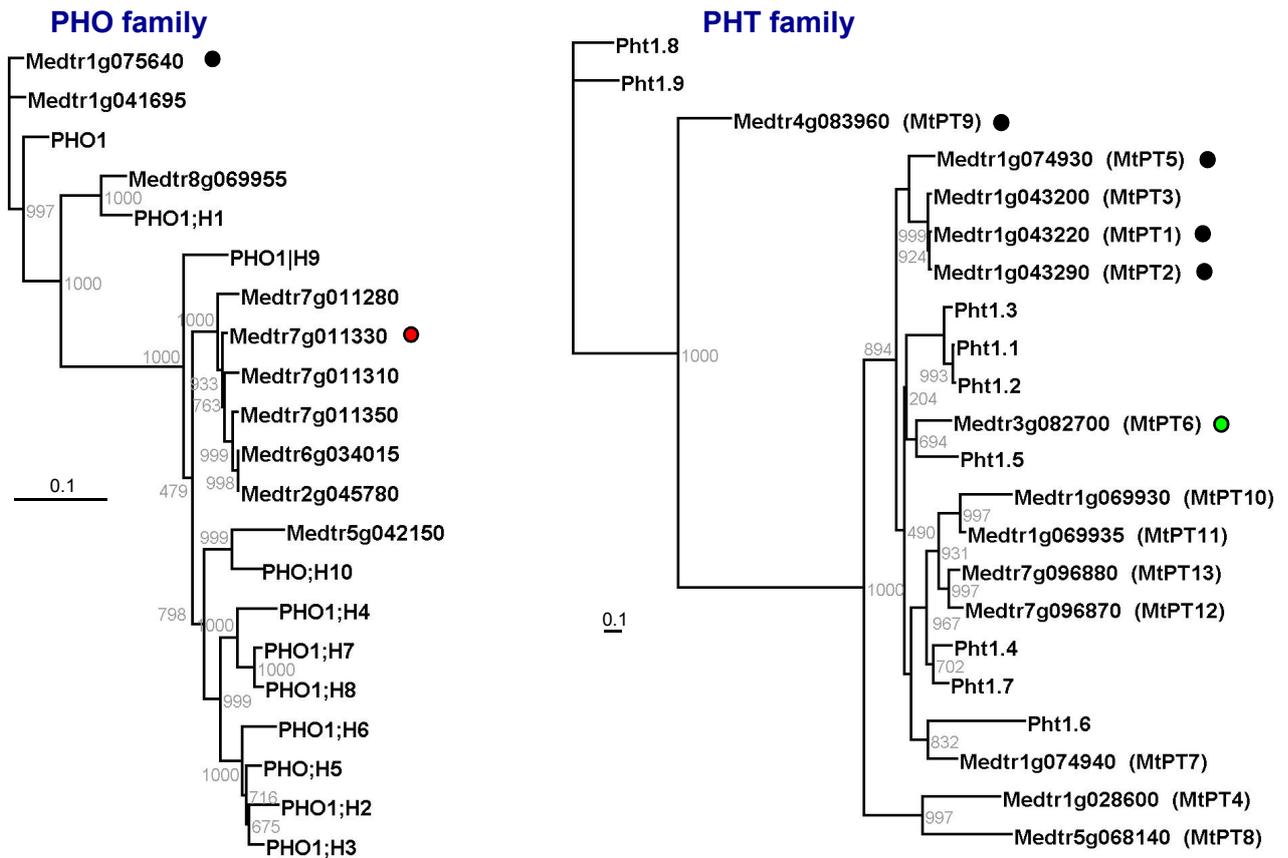


**Figure S7: The NRT3 nitrate transporter family in *Medicago truncatula* and its members displaying expression in root hairs. (A)** Phylogenetic relationship of *A. thaliana* and *M. truncatula* NRT3 proteins. Genes expressed in root hairs (FPKM value  $\geq 1$ ; see Table S2) are labeled with colored circles: red and black circles correspond to genes induced or not regulated by the NF treatments, respectively. **(B)** Relative expression (in FPKM) of *M. truncatula* NRT3 genes in control root hairs.

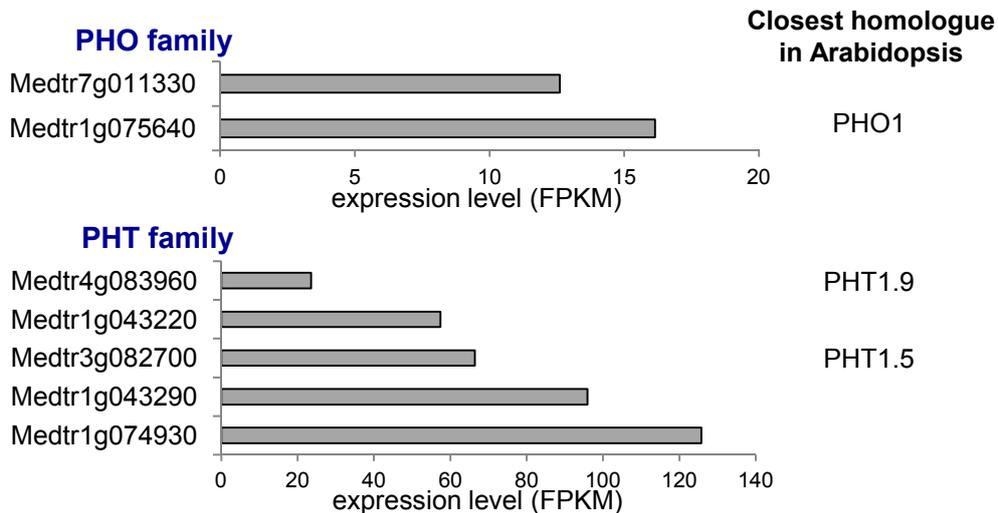
**A****B**

**Figure S8: The AMT ammonium transporter family in *Medicago truncatula* and its members displaying expression in root hairs. (A)** Phylogenetic relationship of *A. thaliana* and *M. truncatula* AMT proteins. Genes expressed in root hairs (FPKM value  $\geq 1$ ; see Table S2) are labeled with colored circles: red, green and black circles correspond to genes induced, repressed or not regulated by the NF treatments, respectively. **(B)** Relative expression (in FPKM) of *M. truncatula* AMT genes in control root hairs.

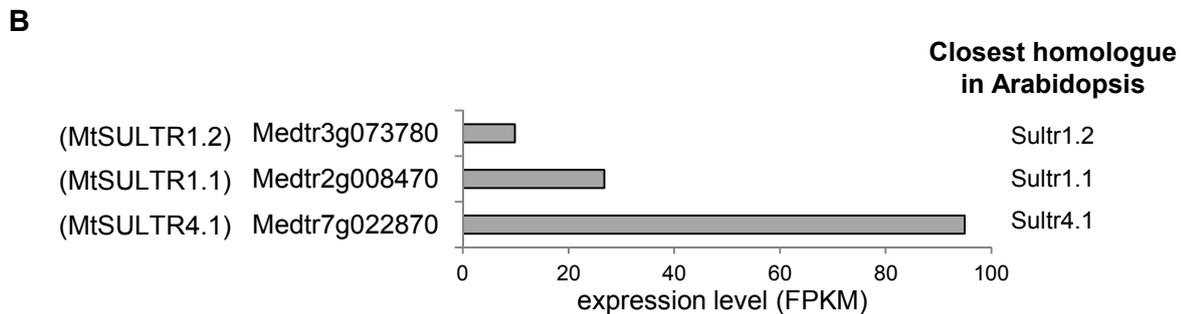
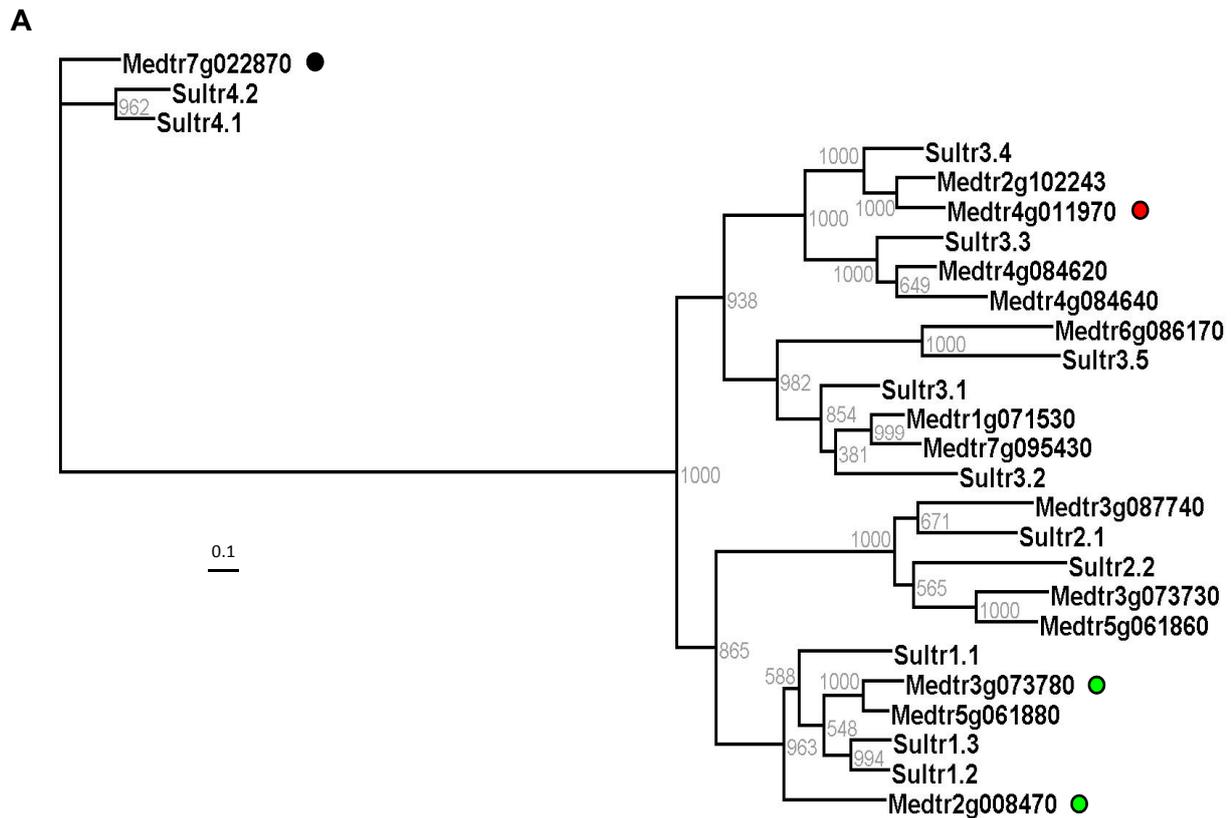
**A**



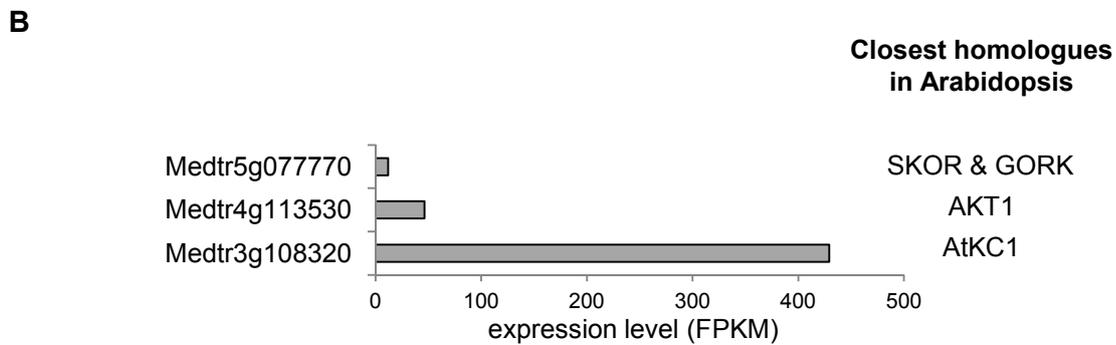
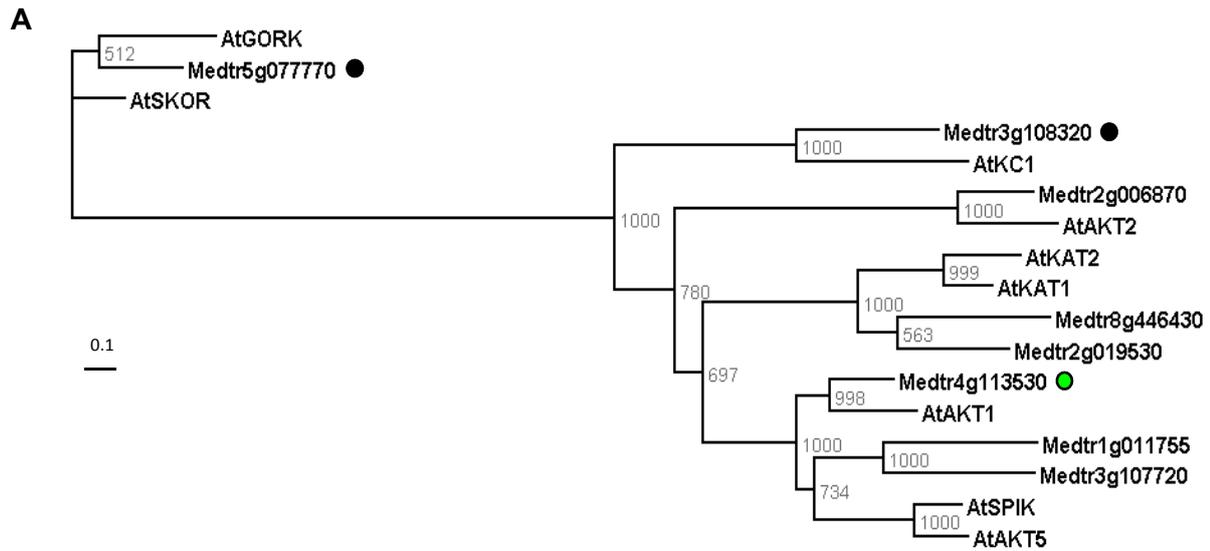
**B**



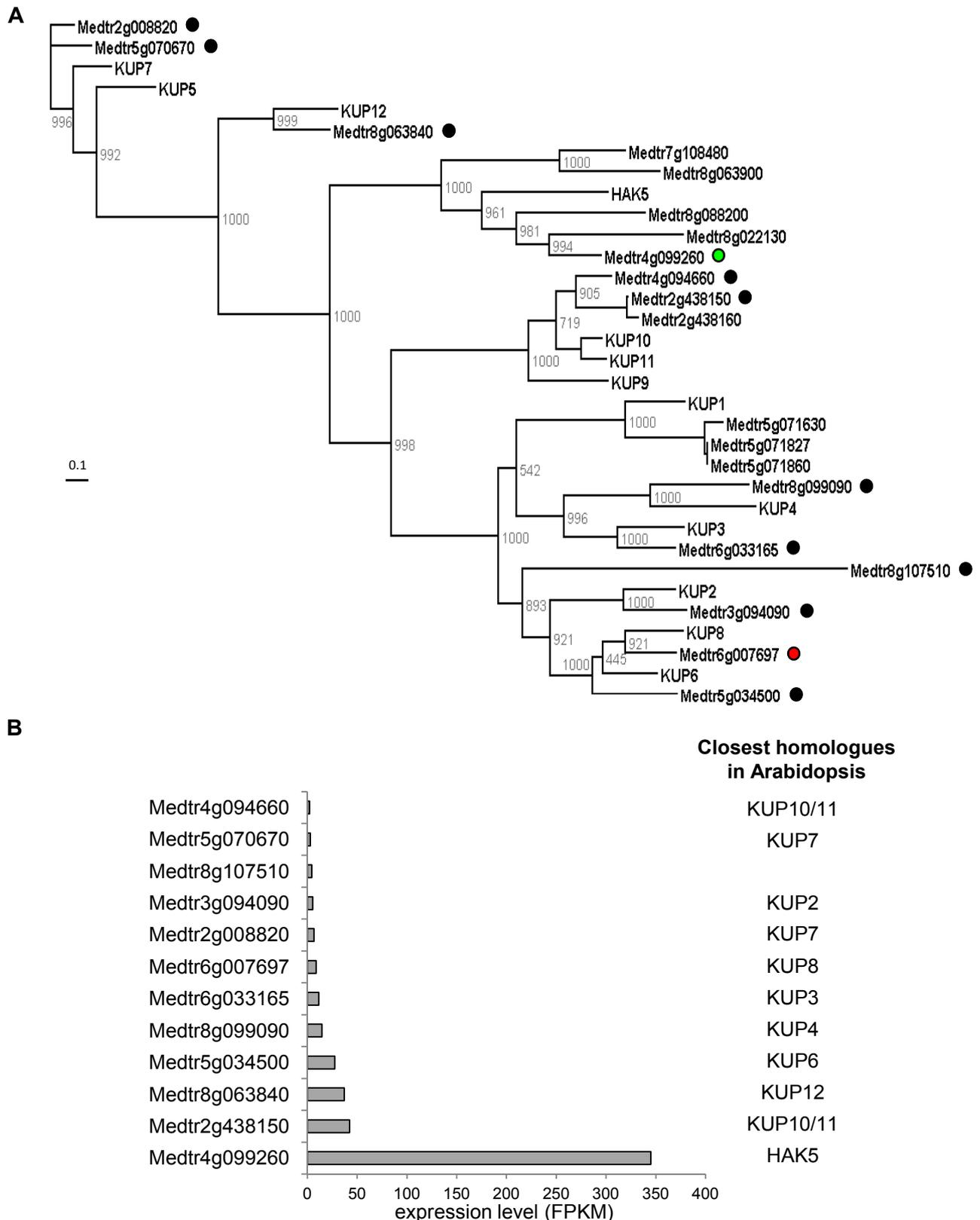
**Figure S9: The PHT1 and PHO1 phosphate transporter families in *Medicago truncatula* and their members displaying expression in root hairs. (A)** Phylogenetic relationship of *A. thaliana* and *M. truncatula* PHO1 (left panel) and PHT1 (right panel) proteins. Genes expressed in root hairs (FPKM value  $\geq 1$ ; see Table S2) are labeled with colored circles: red, green and black circles correspond to genes induced, repressed or not regulated by the NF treatments, respectively. **(B)** Relative expression (expressed in FPKM) of *M. truncatula* PHO1 (upper panel) and PHT1 (lower panel) genes in control root hairs.



