HAL
open science

Intégration de signaux peptidiques et hormonaux régulant l'architecture du système racinaire des légumineuses

Carole Labeur

To cite this version:

Carole Labeur. Intégration de signaux peptidiques et hormonaux régulant l'architecture du système racinaire des légumineuses. Biologie moléculaire. Université Paris-Saclay, 2020. Français. NNT : 2020UPASB009 . tel-03036925

HAL Id: tel-03036925

https://theses.hal.science/tel-03036925v1

Submitted on 2 Dec 2020

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.

Intégration de signaux peptidiques et hormonaux régulant l'architecture du système racinaire des légumineuses

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°567
Sciences Du Végétal : du gène à l'écosystème (SDV)
Spécialité de doctorat: Biologie
Unité de recherche : Institute of Plant Sciences Paris-Saclay (IPS2),
Bâtiment 630, rue de Noetzlin, 91405 Orsay, France
Référent : Faculté des Sciences d'Orsay

Thèse présentée et soutenue à Orsay, le 02 Octobre 2020, par

Carole LABEUR LAFFONT

Composition du Jury

Pascal RATET DR CNRS, IPS2 Paris Saclay	Président
Sandra BENSMIHEN CR HDR CNRS, LIPM Toulouse	Rapporteur-e & Examinatrice
Sandrine RUFFEL CR HDR INRAE, BPMP Montpellier	Rapporteur-e & Examinatrice
Nicolas FREI dit FREY MCU, UPS Toulouse	Examinateur
Anne KRAPP DR INRAE, IJPB Versailles	Examinatrice
Florian FRUGIER DR, CNRS, IPS2 Paris Saclay	Directeur de thèse

Thèse de doctorat

NNT : 2020UPASB009

REMERCIEMENTS

"Sois reconnaissant envers tous, tous t'enseignent."
Bouddha

Je tiens en premier lieu à remercier chaleureusement Martin Crespi et Florian Frugier.

Martin, je te suis infiniment reconnaissante pour m'avoir accueillie en tant qu'Assistant-Ingénieur il y a maintenant 14 ans dans ton équipe alors que j'étais affectée dans un poste qui ne me correspondait pas et dans lequel je m'ennuyais.

Merci de m'avoir offert cette chance, de m'avoir aidée à obtenir ce changement d'affectation qui m'a permis de m'épanouir professionnellement.

Je te remercie pour le chef d'équipe bienveillant que tu as été mais également pour le directeur d'Unité -sans qui l'IPS2 ne serait pas l'IPS2,- qui aujourd'hui me soutient encore, notamment en m'ayant permis de réaliser ce doctorat.

Florian, merci de m'avoir acceptée et encadrée à mon arrivée dans l'équipe de Martin, de m'avoir formée avec l'aide de Silvina sur toutes ces techniques spécifiques à l'étude de Medicago et des interactions symbiotiques.

Merci pour ta confiance et pour l'autonomie grandissante que tu m'as accordée au cours de ces années.

Je te suis reconnaissante également pour ton écoute, ton soutien sans faille et pour m'avoir permis de réaliser cette thèse dans les meilleures conditions.

Je remercie également les membres du jury, Pascal Ratet, Sandra Bensmihen, Sandrine Ruffel, Nicolas Frei dit Frey, et Anne Krapp d'avoir accepté d'évaluer mon travail.

Je tiens aussi à remercier les membres du comité de thèse Marc Lepetit, Pierre Hilson et Marianne Delarue pour les conseils qu'ils m'ont prodigués.

Je remercie les membres de l'équipe SILEG -présents et passés- pour m'avoir soutenue et secondée pendant ces cinq dernières années où j'ai mis de côté ma casquette « Lab' manager ».

Merci en particulier à

- Pierre, pour avoir été un stagiaire de M1 de compétition puis un stagiaire de M2 tout aussi brillant et enfin un collègue doctorant non moins louable !

Merci d'avoir partagé le même bureau, les manips et parfois même des échantillons, merci d'avoir échangé sur tes/mes/nos résultats, de m'avoir initiée aux extractions des petits ARNs et merci aussi de t'être occupé de la carruche !

- Corentin dit Coco qui nous a régalés de petits biscuits mais à qui j'ai fait les gros yeux quand il papotait trop avec son collègue Gautrat.

- Emeline qui a endossé mon rôle au labo pendant ces deux dernières années et a hérité de ma casquette « Multiprojets » ; merci d'avoir assumé toutes les « petites manips » à finir et aussi merci de nous avoir fait découvrir le jeu de Molkki.

- Mathias notre blagueur intarissable ! Merci pour ta bonne humeur, tes jeux de mots et autres calembours qui ont égayé nos repas, nos pauses café et nos réunions d'équipe…C'est promis, dès que j'aurais soutenu la thèse, je te prêterai un bras ou deux…

- Camille en tant que doctorante puis Post-doc : tu resteras notre doctorante-modèle, notre idéal à atteindre…

- Sovanna, sa bonne humeur et ses pâtisseries. J'ai apprécié nos discussions diverses et variées : la cuisine, les voyages, et tellement d'autres choses, la vie quoi !…

- Ambre, notre apprenti AgroParisTech et ses rapports d'étonnement. Je garderai de toi le souvenir des premières manips à l'IPS2 : le distributeur d'eau pure qui était toujours dans le rouge et me faisait enrager, les pois cultivés avec des filtres à thé qui ne nodulaient pas, etc…Ta présence nous a boostés dans cette période de transition !

-les anciens membres permanents de l' équipe, Véronique Gruber et Anouck Diet.

- les stagiaires qui sont passés dans l'équipe ces dernières années : Maureen, Maxime, Daniel, Charlotte, Hugo, Hind

Je remercie également les membres du plateau d'imagerie (Gautier, Halima, Aurélie, Thomas, Séverine) et l'équipe des Assistants de Prévention d'avoir été indulgents envers moi notamment pour mon manque de disponibilité ces derniers mois.

Merci à tous les membres de l'IP2, en particulier l'ensemble du personnel administratif, de la laverie, et de la serre qui réalisent un travail indispensable à notre activité de recherche.

Enfin, je tiens à remercier ma famille, mes amis, ceux qui me soutiennent, me poussent, d'ici-bas ou de là-haut !

Merci à Pascal de m'avoir encouragée à me lancer dans cette entreprise malgré les contraintes que cela supposait.

Merci à mes enfants qui ne m'ont pas (trop) eue sur le dos ces derniers mois, pour leur patience, leur soutien, chacun à leur manière.

SOMMAIRE

INTRODUCTION **1**

I. Le système racinaire des plantes légumineuses **2**

A . Plasticité développementale du système racinaire : une interaction entre développement et environnement 2

1. Croissance racinaire et ramifications 4

2. La nodosité fixatrice d'azote : un autre organe racinaire chez les légumineuses 7

B. Développement des nodosités symbiotiques fixatrices d'azote 9

1. Etape de reconnaissance des symbiontes, ou pré-infection 9

2. Infection par les bactéries symbiotiques 10

3. Initiation de l'organogénèse des nodosités et différenciation 13

4. Bases moléculaires de la symbiose fixatrice d'azote chez les plantes légumineuses 16

a) Perception des facteurs Nod 16

b) Génération d'oscillations calciques nucléaires 19

c) Transduction du signal en aval des oscillations calciques nucléaires 20

d) Régulateurs transcriptionnels agissant en aval des oscillations de calcium 20

(1) CYCLOPS/IPD3 21

(2) Les facteurs de transcription NSP1 et NSP2 22

(3) Les facteurs de transcription ERN 22

(4) Les facteurs de transcription NF-Y 23

(5) Le facteur de transcription NIN 25

e) Rôle des cytokinines lors de la mise en place des nodosités 28

II. Hormones peptidiques **34**

A. Définition 34

B. Le rôle des peptides CLE chez Arabidopsis 37

1. Les peptides CLE impliqués dans la maintenance des méristèmes 37

2. Le rôle des peptides CLE dans les interactions de la plante avec son environnement 40

C. Le rôle des peptides « C-Terminally Encoded Peptide » (CEP) dans la nutrition azotée chez Arabidopsis 43

III. Le rôle des hormones peptidiques chez les légumineuses **48**

A. Les peptides de signalisation impliqués dans l'infection symbiotique et l'organogénèse des nodosités 49
B. Les peptides de signalisation impliqués dans la régulation du nombre de nodosités 50
1. Les peptides CLE et l'AON 50
a) Modification et perception des peptides CLE liés à l'AON 50
b) Signaux systémiques descendants agissant en aval du module CLE/récepteur dans l'AON 54
c) Inhibition de la nodulation par le nitrate via des peptides CLE 56
2. Les peptides CEP 57

IV. Objectifs de la thèse **60**

CHAPITRE I: Identification d'un signal peptidique agissant via le récepteur LRR-RLK CRA2 pour contrôler le nombre de racines latérales et de nodosités chez *Medicago truncatula.* **63**

Introduction et l'article 1 **64**

CHAPITRE II: Relations entre la voie de signalisation médiée par le récepteur CRA2 et la voie de l'AON médiée par SUNN. **65**

I. Introduction et article 2 **66**

II. Résultats complémentaires **68**

A. Expression "basale" des genes CEPs dans le mutant *cra2* 68
B. Localisation spatiale des transcrits CRA2 et SUNN dans des tiges et analyse d'une interaction physique des récepteurs en système hétérologue 69
C. Phénotype de nodulation d'un double mutant *cra2;sunn* généré dans le fond R108 70
D. Phénotype de nombre de racines latérales du double mutant *cra2;sunn* 71
E. Effet local de CEP1 sur le nombre de racines latérales. 72

CHAPITRE III: Intégration de la voie de signalisation CEP /CRA2 avec la voie cytokinine/CRE1 et la voie CLE/SUNN **74**

I. Introduction et article 3 **75**

II. Résultats complémentaires **77**

A. Rôle des facteurs de transcription ERN1 et NF-YA1 dans la régulation de l'expression de *CLE13* et *CEP7* 77
B. Expression basale de gènes de nodulation précoce dans le mutant *cra2* 78
C. Régulation de l'expression de *CEP7* en réponse à rhizobium dans un système de « split-root » 79

DISCUSSION GENERALE **81**

I. Comparaison de la voie CEP/CRA2 chez Medicago avec la voie CEP/CEPR chez Arabidopsis **82**

II. Coordination par le facteur de transcription NIN de la régulation de différents peptides de signalisation régulant la nodulation **86**

III. Connections entre les voies de signalisation des cytokinines et des peptides hormonaux **89**

IV. Intégration des résultats issus de cette Thèse avec l'identification du module miR2111/TML comme cible commune des voies systémiques CEP/CRA2 et CLE/SUNN **93**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES **96**

INTRODUCTION

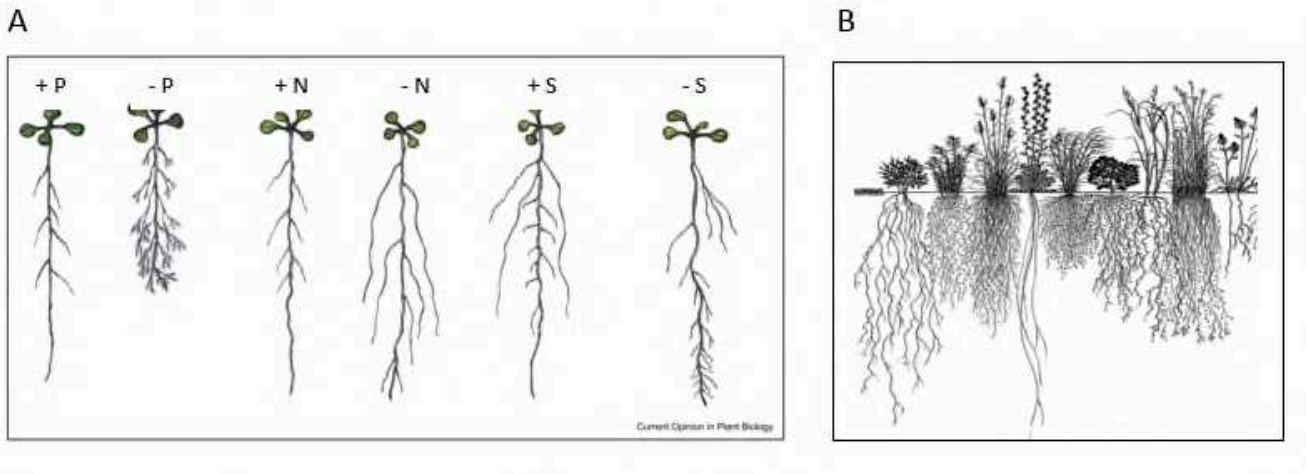


Figure 1 : L'architecture du système racinaire est influencée par une combinaison de facteurs environnementaux et génétiques.

(A) Schéma illustrant les variations d'architecture du système racinaire d'Arabidopsis en réponse à la disponibilité en nutriments phosphate (P), azote (N) ou soufre (S).
(d'après Lopez-Bucio et al., 2003)

(B) Illustration de la diversité des architectures racinaires observées dans un même environnement pour différentes espèces végétales.
(modifié à partir de Heidi Natura, Conservation Research Institute,
http://livinghabitats.com/root-diagram/)

I. Le système racinaire des plantes légumineuses

A. Plasticité développementale du système racinaire : une interaction entre développement et environnement

Les plantes, organismes sessiles, sont soumises tout au long de leur cycle de développement à des fluctuations de leurs conditions environnementales, concernant à la fois les conditions de lumière, la présence de stress biotiques et abiotiques, et la disponibilité en eau et en nutriments dans le sol (Malamy, 2005). Cet environnement, et notamment la composition des sols, n'étant pas homogène, le développement et la croissance de la plante sont étroitement dépendants de cette hétérogénéité. Ainsi, le système racinaire est confronté à des gradients d'humidité, d'acidité et de température, mais également à la présence de zones riches en nutriments dont la concentration va s'amenuiser dynamiquement au cours du temps, du fait de leur prélèvement par les racines et les microorganismes présents dans la rhizosphère (Lynch, 1995; Hodge et al., 2000). Une des stratégies permettant à la plante de s'adapter à l'hétérogénéité de la distribution des nutriments dans le sol, dans le temps et/ou dans l'espace, consiste à moduler la croissance et l'architecture de son système racinaire afin de pouvoir plus efficacement explorer les sols pour coloniser préférentiellement les zones riches en eau et nutriments qui sont cruciaux pour sa croissance, et éviter les zones défavorables à son développement. Cette plasticité développementale des racines se traduit par des modifications de leur vitesse de croissance, du nombre de ramifications -ou racines latérales- ainsi que de l'orientation de ces racines latérales par rapport à la gravité (Giehl et al., 2014). Le nombre et la croissance des racines latérales sont notamment stimulés dans les compartiments du sol où les concentrations en nutriments (nitrate, phosphate…) sont importantes (Drew et al., 1973; Drew, 1975). Du fait de cette plasticité, les plantes peuvent compenser la faible disponibilité en nutriments d'une partie de leur système racinaire en favorisant le développement des racines situées dans les régions du sol qui sont riches en nutriments, et ainsi assurer une croissance des parties aériennes comparable, que les racines aient accès à une quantité donnée de nutriments de manière homogène ou hétérogène (Fransen et al., 1998; De Kroon et al., 2005). L'architecture du système racinaire est donc influencée par ces facteurs environnementaux mais aussi par des facteurs génétiques (**Figure 1**) : ainsi, une grande variabilité d'architecture des systèmes racinaires, plus ou moins profonds, plus ou moins

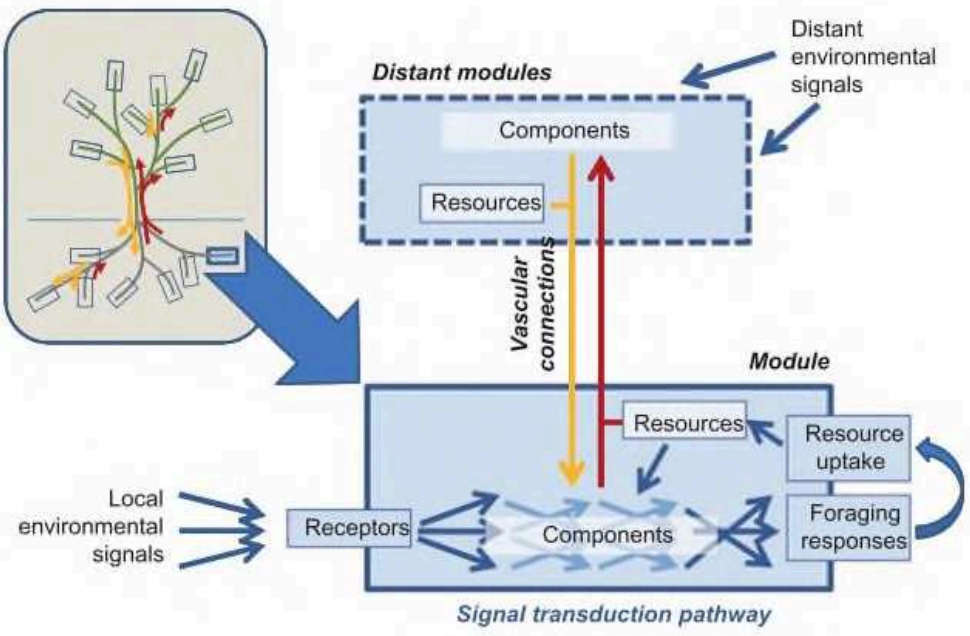


Figure 2 : Régulations locales et systémiques du développement des plantes.

Schéma illustrant une théorie modulaire du fonctionnement des plantes, impliquant des connections locales entre différents modules des racines ou des parties aériennes, et à distance entre racines et parties aériennes. Les flèches orange et rouges représentent respectivement les flux vasculaires descendants et ascendants de sève. Chaque module comporte des récepteurs qui détectent les différents signaux environnementaux et transduisent localement une cascade de signalisation aboutissant à une réponse développementale (croissance, ramification) et physiologique (import de nutriments). Ces réponses de recherche de nutriments sont contrôlées localement via l'absorption des nutriments, ou plus globalement au travers de l'ensemble de la plante via des régulations systémiques générées par des signaux perçus localement dans des modules distants. Ces signaux systémiques circulant par les tissus vasculaires intègrent le statut nutritionnel déficitaire ou à satiété de la plante. Chaque module local exporte également des signaux et des ressources (nutriments) via les tissus vasculaires, affectant les réponses de modules distants. (d'après de Kroon et al., 2009)

étroits, existe dans une même niche écologique selon les espèces végétales (Malamy, 2005).

La plasticité développementale peut être aussi interprétée comme une stratégie, certains auteurs proposant même le terme de « comportement » de la plante, afin d'optimiser sa recherche de nourriture, impliquant un ensemble de modifications physiologiques et morphologiques du système racinaire qui permettent d'améliorer directement ou indirectement le prélèvement des ressources essentielles (Hutchings et de Kroon, 1994). De Kroon et al. (2009) propose un modèle dans lequel la plante est considérée comme un ensemble de modules percevant localement des signaux environnementaux (**Figure 2**). Pour chacun de ces différents modules, le signal perçu localement induit une voie de signalisation qui, en intégrant ce signal avec ceux provenant des modules distants de la racine ou des parties aériennes, va permettre de générer une réponse locale visant à optimiser la recherche de nutriments et leur absorption en fonction de la disponibilité en ressources et des besoins de la plante. La plasticité du système racinaire dépend ainsi d'une combinaison de signaux locaux et systémiques, c'est-à-dire agissant à distance de leur lieu de production.

L'existence et l'intégration de ces signalisations locales et à longue distance ont été notamment mises en évidence dans le contexte de l'analyse du développement racinaire en réponse à la disponibilité en azote. Ainsi, une application localisée de nitrate sur le système racinaire, ou l'utilisation d'un milieu de culture hétérogène contenant des zones riches ou pauvres en nitrate, ont permis de mettre en évidence une stimulation de l'élongation des racines latérales (**Figure 3A**) (Drew et al., 1973; Robinson, 1994; Zhang et Forde, 1998; Linkohr et al., 2002). A l'inverse, une inhibition de la croissance des racines latérales est observée lorsque les plantes sont cultivées dans un milieu homogène riche en nitrate, dès 10mM de KNO_3 (Zhang et Forde, 1998). Ces différences révèlent que pour une même condition environnementale, dans ce cas une forte concentration en azote, les réponses locales observées diffèrent en fonction du statut azoté global de la plante, et que les signaux et réponses locales semblent « dominés » par les signaux et réponses systémiques qui intègrent le statut nutritionnel global de la plante (Forde, 2002). Des expériences de « split-root », dans lesquelles les deux moitiés d'un système racinaire sont soumises à des environnements différents, sont utilisées pour différencier les réponses locales et systémiques. La **figure 3B** décrit un « split-root » mis en œuvre pour analyser les signaux de demande ou

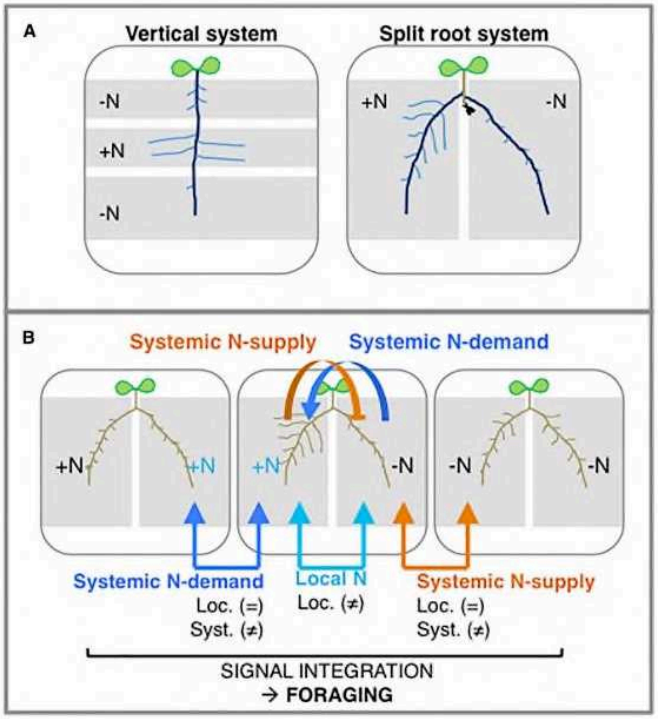


Figure 3 : Schémas représentant différents types de « design » expérimentaux permettant d'étudier séparément les réponses locales et systémiques.

(A) Deux types de « design » expérimentaux sont utilisés pour mettre en évidence que la croissance des racines latérales a lieu préférentiellement dans les régions riches en azote (+N) au détriment des régions pauvres en azote (-N). A gauche, la racine principale est cultivée dans un milieu hétérogène comprenant des segments dépourvus d'azote (-N) ou riches en azote (+N); à droite, la plante est cultivée selon la technique de « split-root » qui permet de générer deux racines latérales équivalentes et de les cultiver indépendamment sur des milieux différents (ici + ou – N). Les racines néoformées sont représentées en bleu foncé, les racines latérales en bleu clair.

(B) « Design » expérimental permettant d'étudier les modifications d'architecture racinaire en réponse à des milieux homogènes ou hétérogènes en azote. Ce « design » implique trois « split-roots »: un hétérogène au centre, et deux homogènes, soit riche en N (à gauche), soit pauvre en N (à droite). Sous le schéma, il est indiqué comment les trois types de signaux peuvent être déduits par la comparaison de ces trois conditions : (i) un effet local de l'azote peut être mis en évidence par la comparaison des deux compartiments d'un « split-root » hétérogène ; (ii) un signal systémique d'approvisionnement en azote peut être identifié par la comparaison du compartiment riche en azote (+N) d'un « split-root » hétérogène avec celui d'un « split-root » homogène riche en azote ; (iii) un signal systémique de demande d'azote peut être détecté par la comparaison du compartiment en déficit d'azote (-N) d'un « split-root » hétérogène avec celui d'un « split-root » homogène en déficit d'azote. Loc : signal local ; Sys : signal systémique. (d'après O'Brien et al., 2016)

d'approvisionnement en azote, et déterminer si ces signaux sont locaux et/ou systémiques (Ruffel et al., 2011; O' Brien et al., 2016). D'une part, la comparaison des deux compartiments racinaires d'une même plante en « split-root » hétérogène permet de mettre en évidence l'existence d'un effet local de l'azote. D'autre part, la comparaison du compartiment riche en azote (+N) d'un « split-root » hétérogène avec celui d'un « split-root » homogène où toutes les racines sont dans un milieu riche en azote, révèle l'existence d'un signal systémique d'approvisionnement en azote -généré par la perception locale du nitrate-, qui va inhiber le développement des racines latérales dans le compartiment carencé en azote. Quant à la comparaison du compartiment en déficit d'azote (-N) d'un « split-root » hétérogène avec celui d'un « split-root » homogène en déficit d'azote, elle met en évidence l'existence d'un signal systémique de demande d'azote, qui va favoriser la croissance des racines latérales dans le compartiment riche en azote. Ainsi, la plante en « split-root » hétérogène induit un développement compensatoire des racines dans le compartiment riche en azote, qui dépend d'une régulation systémique impliquant les parties aériennes de la plante (Ruffel et al., 2011; O' Brien et al., 2016).

1. Croissance racinaire et ramifications

Le système racinaire assure des fonctions cruciales pour la nutrition et le développement de la plante, en absorbant l'eau et les nutriments minéraux essentiels tout en offrant un ancrage dans le sol (Shekhar et al., 2019). Sa plasticité développementale implique que certaines cellules de la racine restent indifférenciées tout au long de la vie de la plante, au niveau des méristèmes, ou soient capables de se dé-différencier pour reformer des cellules souches pluripotentes. Cette capacité de croissance continue, indéterminée, implique aussi l'existence de mécanismes de régulation pour contrôler l'activation ou l'inhibition du développement et de la croissance des racines (Malamy, 2005).

Chez les plantes de la famille des Dicotylédones, comme l'espèce *Medicago truncatula* qui est l'objet de cette thèse, le système racinaire se développe à partir de la radicule formée durant l'embryogénèse. Cette racine primaire (RP) donne naissance ensuite à des racines secondaires, capables à leur tour de se ramifier en racines tertiaires, pour former au final un ensemble de racines latérales (RL).

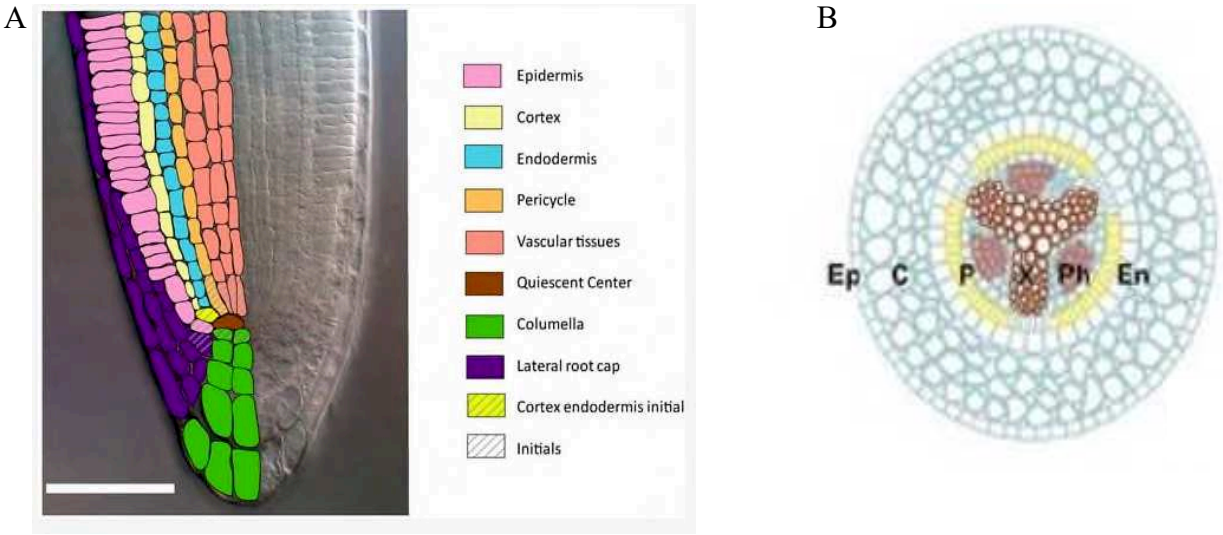


Figure 4 : Structure cellulaire de racines de Dicotylédones.

(A) Organisation cellulaire du méristème apical racinaire d'*Arabidopsis thaliana*. Apex d'une racine primaire d'*A. thaliana* observée en microscopie à contraste interférentiel (DIC), sur laquelle sont représentés avec une couleur différente les différents types cellulaires. Le centre quiescent est indiqué en marron, et les cellules initiales sont représentées par des hachures. Barre d'échelle : 50µm.
(d'après Barrada et al., 2015)

(B) Vue radiale de l'organisation cellulaire d'une racine de *Medicago truncatula.* Image d'une coupe transversale de racine primaire de *M. truncatula*. Au centre de la racine, le cylindre central constitué de faisceaux de xylème (X) et de phloème (Ph) est délimité par une couche de cellules du péricycle (P), puis de l'endoderme (En), de plusieurs couches de cellules de cortex (C) et d'une couche de cellule épidermiques (Ep) extérieure.
(d'après Kondorosi et al., 2005)

La racine d'*Arabidopsis thaliana* a été largement utilisée comme modèle pour comprendre le développement racinaire en raison notamment de la simplicité de sa structure et de son accessibilité pour les approches de biologie cellulaire sur tissus vivants. Le méristème apical racinaire (RAM) de la racine primaire est organisé autour d'un centre quiescent (QC) associé à des cellules souches, ou cellules initiales, qui seront à l'origine des différents tissus de la racine (**Figure 4A**). Les cellules initiales du méristème proximal sont à l'origine des tissus vasculaires, épidermiques et des files de cellules du cortex et de l'endoderme. Le méristème distal est à l'origine des cellules de la coiffe racinaire (Scheres et al., 1994).

Au-dessus de cette zone méristématique apicale où ont lieu les divisions dans les différentes files cellulaires, les cellules cessent de se diviser et s'allongent (zone d'élongation), avant de se différencier (zone de différenciation). Cette dernière zone se visualise facilement de par la différenciation de poils absorbants au niveau de certaines cellules épidermiques, responsables de l'absorption de l'eau et des nutriments (**Figure 5A**) (Shekhar et al., 2019).

Sur une coupe transversale de racine, le cylindre central, au centre, inclue les tissus vasculaires, xylème et phloème, assurant les mouvements de sèves et donc d'eau, de nutriments, et de signaux entre les racines et les parties aériennes de la plante. Le cylindre central est lui-même entouré de couches successives de cellules : le péricycle, l'endoderme, le cortex, et l'épiderme**.** Dans une racine jeune d'Arabidopsis, une seule couche de chaque tissu existe, tandis que chez de nombreuses espèces dont *M. truncatula*, le tissu cortical est constitué de plusieurs assises de cellules depuis l'apex racinaire (**Figure 4B**) (Kondorosi et al., 2005).