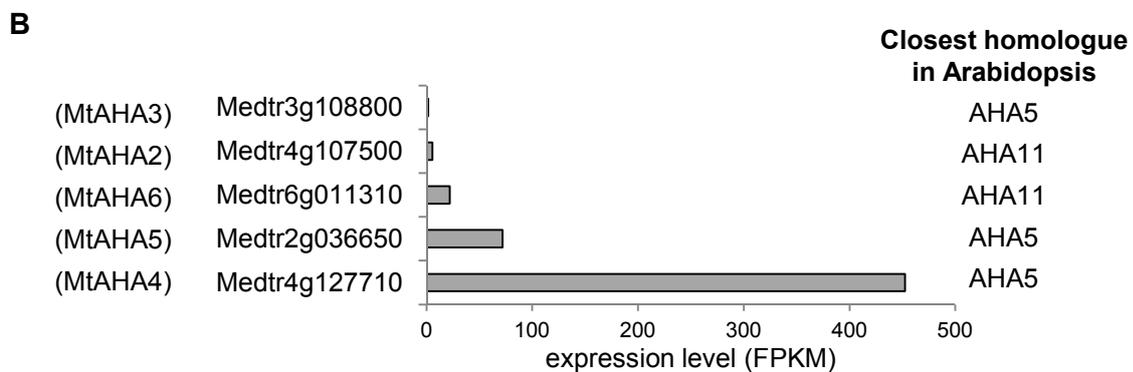
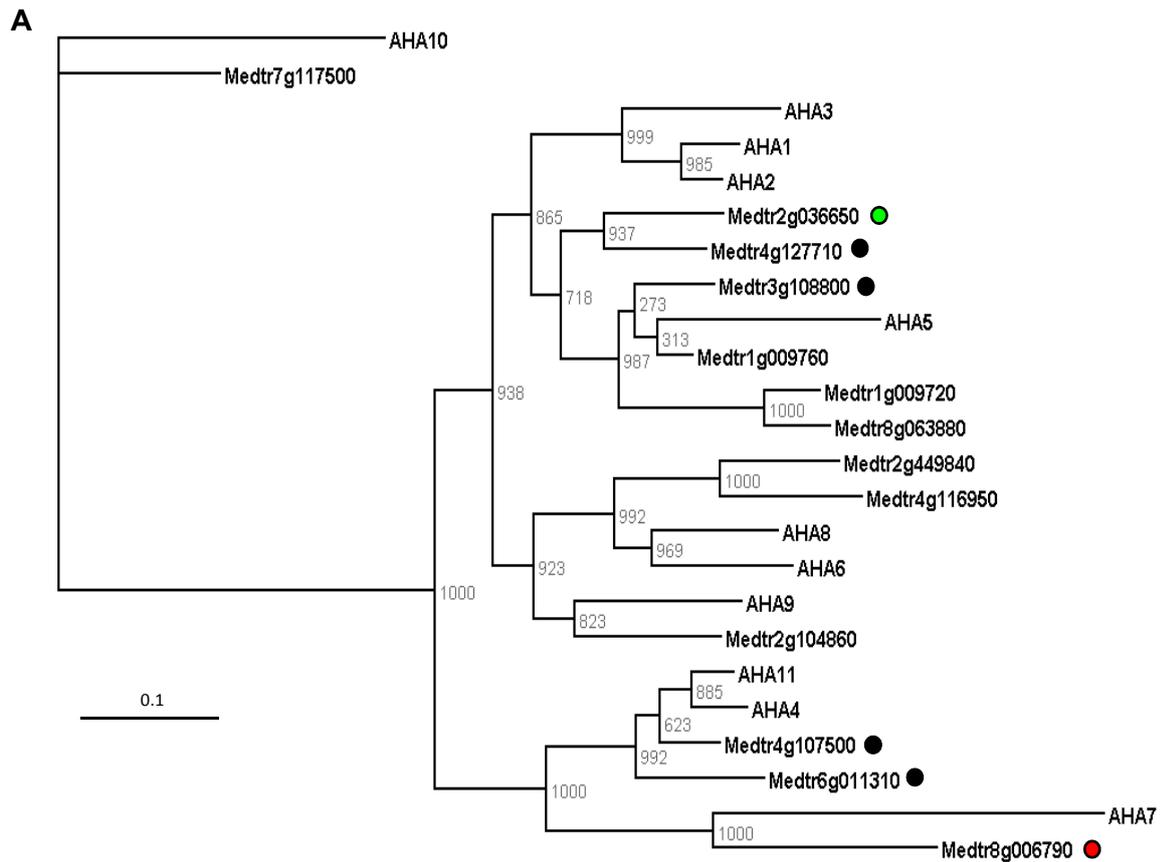
**Figure S10: The SULTR sulfate transporter family in *Medicago truncatula* and its members displaying expression in root hairs. (A) Phylogenetic relationship of *A. thaliana* and *M. truncatula* SULTR proteins. Genes expressed in root hairs (FPKM value  $\geq 1$ ; see Table S2) are labeled with colored circles: red, green and black circles correspond to genes induced, repressed or not regulated by the NF treatments, respectively. (B) Relative expression (in FPKM) of *M. truncatula* SULTR genes in control root hairs.**



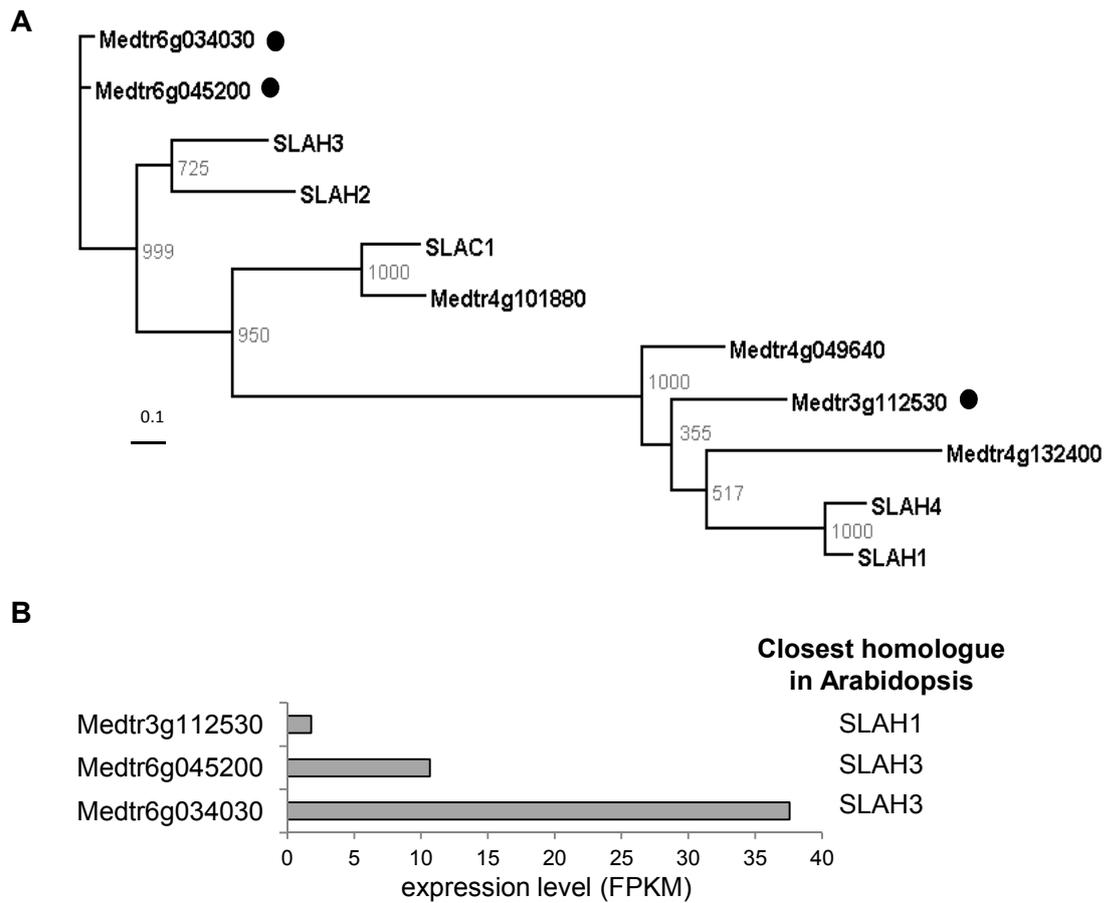
**Figure S11: The Shaker potassium channel family in *Medicago truncatula* and its members displaying expression in root hairs. (A)** Phylogenetic relationship of *A. thaliana* and *M. truncatula* Shaker proteins. Genes expressed in root hairs (FPKM value  $\geq 1$ ; see Table S2) are labeled with colored circles: green and black circles correspond to genes repressed or not regulated by the NF treatments, respectively. **(B)** Relative expression (in FPKM) of *M. truncatula* Shaker genes in control root hairs.



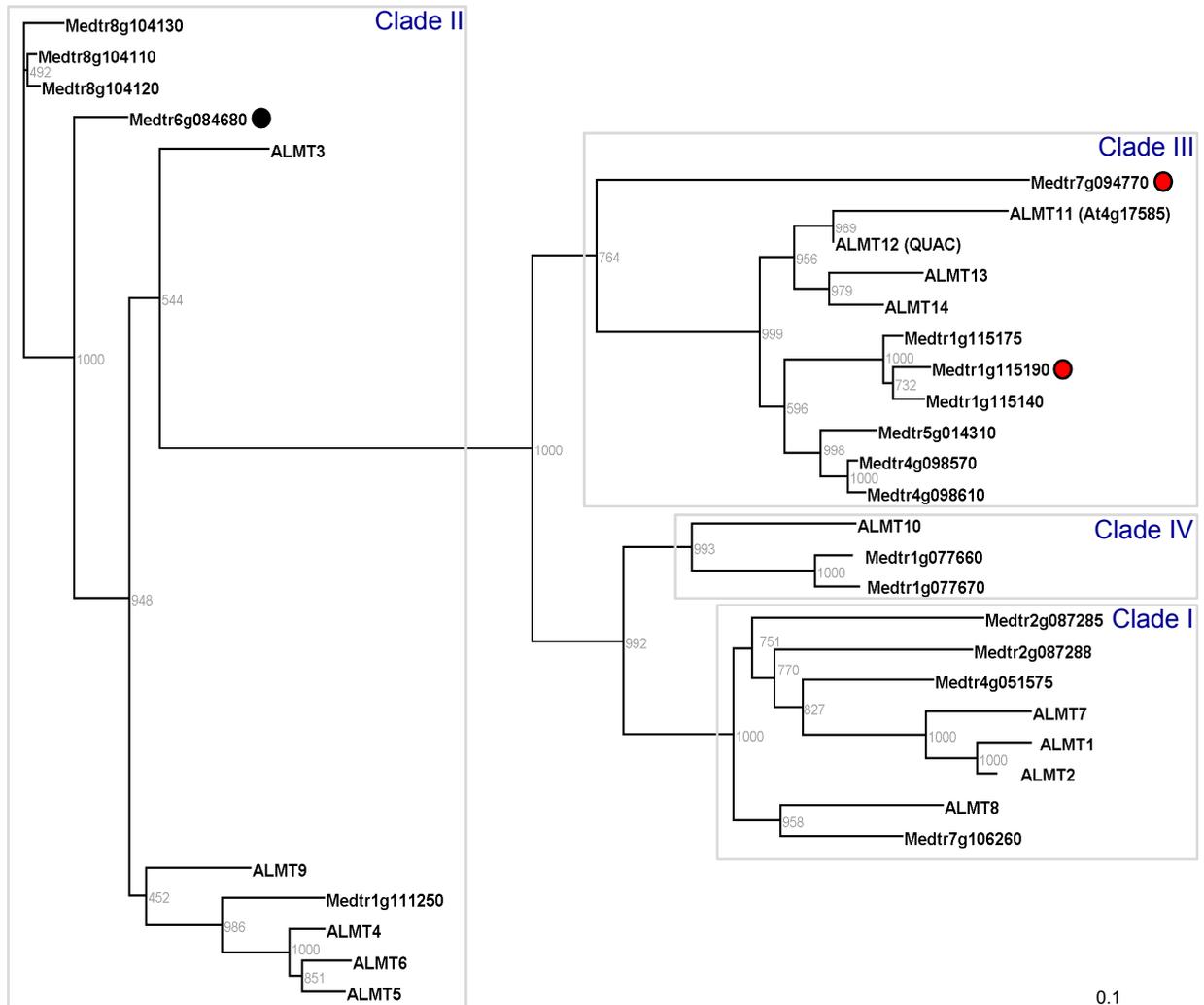
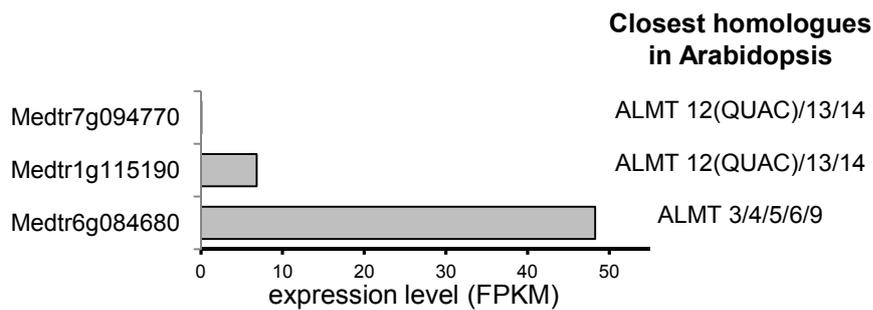
**Figure S12: The HAK/KUP/KT potassium transporter family in *Medicago truncatula* genome and its members displaying expression in root hairs. (A)** Phylogenetic relationship of *A. thaliana* and *M. truncatula* HAK/KUP/KT proteins. Genes expressed in root hairs (FPKM value  $\geq 1$ ; see Table S2) are labeled with colored circles: red, green and black circles correspond to genes induced, repressed or not regulated by the NF treatments, respectively. **(B)** Relative expression (in FPKM) of *M. truncatula* HAK/KUP/KT genes in control root hairs.



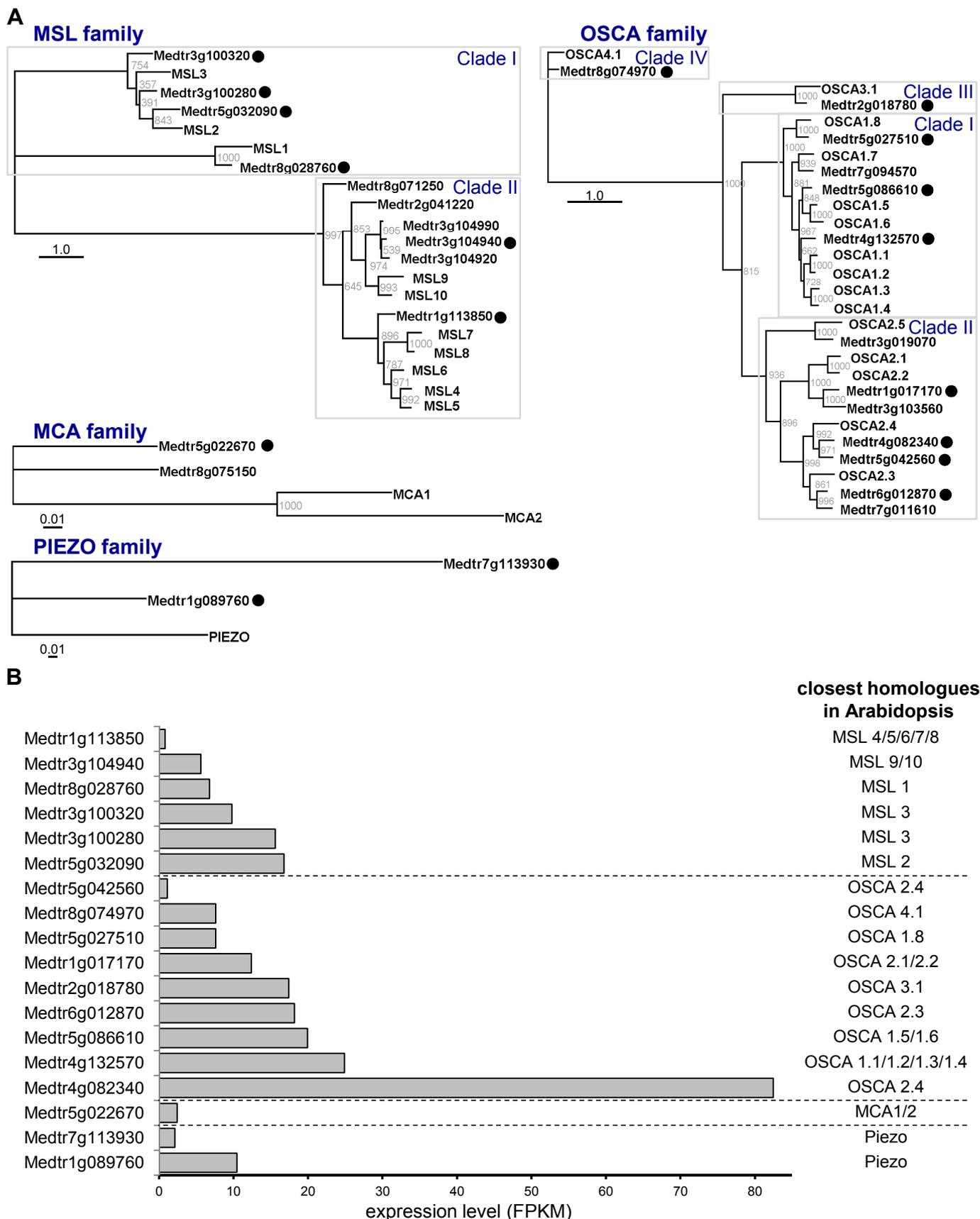
**Figure S13: The AHA proton pump family in *Medicago truncatula* and its members displaying expression in root hairs. (A)** Phylogenetic relationship of *A. thaliana* and *M. truncatula* AHA proteins. Genes expressed in root hairs (FPKM value  $\geq 1$ ; see Table S2) are labeled with colored circles: red, green and black circles correspond to genes induced, repressed or not regulated by the NF treatments, respectively. **(B)** Relative expression (in FPKM) of *M. truncatula* AHA genes in control root hairs.