Contrairement à la racine primaire, le développement des RLs est post-embryonnaire. Les différentes étapes de la formation des RLs -pré-initiation, initiation, développement, émergence et activation du méristème néoformé (Péret et al., 2009; Banda et al., 2019)- constituent autant de points de régulation possibles, positifs ou négatifs, permettant de réguler leur formation et leur croissance, et ainsi permettre la plasticité développementale du système racinaire (Tian et al., 2014). Chez Arabidopsis, la pré-initiation des RLs, appelée « priming », est déterminée dans le méristème basal qui correspond à une zone où les cellules du péricycle

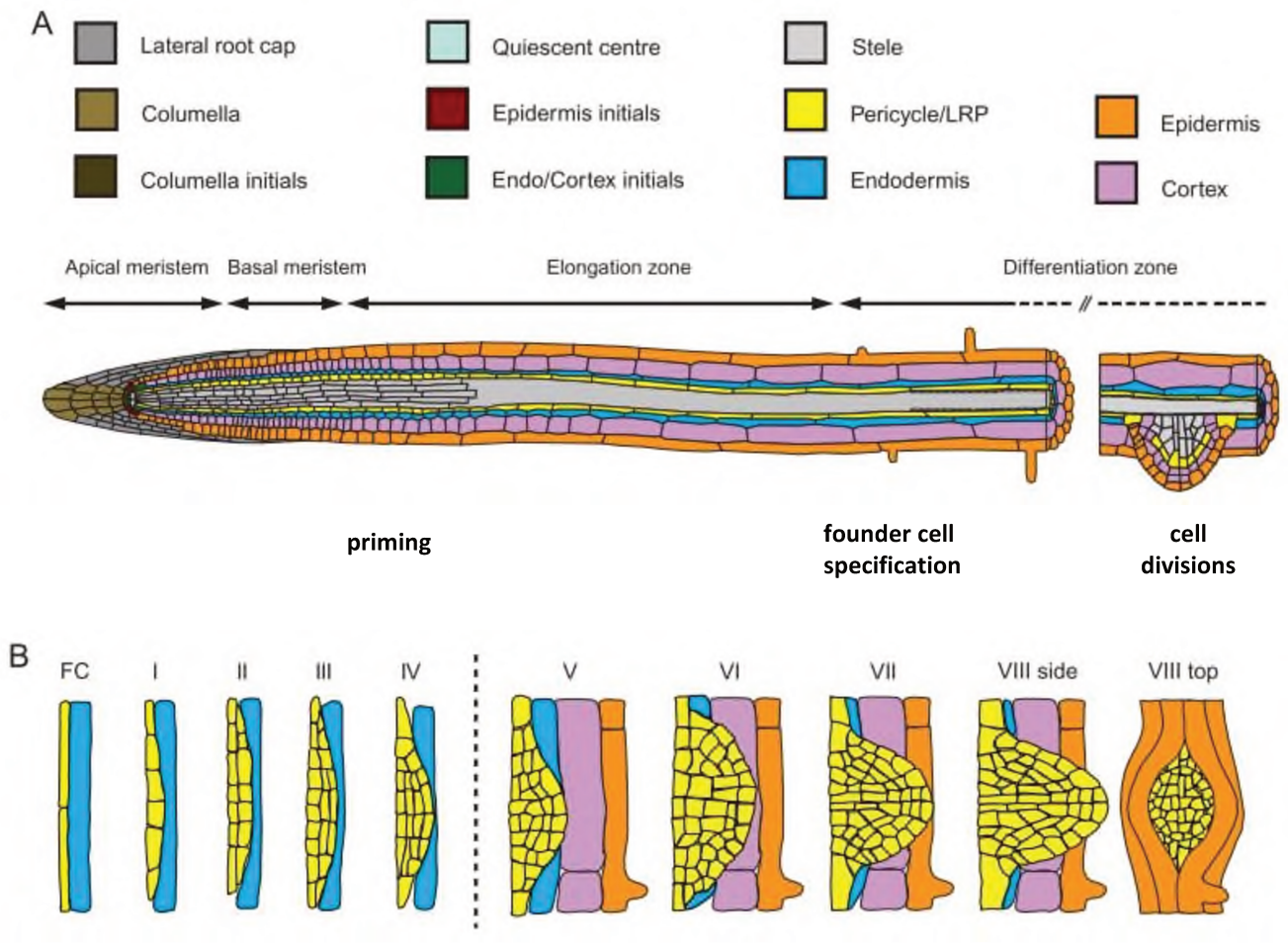


Figure 5 : Différenciation des racines et formation des racines latérales chez *Arabidopsis thaliana.*

(A) Représentation schématique d'une racine d'Arabidopsis avec, de gauche à droite, le méristème apical racinaire (RAM), le méristème basal où les cellules prolifèrent, la zone d'élongation cellulaire, et la zone de différenciation cellulaire où se forment les poils absorbants et les primordia de racines latérales (RLs), La pré-initiation (priming) des RLs et la spécification des cellules fondatrices ont lieu au niveau du méristème basal et au début de la zone de différenciation, respectivement.

(B) Représentation schématique de la formation des RLs, depuis la mise en place des cellules fondatrices des RLs et de l'initiation des divisions cellulaires jusqu'à la formation d'un primordium constitué de 1 à 4 couches de cellules (stades I à IV), atteignant l'endoderme de la racine principale (stade IV), puis le cortex et l'épiderme de la racine principale (stades V à VII), et enfin, émergeant de la racine principale (stade VIII).
(modifié d'après Shekhar et al., 2019)

situées en face des pôles de xylème sont dans un stade du cycle cellulaire leur permettant de rentrer en mitose (phase G2), alors que les cellules du péricycle situées à proximité des pôles de phloème sont arrêtées en phase G1 (Casimiro et al., 2003; Beeckman et al., 2001). Cette première étape de pré-initiation est associée à une signalisation hormonale médiée par l'auxine, car des oscillations de la réponse à l'auxine sont observées au niveau des cellules du péricycle à proximité des sites de pré-initiation. Il a été proposé que la pré-initiation des RLs pourrait résulter de la perception par les cellules du péricycle d'un signal produit par les cellules du xylème (De Smet et Beeckman, 2011).

Après leur pré-initiation, certaines cellules du péricycle acquièrent dans une fenêtre développementale définie, située au début de la zone de différenciation de la racine primaire, la spécification de cellules fondatrices qui initient des divisions cellulaires et deviennent ainsi compétentes pour l'initiation des RLs (Dubrovsky et al., 2011).

Le développement d'une RL débute ainsi dans la zone de différenciation par une augmentation de volume des cellules fondatrices qui se divisent ensuite de manière anticline (Casimiro et al., 2001). Une succession de divisions cellulaires anticlines et périclines aboutit à la formation d'un primordium de RL. Malamy et Benfey (1997) définissent huit stades de développement des RL chez Arabidopsis (**Figure 5B**): le stade I est constitué d'une seule couche de cellules, les stades II à IV sont composés respectivement de deux, trois et quatre assises de cellules, atteignant l'endoderme au stade IV. Les divisions cellulaires atteignent ensuite le cortex et l'épiderme racinaire (stades V à VII) puis le primordium émerge de la racine (stade VIII) (Malamy et Benfey, 1997). Si l'ensemble de ces divisions dérive uniquement de cellules du péricycle chez Arabidopsis, la formation des RL implique aussi des divisions de cellules de l'endoderme et du cortex comme cela a été rapporté chez plusieurs autres espèces végétales et notamment chez *M. truncatula* (Bell et McCully, 1970; Casero et al., 1995; Herrbach et al., 2014; Xiao et al., 2019). Le développement d'une racine latérale de *M. truncatula* a été défini en sept stades. Le stade Ia débute comme chez Arabidopsis par des divisions anticlines de cellules du péricycle à proximité des pôles de xylème. Les cellules du péricycle se divisent ensuite de manière péricline et les cellules avoisinantes de l'endoderme se divisent à leur tour de manière anticline (stade Ib). Par la suite, les divisions périclines des cellules du péricycle conduisent à la formation d'une bicouche de cellules (stade II), puis au stade III, en plus des divisons du péricycle qui génèrent quatre assises de cellules, les cellules

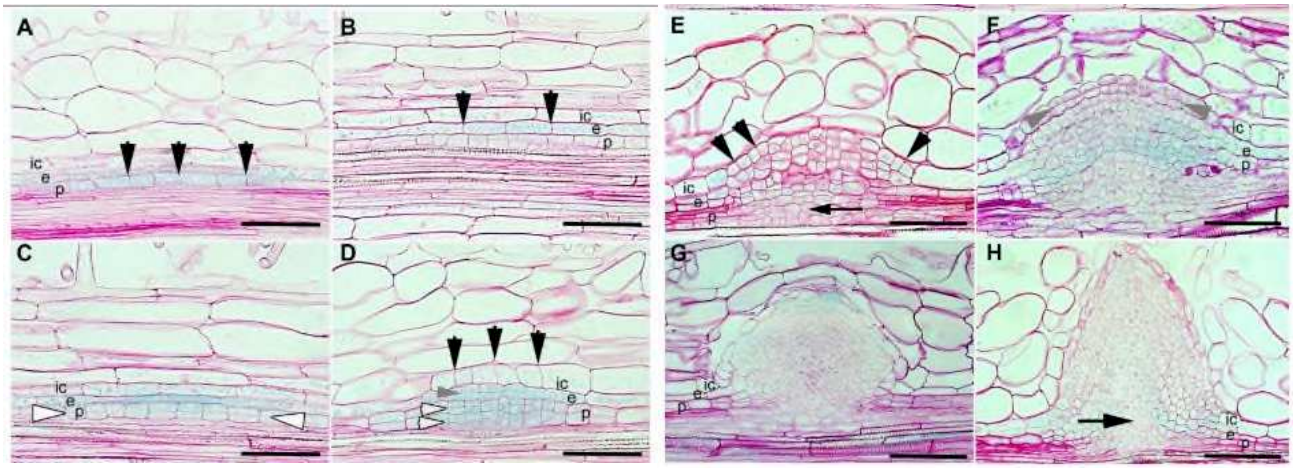


Figure 6 : Stades de développement des racines latérales chez *M. truncatula.*

Des sections longitudinales (8-10µm) de racines ont été colorées au rouge de ruthénium, et expriment des gènes marqueurs de l'endoderme et du péricycle (A-F, H) ou du méristème apical (G) (coloration bleue).

(A) Stade Ia. Premières divisions anticlines de cellules du péricycle (flèches noires).
(B) Stade Ib. Divisions anticlines de l'endoderme (flèches noires) et divisions périclines des cellules du péricycle.
(C) Stade II. Divisions périclines des cellules du péricycle (flèches blanches) formant une bicouche de cellules du péricycle et divisions anticlines de l'endoderme.
(D) Stade III. Divisions périclines du péricycle formant quatre couches (flèches blanches), divisons périclines de l'endoderme formant deux couches (flèches grises), et divisions anticlines du cortex interne (flèches noires).
(E) Stade IV. Divisions des cellules du péricycle, de l'endoderme et du cortex.
(F) Stade V. Extension du primordium grâce à la prolifération des cellules des trois tissus. Les cellules corticales adjacentes commencent à s'effacer.
(G) Stade VI. Le primordium de racine latérale atteint l'épiderme.
(H). Stade VII. Le primordium de racine latérale traverse l'épiderme.
p: péricyle; e: endoderme ; ic : cortex interne. Barre d'échelle : 100 µm.
(d'après Herrbach et al., 2014)

de l'endoderme et du cortex interne se divisent à leur tour. Les divisions des cellules de ces trois tissus continuent et le primordium de RL occupe la moitié de l'épaisseur du cortex (stade IV), puis sa taille dépasse la moitié du cortex (stade V). Enfin, le primordium atteint l'épiderme (stade VI) et émerge de la racine parentale (stade VII) (**Figure 6**) (Herrbach et al., 2014).

2. La nodosité fixatrice d'azote : un autre organe racinaire chez les légumineuses

Chez les plantes de la famille des Légumineuses (Fabacées), la plasticité du système racinaire se traduit non seulement par leur capacité à former plus ou moins de RLs, et à réguler la longueur de ces racines, mais aussi par la formation d'un autre type d'organe racinaire, la nodosité symbiotique fixatrice d'azote.

En effet, les plantes légumineuses ont la particularité de s'adapter à un déficit azoté via la mise en place d'une interaction symbiotique avec des bactéries du sol, collectivement nommées rhizobia, aboutissant à la formation de nodosités racinaires. Ces organes sont le siège d'échanges nutritionnels mutualistes entre les deux symbiontes : les plantes accueillent et nourrissent les bactéries symbiotiques qui ont une capacité de fixer l'azote, présent en quantité non-limitante dans l'atmosphère, en ammonium qui est assimilable par la plante. Les symbioses fixatrices d'azote entre plantes et bactéries, apparues il y a environ 60 millions d'années, ont tout d'abord un intérêt écologique important car elles permettent aux plantes ayant cette capacité, de survivre et de coloniser des milieux dont la teneur en azote est très faible, l'azote étant un facteur limitant majeur de la croissance végétale. De plus, ces plantes légumineuses présentent aussi un intérêt agronomique, car elles permettent d'une part d'enrichir les sols en azote de manière alternative à l'apport d'intrants azotés; et d'autre part, ces plantes riches en protéines végétales sont utilisées comme plantes fourragères pour nourrir le bétail et comme plantes à graines protéagineuses, représentant ainsi une alternative aux protéines d'origine animale dans l'alimentation humaine.

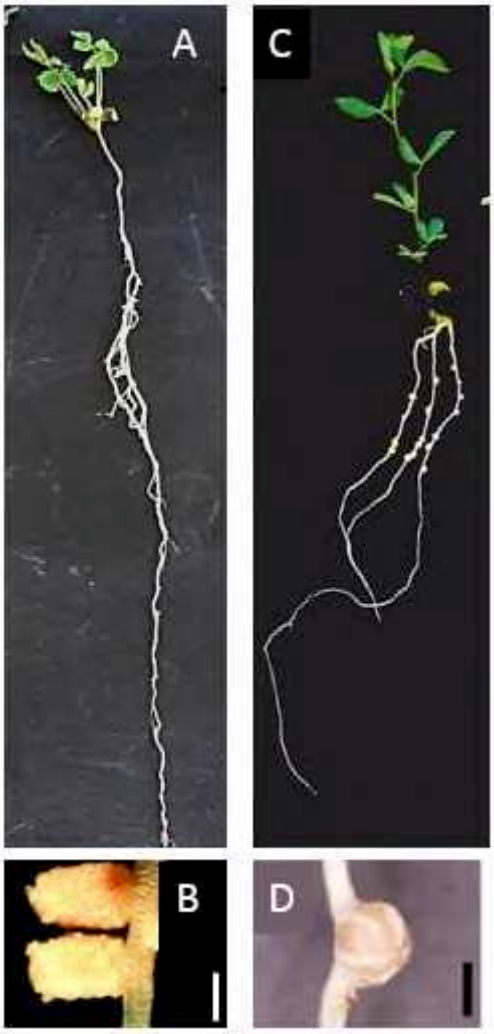


Figure 7 : *Medicago truncatula* et *Lotus japonicus,* des plantes modèles d'étude de la symbiose fixatrice d'azote chez les légumineuses.

Images représentatives de plantes de *Medicago truncatula* (A-B) et de lotier (*Lotus japonicus* C-D)

(A) Plante de *M. truncatula* génotype Jemalong A17, deux semaines après inoculation par *Sinorhizobium meliloti* en condition de déficit azoté. (B) Nodosités symbiotiques fixatrices d'azote à croissance indéterminée, trois semaines après inoculation. (C) Plante de *L. japonicus* génotype Gifu, trois semaines après inoculation par *Mesorhizobium loti* en condition de déficit azoté (D) Nodosités à croissance déterminée, trois semaines après inoculation. Barre d'échelle : 2 mm.

(d'après données personnelles (A); Penmetsa et al., 2003, (B); Szczyglowski et al., 1998, (C); Suzaki et al., 2013 (D))

Deux grands types de nodosités racinaires sont décrits: les nodosités à croissance indéterminée, qui se développent généralement sur les racines de légumineuses tempérées telles que *M. sativa* (la luzerne), *M. truncatula*, ou *Pisum sativum* (le pois) ; et les nodosités à croissance déterminée qui se forment principalement sur les racines de légumineuses subtropicales telles que *Lotus japonicus* (le lotier), *Glycine max* (le soja), ou *Phaseolus vulgaris* (le haricot). La différence majeure entre ces deux types de nodosités réside dans l'existence d'un méristème persistant dans le cas de la nodosité à croissance indéterminée, qui lui confère une forme allongée ; tandis que la nodosité déterminée n'a pas de méristème persistant et est en conséquence de forme arrondie. Pour chacun de ces types de nodosités, une espèce de légumineuse associée à un partenaire symbiotique a été choisie comme modèle d'étude: *M. truncatula* en interaction avec *Sinorhizobium meliloti* ou *S. medicae*, cette dernière souche ayant été identifiée comme fixant plus efficacement l'azote atmosphérique avec cette plante-hôte (Terpolilli et al., 2008) ; et *L. japonicus* associé à *Mesorhizobium loti* (**Figure 7**) (Ferguson et al., 2010). De nombreuses ressources génétiques et génomiques existent, comme la disponibilité de leur séquence génomique -les dernières versions des génomes publiés étant la v5.0 pour le génotype Jemalong A17 de *M. truncatula* (Pecrix et al., 2018) et pour *L. japonicus,* la v1.2 pour le génotype Gifu (Kamal et al., 2020) et la v3.0 pour le génotype MG20 (Li et al., 2020)- ainsi que l'existence de méthodes de transformation génétique efficaces, via *Agrobacterium tumefaciens* ou *A. rhizogenes* (Stougaard, 1995; Chabaud et al., 1996; Boisson-Dernier et al., 2001). De plus, des collections de mutants ont été générées, soit par mutagénèse chimique à l'EMS (Ethyl-Methane-Sulfonate), entrainant des substitutions nucléotidiques qui peuvent être identifiées par une approche de TILLING (« Targeted Induced Local Lesions in Genomes ») (Perry et al., 2003; Le Signor et al., 2009) ; soit par insertion de rétrotransposons *Tnt1* chez *M. truncatula* (Tadege et al., 2008) et LORE1 chez *L. japonicus* (Fukai et al., 2012; Urbański et al., 2012).

La mise en place de cette interaction symbiotique entre plantes légumineuses et bactéries rhizobia va être décrite en détail dans la prochaine section, en se focalisant sur les connaissances acquises chez *M. truncatula* et *L. japonicus.*

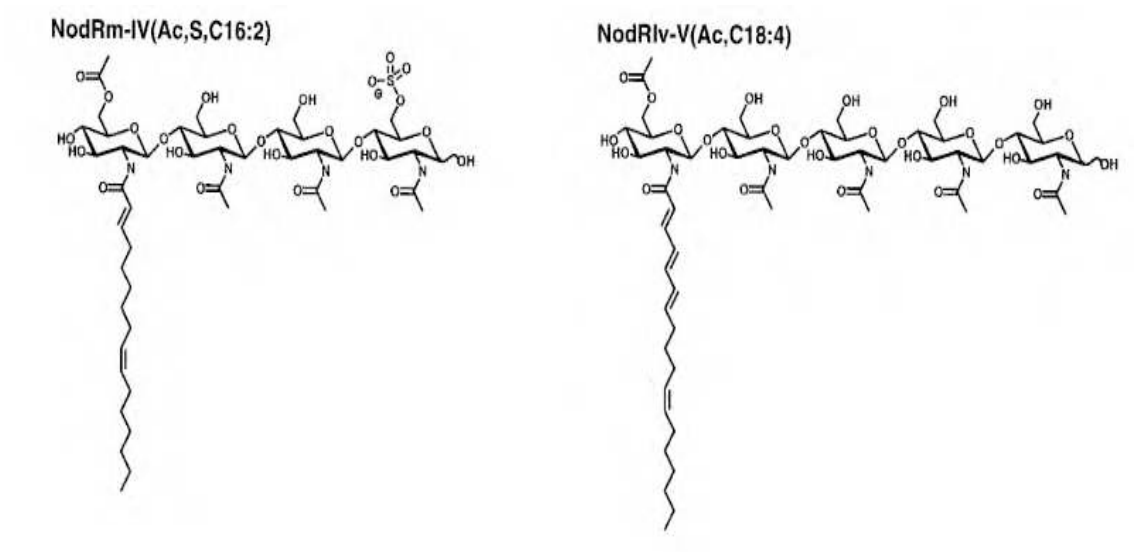


Figure 8 : Structure chimique des facteurs Nod.

Les facteurs Nod sont composés d'un squelette lipochitooligosaccharide (LCO) constitué de 4 à 5 résidus N-Acétylglucosamine reliés par des liaisons β1 → 4 (structure de la chitine) et dont le sucre terminal est lié à une chaine lipidique. Le facteur de nodulation NodRM-IV(Ac,S,$C_{16:2}$) est synthétisé par *S. meliloti,* et le facteur NodRlvV-V(Ac,$C_{18:4}$) par *S. leguminosarum bv viciae.* Les deux molécules signal diffèrent à la fois par la longueur du squelette oligosaccharidique, par la présence ou l'absence d'un résidu 6-O-sulfate décorant le dernier sucre, ainsi que par la longueur et la position des insaturations de la chaine lipidique.
(d'après Ehrhardt et al., 1996)

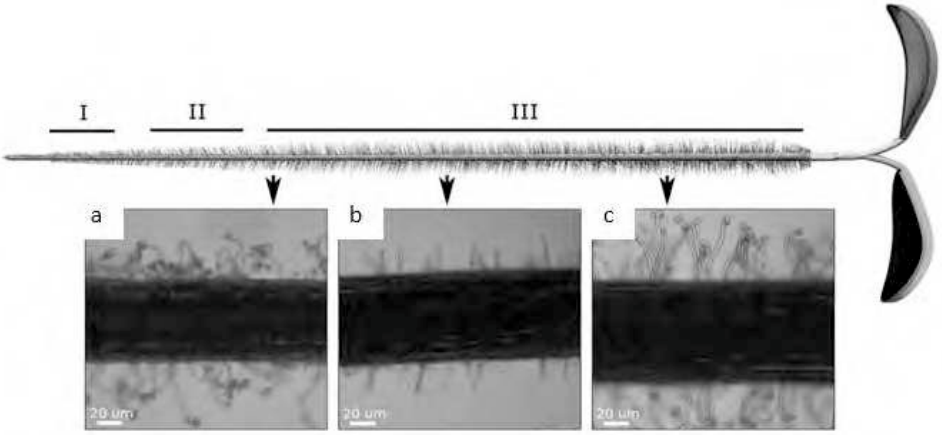
B. Développement des nodosités symbiotiques fixatrices d'azote

La capacité des légumineuses à développer des nodosités fixatrices d'azote atmosphérique lors d'un déficit azoté est déterminée par leur capacité à reconnaitre spécifiquement une espèce de rhizobium donnée. Après cette étape de reconnaissance de la compatibilité symbiotique entre les deux symbiontes, les bactéries infectent la plante-hôte au niveau des poils absorbants et induisent des divisions cellulaires au niveau des couches internes de la racine pour former un primordium de nodosité. Ce primordium se différencie ensuite en une nodosité, organe dans lequel les bactéries se différencient dans un environnement présentant une faible teneur en oxygène compatible avec une activité de fixation de l'azote atmosphérique.

1. Etape de reconnaissance des symbiontes, ou pré-infection

La mise en place des nodosités symbiotiques débute par un dialogue moléculaire entre les légumineuses et les bactéries rhizobia. Lors d'une carence en azote minéral dans le sol, les racines des légumineuses sécrètent dans la rhizosphère des composés phénoliques issus du métabolisme secondaire, les flavonoïdes, qui sont reconnus par les rhizobia (Weston et Mathesius, 2013). La perception de flavonoïdes spécifiques par les bactéries compatibles induit en retour la synthèse et la sécrétion par les bactéries de « facteurs de nodulation » (ou facteurs Nod) (Fisher et Long, 1992). Il existe cependant des espèces de *Bradyrhizobium* qui ont la faculté d'établir une interaction symbiotique avec certaines légumineuses hôtes *Aeschynomene* de manière indépendante de la production de facteurs Nod (Giraud et al., 2007; Bonaldi et al., 2011), les bactéries produisant alors des effecteurs symbiotiques via le système de sécrétion de type III (Teulet et al., 2019). Dans le cadre de cette thèse, l'interaction symbiotique modèle étudiée implique la production de facteurs Nod. Ces facteurs Nod sont composés d'un squelette Lipochitooligosaccharidique (LCO) constitué de 4 à 5 résidus N-Acétylglucosamine reliés par des liaisons β(1 → 4), dont le sucre terminal, non réduit, est lié à une chaine lipidique (Dénarié, 1996). Leur structure diffère selon la présence de motifs tels que des groupements méthyl, fucosyl, acétyl ou sulphate qui se greffent sur les résidus N-Acétylglucosamine du squelette LCO, ainsi que par le nombre et la position des

A



B

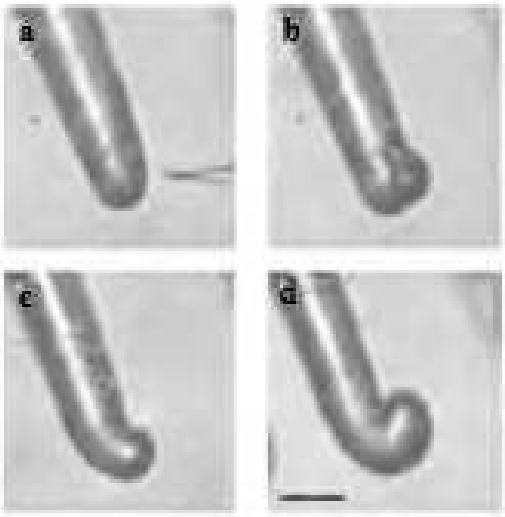


Figure 9 : Déformation des poils absorbants en réponse à rhizobium.

(A) Morphologie des poils absorbants de racines de *M. sativa* suite à l'inoculation par rhizobium. Le schéma représente trois zones de l'apex racinaire définies par l'état de croissance et de différenciation des poils absorbants. (a-c) modifications morphologiques des poils absorbants suite à l'inoculation par *Sinorhizobium meliloti*, en fonction de leur localisation par rapport à l'apex de la racine.
(d'après Gage et al., 2004)

(B) Cinétique de déformation d'un poil absorbant après application localisée de facteurs Nod. (a) Application de facteurs Nod 10^{-9}M à l'aide d'une micropipette sur un poil absorbant en croissance de racines de *M. truncatula*. (b) Après 15 minutes, le poil absorbant présente un gonflement à son extrémité. (c) Après 25 minutes, une réorientation de la croissance du poil absorbant est observée. (d) Après 50 minutes, une déformation du poil absorbant en « crosse de berger » a été initiée. Barre d'échelle : 18µm
(d'après Esseling et al., 2003)

insaturations sur la chaine lipidique, dont la longueur est par ailleurs variable. Ces décorations des facteurs Nod spécifiques à chaque souche bactérienne sont importantes pour la reconnaissance et la spécificité de l'interaction avec une (ou des) espèce(s) végétale(s) donnée(s) (**Figure 8**) (Roche et al., 1991; Ehrhardt et al., 1996; D'Haeze et Holsters, 2002). La spécificité de l'interaction symbiotique légumineuses/rhizobia repose donc à la fois sur la spécificité des flavonoïdes produits par la plante et des facteurs Nod produits par les bactéries, ainsi que par leur capacité à être perçus par l'autre partenaire (Ardourel et al., 1994; Denarié et al., 1996; Downie et Walker, 1999).

Les facteurs Nod induisent après leur perception par la plante-hôte un processus d'infection, préférentiellement au niveau de la région de la racine localisée au-dessus du méristème apical racinaire (**Figure 9A**) (Gage, 2004; Bhuvaneswari et al., 1981). Cette « zone de sensibilité à rhizobium » correspond à la région de la racine où les poils absorbants sont en cours de différenciation (Sieberer et al., 2005), et par conséquent n'ont pas encore de paroi secondaire qui constituerait un frein à leur plasticité développementale et à l'interaction symbiotique. En effet, la perception des facteurs Nod induit rapidement -en une heure environ- l'arrêt de la croissance des poils absorbants, et une réorientation de leur croissance apicale, ayant pour conséquence leur déformation en « crosse de berger » (**Figure 9B**) (Esseling et al., 2003; Sieberer et al., 2005). Des mouvements ioniques rapides sont induits par les facteurs Nod au niveau de la membrane plasmique de l'apex du poil absorbant infecté, et notamment un influx de calcium qui jouerait un rôle dans la ré-orientation de la croissance polarisée du poil absorbant (Miwa et al., 2006). Ainsi, l'application de facteurs Nod purifiés à faible concentration (10^{-12} - 10^{-9} M) suffit à induire une déformation des poils absorbants (Esseling et al., 2003), même si l'infection par les rhizobia est requise pour observer des « crosses de berger », et également pour initier des divisions cellulaires dans les couches internes de la racine, qui sont à l'origine de la formation des nodosités (Truchet et al., 1991).

2. Infection par les bactéries symbiotiques

L'infection symbiotique par les rhizobia se caractérise par la pénétration des bactéries symbiotiques dans les cellules végétales au niveau de l'épiderme. Chez les légumineuses modèles, comme *M. truncatula* ou *L. japonicus*, les rhizobia pénètrent la racine

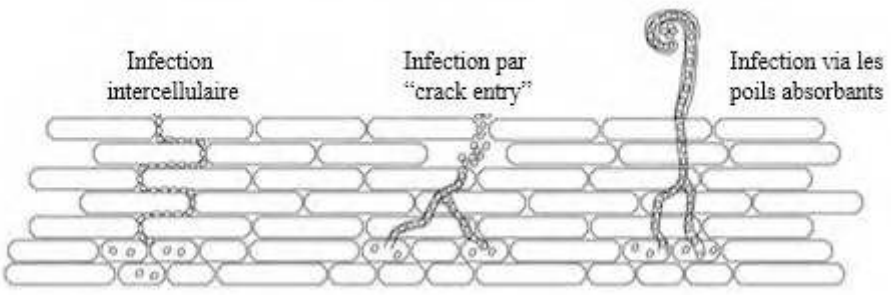


Figure 10 : Différents modes d'infection par les rhizobia chez les légumineuses.