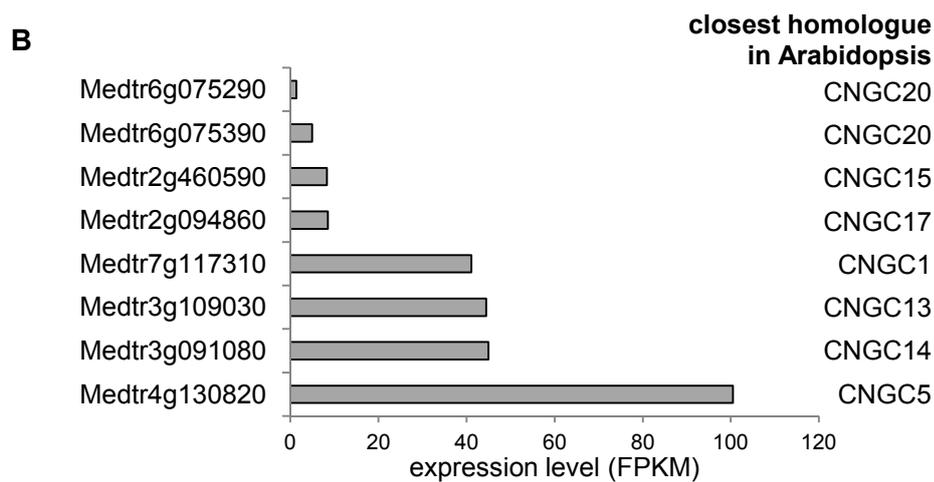
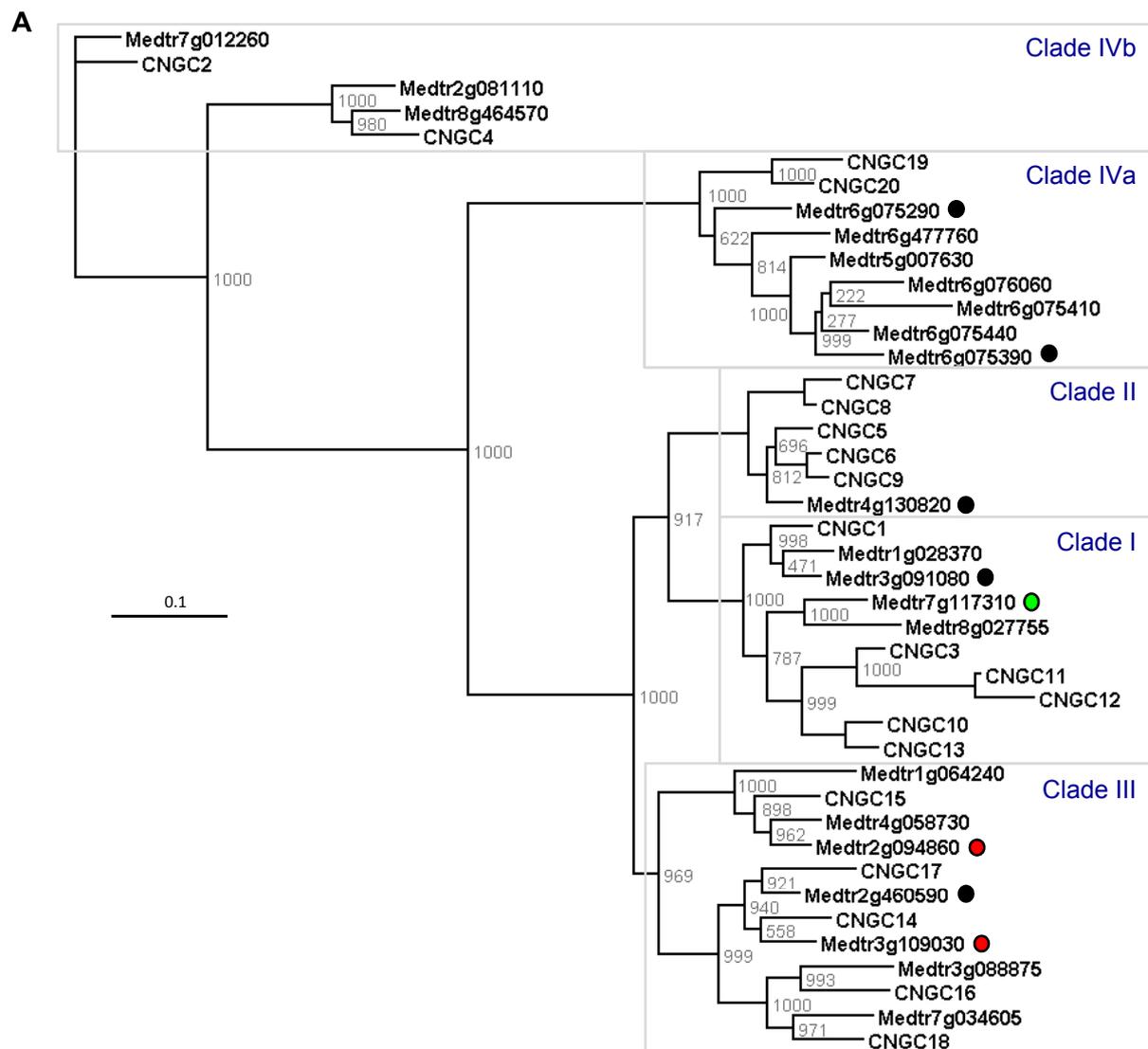
**Figure S14: The SLAC anion channel family in *Medicago truncatula* and its members displaying expression in root hairs. (A)** Phylogenetic relationship of *A. thaliana* and *M. truncatula* SLAC proteins. Genes expressed in root hairs (FPKM value  $\geq 1$ ; see Table S2) are labeled with black circles (not regulated by NF treatments). **(B)** Relative expression (in FPKM) of *M. truncatula* SLAC genes in control root hairs.

**A****B**

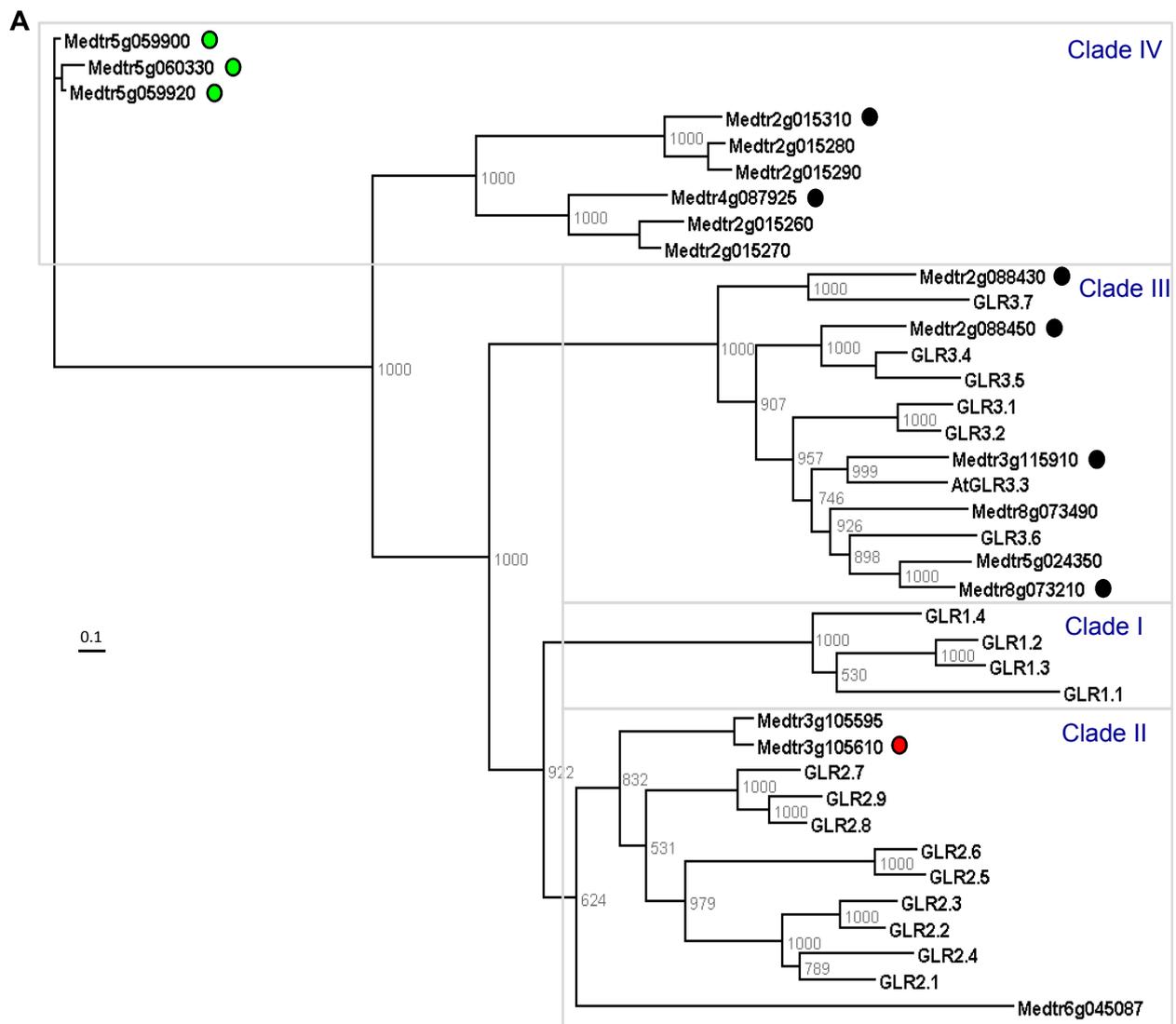
**Figure S15: The ALMT anion channel family in *Medicago truncatula* and its members displaying expression in root hairs. (A) Phylogenetic relationship of *A. thaliana* and *M. truncatula* ALMT channels. Genes expressed in root hairs (FPKM value  $\geq 1$ ; see Table S2) are labeled with colored circles: red and black circles correspond to genes induced not regulated by the NF treatments, respectively. (B) Relative expression (in FPKM) of *M. truncatula* ALMT genes in control root hairs.**



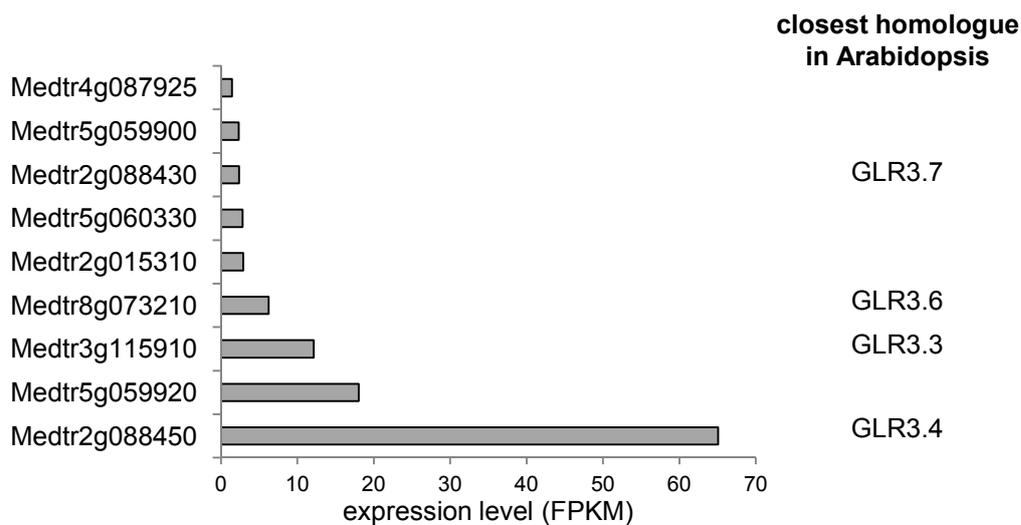
**Figure S16: Mechanosensitive and osmosensitive channels identified in the *Medicago truncatula* genome and its members displaying expression in root hairs.** (A) Phylogenetic relationship of MSL (upper left panel), OSCA (upper right panel), MCA (middle panel) and PIEZO (lower panel) channels in *A. thaliana* and *M. truncatula*. Genes expressed in root hairs (FPKM value  $\geq 1$ ; see Table S2) are labeled with black circles (not regulated by NF treatments). (B) Relative expression (in FPKM) of *M. truncatula* MSL, OSCA, MCA and Piezo genes in control root hairs.



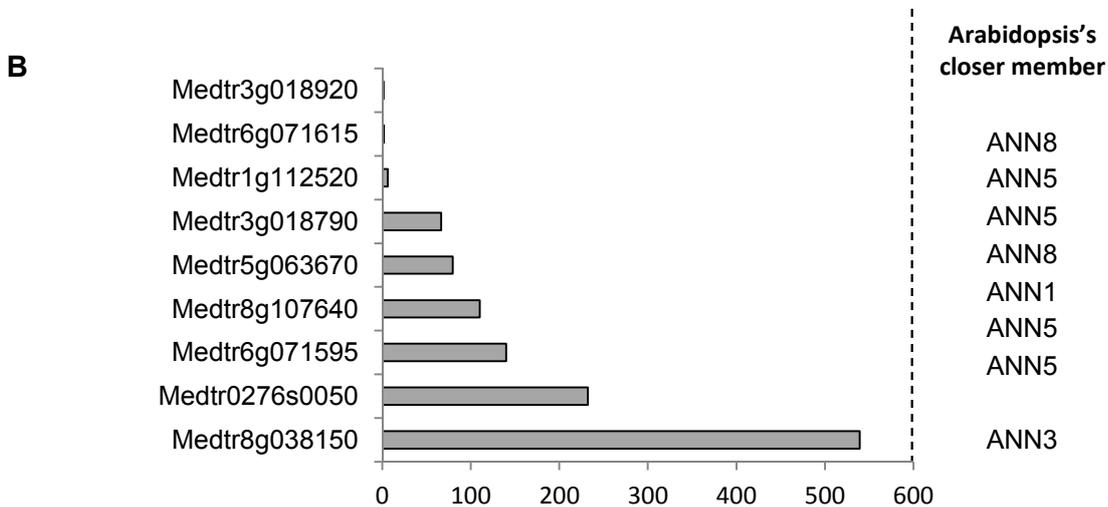
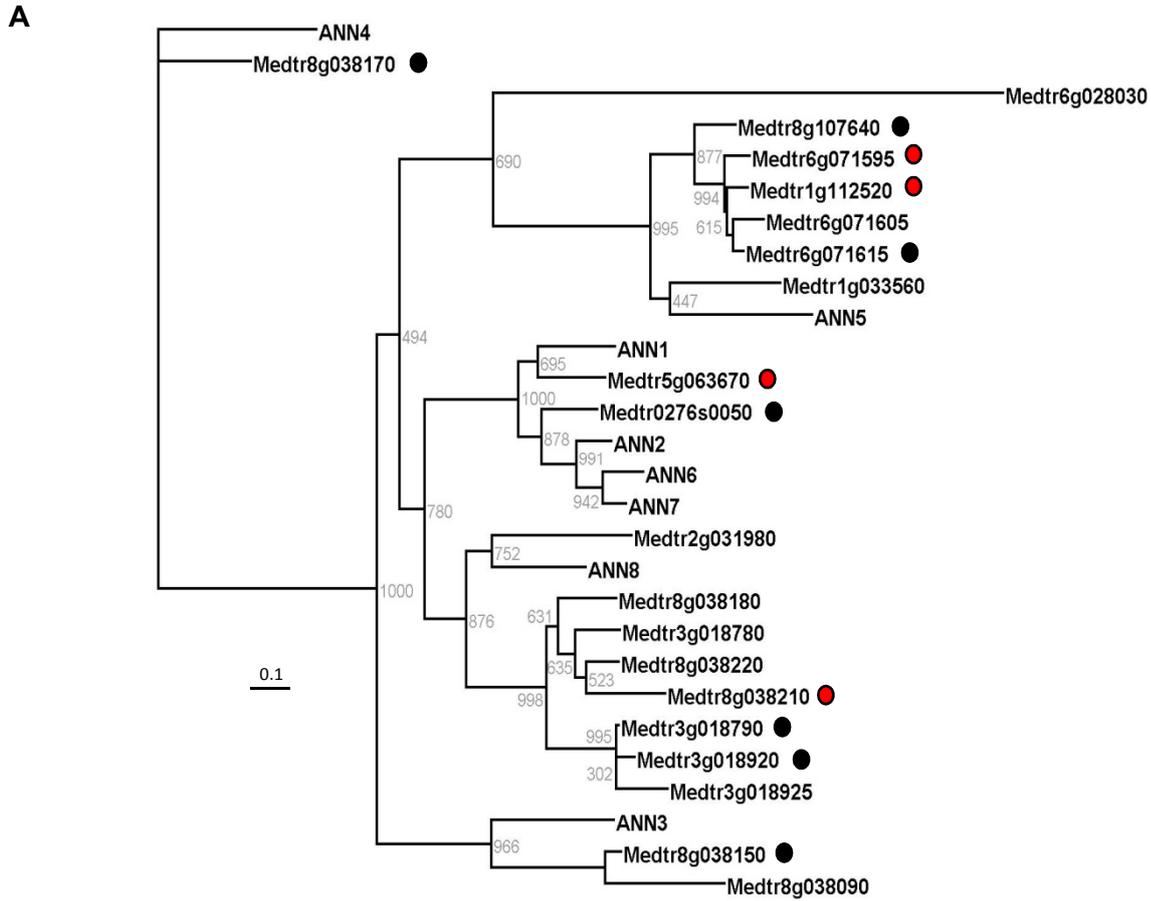
**Figure S17: The CNGC ion channel family in *Medicago truncatula* and its members displaying expression in root hairs. (A) Phylogenetic relationship of *A. thaliana* and *M. truncatula* CNGC proteins. Genes expressed in root hairs (FPKM value  $\geq 1$ ; see Table S2) are labeled with colored circles: red, green and black circles correspond to genes induced, repressed or not regulated by the NF treatments, respectively. (B) Relative expression (in FPKM) of *M. truncatula* CNGC genes in control root hairs.**