De gauche à droite : infection intercellulaire, qui serait le mode d'infection le plus ancestral ; infection par « crack-entry » ; infection via les poils absorbants et la formation de cordons d'infection. (d'après Madsen et al., 2010b)

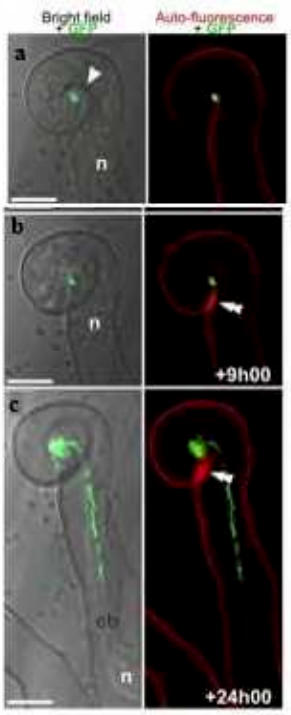


Figure 11 : Initiation de la formation d'un cordon d'infection

A gauche, images d'un poil absorbant de *M. truncatula* inoculé par une souche de *S. meliloti* exprimant le gène rapporteur *GFP*, prises en microscopie en champ clair ; et à droite, les mêmes images en microscopie confocale. (a) Les bactéries prolifèrent au sein du poil absorbant déformé en « crosse de berger ». (b) Les bactéries prolifèrent au sein d'une structure nommée chambre d'infection, formée par l'accumulation de matériel pariétal végétal autofluorescent, indiquée par la double flèche. (c) Formation du cordon d'infection permettant la progression des bactéries au sein du poil absorbant et de la racine. n : noyau ; cb : pont cytoplasmique ; échelle : 10 µm. (d'après Fournier et al., 2015)

essentiellement via les poils absorbants, mais l'infection symbiotique peut aussi se faire plus rarement de manière intercellulaire, indépendamment des poils absorbants (Sprent et James, 2007). Les bactéries s'immiscent alors entre les cellules épidermiques, ou au niveau d'une discontinuité de l'épiderme due à une blessure ou à l'émergence d'une RL, pour induire une infection dite par « crack-entry ». Ce mode d'infection a été décrit en particulier chez certaines légumineuses tropicales ou méditerranéennes telles qu'*Arachis hypogaea*, *Lupinus albus* ou *Sesbania rostrata* (**Figure 10**) (Chandler, 1978; González-Sama et al., 2004; Goormachtig et al., 2004; Madsen et al., 2010b).

Nous décrirons par la suite en détail uniquement le mode d'infection par les poils absorbants, vu qu'il est associé à l'interaction *M. truncatula* / *S. meliloti* qui sera étudiée dans cette thèse.

La première étape de l'infection rhizobienne via les poils absorbants débute par l'attachement des bactéries, qui serait facilité par des lectines présentes sur la partie apicale du poil absorbant. Ces lectines joueraient un rôle dans la stabilisation de l'interaction avec les bactéries symbiotiques compatibles grâce à des liaisons réversibles avec des polysaccharides de la paroi bactérienne, mais potentiellement aussi dans la spécificité de l'interaction (van Eijsden et al., 1995; De Hoff et al., 2009). Des liaisons plus fortes établies entre les fibres de cellulose des bactéries et le mucilage présent à la surface du poil absorbant stabilisent aussi l'interaction. La déformation des poils absorbants en crosse de berger permet d'abriter les rhizobia compatibles au sein d'une niche où ils prolifèrent et se trouvent regroupés dans une structure appelée chambre d'infection (**Figure 11**) (Esseling et al., 2003; Gage, 2004). Des micro-colonies se forment alors au sein de ces poches d'infection, qui vont dégrader la paroi cellulaire du poil absorbant (Ridge et Rolfe, 1985). Puis la membrane plasmique s'invagine pour former une structure tubulaire qui correspond à un cordon d'infection. Un remodelage du cytosquelette du poil absorbant est alors observé, accompagné de la migration du noyau à l'apex du cordon d'infection en croissance (Timmers et al., 1999). Un pont cytoplasmique se forme d'une part entre l'extrémité du cordon d'infection et le noyau de la cellule infectée, et d'autre part entre le noyau et la base du poil absorbant (**Figure 12**) (Fournier et al., 2008).

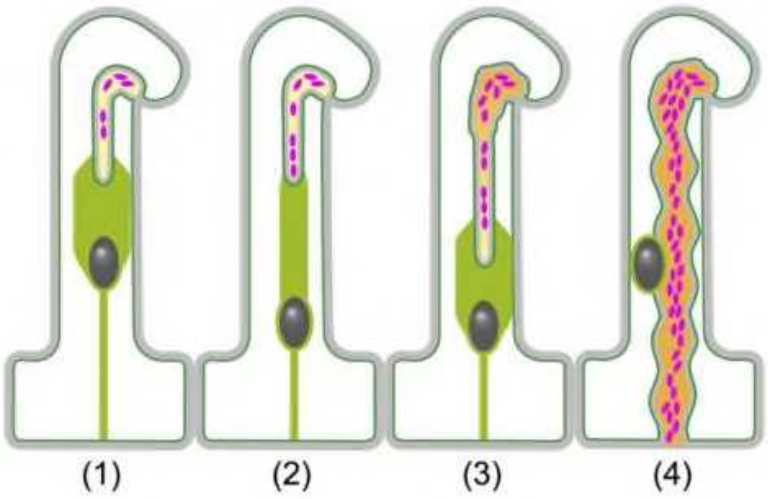


Figure 12. Différentes étapes de la progression du cordon d'infection dans les poils absorbants chez *M. truncatula*.

Les cordons d'infection récemment initiés contiennent une faible population de bactéries (1). Un large pont cytoplasmique connecte la pointe du cordon d'infection au noyau, alors qu'un autre pont cytoplasmique plus étroit relie le noyau à la base du poil absorbant (1-3). La distance entre le cordon d'infection et le noyau qui migre vers la base du poil absorbant peut varier de manière importante (2). Les bactéries se multiplient et colonisent le cordon (2, 4). Quand le cordon d'infection (4) atteint la base du poil absorbant, le noyau n'est plus positionné à l'extrémité du cordon d'infection.
Gris foncé : noyau ; gris clair : paroi cellulaire ; vert clair : réticulum endoplasmique; vert foncé : membrane plasmique ; jaune/orange, le gradient de couleur représente le degré de maturation de la matrice du cordon ; magenta : bactéries.
(d'après Fournier et al., 2008)

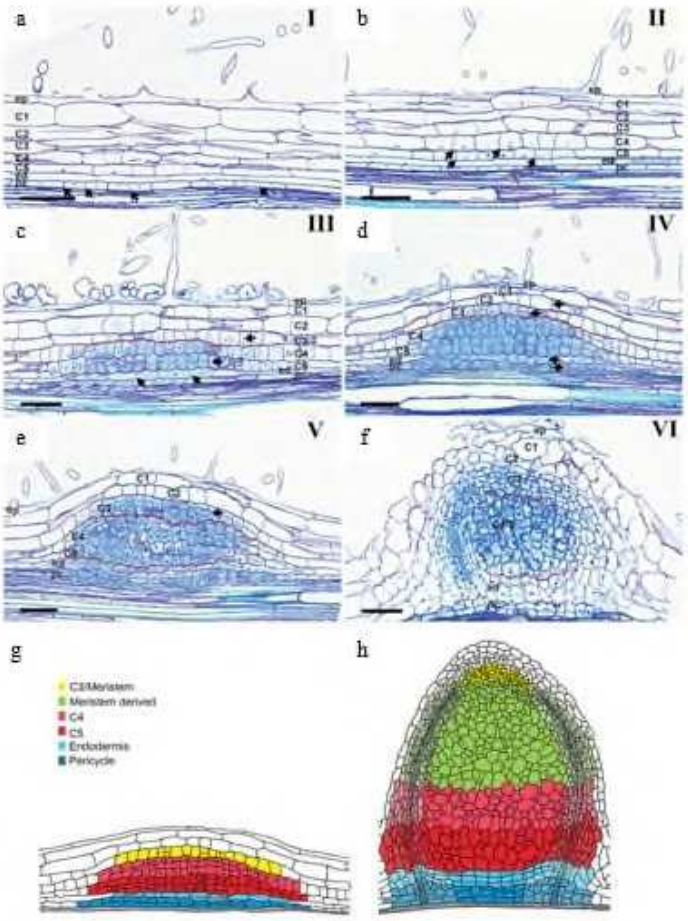


Figure 13: Différents stades de développement du primordium de nodosité chez *M. truncatula*.

Sections longitudinales de racines de *M. truncatula* à différents stades après inoculation par *S. meliloti.* (a) Stade I. Des divisions cellulaires anticlines sont induites dans le péricycle (flèches). (b) Stade II. Les divisions cellulaires anticlines s'étendent aux couches C5 et C4 du cortex (cortex interne). (c) Stade III. Les divisions cellulaires anticlines s'étendent à la couche C3 (cortex central) et à l'endoderme. Des divisions périclines sont induites dans les cellules dérivées de C4/C5. (d) Stade IV. Des divisions cellulaires périclines sont induites dans les cellules C3, l'endoderme et le péricycle. Les divisions des cellules C4/C5 continuent. Des cellules du cortex externe C2 se divisent (divisions anticlines). (e) Stade V. Les cellules dérivées de C3 forment environ 4 couches cellulaires; les cellules C4/C5 forment environ 8 couches de cellules; le péricycle et l'endoderme contribuent à former environ 6 couches de cellules à la base du primordium. Les cellules C2 et C1 se divisent occasionnellement de manière anticline, mais ont un rôle limité dans la formation de la nodosité. (f) Stade VI. Les faisceaux vasculaires sont formés à la périphérie du primordium; le méristème apical est mis en place. (c-f) : la ligne rouge indique la frontière entre les cellules dérivées de C3, de C4/C5, et de l'endoderme. Ep : épiderme ; C1 : couche de cortex n°1 ; C2 : n°2 … C5 : n°5 ; ed : endoderme ; pc : péricycle. Barre d'échelle : 75µm. (g-h) Représentation schématique du devenir des cellules du primordium d'une nodosité indéterminée. Les cellules du primordium (g) étant à l'origine des cellules de la nodosité (h) sont indiquées par une même couleur sur le schéma.
(modifié d'après Xiao et al., 2014)

La progression du cordon d'infection nécessite la formation en continu d'une nouvelle membrane isolant le contenu de la cellule végétale des bactéries, cette membrane étant constituée par la plante via des vésicules de sécrétion (Brewin, 1991). Le cordon d'infection progresse jusqu'à atteindre la base du poil absorbant, « guidé » par le noyau, puis le noyau de la cellule de cortex externe adjacente au site d'infection se repositionne à son tour, induisant la formation d'une nouvelle structure de pré-infection dans cette seconde cellule (Timmers et al., 1999). Un pont cytoplasmique intercellulaire permet alors le passage du cordon d'infection dans les couches cellulaires successives de la racine, jusqu'à atteindre le primordium de nodosité en formation.

3. Initiation de l'organogénèse des nodosités et différenciation

Simultanément à l'infection au niveau de l'épiderme par les rhizobia, des divisions cellulaires sont initiées dans les tissus internes de la racine, en face des pôles de protoxylème, à proximité du site d'infection (Timmers et al., 1999; Xiao et al., 2014). Chez les deux types de nodosités, l'initiation de l'organogénèse a lieu au niveau de tissus différents : la formation des nodosités indéterminées étant initiée par des divisions de cellules du péricycle et du cortex interne, alors que les nodosités déterminées résultent de divisions cellulaires initiées dans le cortex externe ou central (Oldroyd et al., 2011). Par la suite, nous allons détailler seulement le développement d'une nodosité indéterminée, qui correspond au modèle *M. truncatula* étudié dans cette thèse.

Les cellules du péricycle se divisent dans les 12 heures qui suivent le début de l'infection par les rhizobia, et des modifications du cytosquelette sont observées dans ces cellules dès 16 à 18 heures après inoculation (Timmers et al., 1999). Cette activation du péricycle se traduit d'abord par des divisions anticlines puis périclines, conduisant à la formation d'une bicouche de cellules au niveau du péricycle (**Figure 13**). Par la suite, les cellules du cortex interne se divisent à leur tour de manière anticline puis péricline, 18 à 24 heures après inoculation (Timmers et al., 1999). Pour définir à quelles files cellulaires de la racine de *M. truncatula* les cellules en division qui vont former le primordium de nodosité

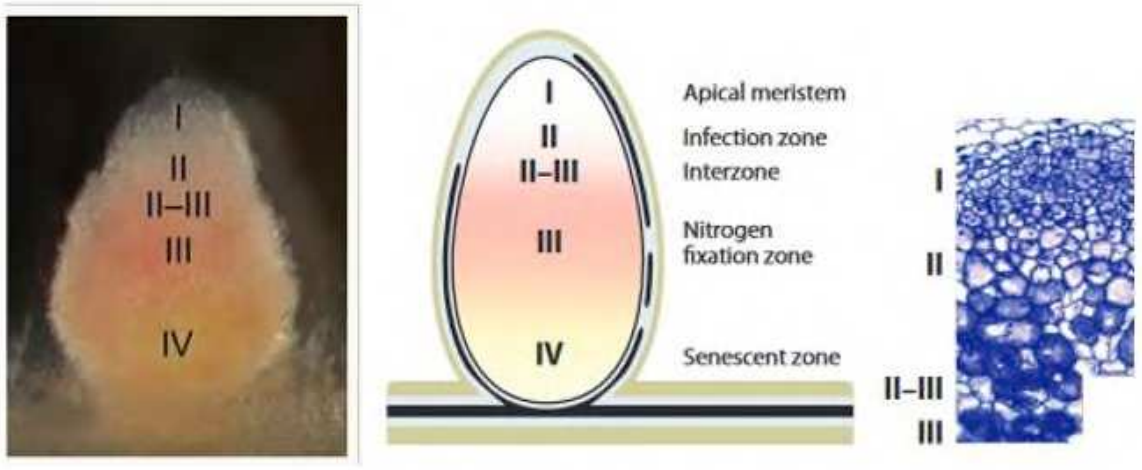


Figure 14 : Différentes zones centrales d'une nodosité indéterminée.

Les nodosités sont constituées d'un méristème apical (I), suivi d'une zone d'infection (II), d'une interzone II-III, d'une zone de fixation d'azote (III), et d'une zone de senescence basale (IV). Les cellules symbiotiques végétales et bactériennes se différencient dans la zone II et dans l'interzone II-III, et sont complètement différenciées et métaboliquement fonctionnelles dans la zone III. Lors de leur différenciation, le niveau de ploïdie des cellules végétales augmente à chaque cycle d'endoréplication, et leur volume augmente aussi progressivement (image de droite). La différenciation des bactéries en bactéroïdes implique également un processus d'endoréplication. Enfin, sur des nodosités âgées d'environ 4-5 semaines après inoculation, les cellules bactériennes et végétales commencent à se dégrader dans la zone IV de sénescence.
A droite, section de nodosité colorée au bleu de toluidine.
(modifié d'après Kondorosi et al., 2013)

appartiennent, la cellule appartenant à la couche corticale racinaire la plus externe est désignée C1, et celle appartenant à la couche corticale la plus interne C5 (**Figure 13**) (Xiao et al., 2014). Le primordium de nodosité est formé de divisions issues des couches internes racinaires C5 et C4, puis du cortex central (couche C3) 24 à 48 heures après inoculation. Les couches de cellules du cortex externe C1 et C2 se divisent occasionnellement mais ont un rôle limité dans la formation de la nodosité. Les cellules du cortex central C3 génèrent plusieurs couches de cellules qui constitueront le méristème apical de la nodosité, tandis que les cellules C4 et C5 produisent environ huit couches de cellules ayant une activité mitotique limitée et qui se différencient rapidement. Cette différenciation implique un processus d'endoréplication qui correspond à un cycle cellulaire altéré, où la réplication de l'ADN n'est pas suivie d'une division cellulaire (Kondorosi et al., 2005). Ainsi, le niveau de ploïdie des cellules végétales augmente à chaque cycle d'endoréplication, passant de 2C jusqu'à 64C (C correspondant au contenu en ADN haploïde), et leur volume devient plus important (Nagymihály et al., 2017). Les cordons d'infections progressant depuis l'épiderme atteignent les cellules dérivées des divisions du cortex interne C4/C5, 42 à 48 heures après inoculation, se ramifient dans ces cellules, et 80 heures après l'inoculation, les bactéries commencent à être libérées des cordons d'infection dans le cytoplasme des cellules du primordium de nodosité grâce à un mécanisme de type endocytose (Ivanov et al., 2012; Xiao et al., 2014). Les bactéries relarguées des cordons d'infection se différencient ensuite en bactéroïdes, cette différenciation étant elle aussi associée à des cycles d'endoréplication (Mergaert et al., 2006). Ces bactéroïdes ont une taille augmentée par rapport aux bactéries libres, et sont entourés par une membrane d'origine végétale, dite péri-bactéroïdienne, pour former des unités symbiotiques, ou symbiosomes, qui ont la capacité métabolique de fixer l'azote atmosphérique (Roth et Stacey, 1989).

Le primordium de nodosité va croître via des divisions cellulaires au niveau du méristème apical, jusqu'à émerger de la racine, et va ensuite se différencier en nodosité fonctionnelle (**Figure 14**). Un gradient de différenciation va se mettre en place au niveau des tissus centraux de la nodosité, où cinq zones sont classiquement décrites à partir de l'apex (Vasse et al., 1990):

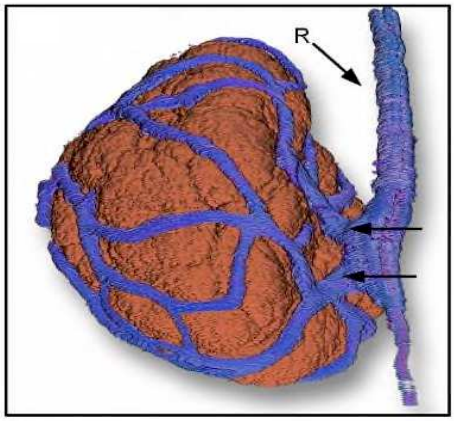


Figure 15 : Reconstruction tridimensionnelle d'une nodosité déterminée mature mettant en évidence le réseau formé par les faisceaux vasculaires périphériques.

En orange, la zone centrale infectée par les rhizobia; en bleu, les faisceaux de tissus vasculaires périphériques ; R : tissus vasculaires de la racine ; les deux flèches montrent la connexion des faisceaux vasculaires entre la racine et la base de la nodosité.
(d'après Livingston et al., 2019)

- le méristème apical, ou zone I, qui dans le cas des nodosités indéterminées se divise continuellement pour assurer une croissance en continu de la nodosité. Cette zone ne contient pas de bactéries ;

- la zone d'infection, ou zone II, sous-jacente, est constituée de plusieurs assises de cellules se différenciant de la partie proximale (apicale) vers la partie distale (basale) de la nodosité. Ces cellules, allongées suite à leur endoréplication, se différencient, et certaines sont colonisées par des bactéries issues des cordons d'infection, qui se différencient en bactéroïdes dans cette zone ;

- une interzone à l'interface entre les zones II et III, constituée de deux à trois couches de cellules riches en amyloplastes chez la luzerne, et qui pourrait constituer une barrière à la diffusion de l'oxygène de la zone d'infection vers la zone de fixation d'azote (Soupene et al., 1995) ;

- la zone de fixation d'azote, ou zone III, siège de l'activité métabolique de la nodosité, où les bactéroïdes réduisent l'azote atmosphérique en ammonium au sein des cellules végétales. Cette zone est associée à une couleur rose due à la présence d'une protéine transportant l'oxygène, la léghémoglobine, qui participe à générer un environnement micro-aérobie favorable à l'activité du complexe nitrogénase bactérien (Downie, 2005). En plus des cellules végétales infectées, un autre type cellulaire, non infecté, utilise des sources carbonées issues de la photosynthèse pour les métaboliser en acide malique afin d'alimenter les cellules infectées et permettre l'activité de fixation de l'azote atmosphérique par les bactéries (White et al., 2007) ;

- la zone de senescence, ou zone IV, apparait dans des nodosités âgées (d'environ 4-5 semaines après inoculation par rhizobium chez *M. truncatula*) et contient des cellules bactériennes et végétales en cours de dégradation pour assurer le recyclage des nutriments (Timmers et al., 1998). Une couleur verte est associée à cette zone, due à l'oxydation de la léghémoglobine (Timmers et al., 2000).

Autour de ces tissus centraux de la nodosité, des tissus périphériques impliquent différentes couches cellulaires, et notamment -de l'extérieur vers l'intérieur- de cortex externe, d'endoderme, de cortex interne, et de faisceaux vasculaires qui connectent la nodosité aux tissus vasculaires de la racine (Patriarca et al., 2004). Ces faisceaux vasculaires

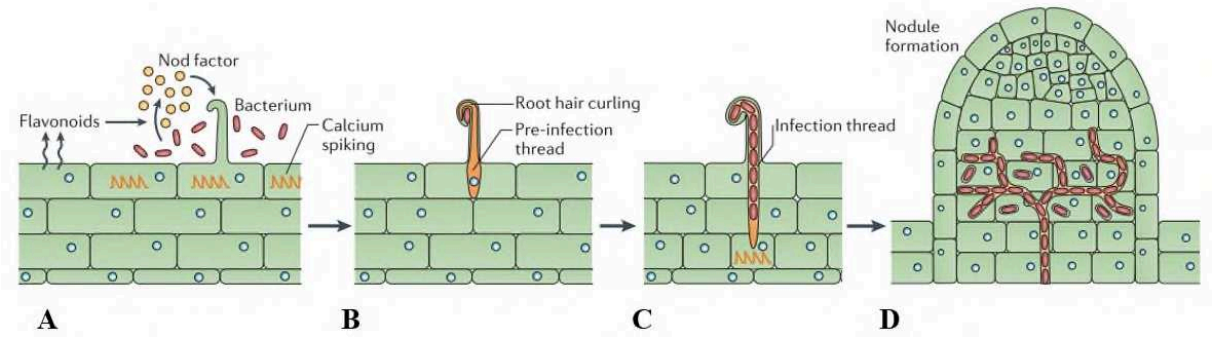


Figure 16 : Schéma de synthèse des différentes étapes de la mise en place d'une nodosité indéterminée.

(A) Reconnaissance des partenaires symbiotiques, ou pré-infection. La reconnaissance entre les partenaires symbiotiques se fait grâce à un échange de signaux : les bactéries perçoivent des flavonoïdes spécifiques secrétés par la plante, et produisent en retour des facteurs de nodulation (facteurs Nod) qui seront reconnus par la plante. Cette reconnaissance réciproque des partenaires symbiotiques se traduit par l'initiation d'oscillations calciques dans l'épiderme racinaire.

(B) Infection des poils absorbants. Les rhizobia s'attachent sur les poils absorbants qui se déforment en une crosse de berger, à l'intérieur de laquelle les bactéries prolifèrent. Le cordon d'infection se met en place dans le poil absorbant et permet la progression des bactéries vers le cortex de la racine.

(C) Progression des infections dans le cortex. Le cordon d'infection progresse vers les couches de cellules internes du cortex racinaire. La nodosité est initiée en dessous du site d'infection initial par les bactéries.

(D) Organogénèse de la nodosité. Le cordon d'infection se ramifie à l'intérieur du primordium de nodosité et les bactéries sont relarguées dans des compartiments entourés d'une membrane, les symbiosomes. Au sein de ces symbiosomes, les bactéries se différencient en bactéroïdes fixateurs d'azote.

(d'après Oldroyd, 2013)

périphériques se ramifient de la base de la nodosité vers son apex pour constituer un réseau vasculaire permettant les échanges de nutriments ou signaux entre la racine et la région centrale des nodosités (détaillés dans la **Figure 15** ; Livingston et al., 2019). Ainsi, les composés carbonés produits au niveau des feuilles lors de la photosynthèse sont transportés via le phloème jusqu'aux nodosités ; leurs produits de dégradation, essentiellement des acides dicarboxyliques tels que les acides malique et succinique, seront utilisés comme source d'énergie et de squelettes carbonés par les bactéroïdes pour permettre leur activité de fixation d'azote atmosphérique (White et al., 2007). L'azote fixé sous forme d'ammonium est ensuite exporté dans le cytosol des cellules végétales où il est assimilé en glutamine et asparagine, qui seront transportés hors de la nodosité via les faisceaux vasculaire de xylème (Prell et Poole, 2006; White et al., 2007).

4. Bases moléculaires de la symbiose fixatrice d'azote chez les plantes légumineuses

Nous avons vu que la mise en place des nodosités constituait un processus complexe, depuis la reconnaissance des partenaires symbiotiques et l'infection de la racine jusqu'à l'organogénèse de la nodosité et son activité métabolique de fixation d'azote atmosphérique (**Figure 16**). Grâce à des approches génétiques, des mutants de plantes légumineuses affectant l'un et/ou l'autre de ces processus ont été caractérisés, aboutissant à l'identification de nombreux acteurs moléculaires qui permettent notamment de mieux appréhender les voies de signalisation impliquées dans la mise en place des symbioses fixatrices d'azote.

a) Perception des facteurs Nod

La reconnaissance entre les partenaires symbiotiques est un prérequis à l'établissement de la symbiose fixatrice d'azote. Ainsi, les flavonoïdes exsudés par la plante carencée en azote activent chez certaines bactéries compatibles, l'expression de gènes de nodulation, les gènes *nod*. Ces déterminants génétiques codent pour des enzymes responsables de la synthèse des facteurs Nod (NFs) associés aux étapes de pré-infection (Denarié et al., 1996), comme mentionné dans la section I.B.1.

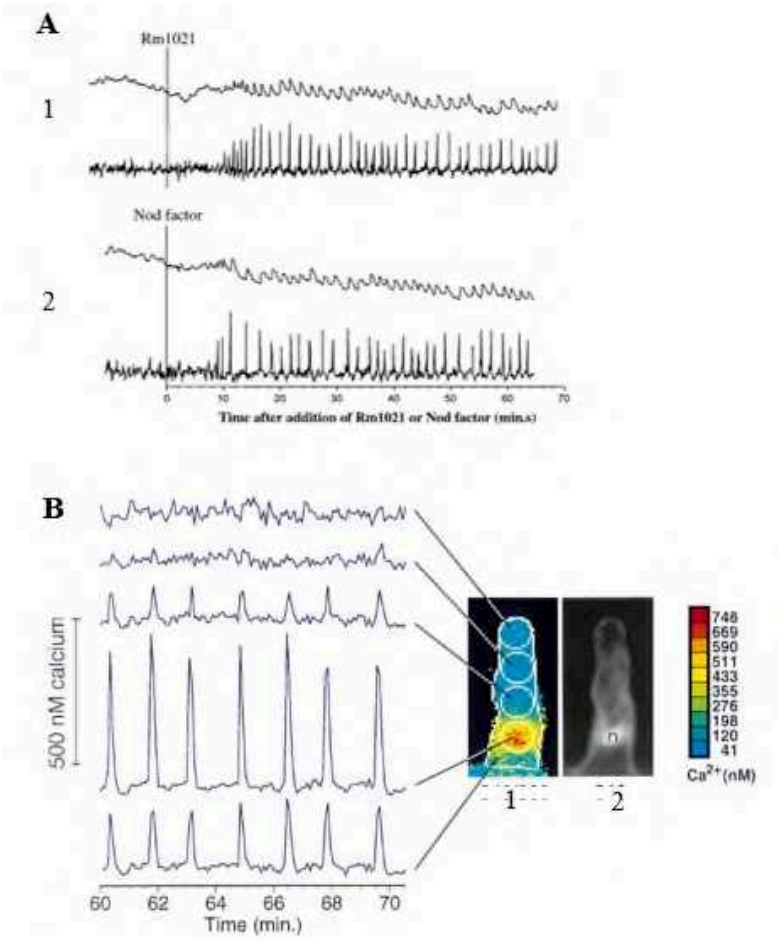


Figure 17. Oscillations calciques mesurées en condition symbiotique après addition de facteurs Nod (NFs) ou de rhizobium.

(A) Oscillations calciques induites rapidement suite à l'interaction avec rhizobium (1) ou suite à une application de NFs (2) chez *M. truncatula.* L'intensité de fluorescence est mesurée dans les poils absorbants après injection de Fura-2-dextran qui se lie aux ions calcium libres. Après avoir déterminé le niveau de bruit de fond, une solution de NFs ou de rhizobium est ajoutée (temps 0) et l'enregistrement de fluorescence se poursuit pendant environ 60 min. Le tracé du haut correspond à l'intensité de fluorescence mesurée (valeurs brutes) ; le tracé du bas correspond aux variations d'intensité de fluorescence en fonction du temps.
(modifié d'après Wais et al., 2002)

(B) Profil spatial de la réponse d'oscillations calciques aux NFs mesuré par fluorescence comme décrit en A. Les oscillations calciques ont été quantifiées dans chacune des cinq zones du poil absorbant définies sur l'image (1), la cinquième zone (tracé du bas) correspondant à la base du poil absorbant. L'échelle est définie par calibration avec une série de solutions de calcium à différentes concentrations. L'image (1), représentative du pic d'oscillation de calcium observé, permet de visualiser par un gradient de couleur la concentration de calcium. L'image (2) révèle la position du noyau (n) dans le poil absorbant. La réponse calcique est localisée dans la zone nucléaire et périnucléaire.
(modifié d'après Ehrhardt et al., 1996)

Les NFs secrétés par les bactéries sont perçus au niveau des poils absorbants par des récepteurs kinases appartenant à la famille LysM-RLKs (« Lysin Motif Receptor-Like Kinases ») contenant trois domaines LysM. Ainsi, les NFs sont reconnus par les récepteurs « Nod Factor Perception » (NFP) et « Lysin Motif Receptor-Like Kinase3 » (LYK3) chez *M. truncatula*, et par leurs homologues « Nod Factor Receptor5 » (NFR5) et NFR1 chez *L. japonicus*, respectivement. Les mutants de ces récepteurs aux NFs sont affectés dans les réponses les plus précoces de l'interaction symbiotique, comme la déformation des poils absorbants (Ben Amor et al., 2003; Limpens et al., 2003; Radutoiu et al., 2003; Arrighi et al., 2006; Smit et al., 2007). Chez les deux légumineuses modèles, il a été montré que seul le domaine kinase de NFR1/LYK3 était fonctionnel, c'est à dire capable de s'auto-phosphoryler mais également de phosphoryler NFR5/NFP, suggérant la formation d'un hétéro-dimère entre les deux récepteurs (Mbengue et al., 2010; Madsen et al., 2010a). Par la suite, chez le lotier, une liaison directe des NFs sur le complexe récepteur NFR1/NFR5 a été mise en évidence (Broghammer et al., 2012).