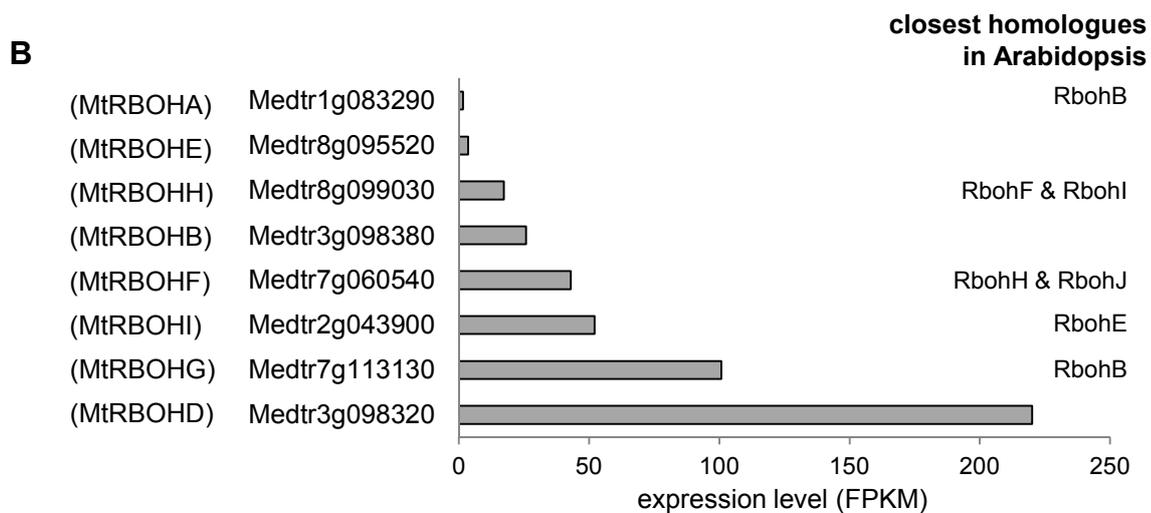
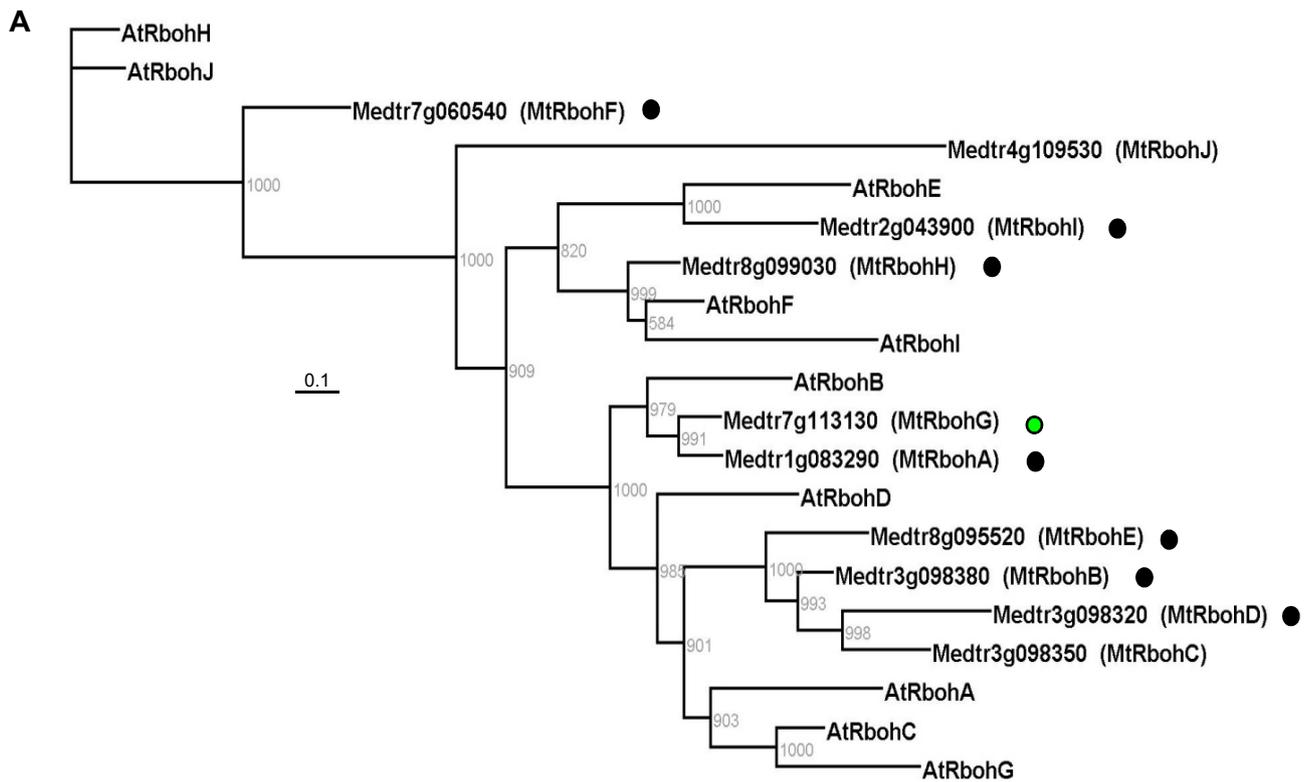
**B**



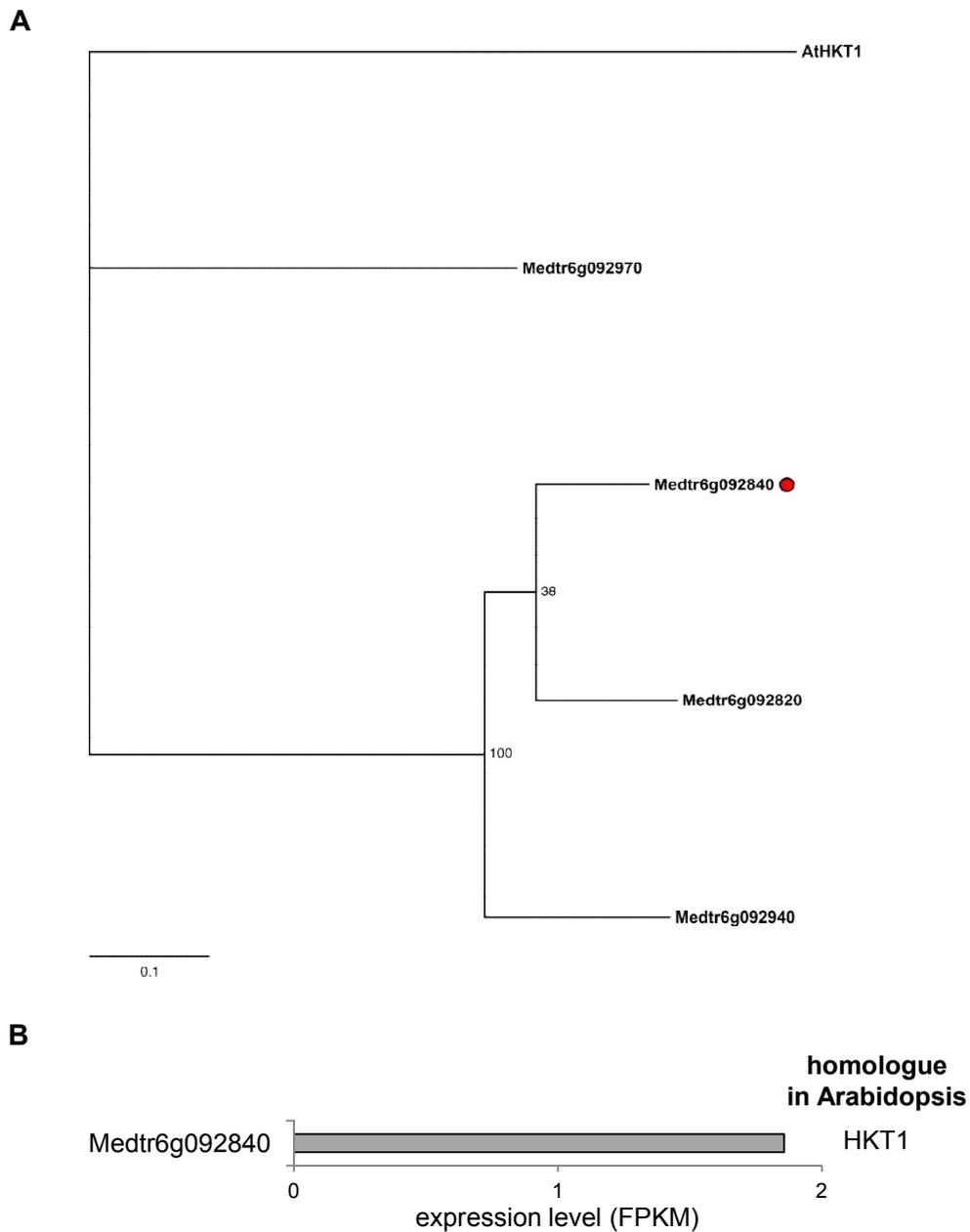
**Figure S18: The GLR ion channel family in *Medicago truncatula* and its members displaying expression in root hairs. (A)** Phylogenetic relationship of *A. thaliana* and *M. truncatula* GLR proteins. Genes expressed in root hairs (FPKM value  $\geq 1$ ; see Table S2) are labeled with colored circles: red, green and black circles correspond to genes induced, repressed or not regulated by the NF treatments, respectively. **(B)** Relative expression (in FPKM) of *M. truncatula* GLR genes in control root hairs.



**Figure S19: The ANN gene family in *Medicago truncatula* and its members displaying expression in root hairs. (A) Phylogenetic relationship of *A. thaliana* and *M. truncatula* ANN proteins. Genes expressed in root hairs (FPKM value  $\geq 1$ ; see Table S2) are labeled with colored circles: red and black circles correspond to genes induced or not regulated by the NF treatments, respectively. (B) Relative expression (in FPKM) of *M. truncatula* ANN genes in control root hairs.**



**Figure S20: The NADPH oxidase family in *Medicago truncatula* and its members displaying expression in root hairs. (A)** Phylogenetic relationship of *A. thaliana* and *M. truncatula* RBOH proteins. Genes expressed in root hairs (FPKM value  $\geq 1$ ; see Table S2) are labeled with colored circles: green and black circles correspond to genes repressed or not regulated by the NF treatments, respectively. **(B)** Relative expression (in FPKM) of *M. truncatula* RBOH genes in control root hairs.



**Figure S21: The HKT transporter family in *Medicago truncatula*. (A)** Phylogenetic relationship of, *A. thaliana* and *M. truncatula* HKT proteins. Red circle: gene expressed in root hairs (>1 FPKM). This gene is induced by NF treatment. **(B)** Relative expression (in FPKM) of this gene in control root hairs.

**Article 2. Mechanosensitive MSL10 channels mediate oscillatory perception in plant**

Auteurs:

D. Tran, T. Girault, **M. Guichard**, N. Leblanc-Fournier, B. Moulia, E. de Langre, J.M. Allain and J.M. Frachisse

Date de publication:

Soumis

Revue:

*Nature Communications*

# Mechanosensitive MSL10 channels mediate oscillatory perception in plant

Authors

Daniel Tran<sup>1</sup>, Tiffanie Girault<sup>1</sup>, Marjorie Guichard<sup>1</sup>, Nathalie Leblanc-Fournier<sup>2,3</sup>, Bruno Moulia<sup>2,3</sup>, Emmanuel de Langre<sup>4</sup>, Jean-Marc Allain<sup>5,6</sup>, Jean-Marie Frachisse<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CEA, CNRS, Université Paris-Sud, Sciences Plant Saclay, Avenue de la Terrasse, 91198 Gif sur Yvette Cedex, France

<sup>2</sup> INRA, UMR 547 PIAF, F-63100 Clermont-Ferrand, France

<sup>3</sup> Clermont Université, Université Blaise Pascal, UMR 547 PIAF, F-63100 Clermont-Ferrand, France

<sup>4</sup> LadHyX, Ecole Polytechnique, Palaiseau, 91128 Cedex, France

<sup>5</sup> LMS, Ecole Polytechnique, CNRS, Université Paris-Saclay, Palaiseau, France

<sup>6</sup> Inria, Université Paris-Saclay, Palaiseau, France

Key words:

Mechanosensitive channel, mechanosensing, mechanotransduction, oscillation, frequency, plant

\*Correspondence:

Jean-Marie Frachisse

Institute for Integrative Biology of the Cell

Saclay Plant Sciences, CNRS

Avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette, France

jean-marie.frachisse@i2bc.paris-saclay.fr

27 **Abstract**

28 **Count:**

29 All cells and organisms experience mechanical forces. For non-aquatic plants, wind is the major  
30 environmental abiotic source of recurring oscillatory mechanical load. Mechanical stimulations  
31 induce short-term cellular responses, leading to mechanoresponsive gene activation<sup>1</sup> followed  
32 by long-term responses permitting structural reinforcement at the whole-plant level<sup>2</sup>. We show  
33 that the Mechanosensitive channel Small conductance-Like 10 (MSL10) contributes to  
34 oscillation perception in plants. This channel responds to pulsed membrane stretching with  
35 rapid activation and relaxation. Furthermore, oscillatory pressure stimulation modulates its  
36 activity, with increased open probability upon oscillatory than during sustained stimulation. At  
37 the plant level, loading the Arabidopsis stem with oscillatory mechanical stimulation induces  
38 MSL10-dependent upregulation of the mechanoresponsive *ZAT7* gene. Our results demonstrate  
39 that MSL10 is a sensor component that detects oscillatory deformation at the molecular-scale,  
40 and is relevant for signal transduction. It is, to our knowledge, the first example of a  
41 mechanosensor involved in early oscillatory perception in plants.

42

43

44

45

46 **1. Main Text**

47 While animals can escape unfavorable environment condition, plants and all other sessile  
48 organisms must resist and adapt to biotic and abiotic stresses. Wind represents one of the most  
49 commonly experienced mechanical abiotic stresses<sup>3</sup> to which plants are exposed. When  
50 exposed to moderate winds, plant stems oscillate at frequencies ranging from 1 to 3 Hz<sup>4</sup>,  
51 according to their physical characteristics (architecture, branching, mass and stiffness). In

52 response to these repeated mechanical cues, plants adjust their growth and remodel their cell  
53 walls<sup>5-7</sup>. This process, called thigmomorphogenesis, results in increased radial growth<sup>8</sup> and root  
54 biomass<sup>9,10</sup>, and in decreased height<sup>2,10</sup>. This is thought to be an acclimation process improving  
55 the plants resistance to repeated mechanical stresses. Still, the cellular perception and  
56 transduction of such recurring environmental, global, mechanical signals is an open question in  
57 plants, among living organisms.

58 It is thought that in plants, structural compartments such as the cell wall, the plasma membrane  
59 and the cytoskeleton<sup>11</sup> are involved in mechanoperception, and that mechanotransduction is  
60 achieved through proteins able to change their conformation when submitted to the mechanical  
61 stresses transmitted into these compartments from the whole plant loading. In turn,  
62 mechanically-switched proteins induce downstream mechanoresponsive signaling cascades.

63 Although mechanical signal transduction is an emerging research area in the plant field, some  
64 candidate players already stand out. One can cite for example serine-threonine protein kinases  
65 associated with the cell wall<sup>12</sup>, members of the large family of membrane-localized Receptor-  
66 Like Kinases<sup>13</sup>, and mechanosensitive (MS) channels embedded in the membrane<sup>14</sup>. Originally,  
67 the most extensively described mechanosensitive channels are the MS channel of Large  
68 conductance/Small conductance (MscL and MscS) from *E. coli*<sup>21</sup>. The open probability of these  
69 channels depends on the membrane tension<sup>22,23</sup>, and under hypoosmotic shock, they allow an  
70 osmolytes release and thus enable bacteria to adapt to the new osmotic condition<sup>14,24</sup>. In  
71 animals, patch clamp combined with molecular approaches have identified channels  
72 responsible for touch and pain sensations<sup>27,28</sup>, such as members of the Transient Receptor  
73 Potential (TRP)<sup>15</sup>, Piezo<sup>16</sup> and TREK<sup>17</sup> families. Although several members of these three  
74 families were shown to be directly gated by membrane tension<sup>17-20</sup>, whether they need or not  
75 *in vivo* other structural elements to tune their mechano-sensibility is still under investigation.  
76 Recently, mechanosensitive channels belonging to TREK and Piezo families have been also

77 characterized in details<sup>17,25,26</sup>. In plants, members of the recently identified MscS-Like (MSL)  
78 family were shown in Arabidopsis to be more permeant for anion than cation and to allow *in*  
79 *planta* Cl<sup>-</sup> efflux upon membrane stretching<sup>29,30</sup>.

80 So far, studies have focused on static stretching of the channels. In animals, transduction of  
81 vibrational stimulation is achieved by mechanosensitive channels<sup>31</sup> in organs with specialized  
82 structures (such as the ear) to separate spatially the different frequencies. It remains unclear  
83 how oscillatory stimulation is processed in plants. Because MSL channels are mechanically-  
84 activated and are crucial in early signaling events, we investigated whether the MSL10 channel  
85 is involved in the perception of oscillation stimuli. To do so, we studied the response of the  
86 channel itself at the cellular level through pulsed and oscillating pressure loads in "patch-clamp"  
87 condition. Then, we showed at the plant level that the channel is indeed well located to  
88 perceived loading in the stem. Finally, we showed that ZAT7 gene expression is increased by  
89 oscillating loadings, under the control of MSL10 channel.

90

## 91 **Results**

92 **Kinetics characterization of MSL10 in response to pressure step.** In order to know how fast  
93 MSL10 responds to rapid variations in membrane mechanical tension, we performed a kinetics  
94 study of this channel with the patch clamp technique. To specifically monitor MSL10 activity  
95 in its endogenous environment, we expressed the channel in protoplasts released from calli  
96 derived from a low-background homologous system, a quintuple mutant ( $\Delta 5$ ) lacking the  
97 activity of five MSL-encoding genes (*mssl4;mssl5;mssl6;mssl9;mssl10*) (Fig. 1a). We recorded  
98 mechanically-activated currents from *MSL10*-expressing protoplasts ( $\Delta 5+MSL10$ ) by applying  
99 squared pulses of pressure whilst monitoring transmembrane currents at a constant voltage (-  
100 186mV) on a membrane patch. We used excised patch in order to limit the number of channels  
101 recorded and to be able to apply a large range of pressuring order to determine accurately the

102 response of the channel toward pressure stimulation. We preferred outside-out patches since  
103 this configuration was the most stable and allowed long lasting records. Opening of a single  
104 stretch-activated channel caused a current variation of  $19.4 \pm 1.7$  pA (Fig. 1a, n=14) as reported  
105 in root protoplasts expressing MSL10<sup>30,32</sup>. The activation of these current was found to be faster  
106 as the pressure increased, with a time constant  $\tau_{act}$  ranging from 200 to 2000 ms for a pressure  
107 range of 30 to 80mmHg (Fig. 1b and Extended Data Fig. 1, n = 15). As already reported by  
108 Maksaev *et al.*<sup>29</sup> MSL10 display slow time constant activation compared with the 10 ms range  
109 time constant from *E. coli* MscS<sup>33</sup>. The current-pressure relationship representing the MSL10  
110 channel sensitivity to membrane tension is well described by a Boltzmann function with a  
111 pressure for half-activation ( $P_{0.5}$ ) of  $49.3 \pm 3.4$  mmHg, an activation threshold of about 30  
112 mmHg and a saturation pressure of about 70 mmHg (Fig.1c and Extended Data Fig. 2a-c).

113

114 **MSL10 enables the perception of oscillatory stimulations.** We then characterized the  
115 response of the MSL10 channel to oscillatory pressure stimulation as a function of the  
116 frequency. Mechanosensitive channels respond to the membrane tension, which itself depends  
117 on the pipette (and patch) geometry<sup>34,35</sup>. Thus, as the membrane geometry is slightly different  
118 from one patch to another in our conditions (Extended Data Fig. 2a and 2d), Boltzmann  
119 functions were determined individually for each patch previously to the oscillatory pressure  
120 stimulation. This allows delivering the oscillatory pressure in the same zone of membrane  
121 tension sensitivity. The amplitude of the oscillation was +15/-15 mmHg from a mean-pressure  
122 baseline that we choose slightly below the  $P_{0.5}$  (Fig. 2a),  $P_{0.5}$  being a peculiar point in the  
123 Boltzmann relationship which has no advantage for our study while being difficult to reach  
124 accurately. MSL10 channel activity could be recorded at a wide range of frequencies from 0.3  
125 to 30 Hz (Fig. 2a). Whatever the frequency tested, opening events occurred almost exclusively  
126 during the upper phase of the period ( $\geq 80$  % of cases) (Fig. 2b). Nonetheless, at low frequency

127 ( $\leq 1$  Hz), at least one opening transition of the channel was triggered during each period (100  
128 % of cases). In contrast, beyond 3 Hz, the efficiency of each cycle to trigger an opening  
129 transition decreased with increasing frequencies. For example, at 30 Hz, only 20 % of the  
130 periods triggered channel opening (Fig. 2c). Thus, the channel does not open randomly in  
131 response to oscillatory stimulations, even when misfiring of MSL10 is observed beyond 3 Hz.