Dès les premières minutes suivant la perception des NFs, un influx de calcium est induit dans le cytoplasme des poils absorbants (Cárdenas et al., 1998; Shaw et Long, 2003) rapidement suivi par des oscillations de la concentration en calcium (Ca^{2+}) dans la zone nucléaire et périnucléaire des cellules épidermiques (**Figure 17**) (Ehrhardt et al., 1996; Wais et al., 2000; Capoen et al., 2011). Ces oscillations de calcium se traduisent par une succession d'élévations de la concentration en calcium suivies d'un retour au niveau initial, répétées avec une fréquence déterminée, et ont été décrites chez plusieurs espèces de légumineuses symbiotiques (Wais et al., 2002; Miwa et al., 2006). Il est proposé qu'elles soient un marqueur caractéristique de la transduction du signal symbiotique (Oldroyd, 2013) essentiel pour l'induction de l'expression de gènes associés aux phases initiales de la nodulation, tels que les nodulines précoces, ou « Early Nodulins », *ENOD11* et *ENOD12* (Journet et al., 1994, 2001; Charron et al., 2004). Etant donné que des mutants ne produisant pas d'oscillations de calcium peuvent conserver la capacité à induire l'influx initial de calcium dans les poils absorbants, un découplage de ces deux réponses calciques a été mis en évidence, permettant de positionner d'autres acteurs moléculaires dans la voie de signalisation (Shaw et Long, 2003) comme ceux qui sont décrits dans la section suivante.

Le gène « Symbiosis Receptor-Like Kinase » (SYMRK)/ « Does Not Make Infections2 » (DMI2) code pour un récepteur de la membrane plasmique constitué dans sa partie extracellulaire de domaines de type « Leucine Rich Repeats » (LRR) et Malectine, et appartient à ce groupe de gènes agissant en amont des oscillations calciques (Stracke et al., 2002; Limpens et al., 2005). Ried et al. (2014) ont montré que SYMRK interagissait avec le complexe récepteur des NFs -NFR1/NFR5- dans les racines de lotier, suggérant la formation d'un complexe de récepteurs d'ordre supérieur. SYMRK/DMI2 joue un rôle-clé dans l'initiation de la symbiose rhizobienne, en particulier dans l'initiation de l'infection, l'internalisation des rhizobia et la formation des symbiosomes (Catoira et al., 2000; Limpens et al., 2005; Capoen et al., 2005). De plus, son expression ectopique, ou une expression constitutive de son domaine kinase, miment une activation par les rhizobia, induisant la formation de « nodosités spontanées » en l'absence de bactérie symbiotique (Saha et al., 2014; Ried et al., 2014). L'identification d'un interacteur du domaine kinase cytoplasmique de SYMRK codant pour une enzyme impliquée dans la biosynthèse du mévalonate, la 3-Hydroxy 3-MethylGlutaryl CoA Reductase1 (HMGR1), suggère un rôle dans la production d'un messager secondaire de la transduction du signal symbiotique. La diminution de l'expression de *HMGR1* par ARN interférence provoque une forte réduction des infections symbiotiques et des nodosités formées (Kevei et al., 2007). De manière intéressante, une application pharmacologique de mévalonate est suffisante pour induire des oscillations calciques et l'expression de gènes symbiotiques dans des plantes sauvages et dans le mutant *dmi2,* indiquant que le mévalonate agirait comme un messager secondaire transmettant le signal NF depuis la membrane plasmique vers le compartiment nucléaire (Venkateshwaran et al., 2015).

D'autres interacteurs de DMI2/SYMRK, et/ou de NFP et LYK3, seraient impliqués dans leur régulation post-traductionnelle, permettant de contrôler l'abondance des complexes récepteurs des NFs ou leur activité. Il s'agit de protéines de type « E3 ubiquitin ligases » connues pour ubiquitiner des protéines et assurer leur dégradation ou leur relocalisation, comme par exemple « SymRK-Interacting E3 ubiquitin ligase » (SIE3), qui interagit avec SYMRK et induit sa dégradation, ou « Seven In Absentia 4 » (SINA4), qui déstabilise SYMRK et affecte négativement le processus d'infection par rhizobium (Yuan et al., 2012; den Herder et al., 2012). De la même manière, la protéine E3 ligase « Plant U-box protein 1 » (PUB1) interagit avec DMI2 et LYK3 et a un rôle négatif sur les infections rhizobiennes

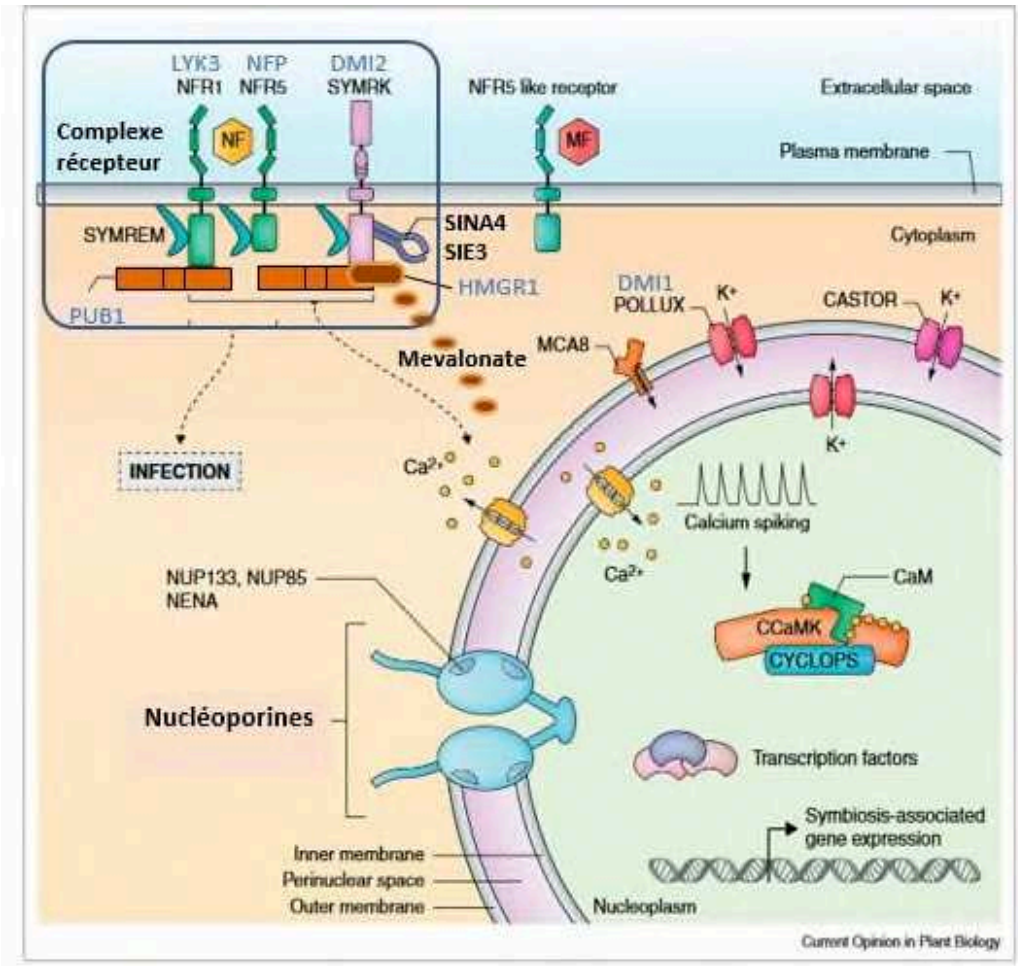


Figure 18. La perception et la transduction du signal symbiotique facteurs Nod (NFs) dans l'épiderme de la racine.

La perception des NFs produits par rhizobium est médiée par des récepteurs de la membrane plasmique de type LysM-kinase, dont NFR1 et NFR5 chez *L. japonicus,* et LYK3 et NFP chez *M. truncatula*. La perception des NFs induit des oscillations calciques (« Calcium spiking ») dans les zones nucléaire et périnucléaire. La production de ces oscillations calciques dépend de l'activité d'un récepteur kinase de la membrane plasmique (SYMRK/ DMI2), d'une enzyme HMGR1 impliquée dans la biosynthèse du mévalonate qui agirait en tant que messager secondaire entre la membrane plasmique et le noyau, ainsi que des canaux calciques (CNGC15), des canaux à cations CASTOR et POLLUX/DMI1, des protéines permettant le transport actif du calcium (MCA8), et chez *L. japonicus* des nucléoporines NUP133, NUP85 et NENA. Des protéines de type « E3 ubiquitine ligases » telles que PUB1, SINA4 et SIE3 interagissent avec les récepteurs membranaires LysM-RLK et SYMRK et régulent post-traductionnellement leur dégradation. Une protéine de la famille des remorines (SYMREM1) interagit aussi avec les récepteurs NFP, LYK3 et DMI2, et régulerait l'accumulation des complexes protéiques récepteurs dans des microdomaines membranaires spécifiques lors de l'interaction symbiotique. Le décodage des oscillations de calcium, médié par CCaMK/DMI3 en association avec CYCLOPS/IPD3, a pour effet l'activation de complexes transcriptionnels régulant l'expression de gènes symbiotiques précoces.
(modifié d'après Singh et Parniske, 2012)

(Mbengue et al., 2010; Vernié et al., 2016). Enfin, une protéine de la famille des remorines, « Symbiotic Remorin1 » (SYMREM1), interagit avec les récepteurs NFP, LYK3 et DMI2, et pourrait être impliquée dans la régulation spatiale des complexes protéiques de perception des NFs dans des microdomaines membranaires (Lefebvre et al., 2010).

b) Génération d'oscillations calciques nucléaires

La mise en place et le maintien des oscillations calciques nucléo-cytoplasmiques nécessitent différents acteurs moléculaires localisés au niveau de la membrane nucléaire (**Figure 18**). Des canaux calciques régulés par les nucléotides cycliques (« cyclic nucleotide–gated channel 15 », CNGC15, Charpentier et al., 2016) exporteraient les ions calcium de l'enveloppe nucléaire vers le nucléoplasme et le cytoplasme, et des canaux à calcium et potassium, CASTOR et POLLUX/DMI1, permettraient de compenser le déséquilibre de charge ionique du au mouvement des ions calcium à travers la membrane nucléaire et/ou participeraient directement au transport d'ions calcium (Catoira et al., 2000; Ané et al., 2004; Peiter et al., 2007; Charpentier et al., 2008). Une étude récente montre notamment que les canaux CASTOR et POLLUX/DMI1 auraient finalement une plus forte affinité pour les ions calcium que potassium (Kim et al., 2019). L'existence d'une interaction physique entre DMI1 et CNGC15 suggère une activité coordonnée de ces canaux ioniques (Charpentier et al., 2016). Suite à l'augmentation de la concentration en calcium dans le nucléoplasme et le cytoplasme, des pompes à calcium (« Ca^{2+}-dependent adenosine triphosphatase », ou Ca^{2+}-ATPases) comme la protéine « *M. truncatula* calcium ATPase » MCA8 permettraient de réimporter les ions calcium du cytoplasme/nucléoplasme vers le lumen de la membrane nucléaire où ils sont stockés (Capoen et al., 2011; Charpentier, 2018).

Enfin, des protéines comme les nucléoporines NUP85 (« Nucleoporin85 »), NUP133 et NENA identifiées chez *L. japonicus,* jouent un rôle positif dans la mise en place des oscillations calciques et sont nécessaires pour la nodulation symbiotique (Kanamori et al., 2006; Saito et al., 2007; Groth et al., 2010). Il est proposé que ces trois nucléoporines constituent un complexe protéique associé aux pores nucléaires et permettraient le transfert de macromolécules à travers l'enveloppe nucléaire. De manière surprenante, il n'a pas été décrit -à ce jour- de protéines équivalentes chez les autres espèces légumineuses dont *M. truncatula*.

.

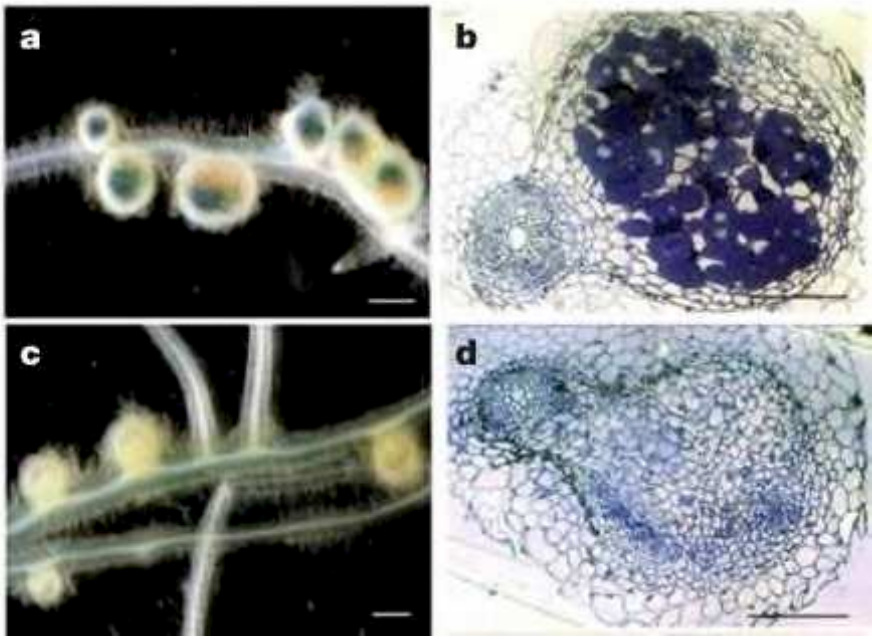


Figure 19: La protéine CCaMK est nécessaire et suffisante pour activer le processus d'organogénèse des nodosités.

(a,b) : Nodosités « sauvages » observées chez le mutant *dmi3* complémenté par *pDMI3:DMI3*. Les rhizobia marqués par le gène rapporteur LacZ sont colorés en bleu à l'intérieur des nodosités (a), et les bactéroïdes apparaissent dans la section de nodosité en bleu foncé grâce à une coloration au bleu de toluidine (b).
(c,d) : Nodosités « spontanées » se formant en l'absence de rhizobium, observées chez le mutant *dmi3* transformé par une version autoactive de DMI3, *pDMI3:DMI3*$_{1\text{-}311}$. La section de nodosité colorée au bleu de toluidine montre l'absence de bactérie la colonisant (d). Barres d'échelle : (a,c) 1mm ; (b,d) 0,25mm.
(d'après Gleason et al., 2006)

c) Transduction du signal en aval des oscillations calciques nucléaires

Le décodage des oscillations calciques serait assuré par une protéine kinase calcium/calmoduline-dépendante (CCaMK) localisée dans le noyau, qui joue un rôle-clé dans la transduction du signal symbiotique (**Figure 18**) (Singh et Parniske, 2012). Les protéines CCaMK chez *L. japonicus* et DMI3 chez *M. truncatula* contiennent une séquence signal N-terminale d'adressage au noyau suivie d'un domaine sérine/thréonine kinase, d'un domaine de liaison à la calmoduline, et d'un domaine de type visinine se caractérisant par la présence de trois ou quatre motifs de type « hélice-boucle-hélice », chacun capable de lier un ion calcium (Lévy et al., 2004; Mitra et al., 2004). La protéine CCaMK, après liaison des ions calcium de manière directe, ou indirecte via la calmoduline, s'autophosphoryle pour induire l'expression des gènes symbiotiques en aval des oscillations de calcium (Gleason et al., 2006; Tirichine et al., 2006; Miller et al., 2013).

L'étude de mutants de cette protéine CCaMK/DMI3 révèle que lorsque les domaines de liaison au calcium sont tronqués ou lorsque le résidu important pour son autophosphorylation est muté, une mutation gain de fonction est générée: CCaMK est alors constitutivement autoactivée, ce qui induit l'organogénèse des nodosités en l'absence d'infection par des bactéries symbiotiques (« nodosités spontanées » ; (**Figure 19**) Gleason et al., 2006; Tirichine et al., 2006; Hayashi et al., 2010). De plus, cette forme autoactive de CCaMK, nécessaire et suffisante pour activer le processus d'organogénèse, peut restaurer la nodulation chez les mutants *symrk, castor, pollux et nup85/nup133*, incapables de produire des oscillations de calcium, confirmant la position de ces acteurs en amont de CCaMK/DMI3 (Hayashi et al., 2010; Madsen et al., 2010b).

d) Régulateurs transcriptionnels agissant en aval des oscillations de calcium

Activée par le calcium, la protéine kinase CCaMK phosphoryle directement la protéine CYCLOPS (nommée chez *M. truncatula* « Interacting Protein of DMI3 », ou IPD3), formant un complexe transcriptionnel responsable de l'activation d'un réseau de gènes symbiotiques en aval (Yano et al., 2008; Messinese et al., 2007; Oldroyd et al., 2011). Parmi

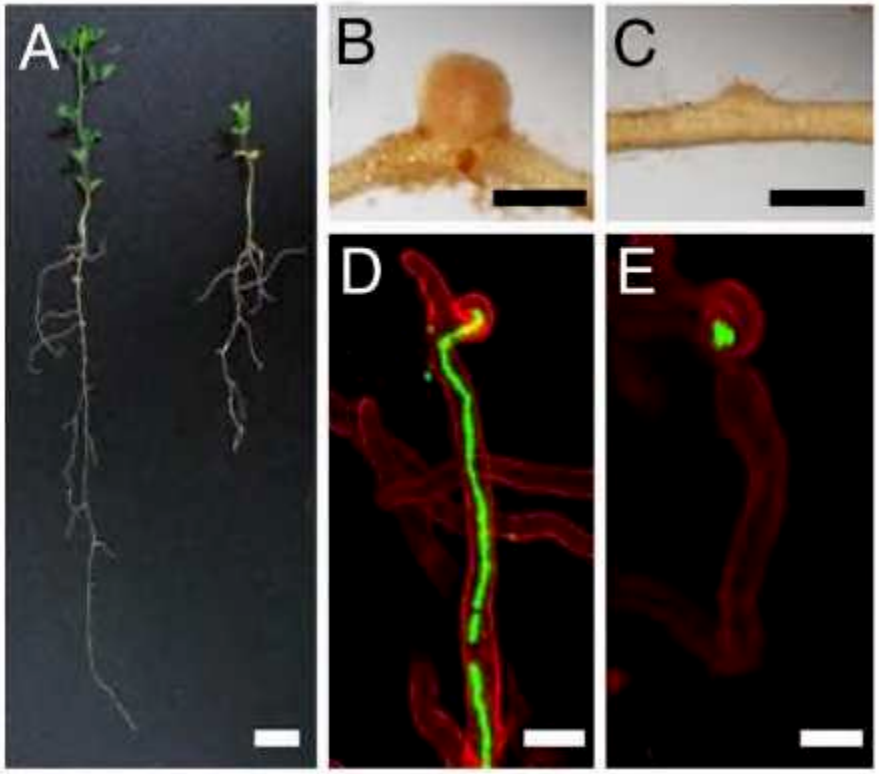


Figure 20 : Le mutant *cyclops* est affecté dans sa capacité à former des cordons d'infection.

(A) Image d'une plante de lotier sauvage (à gauche) et du mutant *cyclops* (à droite) cultivées en carence azotée, un mois après inoculation par rhizobium. Image représentative de nodosité sur une racine sauvage (B), ou de primordium de nodosité chez le mutant *cyclops* (C) (car seuls des primordia de nodosités se développent chez ce mutant). (D-E) Sur des plantes inoculées avec des rhizobia exprimant la GFP, les infections sont suivies et visualisées en microscopie confocale : progression du cordon d'infection dans un poil absorbant sauvage (D), ou infection avortée dans les poils absorbants du mutant *cyclops.*
Barres d'échelle : (A) 1cm ; (B-C) 1mm ; (D-E) 20µm.
(d'après Yano et al., 2008)

ces gènes, les facteurs de transcription « Nodulation Signaling Pathway1 » (NSP1), NSP2, « Ethylene response factor Required for Nodulation1 » (ERN1) et ERN2, des membres de la famille « Nuclear Factor-Y » NF-YA/B/C, et « Nodule INception » (NIN) sont essentiels pour l'initiation des étapes d'infection et d'organogénèse des nodosités via l'activation de gènes de « nodulines précoces » (Andriankaja et al., 2007; Heckmann et al., 2006; Kaló et al., 2005; Marsh et al., 2007; Schauser et al., 1999; Smit, 2005; Laloum et al., 2014; Baudin et al., 2015; Soyano et al., 2013).

(1) CYCLOPS/IPD3

La protéine nucléaire IPD3/CYCLOPS comporte un signal d'adressage au noyau, deux régions riches en résidus sérine et thréonine, sites potentiels de phosphorylation, et une superhélice de type « coiled-coil » impliquée dans son interaction avec DMI3 (Messinese et al., 2007; Yano et al., 2008). La perte de fonction de cette protéine dans le mutant *cyclops* se traduit par une incapacité à former des cordons d'infection, bien que les bactéries colonisent les poils absorbants recourbés en crosse de berger (**Figure 20**) (Yano et al., 2008). Occasionnellement, des primordia de nodosités se développent. De manière comparable à CCaMK, une substitution dans le domaine kinase de la protéine CYCLOPS d'un résidu sérine conservé en aspartate, mime son activation par phosphorylation, et génère une forme autoactive (gain de fonction) qui suffit à induire le développement de nodosités spontanées (Singh et al., 2014). L'utilisation de ce variant constitutivement actif dans des essais de transactivation en feuilles de tabac et de retard sur gel a révélé que CYCLOPS liait le promoteur du gène codant pour le régulateur transcriptionnel NIN et activait sa transcription. Un motif palindromique, le « CYCLOPS Responsive cis-Element » (CYC-RE) a été identifié dans la région promotrice de NIN comme étant crucial pour l'induction de *NIN* par CYCLOPS (Singh et al., 2014). Par la suite, un motif CYC-RE apparenté a été décelé dans le promoteur du gène *ERN1*, et des études fonctionnelles ont montré que CYCLOPS liait effectivement le promoteur de *ERN1* au niveau de ce motif CYC-RE et activait sa transcription en présence de la forme autoactive de CCaMK, à la fois chez Medicago et le lotier (Cerri et al., 2017). Enfin, des expériences d'immunoprécipitation ont montré que les protéines DELLAs, impliquées dans la signalisation des gibbérellines, intervenaient dans la formation du complexe CCaMK–IPD3 en se liant à la protéine IPD3 pour promouvoir son activation par phosphorylation (Jin et al., 2016).

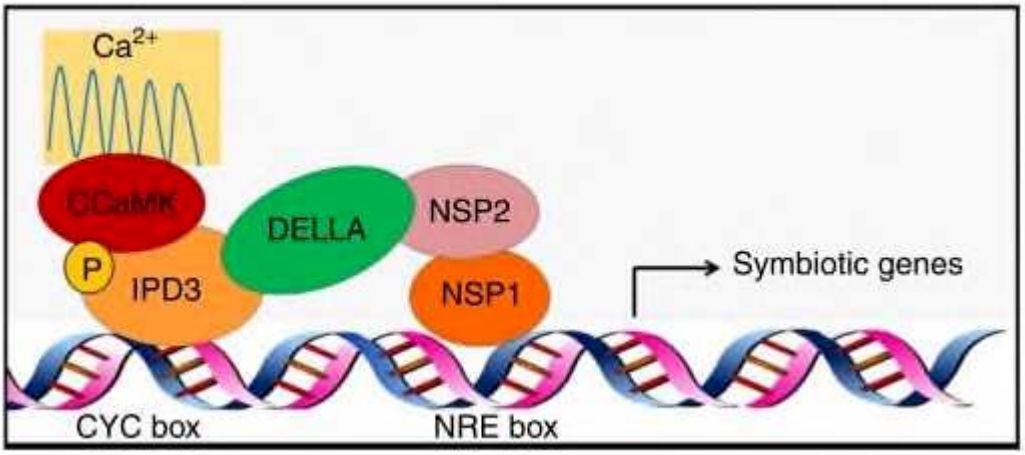


Figure 21 : Les complexes CCaMK/IPD3 et NSP1/NSP2, connectés via les protéines DELLA, activent la transcription de gènes symbiotiques précoces.

Activée par les oscillations de calcium, la protéine CCaMK lie et phosphoryle IPD3 qui va activer l'expression de gènes cibles en se liant au niveau de « Cyc-box » dans la région promotrice de gènes symbiotiques précoces tels que *ERN1* ou *NIN*. Par ailleurs, NSP1 lie aussi les promoteurs de *ERN1* et *ENOD11*, mais via un motif « Nodulation Responsive Element » (NRE), et forme un hétérodimère avec NSP2 pour activer leur expression. Les protéines DELLA, en interagissant à la fois avec IPD3 et NSP2, créeraient une connexion entre les complexes transcriptionnels CCaMK/IPD3 et NSP1/NSP2 pour réguler la transcription de gènes symbiotiques.
(d'après Jin et al., 2016)

(2) Les facteurs de transcription NSP1 et NSP2

Les facteurs de transcription NSP1 et NSP2 appartiennent à la famille des protéines à domaine GRAS (pour « Gibberellic-Acid Insensitive » (GAI), « Repressor of GAI » (RGA) et « Scarecrow » (SCR) ; Smit, 2005). Le domaine GRAS comporte deux régions riches en leucine potentiellement impliquées dans des interactions protéine-protéine (Kaló et al., 2005; Smit, 2005). Les mutants *nsp1* et *nsp2* répondent partiellement à l'infection par rhizobium en permettant les oscillations de calcium dans les poils absorbants mais pas l'induction de gènes de nodulation précoces tels qu'*ENOD11*, ni la formation de cordons d'infection et l'initiation de l'organogénèse des nodosités (Mitra et al., 2004; Heckmann et al., 2006). Bien que ces deux mutants aient des phénotypes similaires, les protéines NSP1 et NSP2 partagent une faible homologie, suggérant des rôles distincts dans la transduction du signal en aval des oscillations calciques (Kaló et al., 2005; Smit, 2005). Hirsch et al. (2009) a montré que ces deux protéines interagissaient entre elles pour former des homo- et hétéro-dimères, et que ces interactions étaient nécessaires pour leur fonction symbiotique. Cependant, seul NSP1 semble avoir une capacité à lier les séquences promotrices des gènes symbiotiques *ENOD11*, *NIN* et *ERN1* (Hirsch et al., 2009), bien que la présence simultanée de NSP1 et NSP2 soit nécessaire pour transactiver l'expression d'*ERN1* et d'*ENOD11* (Cerri et al., 2012). Des données plus récentes indiquent que l'expression d'*ERN1* dans des protoplastes d'Arabidopsis est potentialisée lorsqu'une protéine DELLA interagit avec le complexe transcriptionnel NSP1/NSP2 (Jin et al., 2016; Fonouni-Farde et al., 2016). Enfin, des expériences de triple hybride et de co-immunoprécipitation indiquent que IPD3 et NSP2 interagiraient ensemble par l'intermédiaire d'une protéine DELLA, suggérant comme déjà mentionné précédemment que les protéines DELLAs permettraient de coordonner l'activation des complexes transcriptionnels NSP1/NSP2 et CCaMK/IPD3 pour activer la transcription de gènes symbiotiques (**Figure 21**) (Jin et al., 2016).

(3) Les facteurs de transcription ERN

Les facteurs de transcription ERN appartiennent à la grande famille des AP2/ERFs (« APetala2/Ethylene Response Factor ») (Andriankaja et al., 2007). Chez *M. truncatula*, l'identification des facteurs de transcription ERN1, ERN2 et ERN3 résulte d'un criblage

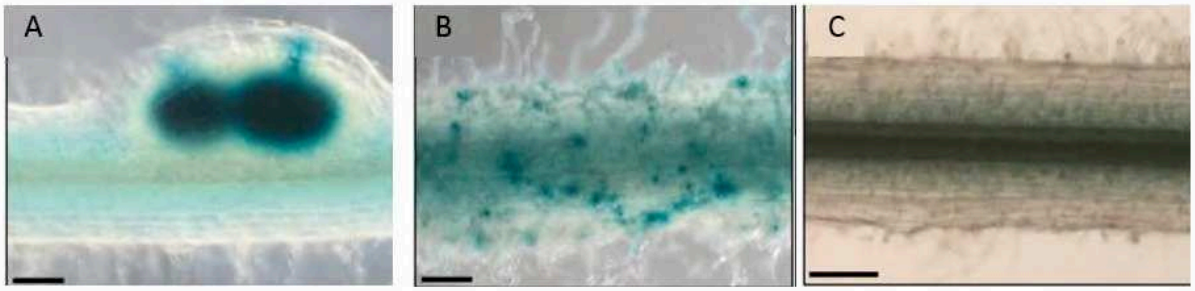


Figure 22: ERN1 et ERN2 sont impliqués dans l'initiation des nodosités.

Des plantes cultivées en aéroponie ont été inoculées par des rhizobia marqués par le gène LacZ et colorées trois jours après inoculation pour révéler l'activité de la ß-galactosidase. Des primordia ou de jeunes nodosités infectés apparaissent sur les racines sauvages (A), alors que les infections symbiotiques sont initiées puis arrêtées dans les racines du simple mutant *ern1* (B), et que dans le double mutant *ern1,ern2* aucune infection n'est initiée (C).
Barre d'échelle : 250µm.
(d'après Cerri et al., 2016)

simple hybride visant à identifier des régulateurs transcriptionnels capables de lier le promoteur d'*ENOD11*, au niveau de la région impliquée dans la réponse aux NFs (« NF-box ») (Andriankaja et al., 2007). La localisation au noyau de ces trois protéines ERN qui présentent une forte homologie entre elles est en accord avec leur fonction prédite de facteur de transcription. Contrairement à *ERN3*, les gènes *ERN1* et *ERN2* sont rapidement induits dans les cellules épidermiques en réponse à un traitement par les NFs, suggérant un rôle positif dans la mise en place des nodosités. Le mutant *ern1*, aussi nommé **«** *branching infection threads1 » (bit1)* est en effet affecté dans sa capacité à induire des gènes de nodulation précoce, à développer des cordons d'infection et à former des nodosités (Middleton et al., 2007), mais son phénotype moins drastique que celui d'autres mutants de la voie NF suggère une redondance fonctionnelle avec ERN2. Le mutant *ern2* présente un phénotype plus tardif qu'*ern1*, lui permettant de développer des nodosités fixatrices d'azote dont seulement certaines présentent des défauts de colonisation par les rhizobia. L'étude du double mutant *ern1;ern2* révèle un blocage très précoce de l'interaction symbiotique se traduisant par une incapacité à initier des infections dans les poils absorbants, démontrant l'implication redondante de ces deux facteurs de transcription ERN1/ERN2 dans la signalisation des NFs, l'initiation et le développement des nodosités (**Figure 22**) (Cerri et al., 2016). Récemment chez le lotier, des homologues de *ERN1* et *ERN3* ont été identifiés, ayant globalement une fonction similaire à celle décrite chez *M. truncatula* (Cerri et al., 2017; Kawaharada et al., 2017). Le mutant *ern1* du lotier se révèle par ailleurs incapable de développer des nodosités spontanées induites par la construction CCaMK autoactivée, suggérant qu'ERN1 pourrait être requis pour l'organogénèse des nodosités indépendamment de son rôle pour la formation des cordons d'infection (Kawaharada et al., 2017).