132 We then undertook a comparison between static and oscillatory stimuli using a protocol  
133 alternating the two types of stimulations (Fig. 3a). Sinusoidal pressure stimulation of a given  
134 frequency was applied for 1 min followed by a static stimulation held at “mean-pressure” for 1  
135 min. The static stimulation that we call “mean-pressure” is the time averaged oscillatory  
136 pressure. Such a protocol allows to apply the same mean-pressure on the membrane during  
137 static or oscillatory stimulation. This protocol was repeated in order to sweep frequency from  
138 0.3 to 30 Hz and then from 30 to 0.3 Hz, allowing to compare the channel activity under  
139 different oscillatory conditions with channel activity under static stimulation. Figure 3b-d  
140 shows relative effect of frequencies (ratios oscillatory/static) on individual patches as  
141 exemplified by a representative recording (Extended Data Fig. 3). For all frequencies, the open  
142 probability ( $NP(o)$ ) was 0.5 to 5.2 times higher during oscillatory pressure stimuli than during  
143 static pressure and for each frequency the mean  $NP(o)$  is significantly higher upon dynamic  
144 than static stimulation, while the pressure applied was on average the same (Fig. 3b; red  
145 asterisks, Mann-Whitney Rank Sum Test,  $p \leq 0.05$ ). A difference peaking is observed at low  
146 frequency (0.3, 1 and 3 Hz) compared with highest frequency of 30 Hz (Fig; 3b, green asterisks,  
147 Mann-Whitney Rank Sum Test,  $p \leq 0.05$ ; and Extended Data Fig. 3). The increase in  $NP(o)$  of  
148 the channel during oscillations is consistent with a modification in the equilibrium closed/open  
149 states of the channel. In order to further characterize the opening and closing oscillation  
150 dependency of MSL10, we have also compared time constant obtained either in static or  
151 dynamic conditions. We measured a mean open time constant in static condition of  $\tau_{open\ static}$

152 =  $14.7 \pm 1.9$  ms. This time constant is little affected by oscillatory stimulation since  $\tau_{open}$   
153 oscillation relative to static keep close to 1 (Fig. 3c) although there is an increase at 1 and 3 Hz.  
154 However the mean close time constant decreased under oscillatory stimulation from  $\tau_{close}$  Static  
155 =  $164.5 \pm 24.8$  ms to  $\tau_{close}$  Oscillation =  $106.4 \pm 17.6$  ms (all frequencies). This is reflected by  
156 the ratio  $\tau_{close}$  Osc./ $\tau_{close}$  Sta. smaller than 1 (Fig. 3d), pointing to the fact that MSL10 spends  
157 less time in the closed state upon oscillatory stimuli. To get a complete view on the open  
158 probability pressure dependency of MSL 10 we have compared NP(o) (Extended Data Fig. 4a)  
159 under oscillatory pressure stimulation (channels gated by periodic pressure of 4 Hz or 20 Hz )  
160 to NP(o) under static condition corresponding either (i) at the pressure achieved during the  
161 minimum of the oscillation (Mean -15; gating of the channel at static minimum pressure), (ii)  
162 at mean-level pressure (Mean), (iii) or at the pressure achieved during the maximum of the  
163 oscillation (Mean +15; gating of the channel at static maximum pressure). In Extended Data  
164 Fig. 4b, the comparison of the channel activities in different conditions shows: at static low  
165 pressure a decrease of 3.2 of NP(o) relative to Mean, at static high pressure an increase of 3.4  
166 of NP(o) relative to Mean, at two sinusoidal (4 Hz and 20 Hz) pressure an increase of 1.4 and  
167 1.5, respectively, of NP(o) relative to Mean. Although the maximum static pressure is the most  
168 efficient, this set of results corroborates our finding that oscillatory stimulations elicit the  
169 channel with higher efficiencies than a static stimulation with the same average pressure.  
170 Together, our results support the idea that MSL10 responds to oscillatory pressure stimuli by  
171 modulating its activity according to frequency.

172

### 173 **MSL10 is expressed in the floral stem.**

174 In a former study on young Arabidopsis plant, we have shown that the two mechanosensitive  
175 channels MSL9 and MSL10 were mainly expressed in root in overlapping but not identical

176 patterns, while *MSL10* was also present in the leaf vasculature<sup>30</sup>. In our present study,  
177 performed on plant at a later stage, we confirmed<sup>30</sup> that *MSL10* promoter drives the GUS  
178 reporter in the root with higher expression in the tip and in leaves vasculature. We also found  
179 that in addition of the vasculature of the leaves of the rosette, the GUS staining is present  
180 throughout the vasculature of the stem (Fig. 4a,b). Here, in order to determine whether *MSL10*  
181 localization in aerial organs of the plant is compatible with its function of oscillation sensor we  
182 pursue the characterization of *MSL10* gene in the stem. The obtained GUS reporter gene pattern  
183 confirms the expression of the *MSL10* gene in vascular tissues at the bottom of the petioles and  
184 in the intra-rosette stem segment of plants at the reproductive stage (Fig. 4b, c).

185

186 ***MSL10* is required for induction of mechanoresponsive genes in response to oscillatory**  
187 **stimulation.** The function of *MSL10* as an oscillation mechanoreceptor was then tested at the  
188 whole plant level. Touching or bending the rosette of *Arabidopsis* induces the expression of  
189 touch-induced genes<sup>36</sup>. Most of these genes show rapid increases in expression in stimulated  
190 organs. In our study, to mimic the effect of the wind, mechanical oscillatory stimulations at  
191 different frequencies were applied to young floral stems. For this purpose, each plant was  
192 excited by a shaker positioned against to the base of the stem (Fig. 5a). Excitation at 4 Hz  
193 produced higher amplitude motion than at 20 Hz (Extended Data Movie 1) due to the modal  
194 characteristics of the plant linked to the stem mass and stiffness<sup>37</sup>. Since the *MSL10* channel  
195 responds to oscillatory stimulation, we then tested whether *MSL10* is involved in the regulation  
196 of three mechano-responsive genes in the intra-rosette stem segment. Two of them encode for  
197 transcription factors of the C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-zinc finger proteins family (ZAT genes; Kielbowicz-Matuk  
198 2012), they are involved in the signaling pathway induced by biotic- and abiotic stresses, whilst  
199 the third gene named touch gene (*TCH*) encode for Xyloglucan Endotransglycosylase  
200 transcriptionally activated in response to a touch stimulation (38). The basal part of the floral

201 stem together with the collar are area under highest mechanical stress when oscillatory loads  
202 are applied to the stem. To determine whether MSL10 is involved in stem oscillation sensing,  
203 a reverse genetic approach was used. Wild type (WT) plants, quintuple mutant ( $\Delta 5$ ) and  
204 quintuple mutants overexpressing *MSL10* ( $\Delta 5+MSL10$ ) were tested for their responsiveness to  
205 oscillatory stimulation. Intra-rosette stem segment (collar, base of floral stem and leaves  
206 petioles) were collected 30 min after a 1 min oscillatory stimulation of the stem at low or high  
207 frequency (Fig. 5a and Extended Data Movie 1). Figure 5b-d shows that *TCH4*, *ZAT12* and  
208 *ZAT7* transcripts are accumulated in wild-type plants stimulated with 4 Hz and 20 Hz  
209 oscillations. This transcriptional regulation of *ZAT* genes is specific to oscillatory stimuli since  
210 a 1 minute static bending of the stem with the same amplitude (Extended Data Fig. 5a) only  
211 slightly increased the transcript level. On the contrary, the transcript level for *TCH4* gene is  
212 increased moderately under static bending (Extended Data Fig. 5b).  $\Delta 5$  plants show, in response  
213 to oscillation, an upregulation of *TCH4* transcript abundance but no variation in *ZAT7* and  
214 *ZAT12* transcript levels, indicating the requirement of MSL channels for *ZAT* transcription  
215 factor-encoding gene expression (Fig. 5b-d). The overexpression of MSL10 in  $\Delta 5$  mutant did  
216 not change *TCH4* expression induced by oscillatory stimulations (Fig. 5b). The transcriptional  
217 activation of *TCH4* by mechanical oscillations therefore does not require one of the MSL  
218 channels impaired in the  $\Delta 5$  mutant. The upregulation observed for *ZAT12* is not restored by  
219 MSL10 indicating the requirement of other MSL proteins to regulate this transcription factor.  
220 In contrast, the presence of the MSL10 channel restores the upregulation of *ZAT7* expression  
221 in response to oscillatory stimulation (Fig. 5d). The observed regulation of mechanosensitive  
222 gene expression in response to oscillation is consistent with previous work implicating the cell  
223 wall-modifying enzyme TCH4<sup>38,39</sup>, the *ZAT* transcription factor-encoding gene family in  
224 Arabidopsis<sup>36,40-42</sup> and their *ZFP* homologues in poplar<sup>43</sup>, in responses to various mechanical  
225 stresses. Additionally our experiments, performed at plant scale, indicate that the MSL10

226 channel is (i) able to sense oscillations in whole plants and is (ii) required to induce *ZAT7*  
227 expression in response to oscillatory stimulation.

228

## 229 **Discussion**

230 We provide compelling evidences to support the hypothesis that mechanical oscillation  
231 perception in plants is mediated through MSL proteins. In this study, we have shown that  
232 MSL10 channel property confers an oscillation dependency on *ZAT7* transcription, leading to  
233 rapid transcript accumulation in intra-rosette stem segment upon stimulation. At whole plant  
234 level, the finding of *ZAT7* gene transcript accumulation induced by oscillatory stimulation  
235 under MSL10 control is consistent with previous reports implicating transcription factor *ZAT*  
236 gene family, in response to mechanical stress in *Arabidopsis*<sup>36,40-42</sup> and in strain  
237 mechanosensing for the *ZFP* homologous in poplar tree<sup>44</sup>. For *ZAT12* gene, the same oscillatory  
238 stimulation likely requires the presence of either MSL4, MSL5, MSL6 or MSL9 protein to  
239 upregulate this transcription factor. In contrast, the cell wall-modifying enzymes TCH4,  
240 involved in growth<sup>38,39</sup> and transcriptionally activated by mechanical oscillation, do not require  
241 one of the MSL channel impaired in the quintuple mutant. At the single channel level, a direct  
242 mechanical oscillatory stimulation of the membrane increases the open probability of MSL10  
243 (Np(o)) compared to a stationary stimulation. The role proposed for MSL10 in response to  
244 frequency stimulation leads us to consider this channel as “an oscillation transducer”  
245 responding to rapid variations in the membrane tension, while being only weakly dependent of  
246 the frequency in the tested range. At the channel level, viscoelastic properties of the cell wall-  
247 membrane matrix surrounding MSL10 *in cello* might influence the frequency dependency of  
248 the channel. Our finding raises also the question of the relationship between oscillating  
249 membrane tension on the scale of a pipette tip and vibrating an entire plant organ. It is known  
250 that MS channels can be activated by either a tension in the membrane plan or by local bending

251 of the membrane (a leaflet being then under tension and the other being under compression).  
252 We also know that a mechanical stimulation, in order to be efficient (in term of physiological  
253 response) should produce a tissue/cell deformation (Coutand and Moulia; J.Exp.Bot., 2000;  
254 Moulia et al., Front; Plant Sci, 2015). In other hand, a previous study on Arabidopsis<sup>37</sup>  
255 combining sinusoidal sweep excitation with high speed imaging allowed us to estimate several  
256 modal frequencies and the corresponding spatial localizations of deformation. Therefore the  
257 qualitative model that we propose is that tissue/cell deformation induced by mechanical  
258 oscillations will induce local membrane tension able to trigger MSL10 channel. However a full  
259 assessment of this hypothesis requires to work out the full “localization/distribution/intensity”  
260 of the membrane stretching or tensions. That question is currently being investigated in some  
261 laboratories by the mean of “fluorescent tension sensor reporters” but mapping physical  
262 strength at cell and organ level is the matter of a separated study on its own.

263 At organ level, the frequency dependency of transcription factor mRNA regulated upon  
264 MSL10 activation is probably affected by the cell wall-plasma membrane-cytoskeleton  
265 continuum<sup>11</sup> that might damped or amplify frequencies at the cellular level. Finally, our results  
266 also raise the question of the coupling between MSL channel activity and *ZAT7* activation. In  
267 response to oscillation, activation of MSL10 anion permeant channel is favorable generating a  
268 plasma membrane depolarization. The coupling of an initial depolarization with second  
269 messengers triggering raises fundamental questions that cannot be answered yet in the frame of  
270 plant MS channel study, still in its infancy.

271 In conclusion, since plants are often subjected to physical cues in the nature, MSL10 might  
272 represent a molecular component of a fairly general system of oscillatory perception in plants.  
273 Our findings open new avenues for studying the molecular mechanisms involved in frequency  
274 perception that allow environmental adaptation.

275

276 **2. METHODS (1086 words)**

277 **a. Plants**

278 *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia-0 plants were grown on peat pellets (Jiffy-7) under a  
279 16 h light/8 h dark regime at 22 °C (150 μE and 55 % relative humidity). All the experiments  
280 were conducted on 4-week-old plants selected for the homogeneity of their developmental  
281 stage: the height of the main stem varied from 9 cm to 12 cm. These plants were kept under  
282 standard thermal conditions during the experiments. Mechanical oscillatory stimulations were  
283 performed 6–8 h after dawn. Transgenic *Arabidopsis* lines used for histochemical studies and  
284 carrying the *pMSL10::GUS* promoter-reporter gene fusion were obtained previously<sup>30</sup>.

285

286 **b. Mechanical treatment**

287 Mechanical vibration experiments were conducted as described by Der Loughian et al. (2014)<sup>37</sup>.  
288 The method is based on a sinusoidal excitation in frequency. Each plant is excited by a shaker  
289 whose arm is positioned against the stem 1 cm above the collar (Extended Data Movie S1). The  
290 shaker (PCB Piezotronics, K2007E01) is controlled by a low-frequency generator (AIM-TTI,  
291 model TG2000).

292 Since developmental stages differ in terms of mass and stiffness, the excitation was adapted in  
293 terms of frequency range: oscillatory stimulations of 0, 4 or 20 Hz, lasting 60 s, were used for  
294 global and local modes, respectively. The level of excitation, of the order of 0.1 N, was also  
295 adapted to give small amplitude motions around one millimeter. In such experimental  
296 conditions, the deformation of the tissue (bottom of the stem) is slightly dependent of frequency  
297 of the stimulation.

298

299 **c. Quantitative RT-PCR**

300 Plants have a rosette composed of 12 to 14 mature leaves and a floral stem. The 1<sup>st</sup> basal  
301 centimeter (which are under the highest mechanical stress) of the floral stem and all petioles of  
302 Arabidopsis plants together with the collar were separated surgically from the rest of the plant.  
303 Frozen (-80 °C) samples of 2 basal section per biological replicate (20–100 mg) were  
304 homogenized for 1 min at 30 Hz (Retch mixer mill MM301; Retch, Haan, Germany) in 2 ml  
305 tubes containing two tungsten beads (2.5 mm diameter). Total RNA was extracted from  
306 homogenized tissues by using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the  
307 manufacturer protocol. Two micrograms of RNA was treated with Dnase. Total RNA (1 µg)  
308 was reverse transcribed using Superscript III (Invitrogen, Carlsbad, California) and oligo(dT)18  
309 primers, according to the manufacturer protocol. Gene expression was determined by  
310 quantitative real-time PCR (LightCycler; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) by using  
311 gene-specific primers, and LightCycler DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics).  
312 Relative expression levels of tested genes were normalized to the mean of internal controls:  
313 *Actin*<sup>45</sup> and *UP* (expressed protein-encoding)<sup>45</sup> and calculated as previously described<sup>46</sup>. Real-  
314 time PCR amplifications were carried out in triplicate on at least four independent experiments.  
315 *ACT2* fw 5'-GGTAACATTGTGCTCAGTGGTGG', rev 5'-  
316 AACGACCTTAATCTTCATGCT;  
317 *UP* fw 5'-AATTCAAGGGCAAATGGAG, rev 5'-GGTCTGCCTGCCAATATTTTC;  
318 *ZAT7* fw 5'-TGGAAGTTGGAGTTGGGAAG, rev 5'-TCGATCGGTACGATAATTGGA;  
319 *ZAT12* fw 5'-CATCCGCAGATTTAGGAACTT, rev 5'-  
320 CGTCGGCAAATAGGCTAATA;  
321 *TCH4* fw 5'-GAAACTCCGCAGGAACAGTC, rev 5'-TGTCTCCTTTGCCTTGTGTG

322

323

#### **d. Protoplast isolation and transient transformation**

324 Calli were digested for 15 min at 22 °C under hyperosmotic conditions (2 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM  
325 MgCl<sub>2</sub>, 1 mM KCl, 10 mM MESs (pH 5.5), 0.2 % cellulysine (Calbochem), 0.2 % cellulase RS  
326 (Onozuka RS, Yakult Honsha Co.), 0.004 % pectolyase Y23 (Kikkoman Corporation), 0.35 %  
327 Albumine serum bovin and mannitol to 600 mOsmol. For enzyme removal, the preparation was  
328 washed twice with 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MES (pH 5.5), and mannitol to 600  
329 mOsmol. For protoplast liberation, the preparation was incubated with 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM  
330 MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MES (pH 5.5), and mannitol to 280 mOsmol. Filtering the suspension (through  
331 a 80 µm nylon mesh) yielded protoplasts. For transient expression, protoplasts were co-  
332 transformed as described by Haswell et al. (2008)<sup>30</sup>. Silent protoplasts obtained from quintuple  
333 mutant ( $\Delta 5$ ) Arabidopsis calli were co-transformed with 2.5 µg 35Sp::GFP in the p327 vector  
334 and with 10 µg 35Sp::MSL10 in the pAlligator2 vector. We only used fluorescent protoplasts,  
335 indicating a co-transformation, for patch-clamp experiments. As controls for transfection, we  
336 tested patches from  $\Delta 5$  cells transfected with soluble GFP alone (n= 5) and found no  
337 mechanically activated currents in the pressure range from 0 to 60 mmHg.

338

### 339 e. Electrophysiology

340 Patch-clamp experiments were performed as described at room temperature with a patch-clamp  
341 amplifier (model 200A, Axon Instruments, Foster City, CA) and a Digidata 1322A interface  
342 (Axon Instruments). Currents were filtered at 1 kHz, digitized at 4 kHz, and analyzed with  
343 pCLAMP8.1 and Clampfit 10 software. During patch-clamp recordings, pressure was applied  
344 with a High Speed Pressure-Clamp system<sup>47</sup> (ALA Scientific Instrument, NY), allowing the  
345 application of precise and controlled either pressure pulses or continuous sinusoidal variations  
346 in the pipette<sup>14</sup>. Isolated protoplasts were maintained in bathing medium: 50 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM  
347 MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MES-Tris, and 0,25 mM LaCl<sub>3</sub> (pH 5.6). Membrane seal with low resistance (<  
348 1 GΩ) and with unstable current after excision were rejected. The pipettes were filled with 150

349 mM CsCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM EGTA, 4.2 mM CaCl<sub>2</sub>, and 10 mM Tris-HEPES (pH 7.2),  
350 supplemented with 5 mM MgATP. We adjusted the osmolarity with mannitol to 450 mosmol  
351 for the bath solution and 460 mosmol for the pipette solution using an osmometer (Type 15,  
352 Löser Meßtechnik). Gigaohm resistance seals between pipettes (pipette resistance, 0.8-1.5  
353 MΩ), coated with Sylgard (General Electric) and pulled from capillaries (Kimax-51, Kimble  
354 Glass), and the protoplast membranes were obtained with gentle suction leading to the whole-  
355 cell configuration, and then excised to an outside-out configuration. The current-pressure  
356 relationship data were fitted to a Boltzmann function

$$357 \quad x = C + I_m * \frac{1}{1 + e^{(P_{0.5} - P_c)/P_c}}$$

358 where  $C$  is an instrumental offset,  $I_m$  is the steady state current intensity, and  $P_{0.5}$  is the  
359 pressure of half activation.

360 The current activation kinetics were fitted with a mono-exponential function

$$361 \quad F(t) = A * e^{-t/\tau} + C$$

362 where  $A$  is coefficient,  $\tau$  is time constant and  $C$  maximum current intensity.

363

#### 364 **f. Histology**

365 In order to perform detection of  $\beta$ -glucuronidase (GUS) activity on whole plant, plants were  
366 grown on agar plate. In this culture condition, mature plants with flowering stem have a  
367 reduced height of ~4 cm and are suitable for staining. Tissue was fixed for 30 min in ice-  
368 cold 90% acetone, then incubated overnight at 37°C in 0.5  $\mu$ g/ml 5-bromo-4-chloro-3-indoyl  
369  $\beta$ -glucuronic acid, 100mM NaPO<sub>4</sub> (pH 7), 0.1% Triton X-100, 5 mM potassium  
370 ferricyanide, and 10mM EDTA. Samples were then dehydrated through an ethanol series  
371 and photographed with a camera or with a Nikon AZ100 MultiZoom macroscope (objective:  
372 AZ-Plan Apo 1X NA 0.1 WD 35 mm (Nikon)).

373

374 **g. Statistical analysis**

375 The data were analysed using Student's *t*-test and analysis of variance. Comparison of NP(o)  
376 at different frequencies (Fig.3 and Extended Fig.4) were analysed with Rank Sum test.

377

378 **h. Cloning and genetics**

379 All plasmid constructs were made with Gateway technology (Life Technologies). The *MSL10*  
380 cDNA was cloned previously into pENTR/D-TOPO<sup>30</sup>. This pENTR construct was then used in  
381 recombination reactions with pAlligator<sup>48</sup> to create the *MSL10* protein overexpression  
382 construct (*p35S::MSL10*). The same construct was used to generate stably transformed  
383 quintuple *mssl4;mssl5;mssl6;mssl9;mssl10* mutant lines from *Arabidopsis* and for transient  
384 expression in protoplasts ( $\Delta 5 + MSL10$ ). For the generation of homozygous transgenic lines,  
385 Col-0 plants were transformed with *Agrobacterium* using the floral dip method. Selection of  
386 transformants was performed using a stereomicroscope equipped with a GFP filter and selection  
387 of GFP fluorescent T1 seeds. The transgenic lines described in this work were genetically  
388 determined to have the transgene integrated at a single locus.

389

390 **i. Accession numbers**

391 *MSL4*: At1g53470 (SALK\_142497, *mssl4*-1)

392 *MSL5*: At3g14810 (SALK\_127784, *mssl5*-2)

393 *MSL6*: At1g78610 (SALK\_06711, *mssl6*-1)

394 *MSL9*: At5g19520 (SALK\_114626, *mssl9*-1)

395 *MSL10*: At5g12080 (SALK\_076254, *mssl10*-1)

396 *ACT2*: At3g18780

397 *UP*: At4g33380

398 *ZAT7*: At3g46090

399 ZAT12: At5g59820

400 TCH4: At5g57560

401

402 3. **References** Rajouter:

- 403 1. Monshausen, G. B. & Gilroy, S. Feeling green: mechanosensing in plants. *Trends Cell*  
404 *Biol.* **19**, 228–235 (2009).
- 405 2. Telewski, F. W. A unified hypothesis of mechanoperception in plants. *Am. J. Bot.* **93**,  
406 1466–1476 (2006).
- 407 3. Van de Hoven, I. Power spectrum of horizontal wind speed in the frequency range from  
408 0.0007 to 900 cycles per hour. *J. Meteorol.* **14**, 160–164 (1956).
- 409 4. Rodriguez, M., Langre, E. De & Moulia, B. A scaling law for the effects of architecture  
410 and allometry on tree vibration modes suggests a biological tuning to modal  
411 compartmentalization. *Am. J. Bot.* **95**, 1523–37 (2008).
- 412 5. Verhertbruggen, Y., Marcus, S. E., Chen, J. & Knox, J. P. Cell Wall Pectic Arabinans  
413 Influence the Mechanical Properties of Arabidopsis thaliana Inflorescence Stems and  
414 Their Response to Mechanical Stress. *Plant Cell Physiol.* **54**, 1278–1288 (2013).
- 415 6. Telewski, F. W. Is windswept tree growth negative thigmotropism? *Plant Sci.* **184**, 20–  
416 28 (2012).
- 417 7. Gardiner, B., Berry, P. & Moulia, B. Review: Wind impacts on plant growth, mechanics  
418 and damage. *Plant Sci.* **245**, 94–118 (2016).
- 419 8. Martin, L., Leblanc-Fournier, N., Julien, J.-L., Moulia, B. & Coutand, C. Acclimation  
420 kinetics of physiological and molecular responses of plants to multiple mechanical  
421 loadings. *J. Exp. Bot.* **61**, 2403–12 (2010).
- 422 9. Coutand, C., Dupraz, C., Jaouen, G., Ploquin, S. & Adam, B. Mechanical stimuli regulate  
423 the allocation of biomass in trees: Demonstration with young Prunus avium trees. *Ann.*  
424 *Bot.* **101**, 1421–1432 (2008).
- 425 10. Crook, M. & Ennos, R. Mechanical Differences Between Free-standing and Supported  
426 Wheat Plants , Triticum aestivum L . *Ann. Bot.* **77**, 197–202 (1996).
- 427 11. Mirabet, V., Das, P., Boudaoud, A. & Hamant, O. The role of mechanical forces in plant  
428 morphogenesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* **62**, 365–85 (2011).
- 429 12. Monshausen, G. B. & Gilroy, S. The exploring root--root growth responses to local  
430 environmental conditions. *Curr. Opin. Plant Biol.* **12**, 766–72 (2009).
- 431 13. Monshausen, G. B. & Haswell, E. S. A force of nature: molecular mechanisms of  
432 mechanoperception in plants. *J. Exp. Bot.* **64**, 4663–80 (2013).
- 433 14. Peyronnet, R., Tran, D., Girault, T. & Frachisse, J.-M. Mechanosensitive channels:  
434 feeling tension in a world under pressure. *Front. Plant Sci.* **5**, 558 (2014).
- 435 15. Eijkelkamp, N., Quick, K. & Wood, J. N. Transient receptor potential channels and  
436 mechanosensation. *Annu. Rev. Neurosci.* **36**, 519–46 (2013).
- 437 16. Ranade, S. S. *et al.* Piezo2 is the major transducer of mechanical forces for touch  
438 sensation in mice. *Nature* (2014). doi:10.1038/nature13980

- 439 17. Brohawn, S. G., Su, Z. & MacKinnon, R. Mechanosensitivity is mediated directly by the  
440 lipid membrane in TRAAK and TREK1 K<sup>+</sup> channels. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 3614–  
441 3619 (2014).
- 442 18. Zhou, X.-L. *et al.* The transient receptor potential channel on the yeast vacuole is  
443 mechanosensitive. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 7105–7110 (2003).
- 444 19. Coste, B. *et al.* Piezo proteins are pore-forming subunits of mechanically activated  
445 channels. *Nature* **483**, 176–181 (2012).
- 446 20. Berrier, C. *et al.* The Purified Mechanosensitive Channel TREK-1 Is Directly Sensitive  
447 to Membrane Tension. *J. Biol. Chem.* **288**, 27307–27314 (2013).
- 448 21. Martinac, B. Bacterial mechanosensitive channels as a paradigm for mechanosensory  
449 transduction. *Cell. Physiol. Biochem.* **28**, 1051–1060 (2011).
- 450 22. Kung, C., Martinac, B. & Sukharev, S. Mechanosensitive channels in microbes. *Annu.*  
451 *Rev. Microbiol.* **64**, 313–329 (2010).
- 452 23. Perozo, E., Kloda, A., Cortes, D. M. & Martinac, B. Physical principles underlying the  
453 transduction of bilayer deformation forces during mechanosensitive channel gating. *Nat*  
454 *Struct Biol* **9**, 696–703 (2002).
- 455 24. Levina, N. *et al.* Protection of Escherichia coli cells against extreme turgor by activation  
456 of MscS and MscL mechanosensitive channels: identification of genes required for MscS  
457 activity. *EMBO J.* **18**, 1730–1737 (1999).
- 458 25. Dong, Y. Y. *et al.* K2P channel gating mechanisms revealed by structures of TREK-2  
459 and a complex with Prozac. *Science (80-. ).* **347**, 1256–1259 (2015).
- 460 26. Coste, B. *et al.* Piezo1 and Piezo2 Are Essential Components of Distinct Mechanically  
461 Activated Cation Channels. *Science (80-. ).* **330**, 55–60 (2010).
- 462 27. Alloui, A. *et al.* TREK-1, a K<sup>+</sup> channel involved in polymodal pain perception. *EMBO*  
463 *J.* **25**, 2368–2376 (2006).
- 464 28. Woo, S.-H. *et al.* Piezo2 is required for Merkel-cell mechanotransduction. *Nature* **509**,  
465 622–626 (2014).
- 466 29. Maksaev, G. & Haswell, E. S. MscS-Like10 is a stretch-activated ion channel from  
467 Arabidopsis thaliana with a preference for anions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**,  
468 19015–20 (2012).
- 469 30. Haswell, E. S., Peyronnet, R., Barbier-Brygoo, H., Meyerowitz, E. M. & Frachisse, J.-  
470 M. Two MscS homologs provide mechanosensitive channel activities in the Arabidopsis  
471 root. *Curr. Biol.* **18**, 730–4 (2008).
- 472 31. Kazmierczak, P. & Müller, U. Sensing sound: molecules that orchestrate  
473 mechanotransduction by hair cells. *Trends Neurosci.* **35**, 220–9 (2012).
- 474 32. Peyronnet, R., Haswell, E. S., Barbier-Brygoo, H. & Frachisse, J.-M. Sensors of plasma  
475 membrane tension in Arabidopsis roots. *Plant Signal. Behav.* **3**, 726–729 (2008).
- 476 33. Boer, M., Anishkin, A. & Sukharev, S. Adaptive MscS Gating in the Osmotic  
477 Permeability Response in *E. coli*: The Question of Time. *Biochemistry* **50**, 4087–4096  
478 (2011).
- 479 34. Suchyna, T. M., Markin, V. S. & Sachs, F. Biophysics and Structure of the Patch and the  
480 Gigaseal. *Biophys. J.* **97**, 738–747 (2009).
- 481 35. Lewis, A. H. & Grandl, J. Mechanical sensitivity of Piezo1 ion channels can be tuned by  
482 cellular membrane tension. *Elife* **4**, (2015).

- 483 36. Lee, D., Polisensky, D. H. & Braam, J. Genome-wide identification of touch- and  
484 darkness-regulated Arabidopsis genes: a focus on calmodulin-like and XTH genes. *New*  
485 *Phytol.* **165**, 429–44 (2005).
- 486 37. Der Loughian, C. *et al.* Measuring local and global vibration modes in model plants.  
487 *Comptes Rendus Mécanique* **342**, 1–7 (2014).
- 488 38. Xu, W. *et al.* Arabidopsis TCH4 , Regulated by Hormones and the Environment ,  
489 Encodes a Xyloglucan Endotransglycosylase. *Plant Cell* **7**, 1555–1567 (1995).
- 490 39. Bergonci, T. *et al.* Arabidopsis thaliana RALF1 opposes brassinosteroid effects on root  
491 cell elongation and lateral root formation. *J. Exp. Bot.* **65**, 2219–30 (2014).
- 492 40. Kimbrough, J. M., Salinas-mondragon, R., Boss, W. F., Brown, C. S. & Sederoff, H. W.  
493 The Fast and Transient Transcriptional Network of Gravity and Mechanical Stimulation  
494 in the Arabidopsis Root Apex. *Plant Physiol.* **136**, 2790–2805 (2004).
- 495 41. Walley, J. W. *et al.* Mechanical stress induces biotic and abiotic stress responses via a  
496 novel cis-element. *PLoS Genet.* **3**, 1800–12 (2007).
- 497 42. Ciftci-Yilmaz, S. & Mittler, R. The zinc finger network of plants. *Cell. Mol. life Sci.* **65**,  
498 1150–60 (2008).
- 499 43. Martin, L. *et al.* Characterization and expression analysis under bending and other abiotic  
500 factors of PtaZFP2, a poplar gene encoding a Cys2/His2 zinc finger protein. *Tree*  
501 *Physiol.* **29**, 125–136 (2009).
- 502 44. Coutand, C. *et al.* Strain mechanosensing quantitatively controls diameter growth and  
503 PtaZFP2 gene expression in poplar. *Plant Physiol.* **151**, 223–32 (2009).
- 504 45. Czechowski, T., Stitt, M., Altmann, T. & Udvardi, M. K. Genome-Wide Identification  
505 and Testing of Superior Reference Genes for Transcript Normalization. **139**, 5–17  
506 (2005).
- 507 46. Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-  
508 PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**, e45 (2001).
- 509 47. Besch, S. R., Suchyna, T. & Sachs, F. High-speed pressure clamp. *Pflügers Arch. Eur.*  
510 *J. Physiol.* **445**, 161–6 (2002).
- 511 48. Bensmihen, S. *et al.* Analysis of an activated ABI5 allele using a new selection method  
512 for transgenic Arabidopsis seeds. *FEBS Lett.* **561**, 127–131 (2004).

513

## 514 **Acknowledgements**

515 This work is supported by the grant ANR-09-BLAN-0245-03 from the Agence Nationale de  
516 la Recherche (ANR, project SENZO) and the grant ANR-11-BSV7-010-02 from the Agence  
517 Nationale de la Recherche (ANR, project CAROLS). We would like to thank Dr. Sébastien  
518 Thomine (I2BC, Gif-sur-Yvette, France) and Dr. Alexis De Angeli (I2BC, Gif-sur-Yvette,  
519 France) for their help and for insightful discussions, Dr. Elizabeth Haswell (Washington

520 University, St. Louis, USA) for providing quintuple msl mutant and GUS reporter lines,  
521 Gwyneth C. Ingram for corrections on the manuscript (ENS, Lyon, France).

522

#### 523 **4. Author Contributions**

524 D.T performed experiments; T.G generated MSL 10 lines; M.G, N.L.F, B.M and E.dL were  
525 involved in study design; D.T, J.M.A and J.M.F designed the study; D.T, J.M.A and J.M.F  
526 analyzed data; D.T and J.M.F wrote the paper. All authors discussed the results and  
527 commented on the manuscript.

528

#### 529 **5. Author information**

530 Reprints and permissions information is available at [www.nature.com/reprints](http://www.nature.com/reprints). The authors  
531 declare no competing financial interest. Correspondence and requests for materials should  
532 be addressed to J.M.F ([jean-marie.frachisse@i2bc.paris-saclay.fr](mailto:jean-marie.frachisse@i2bc.paris-saclay.fr)).

533

#### 534 **6. Figure legends (558 words)**

535

536 **Figure 1 | MSL10 is quickly activated in response to pulse pressure stimulation. a,**  
537 Quintuple mutant ( $\Delta 5$ ) elicited by increased pressure steps in outside-out patch configuration  
538 shows no mechanically activated current.  $\Delta 5$  mutant expressing MSL10 ( $\Delta 5+MSL10$ ) shows  
539 currents elicited in outside-out configuration by increased pressure steps with rapid  
540 activation and relaxation kinetics. The current amplitude varies from one patch to another  
541 depending on channel density (expression of the protein). Single channel amplitude shows  
542 current transitions of  $19.4 \pm 1.7$  pA at  $-186$  mV ( $n = 14$ ). **b,** Pressure dependence of activation  
543 time constant for MSL10 channel in excised outside-out-patch configuration (see Extended  
544 Data Fig. 1). Results are normalized with the  $P_{0.5}$  of each patch and data represent mean  $\pm$

545 s.e (n = 15). **c**,  $I_{\max}$  normalized current–pressure relationship of stretch-activated currents in  
546 excised outside-out-patch configuration in  $\Delta 5+MSL10$ , fitted with a Boltzmann equation.  
547  $P_{0.5}$  of  $49.3 \pm 3.4$  mmHg is the average value determined for individual cells. Data represent  
548 mean  $\pm$  s.e (n = 15).

549 The membrane potential is clamped at -186 mV. MSL10 protein is transiently expressed in  
550 quintuple *mssl4;mssl5;mssl6;mssl9;mssl10* mutant ( $\Delta 5$ ) protoplasts. Ionic conditions are  
551 described in the Materials and Methods.

552

553 **Figure 2 | MSL10 channel responds to oscillatory pressure stimulation. a,**

554 Representative recording of single channel activity of MSL10 transiently expressed in the  
555 quintuple mutant, in excised outside-out-patch configuration, in response to oscillatory  
556 pressure stimulation at 0.3 Hz, 3 Hz and 30 Hz. An oscillatory pressure of +15/-15 mmHg  
557 from a mid-pressure (see Extended Data Fig. 2a-c) is applied. **b, Left**, Idealized MSL10  
558 current used for event analysis in response to oscillatory pressure. *Right*, distribution of  
559 close-open transitions (at least one) elicited at upper (red bars) or lower (light grey bars)  
560 pressure as a function of frequency for 15 seconds of loading. Results represent mean  $\pm$  s.e  
561 (n  $\geq$  5). **c**, Probability that MSL10 channel undergoes at least an close-open transition per  
562 period as a function of frequency. Results represent mean  $\pm$  s.e (n  $\geq$  5).

563 The membrane potential is clamped at -186 mV. MSL10 protein is transiently expressed in  
564 quintuple *mssl4;mssl5;mssl6;mssl9;mssl10* mutant ( $\Delta 5$ ) protoplasts. Ionic conditions are  
565 described in the Materials and Methods.