(4) Les facteurs de transcription NF-Y

Cette famille de gènes est alternativement appelée « CCAAT box-Binding Factor » (CBF) ou « Heme Activator Proteins » (HAP) (Laloum et al., 2013). Les facteurs de transcription de la famille NF-Y agissent en complexe protéique de trois sous-unités (NF-YA, B et C), et se lient à des motifs « CCAAT » présents dans les régions promotrices de leurs gènes cibles. La sous-unité NF-YA de l'hétéro-trimère assure la spécificité de la liaison à

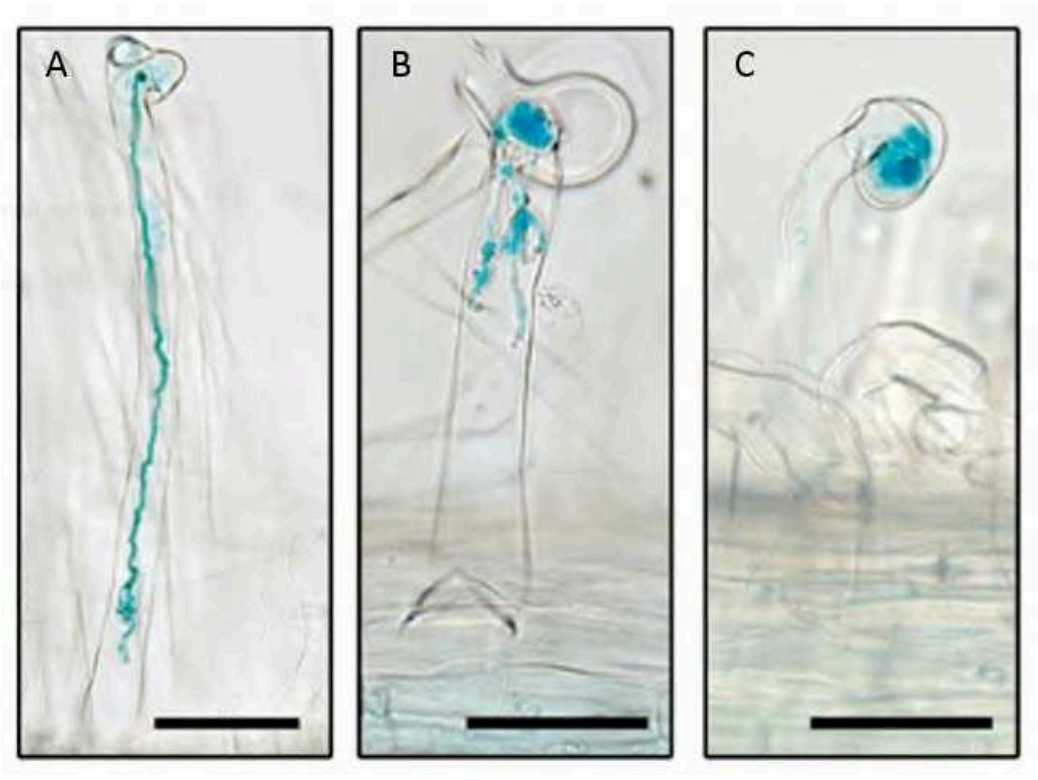


Figure 23: NF-YA1 et NF-YA2 sont impliqués de manière redondante dans la formation des cordons d'infection.

Images représentatives du phénotype des cordons d'infection formés sur des racines sauvages (A), sur des racines du mutant *nf-ya1* (B), ou sur des racines du mutant *nf-ya1* exprimant un ARNi ciblant *NF-YA2* (C). Les observations sont réalisées sur des racines colorées six jours après inoculation avec une souche de rhizobium exprimant le gène LacZ. Les bactéries marquées apparaissent en bleu. Barre d'échelle : 50µm.
(d'après Laloum et al., 2014)

l'ADN, et les sous-unités NF-YB et NF-YC sont impliquées dans la liaison du complexe NF-YA/B/C à l'ADN de par leur domaine HFD (« histone fold domain ») similaire à celui des histones.

Parmi ces facteurs de transcription, NF-YA1 joue un rôle positif dans le développement des nodosités comme le montrent des études « perte de fonction » chez *L. japonicus* et *M. truncatula* (Combier et al., 2006; Soyano et al., 2013). L'étude réalisée chez Medicago indique que la diminution des transcrits *NF-YA1* (initialement nommé *HAP2.1*) par ARN interférence s'accompagne d'un défaut dans l'organogénèse des nodosités, suggérant que NF-YA1 contrôle la persistance du méristème dans les nodosités de type indéterminées (Combier et al., 2006). Par la suite, l'identification d'un mutant *nf-ya1* a permis de mettre en évidence un rôle additionnel de NF-YA1 de promotion de la progression des cordons d'infection (Laporte et al., 2014). Ce rôle précoce de NF-YA1 est en accord avec l'induction de son expression dès 4 heures après un traitement par les NFs, et dès 6 heures après inoculation par rhizobium (Laloum et al., 2014; Laporte et al., 2014). Le phénotype du mutant *nf-ya1* étant moins drastique que celui des mutants *nsp1, nsp2* ou même *ern1*, l'hypothèse d'une redondance fonctionnelle a été explorée. Ainsi, *NF-YA2* présente un profil d'expression redondant avec celui de *NF-YA1* dans les différentes zones de la nodosité. L'extinction de *NF-YA2* par ARN interférence dans le mutant *nf-ya1* est associée par ailleurs à un phénotype plus sévère que celui du simple mutant avec une nodulation réduite, et un blocage plus précoce des cordons d'infection (**Figure 23**) (Laloum et al., 2014). Enfin, l'extinction simultanée de *NF-YA1* et *NF-YA2* par ARN interférence se traduit par une perte de l'induction de l'expression des gènes *ERN1* et *ENOD11* en réponse aux NFs, confirmant cette redondance fonctionnelle (Laloum et al., 2014).

De manière surprenante, chez le lotier, la diminution des transcrits *NF-YA1* par ARN interférence et la perte de fonction dans le mutant *nf-ya1* engendrent une forte réduction du nombre de nodosités sans affecter la formation des cordons d'infection, contrairement au phénotype décrit chez le mutant *nf-ya1* de Medicago (Soyano et al., 2013; Laloum et al., 2014; Hossain et al., 2016), suggérant une implication différentielle de NF-YA1 dans l'infection symbiotique entre les deux espèces. Par ailleurs, l'expression ectopique de NF-YA1 induit chez *L. japonicus* des divisions des cellules corticales qui aboutissent à la formation de structures ressemblant à des primordia de racines latérales (Soyano et al., 2013), renforçant l'hypothèse d'un rôle lié à l'organogénèse.

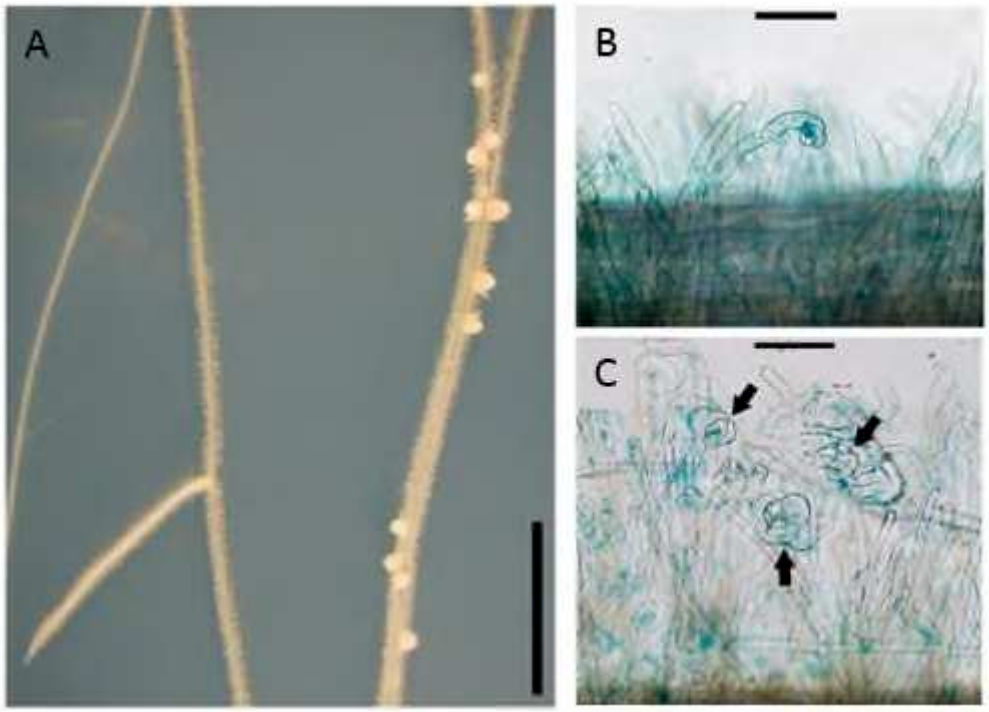


Figure 24 : Phénotype du mutant *nin*

(A) Images représentatives du mutant non-nodulant *nin* (à gauche) et d'une plante sauvage (à droite) 14 jours après inoculation par *S. meliloti*.
(B-C) Images représentatives de racines inoculées par des rhizobia exprimant le gène rapporteur *LacZ*, dont l'activité est visualisée en bleu.
(B) Formation d'une « crosse de berger » au niveau d'un poil absorbant d'une racine sauvage infecté par rhizobium, dans laquelle les bactéries symbiotiques prolifèrent.
(C) Courbure excessive des poils absorbants, correspondant au phénotype d'infection symbiotique du mutant *nin*, indiquée par des flèches noires.
Barres d'échelle : 10mm (A); 40 µm (B-C).
(modifié d'après Marsh et al., 2007)

Par la suite, des expériences de « double hybride » dans la levure ont révélé que les sous-unités NF-YB16, NF-YC1 et NF-YC2, exprimées dans les nodosités, étaient capables d'interagir avec NF-YA1 et NF-YA2, et la formation de trimères NF-YA/B/C a ensuite été validée *in planta* par co-immunoprécipitation (Baudin et al., 2015). Une des cibles directes de ce trimère NF-Y est le promoteur du gène *ERN1*, comme l'ont démontré des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP), et de transactivation avec NF-YA1 (Laloum et al., 2014; Baudin et al., 2015). Enfin, l'activation transcriptionnelle d'*ERN1* par NF-YA1 serait potentialisée par son interaction avec la protéine DELLA1 (Fonouni-Farde et al., 2016).

(5) Le facteur de transcription NIN

La protéine NIN est constituée de trois domaines de fonction inconnue mais conservés entre *M. truncatula* et *L. japonicus*, d'un domaine transmembranaire, d'un domaine de dimérisation présentant un motif RWPxRK (nommé RWP-RK) potentiellement impliqué dans la liaison à l'ADN et, d'un domaine PB1 (pour « Phox » et « Bem1 ») permettant probablement des interactions protéine-protéine (Schauser et al., 1999; Marsh et al., 2007).

L'expression du gène *NIN* est induite rapidement dans la racine dès 3h de traitement par les NFs ou un jour après inoculation par rhizobium (jai), ainsi que dans les nodosités (Schauser et al., 1999; Marsh et al., 2007; Soyano et al., 2014; Van Zeijl et al., 2015). Au niveau spatial, des fusions transcriptionnelles *pNIN:GUS* indiquent une expression au niveau de l'épiderme de la racine en réponse aux NFs ou à rhizobium mais également dans les primordia de nodosités (Soyano et al., 2014; Vernié et al., 2015; Liu et al., 2019c). L'induction de l'expression de *NIN* n'étant pas observée dans les mutants *nfp, dmi1, dmi2, dmi3, cyclops, nsp1* et *nsp2* un jour après inoculation par rhizobium, l'action du régulateur transcriptionnel NIN est positionnée en aval de ces gènes (Marsh et al., 2007; Yano et al., 2008). De plus, NIN agirait en amont d'ERN1 et de NF-YA1, car l'induction de l'expression de *NIN* ne dépend ni d'ERN1 ni de NF-YA1, tandis que l'activation d'*ERN1* et de *NF-YA1* dépend par contre de NIN (Liu et al., 2019a). Enfin, des expériences de transactivation, de retard sur gel (EMSA pour « Electrophoresis Mobility Shift Assays ») et de ChIP chez le lotier indiquent que NIN lie les promoteurs et active la transcription des facteurs de transcription NF-YA1 et NF-YB1 (Soyano et al., 2013).

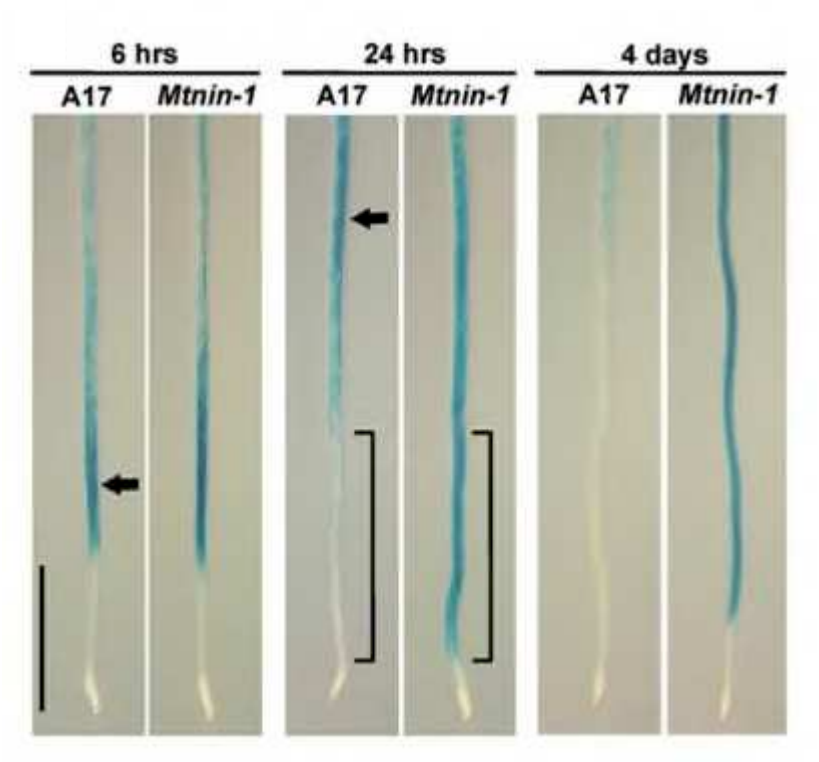


Figure 25 : NIN restreint le domaine d'expression du marqueur de nodulation précoce *ENOD11* en réponse aux facteurs Nod (NFs).

Après 6h de traitement par les NFs (1nM), l'expression de la construction *pENOD11-GUS* est induite dans la zone de réponse à rhizobium d'une racine sauvage de *M. truncatula*, ou du mutant *nin*. Après 24h de traitement par les NFs, l'expression de *pENOD11:GUS* est réprimée entre la zone de réponse à rhizobium et la pointe racinaire chez les plantes sauvages, mais pas chez le mutant *nin*. Après quatre jours, cette expression reste maintenue dans la racine du mutant *nin* et s'étend même jusqu'à l'apex racinaire. Les flèches indiquent la zone de la racine initialement stimulée par l'application de NFs, cette zone étant hors de l'image après quatre jours de traitement par les NFs. Les crochets indiquent la région de la racine où l'expression d'*ENOD11* n'est pas réprimée chez le mutant *nin.* Barre d'échelle : 10mm.
(d'après Marsh et al., 2007)

La nodulation des mutants *nin* de Medicago et du lotier est bloquée en aval de l'étape de reconnaissance des bactéries symbiotiques, ou pré-infection : bien que le signal symbiotique soit perçu au niveau des poils absorbants, la déformation de ceux-ci est excessive et ne conduit pas à la formation de cordons d'infection (**Figure 24**) (Schauser et al., 1999; Marsh et al., 2007). Plus précisément, lorsque les bactéries prolifèrent dans la crosse de berger, NIN est nécessaire pour initier le remodelage de la chambre d'infection et la multiplication des bactéries (Fournier et al., 2008). Le mutant *nin* n'est cependant pas affecté dans la capacité à générer des oscillations calciques en réponse aux NFs (Miwa et al., 2006; Marsh et al., 2007). Ainsi, la protéine NIN a un rôle en aval des oscillations de calcium à la fois dans la formation des cordons d'infection et pour l'initiation des primordia de nodosités (Schauser et al., 1999; Marsh et al., 2007). Le rôle de NIN dans l'organogénèse des nodosités semble indépendant du processus d'infection, sachant que d'une part la forme auto-active de CCaMK/DMI3 induit l'organogénèse de nodosités spontanées en absence d'infection par rhizobium (section I.B.4.c), et que ces nodosités ne se forment pas chez le mutant *nin* (Marsh et al., 2007) ; et d'autre part, que l'expression ectopique de NIN chez *M. truncatula* et *L. japonicus* à l'aide d'un promoteur ubiquitine, mais aussi d'un promoteur s'exprimant spécifiquement dans le cortex de la racine dans le cas de Medicago, induit en absence de bactérie symbiotique des divisions corticales dans la racine et des structures anatomiquement proches de primordia de nodosités (Soyano et al., 2013; Vernié et al., 2015).

Pour mieux comprendre le rôle de NIN en relation avec les infections symbiotiques, Marsh et al. (2007) a utilisé la fusion transcriptionnelle *pENOD11:GUS* pour suivre son induction en réponse aux NFs. L'expression de cette fusion *pENOD11:GUS* est en effet associée à la progression des infections par les rhizobia au niveau des cellules contenant les cordons d'infection et des sites d'initiation des primordia (Journet et al., 2001). Un traitement de 6h par les NFs induit l'expression d'*ENOD11* au niveau de la zone de susceptibilité à rhizobium, *i.e*. au-dessus de l'apex racinaire, indépendamment de NIN (**Figure 25**) (Marsh et al., 2007). Cependant, 24h après l'application de NFs, l'expression de *pENOD11:GUS* n'est plus restreinte à la zone de susceptibilité dans le mutant *nin* mais s'étend jusqu'à l'apex de la racine. Ces données révèlent donc, au-delà du rôle positif de NIN dans l'initiation des infections et de l'organogénèse des nodosités, qu'un rôle additionnel de restriction spatiale de l'expression d'*ENOD11* en réponse aux NFs existe (Marsh et al., 2007).

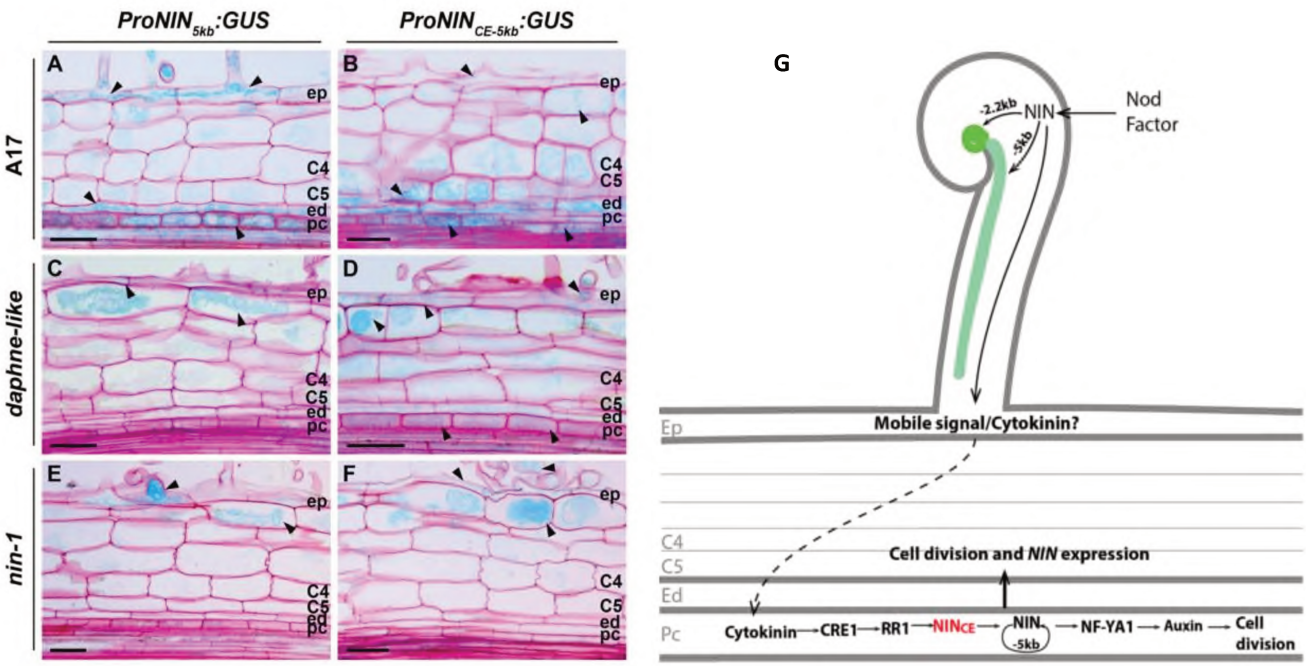


Figure 26 : La région promotrice distale du promoteur du gène *NIN* est nécessaire pour son expression dans le péricycle en réponse à rhizobium.

Les profils d'expression des fusions transcriptionnelles proNIN$_{5kb}$:GUS (A,C,E) et proNIN$_{CE-5kb}$:GUS (B,D,F) ont été observés dans des racines sauvages (A,B) ou chez les mutants *nin*$^{daphne-like}$ (C-D) ou *nin* perte de fonction (E-F), deux jours après inoculation (jai) par rhizobium (sauf E,F : trois jai). Chez le sauvage (A-B), les deux constructions sont exprimées dans l'épiderme, le péricycle, et l'endoderme, et un signal plus faible est détecté dans les cellules du cortex. Chez le mutant *nin*$^{daphne-like}$, la construction proNIN$_{5kb}$:GUS est exprimée seulement dans l'épiderme et le cortex externe, mais pas dans le péricycle (C); par contre, la construction proNIN$_{CE-5kb}$:GUS s'exprime en plus dans le péricycle (D). Dans le mutant *nin* transformé par les deux constructions (E-F), la coloration GUS n'est visible que dans l'épiderme et le cortex externe, mais jamais dans le péricycle. (G) Modèle proposé pour l'action de NIN lors de l'initiation du primordium de nodosité. Après perception des NFs, l'expression de *NIN* est induite dans l'épiderme. La région promotrice jusqu'à 5 kb en amont de l'ATG de NIN est suffisante pour permettre la courbure des poils absorbants et la formation des cordons d'infection. Un signal mobile, dépendant de NIN, est généré dans l'épiderme et serait transmis jusqu'aux cellules du péricycle. Ce signal de nature inconnue induirait l'accumulation de cytokinines dans les couches de cortex interne. Le récepteur aux cytokinines CRE1, dans le péricycle, percevrait les cytokinines et activerait l'expression de *NIN* via le régulateur de réponse RR1. NIN régulerait donc d'une part, directement ou non, sa propre expression ; et d'autre part, activerait directement l'expression de *NF-YA1* et stimulerait les divisions cellulaires à l'origine du primordium de nodosité. A la suite, NIN induirait des divisions dans le péricycle et sa propre expression dans l'endoderme et le cortex via une boucle de rétrocontrôle positif.

Ep : épiderme ; C4 : couche de cortex n°4 ; C5 : n°5 ; ed : endoderme ; pc : péricycle. Barre d'échelle : 50µm. (modifié d'après Liu et al., 2019c)

De manière intéressante, un allèle spécifique de NIN identifié chez le lotier, le mutant *nin*^{daphne}, présente un remaniement chromosomique au niveau de la région promotrice de NIN, sept kilobases (kb) avant l'ATG. Le phénotype non-nodulant de ce mutant est associé à une hyperinfection, contrairement à l'allèle *nin* perte de fonction précédemment décrit (Yoro et al., 2014; Schauser et al., 1999). L'expression ectopique de NIN sous le contrôle du promoteur ubiquitine complémente seulement le phénotype d'hyperinfection de ce mutant *nin*^{daphne}, renforçant l'hypothèse d'un découplage des phénotypes d'infection et d'organogénèse (Yoro et al., 2014). Ces résultats indiquent par ailleurs qu'au-delà de sept kb en amont du codon d'initiation (ATG) de NIN où s'est produit le remaniement chromosomique chez le mutant *nin*^{daphne}, il existerait une région régulatrice permettant l'action positive de NIN sur l'organogénèse des nodosités et le rétrocontrôle négatif sur les infections symbiotiques. Plus récemment, un mutant *nin*$^{daphne\text{-}like}$ a été identifié chez *M. truncatula,* présentant quatre kb en amont de l'ATG de *NIN* une insertion d'une région chromosomique d'environ 2,5 mégabases (Mb) (Liu et al., 2019c). Ce mutant présente un phénotype non-nodulant associé à une hyperinfection, comparable à celui du mutant *nin*^{daphne} du lotier. Une analyse détaillée du promoteur *NIN* chez *M. truncatula* a révélé que la région promotrice proximale, jusqu'à cinq kb en amont de l'ATG, fusionnée au gène *NIN* (*pNIN*$_{5kb}$*:NIN*) permettait de restaurer chez le mutant *nin* la formation des cordons d'infection, mais pas le défaut d'organogénèse des nodosités. De manière intéressante, une région distale du promoteur *NIN*, nommée « CE » pour « Cytokinin Element » (voir section I.B.4.e où cet élément « CE » sera défini), localisée 18 kb en amont de l'ATG de NIN chez *M. truncatula*, et conservée chez différentes légumineuses dont le lotier, permet lorsqu'elle est associée au promoteur proximal de *NIN* (*pNIN*$_{CE\text{-}5kb}$*:NIN*) de complémenter l'ensemble du phénotype de nodulation du mutant *nin*. De plus, lorsque cette région distale est couplée à un promoteur minimal *35S-CaMV* (*pNIN*$_{CE\text{-}35Smin}$*:NIN*), le défaut d'organogénèse du mutant *nin*$^{daphne\text{-}like}$ est restauré, indiquant que cet élément distal est associé à la fonction de NIN dans l'organogénèse des nodosités (Liu et al., 2019c), en accord avec les résultats obtenus avec le mutant *nin*^{daphne} chez le lotier (Yoro et al., 2014). Par ailleurs, une analyse comparative détaillée des fusions transcriptionnelles pNIN$_{5kb}$:GUS et pNIN$_{CE\text{-}5kb}$:GUS dans des racines sauvages ainsi que dans les mutants *nin* et *nin*^{daphne} a été réalisée (**Figure 26**). Chez le sauvage, deux jours après inoculation par rhizobium, les deux constructions révèlent une expression de *NIN* au niveau de l'épiderme racinaire, de l'endoderme et du péricycle, et dans une moindre mesure dans les

cellules du cortex interne. Chez le mutant *nin*^{daphne}, le signal observé avec la construction *pNIN*$_{5kb}$*:GUS* est retrouvé seulement dans les cellules épidermiques, alors que celui observé dans les racines pNIN$_{CE\text{-}5kb}$:GUS révèle une expression non seulement dans l'épiderme mais aussi dans le péricycle. De manière intéressante, les deux constructions exprimées dans le mutant *nin* sont à l'origine d'un signal restreint aux seules cellules de l'épiderme (Liu et al., 2019c). Ces données indiquent d'une part que la région promotrice proximale de *NIN* est responsable de l'expression au niveau de l'épiderme racinaire ; et d'autre part que la région distale du promoteur de *NIN* est nécessaire à l'activation de l'expression de *NIN* dans le péricycle en réponse à rhizobium ; et enfin que l'activité de NIN dans l'épiderme est essentielle pour induire l'expression de NIN dans le péricycle (**Figure 26**). Au final, ces données suggèrent l'existence d'une boucle d'activation de NIN, impliquant un signal mobile généré dans l'épiderme de manière dépendante de NIN, qui activerait ensuite l'expression de NIN dans le péricycle et les couches internes du cortex.

Enfin, au-delà de jouer un rôle crucial dans l'établissement des nodosités, NIN intervient aussi dans le contrôle de leur nombre en étant à l'origine du mécanisme d'autorégulation de la nodulation (AON) (Soyano et al., 2014), qui sera détaillé dans la section III.B.1.

e) Rôle des cytokinines lors de la mise en place des nodosités

Parmi les différentes hormones impliquées dans l'initiation de la nodulation, les cytokinines ont une place à part car elles sont nécessaires et suffisantes pour induire le développement des nodosités, et leur voie de signalisation est essentielle pour assurer une grande partie des régulations transcriptionnelles induites par les rhizobia et les NFs, comme l'ont démontré des travaux réalisés notamment chez les deux légumineuses modèles *M. truncatula* et *L. japonicus.*

L'importance des cytokinines dans l'initiation des nodosités a été mise en évidence à travers la caractérisation de mutants déficients dans la perception des cytokinines, et dont la capacité à noduler est fortement diminuée: *lotus histidine kinase1 (lhk1)* chez *L. japonicus*

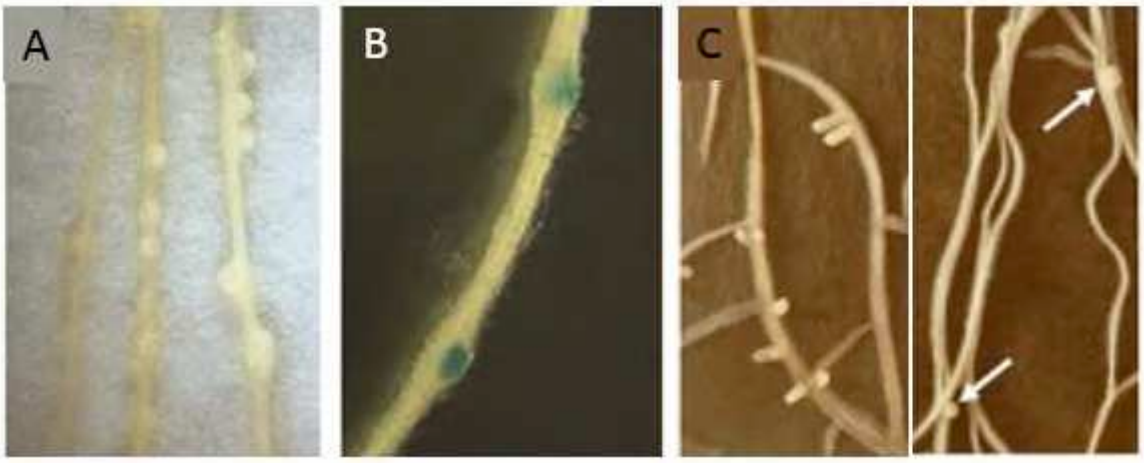


Figure 27 : Les cytokinines sont nécessaires et suffisantes pour induire la formation de nodosités.

(A) Image représentative de primordia de « nodosités spontanées » formés sur des racines de *L. japonicus* en réponse à l'application exogène de cytokinines (BAP pour « BenzylAminoPurine » 10^{-8}M) en absence de rhizobia et en carence azotée.
(B) L'expression de *NIN* est détectée grâce à une fusion transcriptionnelle *pNIN:GUS* dans des nodosités spontanées 21 jours après transfert sur cytokinines (BAP 10^{-8}M).
(C) Le mutant du récepteur aux cytokinines *cre1* (à droite) forme un nombre réduit de nodosités par rapport à une plante sauvage (à gauche). Images représentatives 20 jours après inoculation par *S. meliloti*. Les flèches blanches indiquent les rares nodosités formées chez le mutant *cre1*.
(modifié d'après Heckmann et al., 2011 ; Plet et al., 2011)

(Murray et al., 2007) et *cytokinin response1* (*cre1*) chez *M. truncatula* (**Figure 27**) (Gonzalez-Rizzo et al., 2006; Plet et al., 2011). L'utilisation de bactéries symbiotiques exprimant le gène rapporteur *LacZ* montre que les infections du mutant *cre1* sont bloquées généralement au niveau de l'épiderme ou des cellules du cortex externe, et qu'avec une fréquence nettement plus faible que chez les plantes sauvages, les cellules du cortex se divisent et conduisent à la formation de primordia de nodosités (Plet et al., 2011). Ainsi, un nombre réduit de nodosités se forme chez les mutants *cre1* et *lhk1*, traduisant une redondance fonctionnelle avec les trois autres récepteurs aux cytokinines existant chez ces plantes : en effet, la diminution de l'expression de ces autres récepteurs chez les mutants *cre1* et *lhk1* réduit de manière additive le nombre de nodosités formées (Held et al., 2014; Boivin et al., 2016). A l'inverse, le mutant *spontaneous nodule formation2* (*snf2*), induisant en absence de rhizobia des divisions des cellules corticales et développant des « nodosités spontanées », est affecté dans le gène *LHK1*, et la mutation provoque un effet « gain de fonction » lié à une activation constitutive du récepteur probablement du fait d'un changement de conformation au niveau du domaine extracellulaire impliqué dans la perception des cytokinines (Tirichine et al., 2007). Par ailleurs, l'application exogène de cytokinines sur les racines de certains génotypes de *L. japonicus* induit également des divisions de cellules du cortex et la formation de « nodosités spontanées » en l'absence d'interaction symbiotique (**Figure 27**) (Heckmann et al., 2011). L'équipe d'accueil a montré chez *M. truncatula* que la transformation génétique des racines par une construction activant constitutivement CRE1 induisait aussi le développement de nodosités spontanées, à une fréquence cependant nettement plus faible que chez le lotier (E. Huault, F. Frugier, données non publiées). Ces observations sont en accord avec l'effet d'applications exogènes de cytokinines qui induisent la formation de pseudo-nodosités chez différentes espèces de légumineuses, mais qui nécessitent chez *M. truncatula* des concentrations plus élevées en cytokinines. De plus, le développement de ces pseudo-nodosités atteint des stades moins avancés que pour celles observées chez la luzerne (*M. sativa*) (Gauthier-Coles et al., 2019), soulignant que la capacité *de M. truncatula* à développer des nodosités spontanées est plus faible que celle d'autres légumineuses dont la luzerne et le lotier.

L'ensemble de ces résultats révèle donc que l'activation de la voie de signalisation des cytokinines est nécessaire et suffisante pour induire l'organogénèse des nodosités.

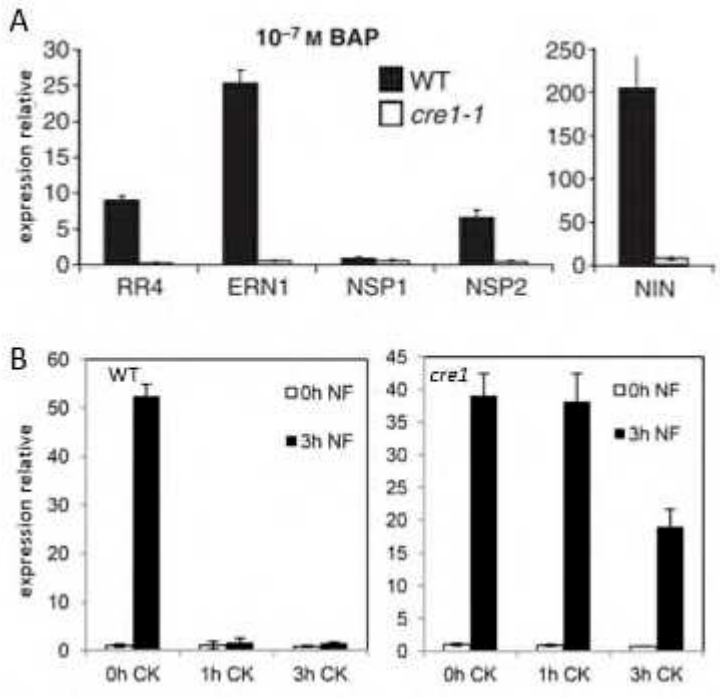


Figure 28. Connexion entre la voie de signalisation des facteurs Nod et la voie médiée par les cytokinines.

(A) L'expression de certains facteurs de transcription de la voie de signalisation des facteurs Nod (NFs) et du régulateur de réponse aux cytokinines *RR4* est induite par les cytokinines. Expression relative des gènes *RR4, ERN1, NSP1, NSP2* et *NIN* dans les racines de plantes sauvages (« WT ») ou du mutant du récepteur aux cytokinines *cre1-1* en réponse à 1h de traitement par la BAP (« BenzylAminoPurine ») 10^{-7}M. Les niveaux d'expression des plantes traitées sont normalisés par rapport à la condition non traitée.
(B) L'induction d'*ENOD11* par les NFs est réprimée par les cytokinines de manière dépendante de CRE1. Expression relative du gène *ENOD11* en réponse à un traitement par les cytokinines (1 ou 3 h BAP 10^{-7}M) suivi d'un traitement par les NFs (10^{-8}M pendant 3h) dans des racines de plantes sauvages « WT » (à gauche) ou du mutant *cre1* (à droite).
(modifié d'après Plet et al., 2011 (A) ; Jardinaud et al., 2016 (B))

Des analyses génétiques chez le lotier visant à introduire la mutation gain de fonction *snf2* dans différents fonds mutants « perte de fonction » de la voie NF et de tester leur capacité de nodulation spontanée ont permis de préciser le rôle des cytokinines par rapport à la voie de transduction des NFs. Ainsi, la formation de nodosités spontanées est observée indépendamment d'une mutation dans les gènes *NFR1/5*, *SYMRK* ou *CCaMK,* positionnant la voie des cytokinines en aval de la perception des NFs et du décodage du signal calcique par CCaMK (Tirichine et al., 2007). Les cytokinines requièrent cependant l'activité de NIN, NSP2 et des protéines DELLA pour induire des nodosités spontanées (Tirichine et al., 2007; Jin et al., 2016), indiquant que les cytokinines jouent un rôle en amont de ces régulateurs transcriptionnels. De plus, une version dominante active de la protéine MtDELLA1 induit des divisions corticales et la formation de structures apparentées à des nodosités spontanées, et complémente partiellement le phénotype de nodulation réduite du mutant *cre1* (Fonouni-Farde et al., 2017). En accord avec ces données génétiques, l'application exogène de cytokinines (10^{-7}M BAP) sur les racines de *M. truncatula* induit rapidement (dès 1h) l'expression de *NIN*, *NSP2*, mais aussi *ERN1*, de manière dépendante du récepteur CRE1 (**Figure 28**), et de DELLA1 pour *NSP2* et *ERN1* (Gonzalez-Rizzo et al., 2006; Plet et al., 2011; Fonouni-Farde et al., 2017).

Il a été observé chez *M. truncatula* que l'application exogène de cytokinines a des effets comparables à ceux d'un traitement par les NFs, induisant des divisions corticales et l'expression de gènes symbiotiques précoces tels qu'*ENOD40*, *NIN* et *ERN1* (Bauer et al., 1996; Frugier et al., 2008), et que les rhizobia et les NFs induisent rapidement la voie des cytokinines. Ainsi, un traitement de 3h par les NFs est suffisant pour induire l'expression de gènes de biosynthèse des cytokinines, tels que l'isopentenyl transferase 1 (IPT1), la cytokinine 5'-monophosphate phosphoribohydrolase (« LONELY GUY » 3, LOG3), ou la cytokinine trans-hydroxylase, (CYP735A1) (Van Zeijl et al., 2015), indiquant une synthèse *de novo* de cytokinines en réponse aux NFs. En accord avec ces résultats, des dosages de cytokinines par chromatographie liquide à ultra-performance couplée à de la spectrométrie de masse en tandem (UPLC-MS/MS) révèlent une augmentation de la concentration en cytokinines dans la zone de réponse à rhizobium après 3 ou 4h de traitement par les NFs (Van Zeijl et al., 2015; Jardinaud et al., 2016). De plus, ce traitement court par les NFs (3h) induit différents gènes de réponse primaire aux cytokinines, et notamment le gène « *Response Regulator A 4* » (*RRA4*) (Van Zeijl et al., 2015), dont l'expression est induite non seulement

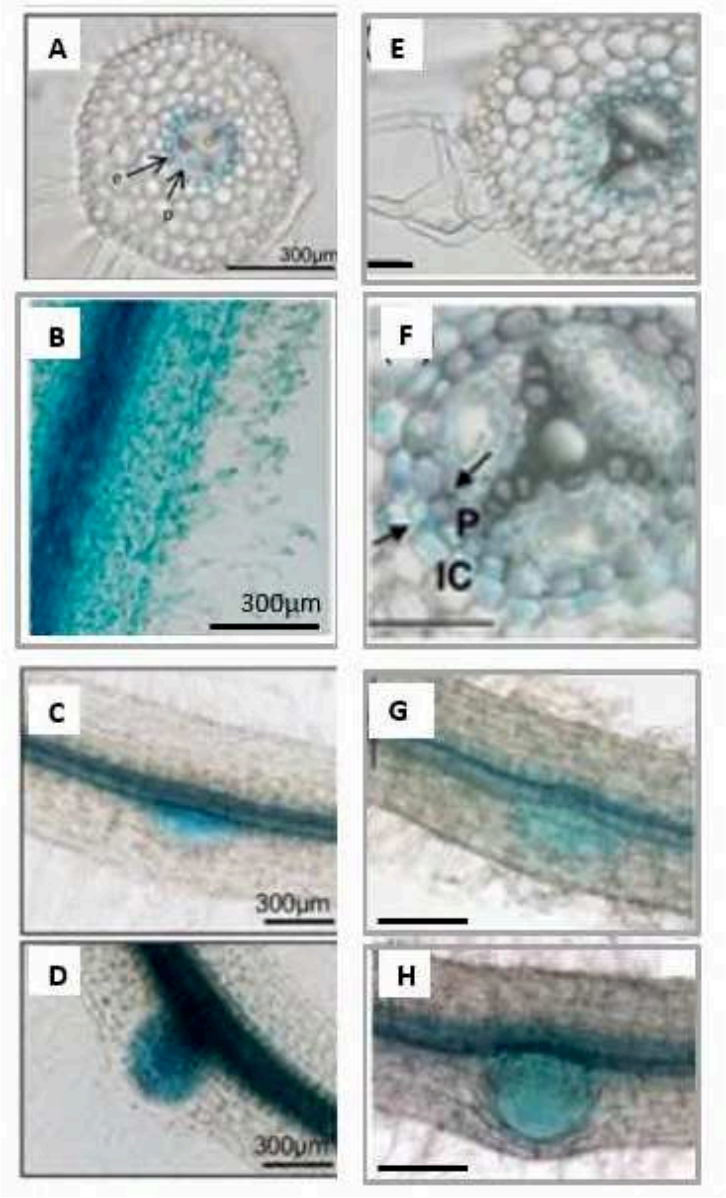


Figure 29 : La voie de signalisation des cytokinines est activée au cours de l'infection par rhizobium.

Localisation de l'activité de *pCRE1:GUS* (A-D) et *pRR4-GUS* (E-H) par coloration histologique (GUS) sur des sections transversales de racines (A, E, F). *CRE1* est exprimé dans les racines non-inoculées au niveau de l'endoderme et du péricycle en face des pôles de protoxylème (A). *RR4* est exprimé également dans le péricycle (P) et dans les cellules du cortex interne (IC) (images E-F). En réponse à un traitement court par les NFs (10^{-9}M, 4h), *CRE1* est exprimé dans les cellules épidermiques (B) ; en réponse à rhizobium, l'expression de *CRE1* et de *RR4* est visible trois jours après inoculation par rhizobium dans les cellules du cortex dès les premières divisions (C,G), puis dans le primordium de nodosité (D,H). Barres d'échelle : 50µm (E-F) ; 250µm (G-H).
(d'après Boivin et al., 2016 (A, C-D) ; Jardinaud et al., 2016 (B) ; Plet et al., 2011 (E-H))

par un traitement cytokinines mais aussi en réponse à rhizobium (Gonzalez-Rizzo et al., 2006). Enfin, des études transcriptomiques comparant la réponse de racines de plantes sauvages ou mutantes *cre1* à, respectivement, un traitement par les NFs (3h) ou une inoculation avec rhizobium (24hpi), révèlent que 73% et 98% des gènes régulés différentiellement dépendent du récepteur CRE1 (Van Zeijl et al., 2015; Schiessl et al., 2019). Ces données indiquent une implication majeure de la voie de signalisation des cytokinines médiée par le récepteur CRE1 dans la mise en place des nodosités.

Le profil d'expression spatiale de CRE1, analysé à l'aide d'une fusion transcriptionnelle *pCRE1:GUS*, révèle une expression lors de l'initiation des divisions des cellules du cortex interne, puis dans les primordia de nodosités, et enfin dans les nodosités différenciées, au niveau de la zone apicale ainsi que dans les tissus vasculaires (**Figure 29**) (Boivin et al., 2016). Ce profil est en accord avec un rôle précoce de ce récepteur des cytokinines dans l'organogénèse des nodosités, et est partiellement chevauchant avec celui du régulateur de réponse *RRA4*, induit également dans les cellules du cortex interne (Plet et al., 2011). Le site d'action des cytokinines durant l'initiation de la nodulation semble être ainsi localisé au niveau des cellules corticales formant le primordium de nodosité. Cependant, une expression plus faible de *CRE1* dans les cellules épidermiques de racines traitées par les NFs a ensuite pu être mise en évidence (**Figure 29**) (Jardinaud et al., 2016). Cette expression épidermique de *CRE1* est indépendamment corroborée par des analyses transcriptomiques focalisées sur la réponse à court-terme (4h) aux NFs des cellules épidermiques racinaires, et aussi en réponse à l'infection par rhizobium au niveau des poils absorbants, qui révèlent tous deux l'activation de gènes de biosynthèse et de réponse aux cytokinines, et notamment du récepteur CRE1 (Breakspear et al., 2014; Jardinaud et al., 2016). Il est intéressant de noter que certains gènes *RRA*, tels que *RRA9*, mais pas *RRA4*, sont régulés par les NFs dans l'épiderme racinaire, suggérant une spécialisation de la réponse aux cytokinines dans ces différents tissus. Par ailleurs, l'utilisation d'une construction synthétique permettant de suivre l'activation de la réponse aux cytokinines (*pTCSn:GUS* ; « Two Component System new») révèle une activation rapide de la voie cytokinine dans les cellules épidermiques en réponse aux NFs et à rhizobium (Jardinaud et al., 2016). Ces données indiquent qu'un rôle symbiotique des cytokinines médié par le récepteur CRE1 existe aussi dans l'épiderme racinaire. En effet, un pré-traitement par les cytokinines d'une heure suffit à empêcher

l'induction par les NFs (3h) du gène *ENOD11*, marqueur précoce de la réponse symbiotique et des infections rhizobiennes, et cette répression de l'activation symbiotique d'*ENOD11* par les cytokinines dépend de CRE1 (**Figure 28**) (Jardinaud et al., 2016). De plus, l'expression tissus-spécifique dans l'épiderme d'une enzyme dégradant les cytokinines potentialise l'induction d'*ENOD11* par les NFs, et augmenterait le nombre de nodosités formées. A l'inverse, lorsque le « pool » de cytokinines est diminué spécifiquement dans les cellules du cortex par la même approche tissus-spécifique, la nodulation est diminuée (Jardinaud et al., 2016). Ces résultats révèlent qu'il existe au niveau de l'épiderme racinaire chez *M. truncatula* un rôle négatif des cytokinines sur l'induction de la voie NF, impactant négativement la nodulation, et rappelant le rôle négatif des cytokinines sur l'infection par les rhizobia proposé chez le lotier, dont le mutant *lhk1* présente un nombre accru d'évènements d'infections symbiotiques au niveau épidermique et cortical (Murray et al., 2007).

Comme mentionné dans la section précédente (voir section I.B.4.d.5), les éléments régulateurs « CE » associés à la réponse aux cytokinines et essentiels pour l'organogénèse des nodosités ont été identifiés dans la région distale du promoteur de *NIN* (Liu et al., 2019c). Cette région régulatrice CE, située à 18 kb en amont de l'ATG de *NIN,* contient six sites de liaisons putatifs par des Régulateurs de Réponse (RR) de type B (Liu et al., 2019c). Cette région, qui serait inaccessible dans le promoteur du mutant $nin^{daphne\text{-}like}$ en raison d'une translocation chromosomique de plusieurs mégabases, se révèle essentielle à l'induction de l'expression de *NIN* en réponse à un traitement par les cytokinines. De plus, une délétion de cette région CE empêche la complémentation du phénotype d'organogénèse des nodosités du mutant *nin*. Cette région régulatrice étant requise pour l'expression de *NIN* notamment dans le péricycle, Liu et al. (2019b) émettent l'hypothèse que la signalisation des cytokinines au niveau du péricycle serait nécessaire à l'activation de l'expression de *NIN* dans ce tissu. En accord avec cette hypothèse, des données d'*hybridation in situ* montrent que *CRE1* et un régulateur de réponse de type B, *RRB1*, sont exprimés dans le péricycle en condition non-symbiotique (Liu et al., 2019c). Enfin, une boucle de rétrocontrôle positif pourrait exister entre NIN et la voie cytokinine : l'activation de CRE1 et de RRA4 dans les cellules corticales en réponse à l'inoculation par rhizobium dépend de NIN (Plet et al., 2011; Vernié et al., 2015) et des expériences de ChIP et de transactivation dans des feuilles de tabac démontrent une activation transcriptionnelle de *CRE1* par NIN (Vernié et al., 2015; Lin et al., 2018).

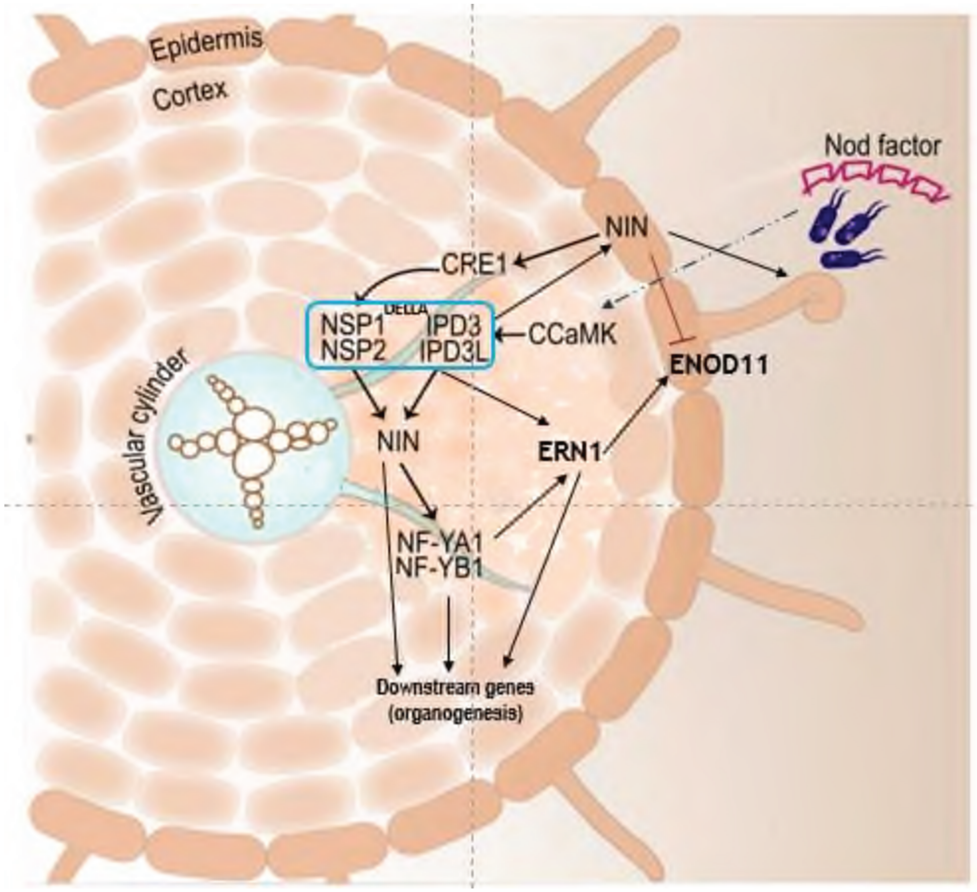


Figure 30 : Un modèle de la transduction du signal facteurs Nod (NFs) dans les racines de *M. truncatula.*

Ce modèle suggère l'existence de deux voies agissant en réponse aux NFs en aval de CCaMK/DMI3, impliquant la protéine IPD3 en association avec les facteurs de transcription NSP1/NSP2 soit directement, soit via le recrutement des facteurs de transcription NIN et NF-YA1, pour au final réguler l'expression d'*ERN1,* qui lui-même régule l'expression d'*ENOD11*. Les protéines DELLA créeraient une connexion entre les complexes NSP1/NSP2 et DMI3/IPD3. Le régulateur transcriptionnel NIN, en régulant près de 85% des gènes symbiotiques, apparait donc comme un acteur central de ce réseau de régulations transcriptionnelles, qui joue un rôle positif lors de l'initiation et de l'organogénèse des nodosités mais aussi un rôle négatif (indiqué par un connecteur violet) pour restreindre l'expression d'*ENOD11* à un stade tardif.
(modifié d'après Roy et al., 2020)

Les travaux de ces dernières années ont ainsi mis à jour que le rôle des cytokinines au cours de l'interaction symbiotique était au cœur d'un réseau de régulations complexes, à la fois négatif pour réguler les infections symbiotiques et la réponse aux NFs, et positif pour induire l'organogénèse des nodosités.

En conclusion de cette partie, le schéma de la **figure 30** propose une synthèse des régulations transcriptionnelles associées aux étapes précoces de la nodulation. Ce modèle, adapté à partir de Roy et al. (2020), suggère qu'en réponse à la perception des NFs bactériens, le complexe transcriptionnel impliquant CCAMK/DMI3 et CYCLOPS/IPD3 serait à l'origine de l'activation de l'expression du facteur de transcription ERN1 via deux voies non exclusives : d'une part, une régulation directe d'*ERN1* via l'interaction physique sur son promoteur de NSP1 et d'IPD3, au sein d'un complexe impliquant NSP1/NSP2 et DMI3/IPD3 reliés par les protéines DELLA ; et d'autre part, ce même complexe transcriptionnel activerait l'expression des facteurs de transcription NIN et NF-YA, qui eux même régulent aussi l'expression d'*ERN1*.

En aval, le facteur de transcription ERN1 régule l'expression de gènes symbiotiques précoces tels qu'*ENOD11*. Des études transcriptomiques réalisées avec le mutant *nin* comparativement à des plantes sauvages sur une région de la racine à proximité du point d'infection par rhizobium (24 hpi) ou dans les poils absorbants cinq jours après inoculation (5 jai), révèlent que respectivement 95% et 85 % des gènes différentiellement régulés par rhizobium à 24 hpi et 5 jai sont dépendants de NIN (Schiessl et al., 2019; Liu et al., 2019a). De plus, parmi les gènes induits par rhizobium dans les poils absorbants à 5 jai, 54% sont régulés de manière opposée dans le mutant *nin* comparé au sauvage tandis que seulement 13% et 5% le sont dans les mutants *ern1* et *nf-ya1*, respectivement. Ainsi, NIN est un acteur central de ce réseau de régulations transcriptionnelles, qui joue différents rôles lors de l'initiation de la nodulation, dans les poils absorbants lors de l'initiation des infections, puis pour restreindre spatialement l'expression d'*ENOD11* et donc restreindre la zone de réponse à rhizobium, mais aussi dans les cellules du péricycle et/ou du cortex où il active la voie de signalisation des cytokinines, en régulant notamment positivement CRE1 et de ce fait, l'organogénèse des nodosités. Un rôle additionnel de NIN dans la régulation du nombre de nodosités pouvant se former sur le système racinaire sera décrit dans la section III.B.1.

II. Hormones peptidiques

A. Définition

Les hormones peptidiques sont définies comme étant de petites molécules de 2 à 100 acides aminés, synthétisées au niveau des ribosomes souvent à partie de précurseurs, qui agissent à faible concentration et coordonnent le développement et la croissance des organismes, ici végétaux, tout en intégrant des facteurs nutritionnels et des stress environnementaux (Tavormina et al., 2015). La première hormone peptidique identifiée chez les plantes est la systémine (Pearce et al., 1991). Ce peptide de 18 acides aminés, isolé à partir de feuilles de tomates, induit la synthèse de protéines de défense de manière comparable à la stimulation qui est observée lors d'une blessure. Grâce à un marquage radioactif, il a été montré que ce polypeptide déposé au niveau d'une blessure se déplaçait non seulement dans toute la feuille, mais était également présent dans le phloème après quelques heures, cette mobilité étant à l'origine du nom de systémine (Pearce et al., 1991). Un récepteur pour la systémine a été identifié récemment, SYR1 pour « Systemin receptor 1 » (Wang et al., 2018).

Suite à la découverte de cette première hormone peptidique, différents types de peptides ont été caractérisés, présentant des fonctions biologiques variées associées à diverses étapes du développement de la plante, parmi lesquels les peptides de signalisation et les peptides antimicrobiens ont été les plus étudiés chez les plantes. Ces derniers présentent une activité antimicrobienne à large spectre contre les bactéries, virus et champignons, conférant aux plantes une résistance non-spécifique -par opposition à une immunité spécifique de type gène de résistance- de par leur mode d'action, notamment associé à leur capacité à perméabiliser et à lyser les membranes des pathogènes ou à inhiber leur métabolisme (Goyal et Mattoo, 2014). Alors que ces peptides interagissent directement avec des structures variées des pathogènes (membranes, protéines…), les peptides de signalisation sont perçus par un récepteur, ce qui permet d'activer ensuite la transduction d'un signal. Ce modèle d'action implique donc l'interaction physique du peptide avec le récepteur, qui se traduit par un changement de conformation du récepteur, ou plus généralement du complexe formé par un récepteur et un ou plusieurs co-récepteurs, à l'origine de l'activation d'une cascade de signalisation qui aboutira à une réponse physiologique (Yamaguchi et al., 2016). On distingue

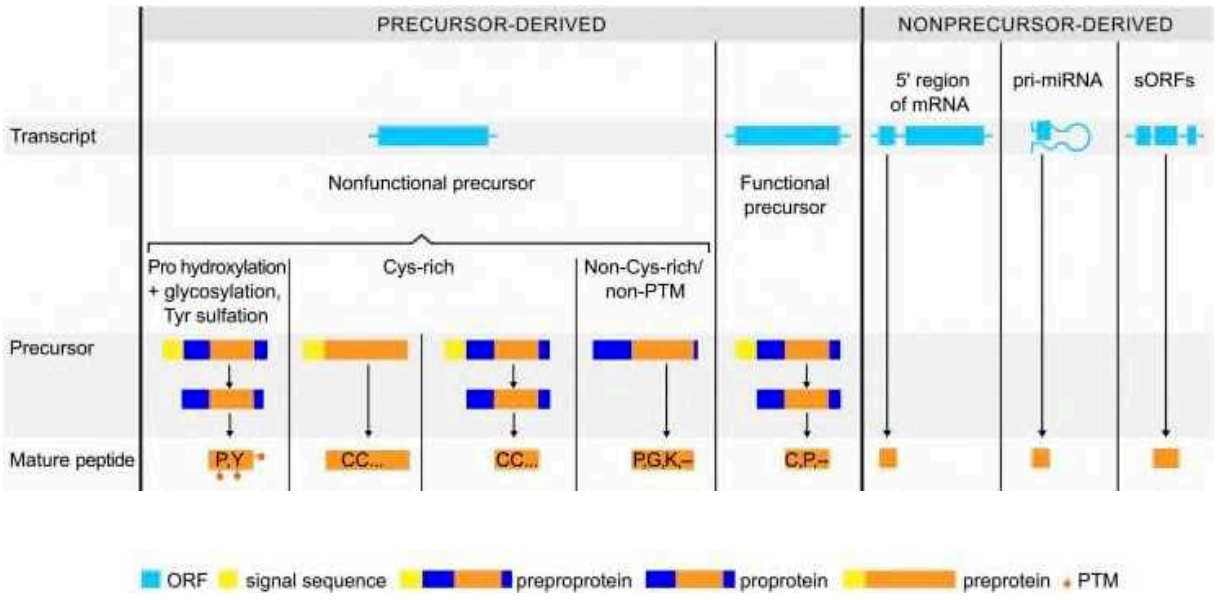


Figure 31 : Les différents types de peptides chez les plantes, classés selon leur biosynthèse, structure et modifications post-traductionnelles.

Les peptides végétaux sont synthétisés à partir d'une protéine précurseur ou directement traduits à partir d'une courte séquence codante inclue dans un transcrit. Dans le cas d'une protéine précurseur, elle peut être non-fonctionnelle ou fonctionnelle. Le peptide mature (rectangle orange) est clivé à partir d'un précurseur qui est nommé « preprotein » lorsqu'il contient seulement un peptide signal N-terminal (« signal sequence »: carré jaune), « proprotein » lorsqu'il contient un prodomaine (rectangle bleu), ou « preproprotein » lorsqu'il contient à la fois un peptide signal et le prodomaine. Les peptides issus de précurseurs non-fonctionnels peuvent être modifiés post-traductionnellement (PTM), riches en cystéines (« Cys-rich »), ou ni riche en cystéines, ni modifiés post-traductionnellement (« non-Cys-rich/non-PTM »). Les peptides non-issus d'un précurseur sont codés par de petites séquences codantes (<100 acides aminés, aa) qui sont situées soit en amont du cadre de lecture principal (« short ORF », ou sORF), soit dans des transcrits primaires de microARN (« pri-miRNAs »), soit dans d'autres transcrits ne codant pas de protéines de plus de 100 aa.
(modifié d'après Tavormima et al., 2015)

les signalisations « cellule autonome », dans lesquelles le peptide et son récepteur sont produits dans une même cellule, des signalisations « non-cellule autonome », dans lesquelles peptide et récepteur sont produits par des cellules distinctes.