566

567 **Figure 3 | Effect of oscillatory pressure stimulation on MSL10 channel characteristics.**

568 **a**, Sequences of 1 min oscillatory pressure alternating with 1 min static pressure are

569 performed on excised outside-out-patches over time. The oscillatory stimulation (same  
570 protocol for Extended Data Fig. 2a-c) is of 30 mmHg amplitude (+15/-15 mmHg from a  
571 mean-pressure level) with a sweep of frequencies from 0.3 to 30 Hz (--), while static  
572 stimulation is at mean-pressure (--). **b-d**, Relative effect of frequency (oscillatory/static  
573 mean-pressure) on **b**, open probability NP(o), **c**, open state time constant and **d**, closed state  
574 time constant. The red dashed line represents the relative ratio static/static (=1). Each point  
575 represents each biological replicate ( $n \geq 5$  for a given frequency); asterisk in red (\*) indicates  
576 in **b**, **c** and **d** that mean value is significantly different from 1 (Mann-Whitney Rank Sum  
577 Test,  $p < 0.05$ ), asterisk in green (\*) in **b** indicates mean NP(o) is significantly different from  
578 mean NP(o) obtained at 30 Hz (Mann-Whitney Rank Sum Test,  $p < 0.05$ ).

579 The membrane potential is clamped at -186 mV. MSL10 protein is transiently expressed in  
580 quintuple *msl4;msl5;msl6;msl9;msl10* mutant ( $\Delta 5$ ) protoplasts. Ionic conditions are  
581 described in the Materials and Methods.

582

583 **Figure 4 | *MSL10* expression pattern is compatible with its function as an oscillation**  
584 **sensor in Arabidopsis plants.** Blue staining represents the  $\beta$ -glucuronidase (GUS) activity  
585 driven by the promoter of *MSL10*. The *MSL10* promoter drives expression of the reporter  
586 gene **a**, in the root tip (indicated by arrows in **b**) and throughout the vasculature of the leaves  
587 and stem, **b**, at the bottom of leaf petioles and **c**, in the rosette collar (**c** is the same view as  
588 **b**, with petioles entirely removed). Scale: **a**, 5mm; **b** and **c**, 500 $\mu$ m.

589

590 **Figure 5 | MSL10 channel is required for the induction of ZAT7 expression by**  
591 **oscillatory stimulation.** **a**, Oscillatory stimulation at 0 ( $\square$ ), 4 ( $\blacksquare$ ) or 20 Hz ( $\blacksquare$ ) was applied  
592 for 1 min to the base of the floral stem either of wild-type (WT), quintuple mutant ( $\Delta 5$ ) or

593 MSL10 complemented lines ( $\Delta 5+MSL10$ ). After 30 min, the base of floral stem together  
594 with the collar and all petioles were harvested and mRNAs quantified by RT-qPCR. The  
595 quantity of specific mRNAs is expressed relative to the mean of *ACT* and *UP* genes for the  
596 **b**, *TCH4* gene **c**, *ZAT12* gene **d**, *ZAT7* gene. Data represent the mean  $\pm$  s.e (n = 4; 4 biological  
597 replicates with 3 technical replicates); asterisk indicates significant difference from WT  
598 control plants (t-test,  $p < 0.05$ ) and the fold increase in transcript compared with the non-  
599 stimulated shoot is indicated in bine of each genotype.

600

## 601 7. Extended data

### 602 Extended Data Figure 1 | MSL10 pressure dependence on activation time constants.

603 Typical analysis of activation current from quintuple mutant expressing MSL10 elicite by  
604 pressure pulses. Current variation after a change in pressure is fitted with a mono-  
605 exponential function. Insets show single current transitions happening during pressure steps.  
606 Opening (*left inset*:  $o_1$ ,  $o_2$  and  $o_3$ ) and closing (*right inset*:  $o_3$ ,  $o_2$  and  $o_1$ ) of three channels  
607 can be seen in this recording.

608

### 609 Extended Data Figure 2 | Determination of current-pressure relationship of MSL10

610 **channel. a**, Current-pressure relationships recorded in different patches and fitted with a  
611 Boltzmann function. Although single activities of MSL10 channels are observed in each  
612 recording, the amplitude of the current varies from one patch to another. This reflects  
613 different channel densities due to heterogeneity of expression levels between protoplasts. **b**,  
614 In order to compare patches, we normalized each curve by maximum current amplitude ( $I_{max}$ )  
615 and **c**, the curves were then normalized to the half-maximal activation point ( $P_{0.5}$ ) from  
616 different patches. **d**, Relationship between the slope of the Boltzmann function at  $P_{0.5}$  as a

617 function of pipette resistance in our ionic conditions. A linear dependence of pipette  
618 resistance (geometry) on Boltzmann curve “steepness” for MSL10 channel activity is  
619 observed. This is in accordance with Laplace’s law showing that the MSL10 channel is  
620 regulated by membrane tension, which is a general feature for MS channels<sup>21</sup>.

621

622 **Extended Data Figure 3 | MSL10 channel characteristics obtained on an individual**  
623 **patch using a protocol alternating frequency and static stimulation.** The same protocol  
624 as Figure 3a alternating frequency and static stimulation was applied to excised outside-out-  
625 patches. **a-c**, Representative single patch analysis at different frequencies (*black square*)  
626 compared to static stimulation (*white square*). Effects of frequency stimulation on **a**, open  
627 probability NP(o), **b**, open state time constant  $\tau_{\text{open}}$  and **c**, closed state time constant  $\tau_{\text{close}}$ .

628 The membrane potential is clamped at -186 mV. MSL10 protein is transiently expressed in  
629 quintuple *mssl4;mssl5;mssl6;mssl9;mssl10* mutant ( $\Delta 5$ ) protoplasts. Ionic conditions are  
630 described in the Materials and Methods.

631

632 **Extended Data Figure 4 | MSL10 channel open probabilities in different static and**  
633 **oscillatory conditions.** **a**, Pressure protocol alternating 1 min frequency and static  
634 stimulation. **b**, Box plot representing the distribution of NP(o) ratio obtained under (i) static  
635 condition corresponding either at the pressure achieved during the minimum of the  
636 oscillation (Mean -15) or at the pressure achieved during the maximum of the oscillation  
637 (Mean +15), (ii) oscillatory condition at 4 Hz and 20 Hz relative to mean-pressure level  
638 (Mean). Red line represents the relative ratio Mean/Mean (=1). Obtained on 9 protoplasts.  
639 Asterisk indicates a significant difference from Mean (t-test,  $p \leq 0.05$ )

640

641 **Extended Data Figure 5 | Effect of static bending of floral shoots on the expression of**  
642 **mechanoresponsive genes. a,** The flowering stem of WT plants was subjected to static  
643 (same displacement as oscillatory stimulation) mechanical bending stimulation for 1 min;  
644 30 min after the treatment the plant was frozen and the bases of floral stem together with  
645 the collars and all petioles were harvested. **b,** Relative transcript levels of  
646 mechanoresponsive genes was quantified by RT-qPCR. Static bending (*grey bar*) induces  
647 an increase in *TCH4* expression whereas *ZAT7* and *ZAT12* expression is not modified  
648 compared to controls (*white bar*). Relative expression is calculated with reference to mean  
649 of *ACT* and *UP* genes. Data represent the mean  $\pm$  s.e (n = 4; 4 biological replicates with 3  
650 technical replicates); asterisk indicates significant difference from control plants (t-test,  
651  $p < 0.05$ ). For each gene, fold increase in transcript compared with the control is indicated in  
652 line of each series.

653  
654 **Extended Data Movie 1 | Arabidopsis floral stem motion in response to frequency.**  
655 Application of oscillatory excitation to the base of young floral stems (9-12 cm), in order to  
656 mimic wind. The oscillation frequencies that a plant can undergo due to a gust of wind  
657 depend on the strength of the wind itself but also on the intrinsic physical and architectural  
658 properties (branching, biomass, stiffness) of the aerial parts of the plant. Recent  
659 biomechanics characterizations based on sinusoidal excitation provide information relating  
660 the physical properties of a plant with its passive motion induced by mechanical loading<sup>37</sup>.  
661 4 Hz excitation (global mod) produces a higher amplitude movement than 20 Hz (apical  
662 mod).

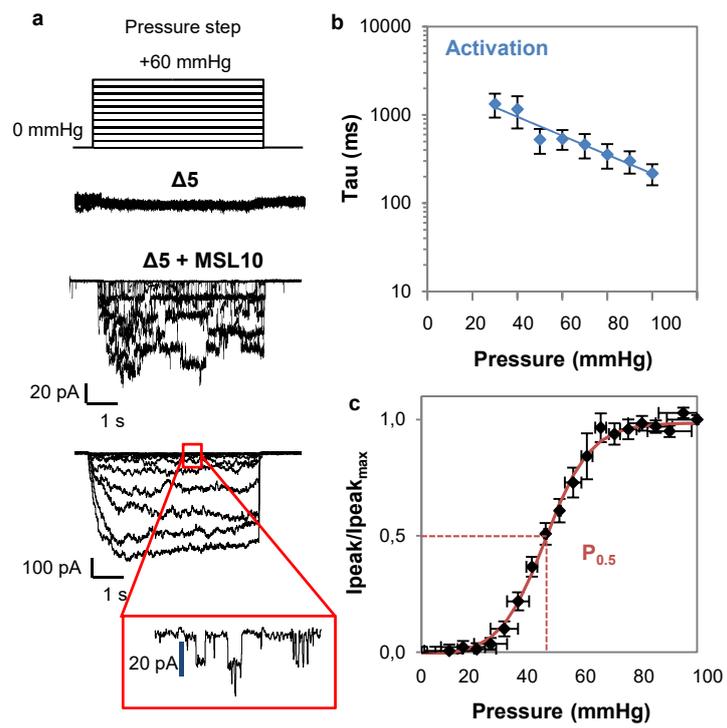
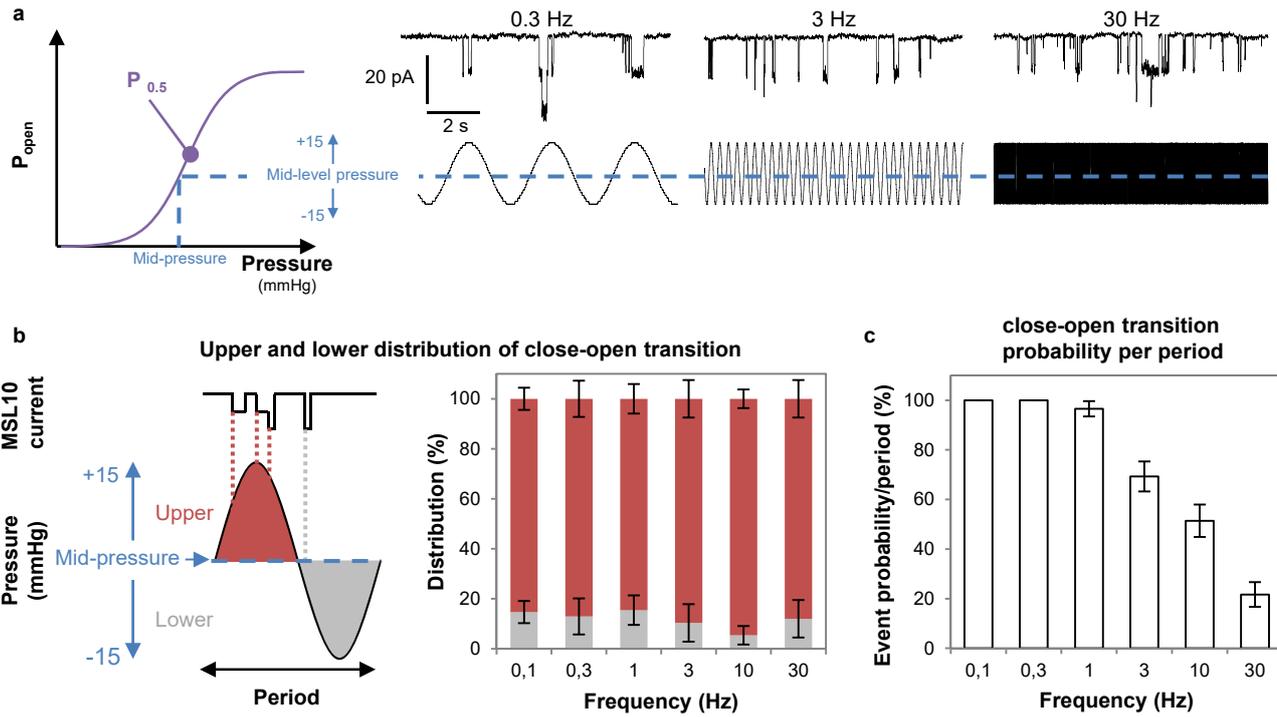


Figure 1



**Figure 2**

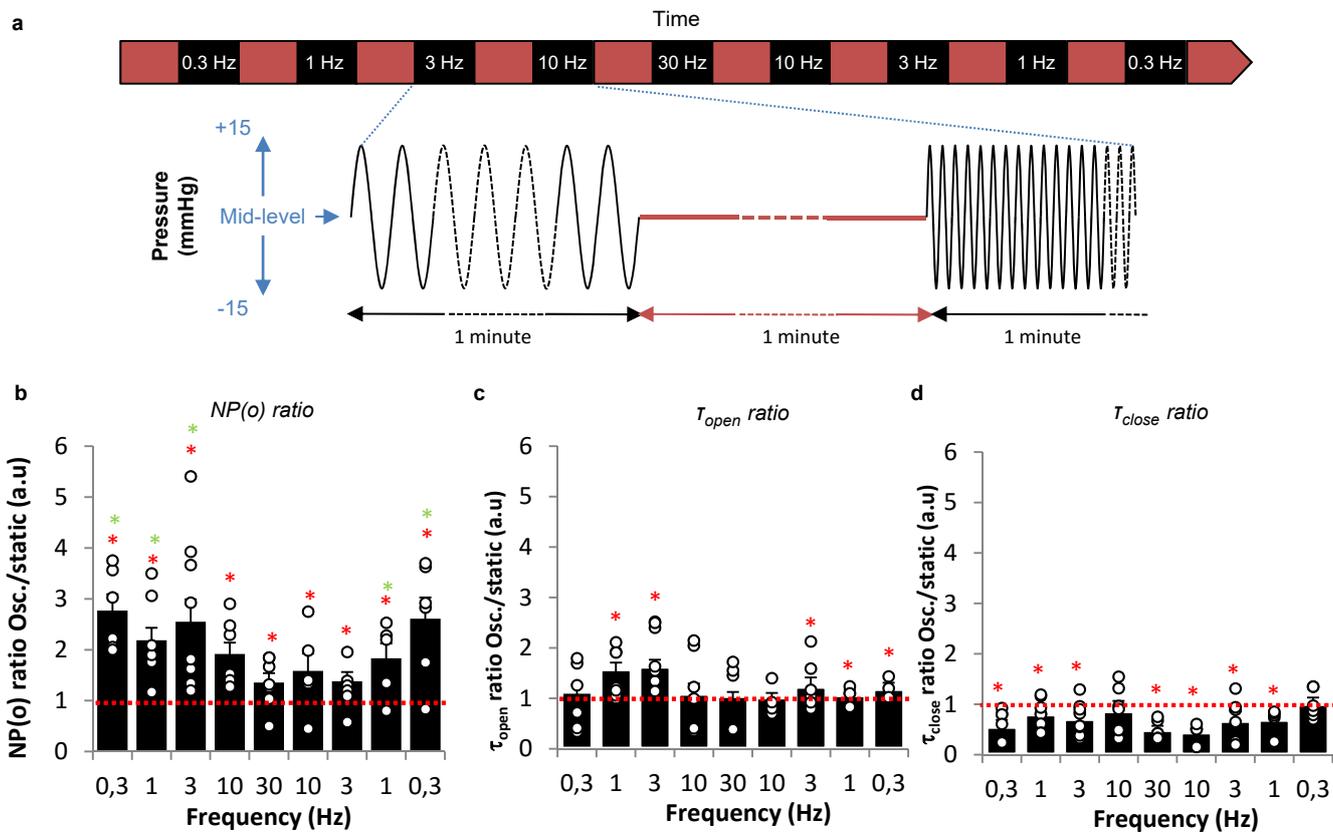
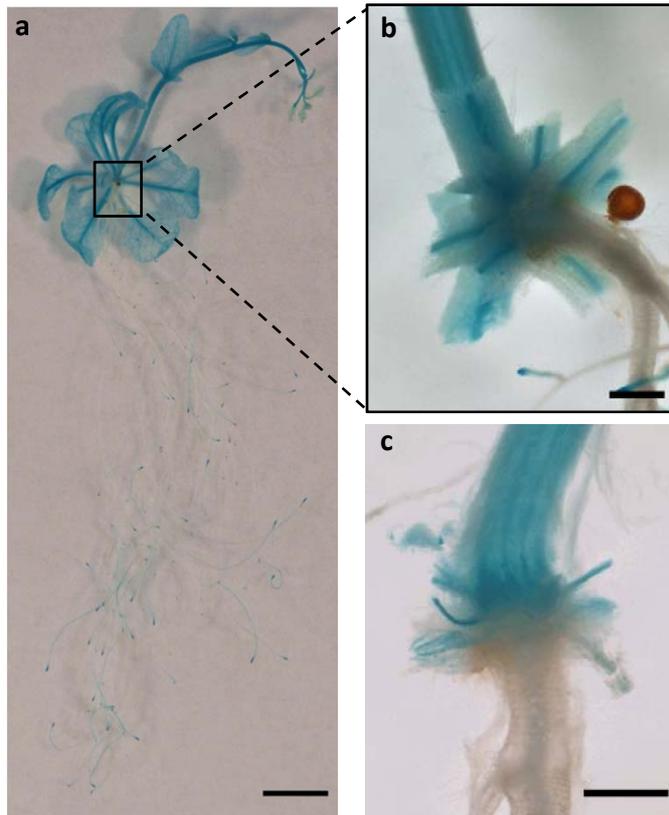
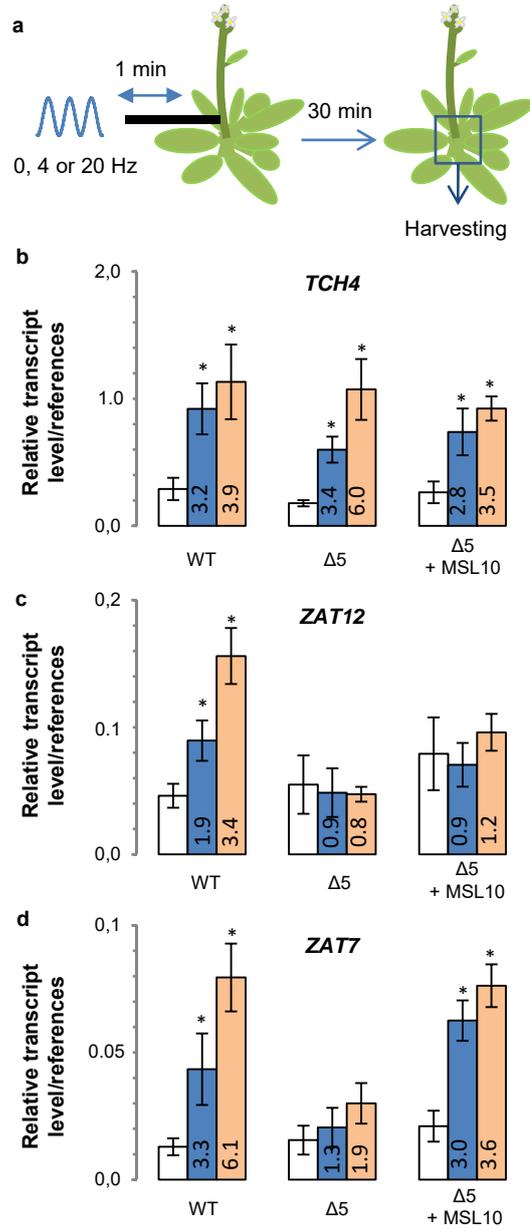