Matsubayashi (2018) définit trois grands groupes de peptides chez les plantes, les peptides non-secrétés, les peptides modifiés post-traductionnellement, et les peptides riches en cystéine, alors que Tavormina et al. (2015) propose une classification différente, basée sur leur voie de biosynthèse (**Figure 31**). En effet, certains peptides fonctionnels sont traduits directement à partir de petites séquences codantes, bien que la majorité des peptides de signalisation caractérisés à ce jour dérivent d'une protéine précurseur (Tabata et Sawa, 2014). Cette protéine précurseur peut être fonctionnelle dans certains cas, comme cela a été décrit chez le soja pour une Peptide Subtilase (GmSUBPEP) qui a un rôle activateur de la synthèse de gènes de défense et qui dérive d'une protéine enzymatique subtilase présentant une activité protéolytique indépendante du rôle de signalisation du peptide (Pearce et al., 2010).

Cependant, les peptides ayant pour origine des précurseurs non-fonctionnels sont le plus fréquemment décrits (Tavormina et al., 2015). Parmi le groupe de peptides codés par des précurseurs non-fonctionnels, on distingue trois classes : (i) les peptides présentant des modifications post-traductionnelles (PTMs) spécifiques, (ii) les peptides riches en résidus cystéine et (iii) une classe regroupant les peptides qui ne sont ni riches en résidus cystéine, ni modifiés post-traductionnellement, classe dans laquelle on retrouve des peptides de 8 à 36 acides aminés qui jouent un rôle dans les mécanismes de défense, à l'instar des systémines et des « Plant Elicitor Peptides » (PEPs). Les peptides riches en cystéine sont quant à eux constitués de 50 à 100 acides aminés, parmi lesquels 2 à 16 résidus sont des cystéines qui ont la particularité de pouvoir former entre elles des ponts disulfure et de générer ainsi une structure secondaire spécifique nécessaire pour l'activité biologique du peptide. Ces peptides riches en cystéine ont été décrits comme jouant des rôles multiples, dans la croissance végétative, le développement reproducteur, ou comme composés antimicrobiens (Marshall et al., 2011).

La classe des peptides présentant des PTMs spécifiques est celle qui nous intéresse plus spécifiquement dans cette thèse, avec en particulier, les peptides de la famille « CLAVATA3 (CLV3)/EMBRYO SURROUNDING REGION » (CLE), une des familles de peptides de signalisation les plus étudiées chez les plantes, ainsi qu'une famille de peptides plus récemment découverte, les « C-TERMINALLY ENCODED PEPTIDES » (CEP).

Dans cette classe de peptides de signalisation, les peptides sont décrits comme étant *a priori* perçus par des récepteurs spécifiques. La protéine traduite à partir du gène correspond à un précurseur biologiquement inactif appelé prépropeptide, qui sera clivée de façon à libérer le peptide signal localisé dans la partie N-terminale du précurseur. C'est à partir de ce propeptide - forme du précurseur dépourvue du peptide signal - que la maturation du peptide de signalisation bioactif va avoir lieu, d'une part grâce à une activité protéolytique qui clive le propeptide pour libérer le domaine peptidique actif, et d'autre part par l'ajout de PTMs spécifiques. Le clivage en amont du domaine peptidique fonctionnel est médié par des enzymes endoprotéolytiques, telles que des sérine protéinases, comme cela a été montré chez *Arabidopsis* pour le peptide CLV3 (Ni et al., 2011), ainsi que par des enzymes exoprotéolytiques telles que des carboxypeptidases qui en éliminant les résidus de part et d'autre du domaine actif, se révèlent nécessaires à l'activité biologique du peptide, comme cela a été mis en évidence pour CLE19 chez Arabidopsis (Tamaki et al., 2013; Matsubayashi, 2014). Les critères qui définissent le site peptidique actif restent à découvrir, mais les PTMs pourraient jouer un rôle de protection contre les activités protéolytiques. Ces PTMs consistent essentiellement en des hydroxylations de résidus proline, des glycosylations de ce même acide aminé, ou des sulfatations de tyrosines. En modifiant les propriétés physico-chimiques des peptides, et par conséquent leur hydrophobicité et leur conformation, ces PTMs moduleraient aussi la capacité de liaison du peptide avec le complexe récepteur, et potentiellement la spécificité et la stabilité de l'interaction, potentialisant ainsi l'activité biologique du peptide (Okamoto et al., 2013; Yamada et Sawa, 2013).

Par la suite, nous résumerons les connaissances acquises sur les fonctions des peptides CLE et CEP chez Arabidopsis avant de décrire leur rôle chez les légumineuses.

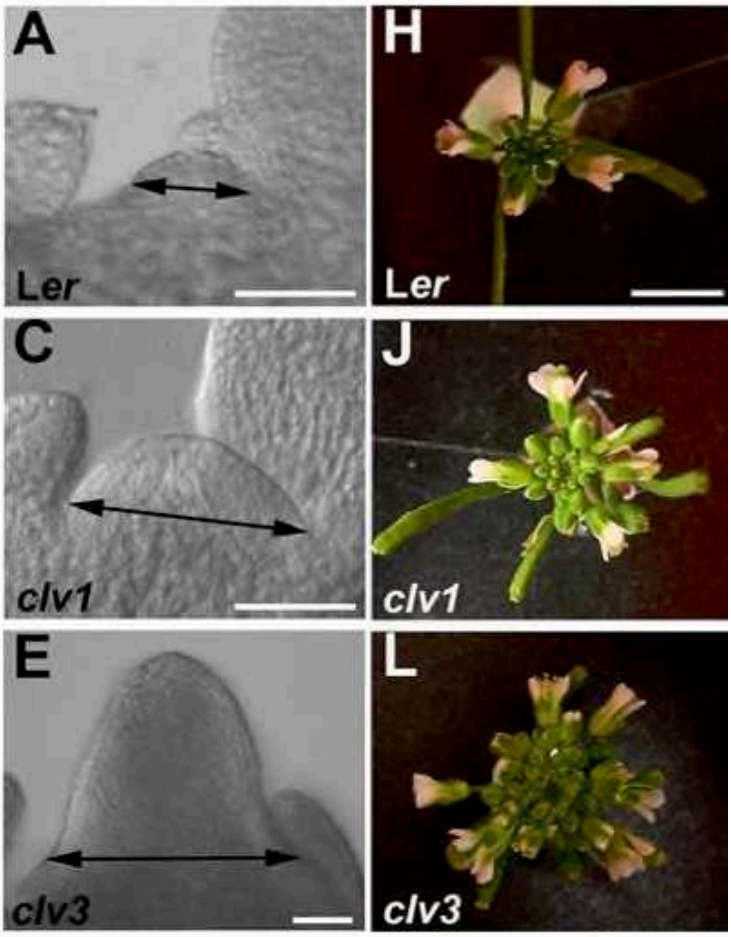


Figure 32 : Phénotype des mutants *clavata1* et *clavata3* d'Arabidopsis.

Les mutants de la voie de signalisation CLAVATA, *clv1* et *clv3,* ont des méristèmes caulinaires apicaux plus larges comparativement à une plante sauvage.
(A, C, E) : Photo en microscopie à contraste interférentiel réalisée sur des coupes (20µm) de méristèmes apicaux caulinaires de plantes sauvages de génotype Landsberg (Ler) et de mutants *clv1* ou *clv3.*
(H, J, L) : Méristèmes des inflorescences de plantes sauvages (Ler) et de mutants *clv1* ou *clv3.*
Barre d'échelle : 5mm.
(modifié d'après Yue et al., 2013)

B. Le rôle des peptides CLE chez Arabidopsis

1. Les peptides CLE impliqués dans la maintenance des méristèmes

La famille des peptides CLE, la plus largement étudiée chez Arabidopsis, se caractérise par un motif constitué de 12 à 14 acides aminés dans la partie C-terminale de la protéine précurseur. Ce motif a initialement été identifié comme étant conservé entre les gènes *CLAVATA3* (*CLV3*) d'Arabidopsis et « Zea mays *EMBRYO SURROUNDING REGION* » (*ZmESR*) du maïs, ce qui a donné le nom « CLV-ESR related », ou CLE, à cette famille de peptides. Par la suite, de nouveaux membres ont été identifiés dans les bases de données génomiques d'Arabidopsis grâce à la conservation de ce motif (Cock et McCormick, 2001), portant à 32 le nombre de gènes CLE dans cette espèce (Jun et al., 2008).

Le mutant *clv3,* identifié par un criblage génétique, présente un phénotype de défaut dans la taille des méristèmes caulinaires apicaux (SAM pour « shoot apical meristem ») associé à une prolifération exagérée des méristèmes à l'origine des inflorescences et des fleurs (Clark et al., 1995). La croissance accrue du SAM chez le mutant *clv3* par rapport à une plante sauvage est détectée à un stade très précoce, dès l'embryogénèse. Toutefois, la mutation de ce gène n'affecte pas la taille du méristème racinaire, suggérant initialement un rôle spécifique de CLV3 dans la régulation du développement des méristèmes caulinaires végétatifs et floraux (Clark et al., 1995), et dans un second temps la possibilité d'une redondance fonctionnelle avec un autre peptide dans la racine. Le phénotype du mutant *clv3* étant similaire à celui du mutant *clavata1* (*clv1*) (**Figure 32**) (Clark et al., 1993; Yue et al., 2013), l'hypothèse d'une action conjointe dans une même voie de signalisation régulant la taille des méristèmes a été proposée. CLV1 code pour un récepteur transmembranaire constitué d'un domaine à activité kinase localisé au niveau cytoplasmique, et d'un domaine extracellulaire comprenant des répétitions riches en leucines (LRR) (Clark et al., 1997).

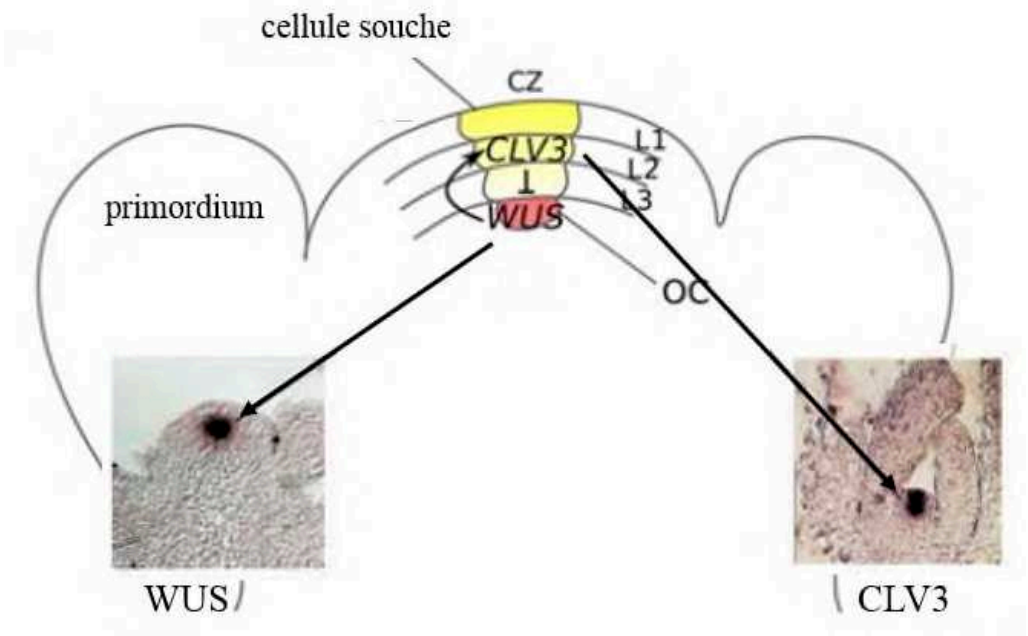


Figure 33 : Modèle de régulation des cellules souches dans le méristème caulinaire apical d'Arabidopsis.

La zone centrale (CZ) du méristème caulinaire apical est constituée à la fois de cellules souches (en jaune) et du centre organisationnel (OC, en rouge), exprimant respectivement les gènes *CLV3* et *WUS*, comme le montrent les images d'hybridation *in situ* correspondantes. L'activité transcriptionnelle de *WUS* dans l'OC permet de spécifier l'identité des cellules souches dans les couches de cellules L1 à L3, qui de leur côté, en exprimant *CLV3*, restreignent par un mécanisme de signalisation non-cellule autonome le domaine d'expression de *WUS* au niveau de l'OC.
(modifié d'après Groß-Hardt et Laux, 2003 ; Miwa et al., 2009)

Comme CLV3 code pour une petite protéine de 96 acides aminés, présentant un signal de secrétion, il a rapidement été proposé que CLV3 puisse être un ligand du récepteur CLV1 (Fletcher et al., 1999). Cette hypothèse a été validée par Ogawa et al. (2008), en utilisant des fractions membranaires de cellules de tabac exprimant le domaine extracellulaire de la protéine CLV1, i.e. sans le domaine kinase cytoplasmique, et un peptide CLV3 marqué avec un isotope photoactivable, révélant ainsi que le domaine peptidique de CLV3 peut se lier directement au domaine extracellulaire de CLV1, de manière spécifique et réversible. Par la suite, la caractérisation de mutants présentant des phénotypes similaires à celui des mutants *clv1* ou *clv3* a permis l'identification d'autres acteurs présents au niveau membranaire et impliqués dans la perception du peptide CLV3 : le récepteur CLAVATA2 (CLV2), constitué d'un domaine LRR extracellulaire mais dépourvu d'un domaine kinase cytoplasmique (Kayes et Clark, 1998; Jeong et al., 1999), la protéine kinase CORYNE (CRN), ancrée à la membrane mais dépourvue de domaine extracellulaire (Müller et al., 2008; Zhu et al., 2010), et le récepteur kinase à domaine LRR « Receptor Like Protein Kinase 2 » (RPK2) (Kinoshita et al., 2010).

Le module régulateur CLV1-CLV3 joue un rôle négatif central sur l'expression du facteur de transcription WUSCHEL (WUS) impliqué dans le maintien de la prolifération des cellules souches au niveau du SAM. Plus précisément, ce module peptide-récepteur CLV1-CLV3 fait partie d'une boucle de rétrocontrôle dans laquelle WUS active la prolifération des cellules souches, cette prolifération induisant en retour l'expression de *CLV3*, qui à son tour réprime l'expression de *WUS* (**Figure 33**) (Groß-Hardt et Laux, 2003). Cette boucle de rétrocontrôle permettrait de restreindre le nombre de cellules dans le SAM et de déterminer sa taille (Mayer et al., 1998; Brand et al., 2000; Schoof et al., 2000). Enfin, la comparaison des profils transcriptionnels et traductionnels de CLV3 via la localisation de ses transcrits par hybridation *in situ* versus la localisation des peptides fusionnés au gène rapporteur GFP (« Green Fluorescent Protein ») indique que le peptide CLV3 serait mobile et pourrait agir à quelques cellules de distance de son lieu de synthèse (Lenhard et Laux, 2003).

De manière analogue à ce qui a été décrit dans le SAM, la taille du méristème apical racinaire (RAM) est contrôlée par une voie de signalisation médiée par des peptides CLE.

Méristème racinaire apical

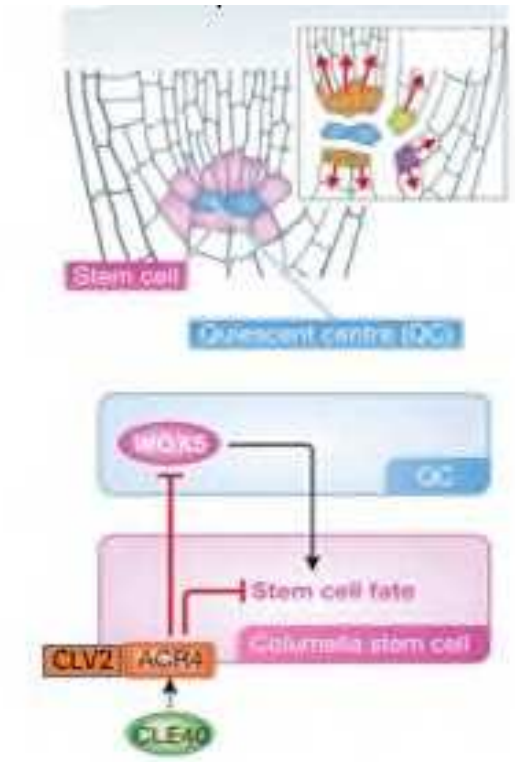


Figure 34 : Modèle de l'organisation du méristème racinaire apical d'Arabidopsis contenant les cellules souches.

Dans le méristème racinaire apical (RAM), les cellules souches entourent le centre quiescent (QC) qui maintient leur pluripotence grâce à un mécanisme régulateur non-cellule autonome impliquant des gènes de la famille *WUSCHEL (WOX), CLAVATA (CLV)* et *ARABIDOPSIS CRINKLY (ACR)*. L'activation du récepteur ACR4 par CLE40, probablement au sein d'un complexe de récepteurs impliquant également CLV1 et/ou CLV2, au niveau des cellules souches de la columelle inhibe de manière non–cellule autonome l'expression de *WOX5* dans les cellules du centre quiescent afin de maintenir leur pluripotence et d'inhiber leur différenciation. Les cellules filles des cellules souches seront à l'origine, en fonction de leur position, des cellules constituant les différents tissus de la racine : vasculaires, épidermique, corticaux, endodermique, et de la columelle.
(modifié d'après Miyashima et al., 2012)

Parmi les 20 gènes codant pour des peptides CLE exprimés dans la racine, 9 sont présents dans le RAM (Jun et al., 2010). Des approches d'application exogène ou de surexpression de certains de ces peptides, comme CLV3, CLE19 et CLE40, induisent une diminution de la longueur des racines et de la taille du RAM (Hobe et al., 2003; Fiers et al., 2005). Le peptide CLE40 étant le plus proche de CLV3 basé sur la similarité de séquence protéique autour du motif CLE (comparaison des 30 derniers acides aminés), et la structure des deux gènes étant similaire notamment en termes de nombre d'introns, il a été proposé que CLV3 et CLE40 pourraient être des protéines de fonction équivalente (Hobe et al., 2003). Si les deux peptides diffèrent de par leur profil d'expression, CLV3 étant strictement exprimé au niveau du SAM et CLE40 étant présent à un faible niveau dans toute la plante et notamment dans la racine, leurs activités se sont révélées comme étant fonctionnellement équivalentes. En effet, le phénotype de SAM exagérément large du mutant *clv3* peut être complémenté par une construction où CLE40 est exprimé sous le contrôle du promoteur CLV3 (Hobe et al., 2003), restaurant ainsi la signalisation médiée par CLV3 pour contrôler la taille du SAM. L'expression ectopique de CLE40, comme celle de CLV3, conduit en revanche à un arrêt de l'activité du SAM et à une inhibition du développement du RAM, favorisant alors la différenciation des cellules du centre quiescent et restreignant le domaine d'expression du facteur de transcription « WUS HOMEOBOX-CONTAINING 5 » (WOX5) qui a des fonctions similaires à celles de WUS dans le SAM (**Figure 34).** En accord avec ces données, le mutant *cle40* présente une prolifération des cellules souches du RAM et un retard de leur différenciation, et développe par conséquent, des racines plus courtes et « ondulées » par rapport à une racine sauvage, tout en ne présentant pas de défaut au niveau du SAM (Hobe et al., 2003; Stahl et al., 2009). De manière intéressante, le profil d'expression de *WOX5* est altéré dans le mutant *cle40*, ce phénotype rappelant celui du mutant d'un récepteur kinase de la famille ARABIDOPSIS CRINKLY, *acr4*, qui présente également -comme *cle40*- des défauts d'organisation du RAM. Comme l'application exogène de CLE40 n'induit pas une différenciation excessive du RAM chez le mutant *acr4,* il a été proposé qu'ACR4 soit un élément de perception du signal CLE40 (Stahl et al., 2009). De plus, le récepteur CLV1, s'exprimant également dans la racine, forme des complexes homo- ou hétéro-dimériques avec ACR4 et serait aussi impliqué dans la perception de CLE40 (Stahl et al., 2013).

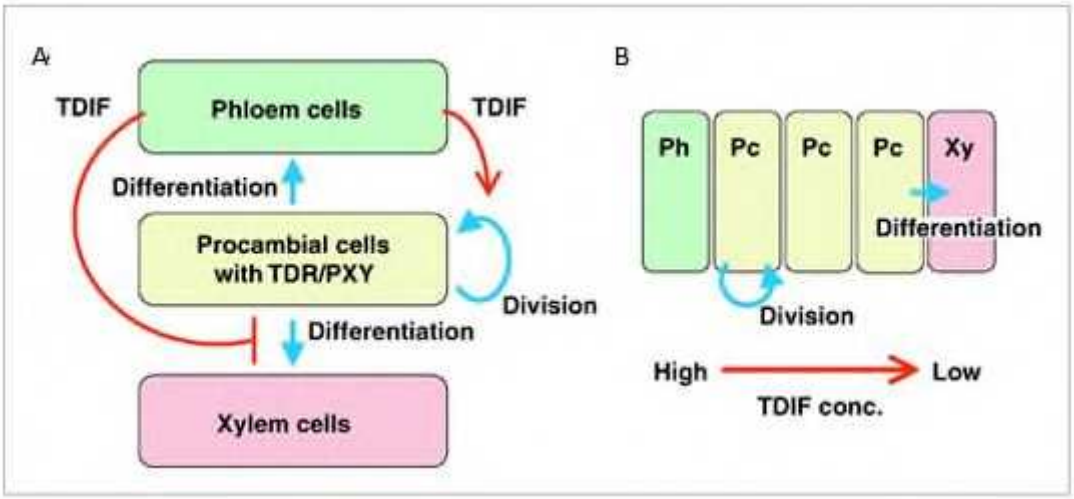


Figure 35 : Modèle de régulation des cellules souches dans le procambium.

(A) Le peptide de signalisation TDIF (« TRACHEARY ELEMENT DIFFERENTIATION INHIBITORY FACTOR ») de la famille CLAVATA (CLE) est secrété par les cellules du phloème (en vert) et perçu par le récepteur TDR/PXY (« TDIF RECEPTOR/ PHLOEM INTERCALATED WITH XYLEM ») présent au niveau des cellules du procambium (en jaune). Ce signal non-cellule autonome joue un rôle positif sur les divisions des cellules du procambium et négatif sur leur différenciation en cellules de xylème (en rose).
(B) Un gradient de concentration de peptides TDIF existe du phloème (Ph) vers le xylème (Xy) en passant par le procambium (Pc), permettant de générer des informations de position pour induire la différenciation du xylème et le maintien des cellules souches.
(d'après Hirakawa et al., 2010)

Ainsi dans la racine, le module CLE40-ACR4/CLV1-WOX5 restreint, de manière non-cellule autonome, la zone dans laquelle les cellules méristématiques se divisent, d'une manière analogue à l'action du module CLV3-CLV1-WUS dans la partie caulinaire.

Enfn, le méristème vasculaire, tout comme les méristèmes caulinaires et racinaires, est aussi régulé par une voie de signalisation peptidique non-cellule autonome, impliquant des peptides CLE nommés « TRACHEARY ELEMENT DIFFERENTIATION INHIBITORY FACTOR » (TDIF)/CLE41/CLE44, et le récepteur kinase de type LRR appartenant à la même sous-famille que CLV1, « TDIF RECEPTOR/ PHLOEM INTERCALATED WITH XYLEM » (TDR/PXY) (Ito et Fukuda, 2006; Etchells et Turner, 2010). Dans le méristème vasculaire, les cellules du procambium se divisent de manière polarisée et se différencient en deux types de cellules qui constitueront les tissus conducteurs que sont le xylème et le phloème (**Figure 35**) (Hirakawa et al., 2010). Lorsque le récepteur TDR/PXY est déficient, comme par exemple dans le mutant *pxy*, des défauts dans la séparation des tissus conducteurs, phloème et xylème, sont observés, en particulier au niveau des tiges et des pétioles (Fisher et Turner, 2007). Des approches de surexpression du peptide CLE44 ou d'application exogène de TDIF chez Arabidopsis ont mis en évidence le rôle stimulateur de ce peptide sur la prolifération des cellules du procambium, et son rôle inhibiteur sur la différenciation des cellules du procambium en xylème (Hirakawa et al., 2008). Le modèle d'action propose que le peptide TDIF, produit dans le phloème, soit perçu à distance par le récepteur PXY/TDR exprimé dans les cellules du procambium (Hirakawa et al., 2008) pour réguler de manière non-cellule autonome d'une part les divisions des cellules du procambium, et d'autre part le devenir de ces cellules, en inhibant leur différenciation en xylème, permettant au final de déterminer l'organisation des éléments conducteurs (Etchells et al., 2015).

2. Le rôle des peptides CLE dans les interactions de la plante avec son environnement

Au-delà de leurs fonctions pour contrôler la taille des méristèmes, les peptides de signalisation, produits dans tous les tissus de la plante, sont impliqués dans la régulation du développement végétatif en relation avec la perception du milieu environnant (**Figure 36**) (Jun et al., 2010). Les nutriments minéraux disponibles dans le milieu étant prélevés par les

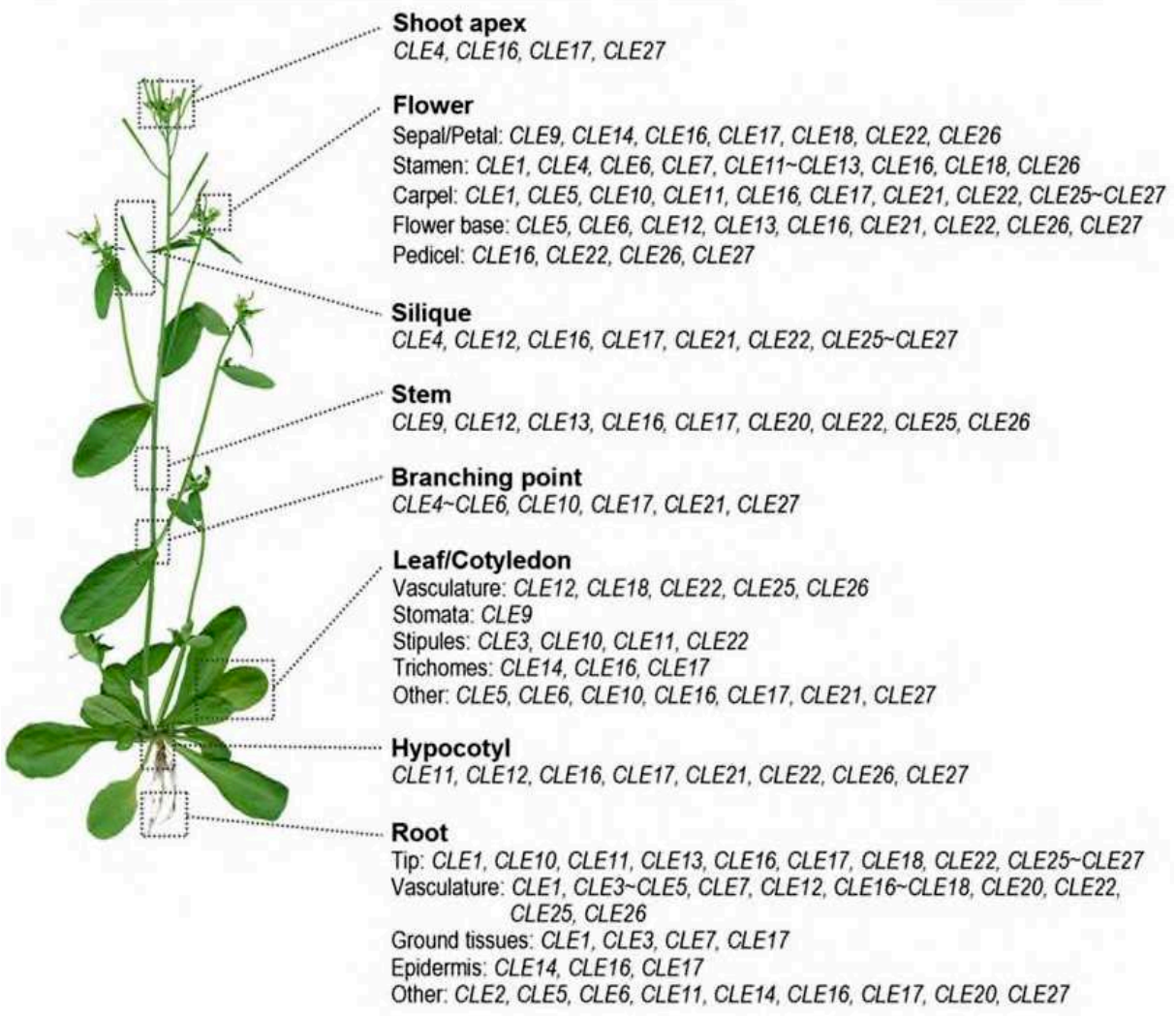


Figure 36 : Expression des gènes *CLE* dans les différents organes et tissus d'Arabidopsis

Le schéma indique pour chaque organe ou tissu une liste des gènes *CLE* pour lesquels une activité du promoteur a été détectée à l'aide de fusions transcriptionnelles avec le gène rapporteur *GUS*.
(d'après Jun et al., 2010)

racines, les peptides associés aux interactions entre réponses environnementales et développementales ont été souvent identifiés de par la régulation de leur expression dans les racines. Ainsi, lorsque des plantes sont soumises à un déficit en azote, l'expression des gènes codant les peptides CLE1, CLE3, CLE4 et CLE7 est induite dans les racines, et des approches de surexpression de l'un de ces quatre gènes révèlent un effet négatif sur la formation des RLs, en particulier sur la croissance des primordia de RLs et sur leur émergence (Araya et al., 2014). De manière intéressante, le mutant *clv1* présente lors d'un déficit azoté un phénotype inverse, c'est-à-dire des racines plus allongées par rapport au sauvage, et il a de plus été montré que la surexpression de *CLE3* requiert le récepteur CLV1 pour réguler la croissance des RLs. Les profils d'expression des gènes codant le récepteur CLV1 et les peptides CLE1/3/4/7, respectivement dans les cellules compagnons du phloème et dans les cellules du péricycle, suggèrent que le récepteur CLV1 perçoit ces peptides CLE de manière non-cellule autonome. Ainsi, ce module de signalisation CLE/CLV1 contrôle négativement la prolifération des racines secondaires dans un milieu où la teneur en azote est limitée (Araya et al., 2014).

Un mécanisme similaire module l'architecture du système racinaire en fonction de la disponibilité en soufre dans le milieu. Dans un environnement carencé en soufre, la plante réprime le développement de ses RLs, et réactive la formation de RLs lorsque la présence de soufre est optimale (Dong et al., 2019). Cette réponse de la racine à la teneur en soufre étant perdue dans le mutant *clv1*, une implication de la voie de signalisation CLV a été suggérée. L'expression des gènes codant les peptides CLE2 et CLE3 étant induite lors d'un apport de soufre, Dong et al.. (2019) proposent que cette voie de signalisation CLE/CLV1 permette de moduler le développement des RLs en fonction de la disponibilité en soufre.