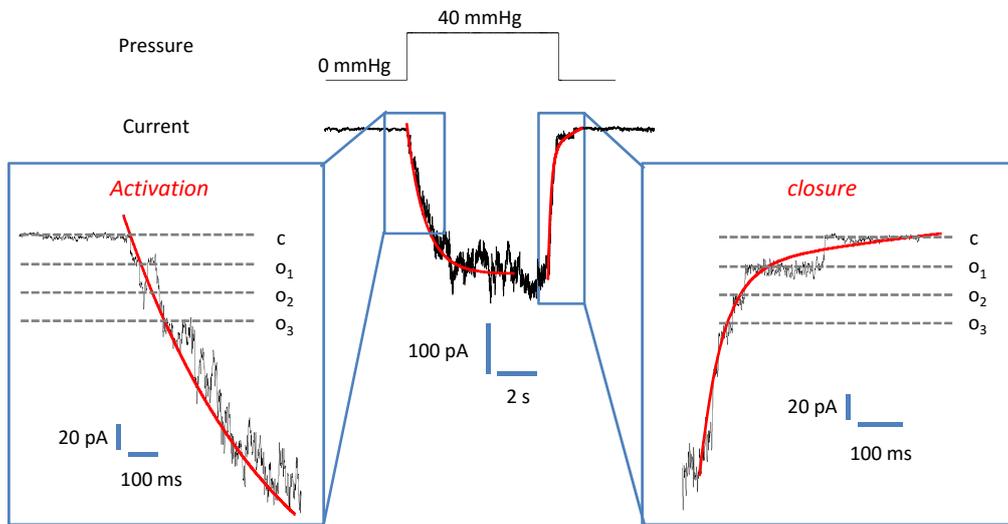
Figure 3



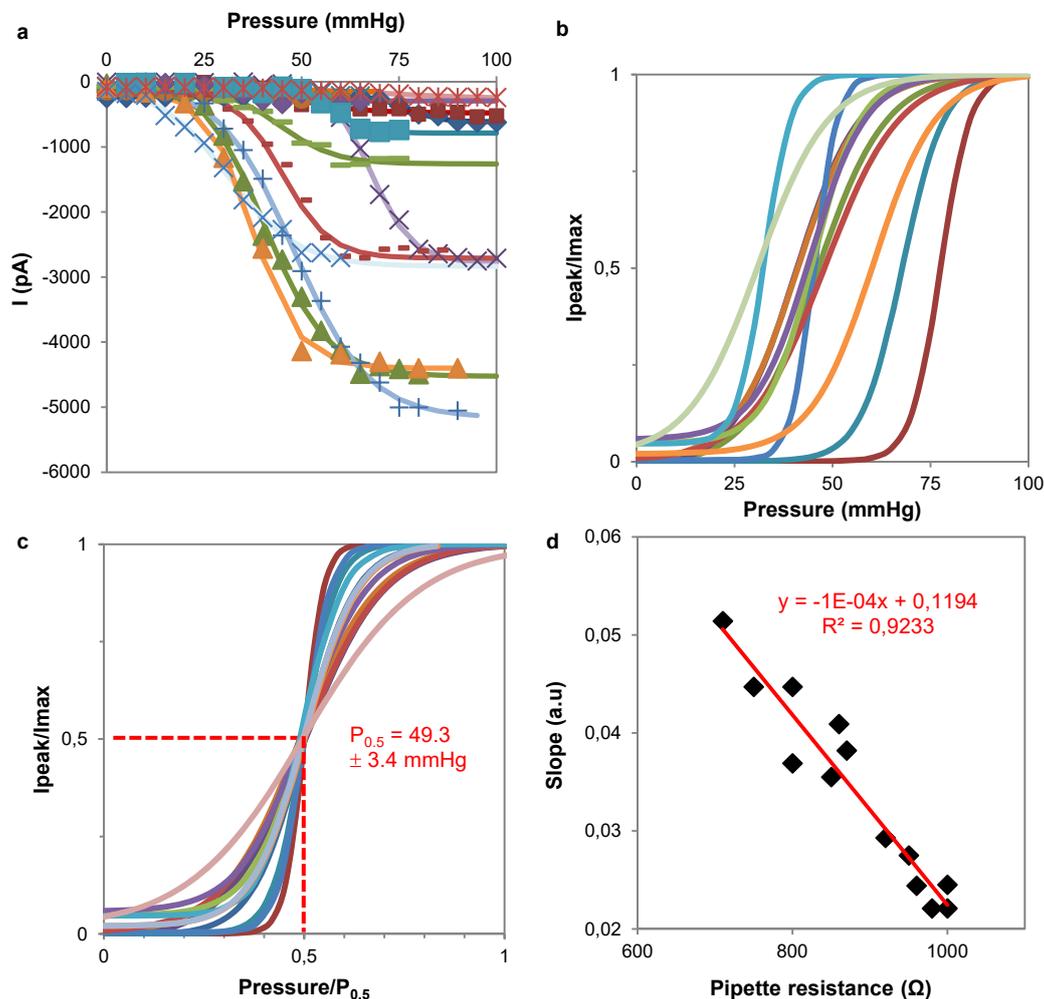
**Figure 4**



**Figure 5**

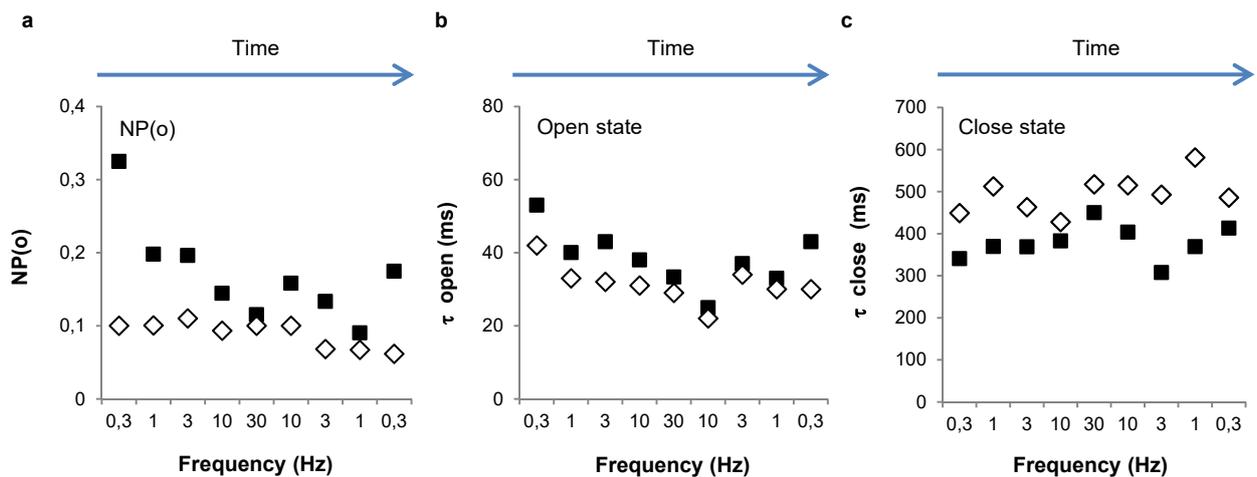


**Extended Data Figure 1 | MSL10 pressure dependence of activation time constant.** Typical analysis of activation current from quintuple mutant expressing MSL10 elicited by pressure pulses. Current is fitted with a mono-exponential function. Insets show single current transitions happening during pressure steps. Opening (left inset: o1, o2 and o3) and closing (right inset: o3, o2 and o1) of three channels can be seen in this recording.

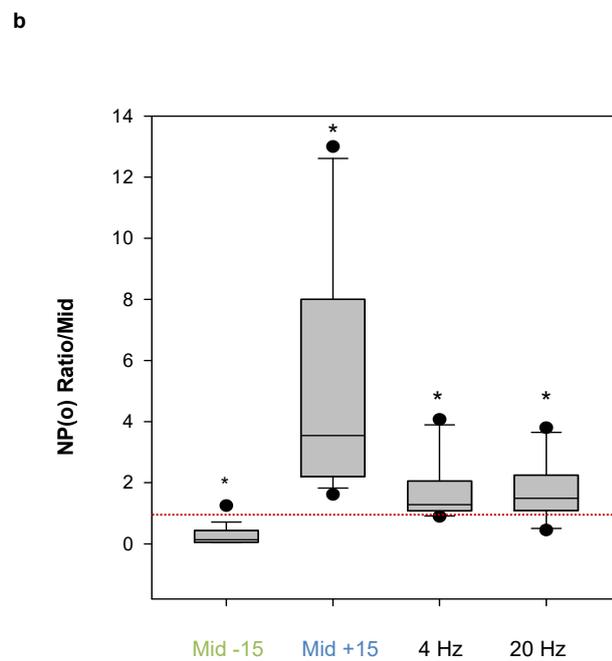
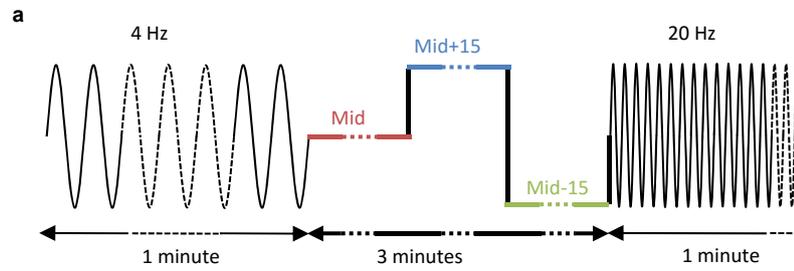


**Extended Data Figure 2 | Determination of current-pressure relationship of MSL10 channel.**

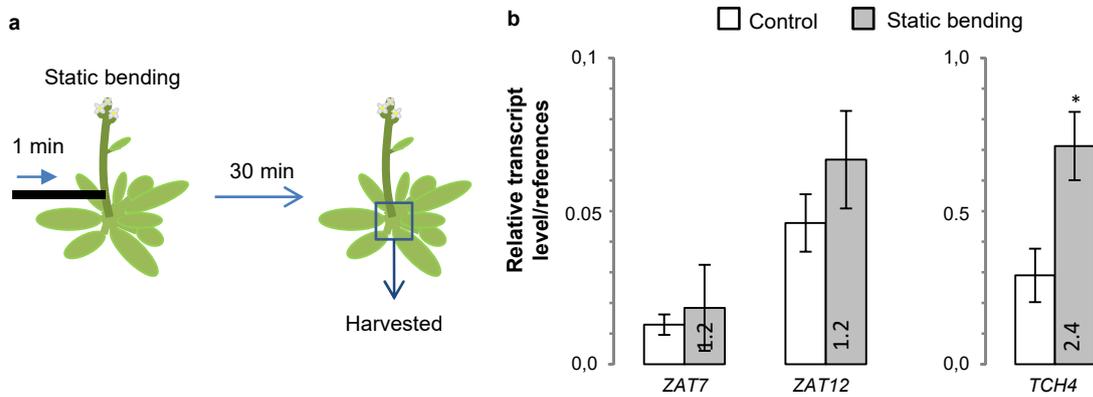
**a**, Current-pressure relationships recorded in different patches and fitted with a Boltzmann function. Although single activities of MSL10 channels are observed in each recording, the amplitude of the current varies from one patch to another. This reflects different channel densities due to heterogeneity of expression levels between protoplasts. **b**, In order to compare patches, we normalized each curve by maximum current amplitude ( $I_{\text{max}}$ ) and **c**, the curves were then normalized to the half-maximal activation point ( $P_{0.5}$ ) from different patches. **d**, Relationship between the slope of the Boltzmann function at  $P_{0.5}$  as a function of pipette resistance in our ionic conditions. A linear dependence of pipette resistance (geometry) on Boltzmann curve “steepness” for MSL10 channel activity is observed. This is in accordance with Laplace’s law showing that the MSL10 channel is regulated by membrane tension, which is a general feature for MS channels<sup>17</sup>.



**Extended Data Figure 3 | MSL10 channel characteristics obtained on an individual patch using a protocol alternating frequency and static stimulation.** The same protocol as Figure 3a alternating frequency and static stimulation was applied to excised outside-out-patches **a-c**. Representative single patch analysis at different frequencies (*black square*) compared to static stimulation (*white square*). Effects of frequency stimulation on **a**, open probability NP(o), **b**, open state time constant  $\tau_{open}$  and **c**, closed state time constant  $\tau_{close}$ . The membrane potential is clamped at -186 mV. MSL10 protein is transiently expressed in quintuple *msl4;msl5;msl6;msl9;msl10* mutant ( $\Delta 5$ ) protoplasts. Ionic conditions are described in the Materials and Methods.



**Extended Data Figure 4 | MSL10 channel open probabilities in different static and oscillatory conditions.** **a**, pressure protocol alternating 1 min frequency and static stimulation. **b**, Box plot representing the distribution of NP(o) ratio obtained under (i) static condition corresponding either at the pressure achieved during the minimum of the oscillation (Mid -15) or at the pressure achieved during the maximum of the oscillation (Mid +15), (ii) oscillatory condition at 4 Hz and 20 Hz relative to Mid-level pressure (Mid). Red line represents the relative ratio Mid/Mid (=1). Obtained on 9 protoplasts. \*significantly different from Mid (t-test, P ≤ 0.05)



**Extended Data Figure 5 | Effect of static bending of floral shoot on mechanoresponsive genes.** **a**, The flowering stem of WT plants was subjected to static (same displacement as oscillatory stimulation) mechanical bending stimulation for 1 min; 30 min after the treatment the plant was frozen and the base of the flowering stem was harvested. **b**, Relative transcript levels of mechanoresponsive genes was quantified by RT-qPCR in rosette internodes. Static bending (grey bar) induces an increase in *TCH4* expression whereas *ZAT7* and *ZAT12* expression is not modified compared to controls (white bar). Relative expression is calculated with reference to mean of *ACT* and *UP* genes. Data represent the mean  $\pm$  s.e (n = 4; 4 biological replicates with 3 technical replicates); asterisks indicate significant difference from control plants (t-test,  $p < 0.05$ ). For each gene, fold increase in transcript compared with the control is indicated in bine of each series.

4 Hz



20 Hz



**Extended Data Movie 1 | Arabidopsis floral stem motion in response to frequency.** Application of oscillatory excitation to the base of young floral stems (9-12 cm), in order to mimic wind. The oscillation frequencies that a plant can undergo due to a gust of wind depend on the strength of the wind itself but also on the intrinsic physical and architectural properties (branching, biomass, stiffness) of the aerial parts of the plant. Recent biomechanics characterizations based on sinusoidal excitation provide information relating the physical properties of a plant with its passive motion induced by mechanical loading<sup>21</sup>. 4 Hz excitation (global mod) produces a higher amplitude movement than 20 Hz (apical mod).





**Titre:** Recherche du rôle des MSL dans les poils racinaires lors de la mise en place de la symbiose fixatrice d'azote chez *Medicago truncatula*

**Mots clés:** Canal mécanosensible – MSL - Poil racinaire – Symbiose - *Medicago truncatula*

**Résumé:** La mise en place des interactions symbiotiques, existant entre les Légumineuses et des microorganismes, sont des processus finement régulés, tant sur le plan moléculaire que cellulaire. Dans le cas de la symbiose avec des bactéries fixatrices d'azote, ou rhizobia, ces modifications se déroulent dans les poils racinaires. Plusieurs arguments tendent à montrer que la perception de contraintes mécaniques pourrait avoir un rôle dans la régulation de ces étapes. Par conséquent, nous nous sommes intéressés à une famille de protéines impliquées dans la mécanotransduction: les MSL (MscS-Like). Il s'agit de canaux capables de s'ouvrir en réponse à une tension mécanique appliquée sur la membrane plasmique. Nous avons exploré leurs fonctions dans les poils racinaires, lors de la mise en place de la symbiose entre la légumineuse modèle *Medicago truncatula* et des rhizobia.

Des études *in silico* du génome de *M. truncatula* nous ont permis de définir la famille des *MtMSL*. Les analyses de l'expression de ces candidats ont montré que seuls deux d'entre eux sont transcrits

dans les poils racinaires: *MtMSL2.1* et *MtMSL2.4*, ce dernier étant majoritaire. Néanmoins, leur expression ne semble pas modifiée par un traitement aux facteurs Nod, molécules bactérienne induisant les premières étapes de la signalisation symbiotique. Parallèlement, des analyses en microscopie confocale, indiquent la présence de *MtMSL2.4* à la membrane plasmique et dans des endomembranes. De plus, des mesures électrophysiologiques ont confirmé leur nature de canal à forte conductance activé par la tension de membrane. Enfin, plusieurs analyses phénotypiques ont été menées sur des mutants *Mtmsl2.4*, tant sur différents aspects de l'interaction avec les rhizobia, que sur la croissance racinaire ou celle des poils racinaires, pour laquelle une méthode de mesure semi-automatique a été développée. Cependant aucune différence avec les contrôles n'a pu être observée. Ces résultats laissent penser que le canal mécanosensible *MtMSL2.4* aurait un rôle lors d'autres phénomènes qu'il serait intéressant de découvrir.

**Titre:** MSL's role in root hairs during the first step of symbiosis in *Medicago truncatula*

**Mots clés:** Mechanosensitive ion channel – MSL - root hair – Symbiosis - *Medicago truncatula*

**Résumé:** The first steps of symbiosis occurring between Legumes and microorganisms are highly regulated processes, both at the molecular level and at the cellular level. During symbiosis with nitrogen fixing bacteria, called rhizobia, these modifications occur in root hairs. Several arguments have shown that mechanical constraints may regulate these steps. Hence, the involvement of physical sensors during these early events is worth considering. We focused here on one of these sensor families, the MSL (MscS-Like). These proteins are channels able to open upon mechanical stretching. We look for their role during first steps of symbiosis between the model Legumes *Medicago truncatula* and rhizobia.

*In silico* studies of *M. truncatula*'s genome allowed us to define a *MtMSL* family. Transcript analyses showed that only two of them were expressed in root hairs: *MtMSL2.1* and *MtMSL2.4*, the latter being the most expressed. However, this expression

is not modified by Nod factor treatments; molecules produced by rhizobia that induces the first symbiotic signalization steps. In parallel, confocal microscopy analyses show plasma membrane and endomembrane localization of *MtMSL2.4*. Moreover, electrophysiological measurements confirmed that this candidate is a high conductance channel mechanically activated. Finally, we performed several phenotypical studies with *Mtmsl2.4* mutants in different conditions. No differences were observed between the mutants and WT during rhizobia symbiotic interaction and root growth. There were also no differences observed in root hair development, for which a partly automatic measurement system was set up. These results suggest *MtMSL2.4* may have a role in other phenomena, which could be interesting to understand further.