Un autre nutriment essentiel au développement de la plante, le phosphate inorganique (Pi), a été relié à une voie de signalisation impliquant des peptides CLE chez Arabidopsis. Lorsque les plantes sont carencées en Pi, la croissance de la racine primaire est bloquée via une inhibition de l'élongation des cellules, et les cellules du RAM perdent leur capacité à se multiplier (López-Bucio et al., 2003). Les travaux de Gutiérrez-Alanís et al. (2017) ont montré qu'en condition de Pi limitant, l'expression des gènes codant les peptides CLE14, CLE22 et CLE26 est induite dans les pointes racinaires. En condition de carence en Pi, le domaine d'expression de *CLE14* s'étend aux cellules souches du RAM et aux tissus

vasculaires au-dessus du RAM, et une application exogène du peptide CLE14 conduit à un arrêt de croissance de la racine primaire, mimant ainsi la carence en Pi, de manière dépendante de CLV2 mais indépendante de CLV1 (Meng et al., 2010). Ainsi CLE14 serait perçu par un complexe de récepteurs/co-récepteurs impliquant CLV2, et induisant la différenciation des cellules du RAM en condition de carence en Pi (Gutiérrez-Alanís et al., 2017).

Enfin, un dernier exemple illustrant le rôle des peptides CLE en relation avec l'environnement est le rôle de CLE25 dans la réponse au stress hydrique (Takahashi et al., 2018). Dans ce cas, le peptide CLE agirait dans une voie de signalisation à longue distance, ou systémique, contrairement aux exemples précédents où l'organe de production des peptides était le même que celui où leur action était observée -même s'il est à noter que dans ces cas précédents, une action à longue distance n'avait pas été spécifiquement analysée via des expériences dédiées, et n'est donc pas à exclure. Le peptide CLE25, produit dans le procambium des tissus vasculaires, présente une expression induite particulièrement au niveau des racines lorsque la plante est soumise à un stress hydrique (Takahashi et al., 2018). Le peptide CLE25 migrerait alors des racines vers les parties aériennes pour être perçu au niveau des feuilles par les récepteurs LRR-RLK « BARELY ANY MERISTEM 1» (BAM1) et BAM3, apparentés à CLV1 mais n'appartenant pas au même clade, et dont la fonction développementale est opposée à celle de CLV1, vu que les SAM des mutants *bam* sont moins développés comparativement à une plante sauvage (De Young et al., 2006). L'activation du module de signalisation CLE25/BAM induirait alors dans les feuilles la synthèse d'acide abscissique (ABA), qui régulerait positivement la fermeture des stomates afin de limiter la perte d'eau lors d'un stress hydrique initié au niveau racinaire.

Nous venons de voir que les peptides CLE jouent un rôle important dans le développement des méristèmes de différents organes/tissus de la plante, ainsi que dans la perception et l'intégration de réponses développementales à certains signaux environnementaux, et que ces peptides, mobiles, agissent généralement de manière non-cellule autonome pour transmettre une information de position, soit localement à quelques cellules de distance, soit systémiquement entre des organes éloignés, pour au final optimiser la croissance de la plante en fonction des ressources en nutriments minéraux disponibles et de

la présence de stress abiotiques. Nous allons détailler à présent le rôle d'une autre famille de peptides de signalisation qui a été impliquée dans la régulation du développement racinaire en réponse à la disponibilité en azote.

C. Le rôle des peptides « C-Terminally Encoded Peptide » (CEP) dans la nutrition azotée chez Arabidopsis

Les peptides CEP ont été découverts par Ohyama et al. (2008) par une approche *in silico* réalisée chez Arabidopsis, à partir de l'observation que les précurseurs de différentes familles de peptides de signalisation, telles que les CLV3/CLE ou les phytosulfokines, partageaient des degrés de similarité variables sur l'ensemble de leur séquence protéique mais présentaient toujours une courte région très conservée dans leur partie C-terminale. Un crible *in silico* a donc été réalisé à partir de bases de données protéiques d'Arabidopsis, afin de sélectionner les petites protéines possédant (i) un peptide signal permettant l'adressage au système de sécrétion et (ii) un domaine C-terminal conservé entre différents gènes, de moins de 15 acides aminés. Ce crible a ainsi permis d'identifier une nouvelle famille de gènes paralogues codant potentiellement pour de petits peptides secrétés, les CEPs, pour « C-Terminally Encoded Peptides ». Une analyse par spectrométrie de masse couplée à une chromatographie liquide du surnageant d'une culture hydroponique de plantes d'Arabidopsis surexprimant un de ces gènes *CEP*, nommé *CEP1*, a permis de confirmer la présence d'un peptide mature de 15 acides aminés dont deux résidus prolines présentaient des hydroxylations. Des études ultérieures ont montré que les PTMs des peptides CEP sont essentiellement des hydroxyprolinations au niveau des résidus 4 et 11 (Ohyama et al., 2008), avec quelques cas où les peptides CEP comportent des hydroxyprolinations additionnelles sur le septième résidu ou une arabinosylation de la proline en position 11 (Mohd-Radzman et al., 2015).

La surexpression de CEP1 chez Arabidopsis inhibe la croissance de la racine principale et l'élongation des RLs, mais également la croissance des parties aériennes, avec des tiges plus courtes bien que le nombre de feuilles et le temps de floraison ne soient pas affectés (Ohyama et al., 2008). Au niveau microscopique, la surexpression de CEP1 induit une réduction du nombre de cellules de la zone méristématique du RAM ainsi qu'une réduction de la taille des cellules de la région différenciée de la racine (Ohyama et al., 2008).

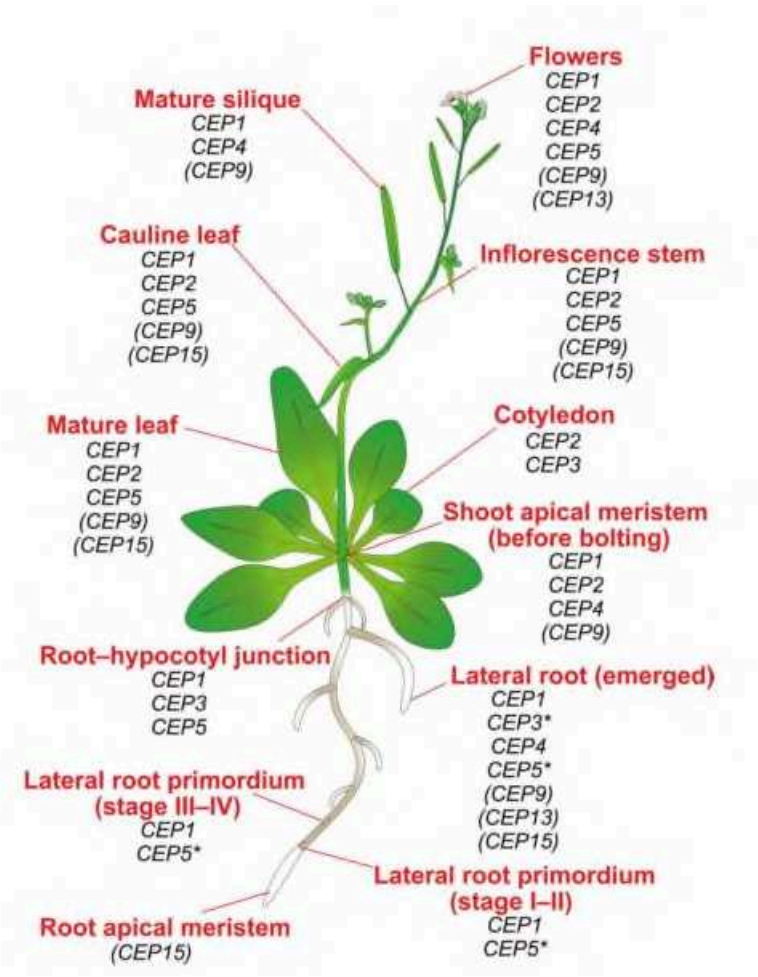


Figure 37 : Expression des gènes *CEP* dans les différents organes et tissus d'Arabidopsis.

Le schéma indique pour chaque organe ou tissu une liste des gènes *CEP* pour lesquels une expression a été décrite soit *in silico* à partir de données transcriptomiques, soit à l'aide de fusions transcriptionnelles avec le gène rapporteur *GUS*. Les gènes entre parenthèses proviennent des données d'expression issues du navigateur « Electronic Fluorescent Pictograph » Browser (eFP ; Winter et al., 2007) disponible sur le site BioAnalyticResource (BAR) (http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi). Les astérisques désignent une expression associée aux tissus vasculaires de la racine primaire à ces stades.
(d'après Roberts et al., 2013)

Par la suite, des approches *in silico* ont permis d'une part de détecter, en plus des cinq gènes *CEP* initialement identifiés, 10 autres gènes codant des peptides CEP chez Arabidopsis (Delay et al., 2013; Roberts et al., 2013) ; et d'autre part, de démontrer qu'une famille de gènes codant des peptides CEP est présente chez de nombreuses autres espèces de plantes à graines, tandis qu'elle est absente du génome d'espèces plus ancestrales, comme les algues, les mousses et les lycophytes, qui sont toutes des espèces ne possédant pas de système vasculaire, ou de ramifications racinaires dans le cas de *Selaginella* (Banks, 2009; Roberts et al., 2013). Une analyse approfondie chez les Angiospermes distingue deux groupes de gènes *CEP* phylogénétiquement distincts, basé sur le degré de conservation de leur(s) domaine(s): les domaines CEP du groupe I sont très conservés sur 1es 15 résidus qui composent le peptide CEP mature, alors que les domaines CEP du groupe II présentent un fort degré de conservation sur seulement neuf résidus localisés en C-terminal (Delay et al., 2013; Roberts et al., 2013). Il est à noter que les travaux publiés portent essentiellement sur les gènes *CEP* canoniques du groupe I.

Une cartographie de l'expression des gènes *CEP* basée sur un ensemble de données obtenues *in planta* et/ou *in silico* chez Arabidopsis suggère que ces peptides sont présents dans toute la plante, de la pointe racinaire au méristème caulinaire, et indique aussi qu'une redondance transcriptionnelle existe dans certains tissus comme les tissus vasculaires, ou dans les racines à la base des primordia de RLs (**Figure 37**) (Roberts et al., 2013).

L'expression des gènes *CEP* est aussi fortement influencée par les conditions externes et notamment la disponibilité en nutriments ou la présence de stress abiotiques, comme un stress osmotique ou des teneurs élevées en CO_2 (Delay et al., 2013). En particulier, le gène *CEP3* est fortement exprimé dans les racines en réponse à une carence azotée ou à un stress salin, et l'apport exogène de ce peptide inhibe la croissance de la racine primaire et le nombre de RLs (Delay et al., 2013), en réprimant notamment les divisions cellulaires et en réduisant ainsi le nombre de cellules du méristème racinaire et la taille de la zone méristématique (Delay et al., 2019). Au niveau moléculaire, l'apport exogène de CEP3 réprime certains gènes régulant positivement la taille de la zone méristématique, et induit certains gènes impliqués dans le contrôle négatif de la croissance de la racine, tels que les peptides CLE1/4/7 mentionnés dans

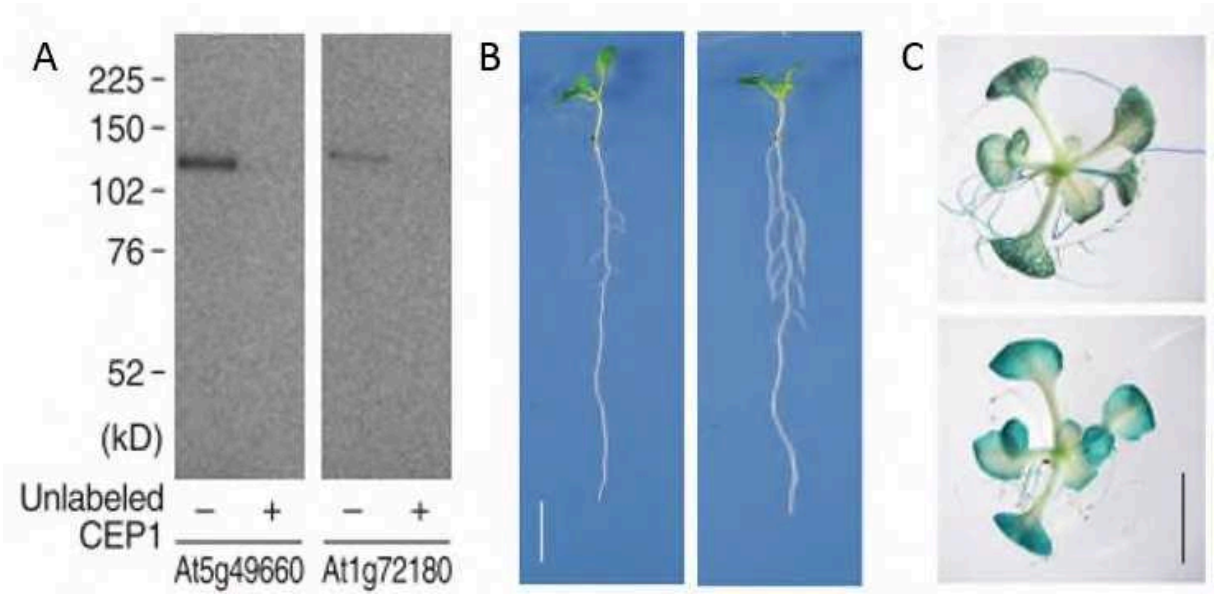


Figure 38 : Caractérisation des récepteurs CEPR chez Arabidopsis.

(A) Liaison directe d'un peptide AtCEP1 photoactivable (10nM) avec les récepteurs LRR-RLK AtCEPR1 (At5g49660) et AtCEPR2 (At1g72180). La spécificité de la liaison est démontrée en ajoutant un excès (100X) de peptide AtCEP1 non marqué pour « déplacer » la liaison du peptide marqué.
(B) Images représentatives du phénotype racinaire de plantes sauvages (à gauche) et du double mutant *cepr1-1;cepr2-1* (à droite) après 10 jours de culture sur un milieu riche en azote. Noter la présence de racines latérales allongées chez le mutant par rapport au sauvage.
(C) Coloration histochimique de plantules d'Arabidopsis transformées avec les constructions *pCEPR1:GUS* (en haut) et *pCEPR2:GUS* (en bas).
Barres d'échelle : 1cm (B) ou 5mm (C).
(modifié d'après Tabata et al., 2014)

la section précédente (section II.B.2) (Delay et al., 2019). En accord avec les applications exogènes, le mutant perte de fonction *cep3* présente une augmentation de la taille du méristème racinaire par rapport à une plante sauvage, et une réponse altérée à différents stimuli environnementaux tels qu'un stress salin, une intensité lumineuse réduite, ou une température plus froide (Delay et al., 2013, 2019).

L'expression du gène *CEP5* est elle aussi induite par des conditions limitantes en azote, et des approches de surexpression ou de perte de fonction par ARN interférence induisent respectivement une diminution ou une augmentation de la longueur des racines primaires et du nombre de RLs émergées (Delay et al., 2013; Roberts et al., 2013). Ces résultats, ainsi que l'analyse du domaine spatial d'expression de *CEP5* associé aux primordia de RLs, indiquent un rôle négatif de CEP5 sur les premières étapes de l'initiation des racines (Roberts et al., 2013, 2016). Il faut noter par ailleurs que CEP5, présent au niveau du SAM, contrôle négativement la croissance des parties aériennes et la taille des rosettes (Roberts et al., 2013).

Afin d'identifier un récepteur pouvant lier les peptides CEP, une version modifiée du peptide CEP1 associé à une molécule photoactivable a été utilisée pour réaliser le criblage d'une banque de récepteurs LRR-RLKs des sous-familles X et XI d'Arabidopsis (**Figure 38**) (Tabata et al., 2014). Ces tests d'interaction ont permis l'identification de deux récepteurs LRR-RLKs capables de lier le peptide CEP1, ces liaisons étant spécifiques car perdues lorsqu'une compétition avec un excès de peptide CEP1 non marqué est réalisée. Ces récepteurs At5g49660/XIP1 et At1g72180 ont été nommés « CEP RECEPTOR 1» (CEPR1) et CEPR2, respectivement. Le profil d'expression de *CEPR1* est associé aux tissus vasculaires de la plante, des feuilles jusqu'aux racines, à l'exception des pointes racinaires, alors que *CEPR2* est détecté dans l'ensemble de la feuille, dans les pointes racinaires des racines primaires et secondaires, mais pas dans les tissus vasculaires (**Figure 38**) (Tabata et al., 2014).

Le double mutant *cepr1;cepr2* est résistant à l'application exogène de peptide CEP1 et montre des phénotypes pléiotropes, correspondant à un développement réduit des feuilles, des tiges, et la formation de RLs plus allongées. La comparaison des phénotypes des simples et doubles mutants *cepr1* et *cepr2* suggère que CEPR1 jouerait un rôle majeur, et CEPR2 un rôle mineur et redondant avec CEPR1 (Tabata et al., 2014).

Le double mutant *cepr1;cepr2* a une capacité réduite à prélever l'azote dans son environnement, et une analyse de son transcriptome comparativement à celui d'une plante sauvage montre une forte réduction de l'expression des transporteurs de nitrate *NRT1.1*, *NRT2.1* et *NRT3.1* qui sont des cibles de la signalisation de demande d'azote (Tabata et al., 2014; Ruffel et al., 2008). Une application exogène de peptides CEP1 induit par ailleurs l'expression de ces transporteurs de nitrate, de manière dépendante des récepteurs CEPR1 et 2. Tabata et al. (2014) établit ainsi un lien entre la production de peptides CEP et la demande en azote.

Afin de séparer les mécanismes systémiques, opérant à longue distance, des régulations locales, des expériences de « split-roots » ont été réalisées. Ainsi, lorsqu'une partie du système racinaire du « split-root » est soumise à une carence azotée, l'expression du gène *NRT2.1* est induite du coté le plus riche en nitrate, tandis que l'expression des gènes *CEP* augmente dans le compartiment carencé en azote. La même expérience réalisée avec le double mutant *cepr1;cepr2* montre que l'induction des gènes *CEP* par la carence en azote est indépendante de ces récepteurs, alors que l'induction des transporteurs de nitrate NRT observée dans le compartiment riche en nitrate dépend de CEPR1/2. De plus, si les peptides CEP1 sont ajoutés à l'un des côtés du « split-root », l'expression des gènes *NRT1.1, NRT2.1* et *NRT3.1* est induite dans tout le système racinaire, suggérant une induction systémique des transporteurs de nitrate NRT, et donc de l'absorption d'azote, par la voie CEP/CEPR. Par ailleurs, la détection dans le flux de sève ascendante (xylème) des peptides CEP3, CEP6 et CEP9 en quantité plus importante lorsque les plantes sont carencées en azote suggère une action en tant que signaux systémiques mobiles (Tabata et al., 2014). L'utilisation d'un peptide CEP1 couplé à un fluorophore montre que ce peptide appliqué sur les racines d'Arabidopsis s'accumule dans les tissus vasculaires de la feuille après quelques heures (Ohkubo et al., 2017).

Par la suite, des expériences de greffes combinées avec des « split-roots » ont montré que les récepteurs CEPR1/2 sont nécessaires dans les parties aériennes pour activer l'expression de *NRT2.1* en réponse à un traitement CEP1 ou à un déficit azoté. Ainsi, le peptide CEP1 serait un signal de demande en azote qui serait produit au niveau des racines en déficit azoté, et transporté vers les parties aériennes où il est perçu par CEPR1/2, activant la production d'un signal descendant vers les racines pour réguler positivement l'expression des transporteurs de nitrate NRT (Tabata et al., 2014). Parmi les gènes candidats pouvant coder ce

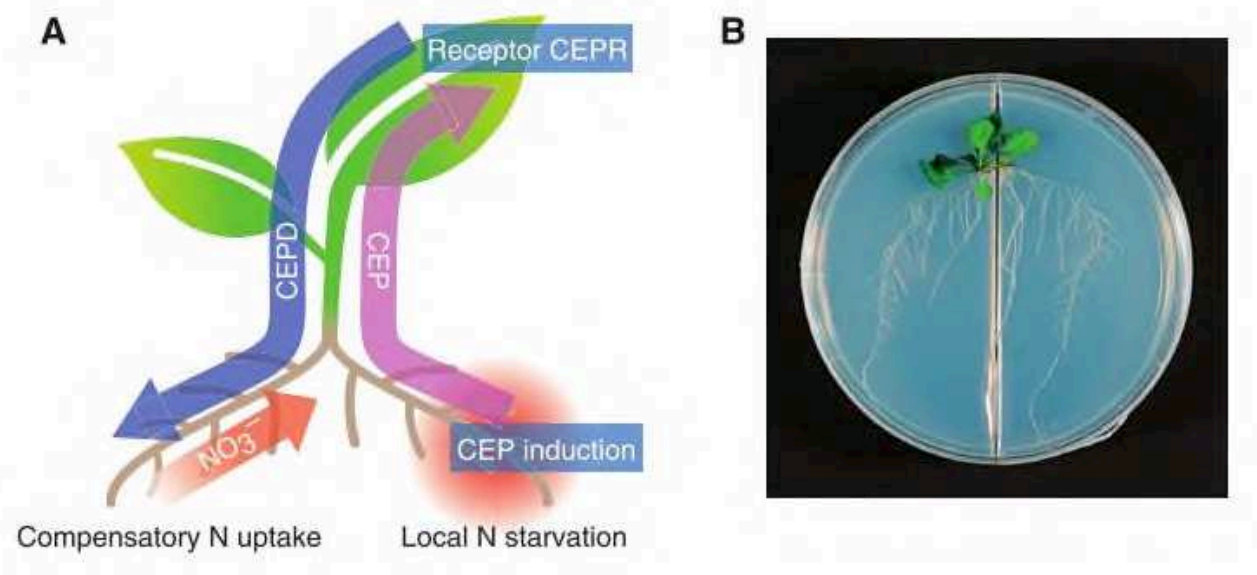


Figure 39 : Schéma de la signalisation de demande en azote, à longue distance, médiée par la voie CEP-CEPR-CEPD.

(A) Plusieurs gènes de la famille « C-TERMINALLY ENCODING PEPTIDE » (CEP) sont induits lors d'un déficit azoté et transmettent à la partie aérienne un signal de demande en azote. La reconnaissance des peptides CEP par les récepteurs « CEP RECEPTOR » (CEPR1/2) dans les parties aériennes entraîne la production d'un signal secondaire, « CEP DOWNSTREAM » (CEPD), des feuilles vers les racines. Ce signal systémique descendant stimule l'absorption de nitrate dans les parties distantes des racines localisées dans des régions riches en azote, qui permettent ainsi de compenser le déficit local en azote des autres parties du système racinaire.

(B) Système expérimental de culture des plantes en « split-root », où le système racinaire est séparé en deux parties qui sont exposées à différentes conditions de culture.
(d'après Matsubayashi, 2018)

signal systémique descendant, des gènes régulés spécifiquement dans les cellules du phloème des feuilles en réponse à un traitement CEP et de manière dépendante de CEPR1/2 ont été recherchés (Ohkubo et al., 2017). Deux gènes, nommés « *CEP DOWNSTREAM 1* » (*CEPD1*) et *CEPD2*, ont ainsi été identifiés, codant pour des glutarédoxines capables d'activer l'expression de *NRT2.1* lorsqu'elles sont surexprimées. Dans le modèle proposé par Matsubayashi (2018) (**Figure 39**), l'activation de la voie CEP/CEPR par le déficit azoté induirait la production des protéines CEPD dans les feuilles, qui migreraient vers les racines via le phloème pour réguler positivement et spécifiquement l'expression de *NRT2.1* dans les racines se développant dans un environnement riche en azote, permettant ainsi d'augmenter l'absorption de nitrate et de compenser la carence en nitrate perçue par l'autre partie distante du système racinaire.

Au final, chez Arabidopsis, l'induction des gènes *CEP* par un déficit azoté inhiberait localement l'élongation des racines primaires en inhibant les divisions dans le RAM, permettant une réduction de la croissance racinaire dans des zones où le nitrate est en quantité limitée ; et par ailleurs induirait à longue distance l'expression de transporteurs NRT et l'absorption de nitrate dans les zones où le nitrate est disponible.

III. Le rôle des hormones peptidiques chez les légumineuses

Les hormones peptidiques, en plus de jouer un rôle dans le développement de la racine et des différents organes de la partie aérienne, sont aussi impliquées chez les plantes légumineuses dans la régulation de la nodulation symbiotique fixatrice d'azote.

Une des plus grandes familles de peptides, comprenant plus de 600 membres chez Medicago, est constituée de peptides riches en cystéines et présents spécifiquement dans les nodosités, appelés NCR pour « Nodule-specific Cysteine-Rich », dont la structure ressemble à celle de peptides liés à la défense contre les bactéries, les défensines (Mergaert et al., 2003). Dans le contexte de la nodulation symbiotique, bien que ces NCR présentent une activité antimicrobienne, un rôle dans la différenciation des bactéries rhizobia en bactéroïdes dans les cellules de la nodosité a été proposé, ainsi que pour limiter leur prolifération et pour favoriser une interaction symbiotique avec certains génotypes de bactéries plutôt que d'autres (Van de Velde et al., 2010; Mergaert, 2018). Malgré le nombre élevé de membres dans cette famille de peptides NCR, la perte de fonction d'un seul de ces peptides peut suffire à induire un phénotype, comme le démontre l'identification du mutant *dnf7* (« *does not fix nitrogen 7* ») affecté dans le gène codant le peptide NCR169, et du mutant *dnf4* affecté dans le NCR211 (Horvath et al., 2015; Kim et al., 2015). Ce mutant, perturbé dans sa capacité de fixation de l'azote peut être complémenté par une version native du gène *NCR169*, mais pas par une version où les cystéines sont substituées, ni par le gène *NCR211* dont la perte de fonction révèle pourtant un phénotype très proche (Horvath et al., 2015; Kim et al., 2015). Ces résultats indiquent une spécificité d'action de ces différents peptides NCR, qui interagiraient directement avec des membranes et différentes protéines bactériennes, et non pas par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques (Kereszt et al., 2018).

D'autres peptides ont été associés aux phases précoces de la nodulation, tel qu'un peptide appartenant à la famille DEVIL (DVL) dont la surexpression affecte négativement la

progression des cordons d'infection chez *M. truncatula* mais pour lequel des approches perte de fonction n'ont pas été réalisées (Combier et al., 2008). Ce peptide non-secrété agit probablement de manière cellule autonome (Ikeuchi et al., 2011).

A présent, le rôle dans la régulation de la nodulation de peptides de signalisation secrétés et agissant via des récepteurs va être détaillé.

A. Les peptides de signalisation impliqués dans l'infection symbiotique et l'organogénèse des nodosités

Des peptides de signalisation interviennent dans les premières étapes de la formation des nodosités, comme c'est le cas de peptides de la famille « Rapid Alkalinization Factor » (RALF). Chez Arabidopsis, ces peptides sécrétés inhibent l'élongation des cellules de la racine via l'activation du récepteur kinase membranaire FERONIA (Haruta et al., 2014). Parmi les quinze membres que comprend cette famille chez *M. truncatula*, au moins RALF1 contrôlerait la formation des cordons d'infection, sa surexpression provoquant une forte diminution du nombre de nodosités, associée à un grand nombre de cordons d'infections avortés (Combier et al., 2008). Cependant aucune approche perte de fonction n'a été réalisée, ni de récepteur potentiel identifié chez *M. truncatula*.

Les peptides phytosulfokines (PSK), constitués de cinq acides aminés et secrétés à l'extérieur des cellules, agissent en tant que facteurs de croissance sur des cellules en culture (Matsubayashi et al., 1997). Chez Arabidopsis, les peptides PSK sont perçus par un récepteur de type LRR-RLK (PSKR1 pour « PSK RECEPTOR 1 »), stimulent la formation de cals, et induisent la croissance racinaire en contrôlant la taille des cellules du méristème (Matsubayashi et al., 2006; Kutschmar et al., 2009). Chez *L. japonicus*, parmi les cinq gènes codant pour des peptides PSK, deux sont exprimés dans les racines et les nodosités, en particulier dans les cellules infectées par rhizobium (Wang et al., 2015). Leur surexpression ou leur application exogène a un effet positif à la fois sur la croissance de la racine et sur le nombre de nodosités formées. Il est à noter que l'effet positif sur la nodulation n'a pas été normalisé par le phénotype de croissance racinaire, et que l'effet stimulateur de ces peptides sur la nodulation pourrait donc être indirect, d'autant plus qu'aucune donnée issue

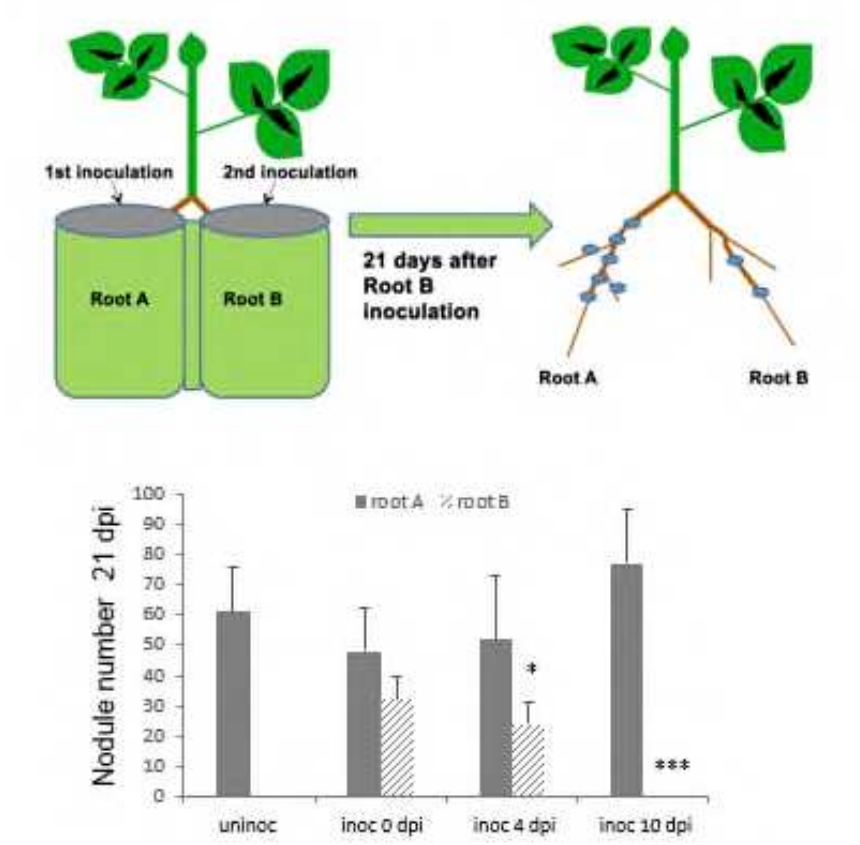


Figure 40: La pré-existence de nodosités a un effet inhibiteur systémique sur la formation de nouvelles nodosités.

En haut, schéma représentant une expérience de « split-root » réalisée chez le soja, dans laquelle une moitié du système racinaire (« root A ») est inoculée par rhizobium, et la deuxième moitié du système racinaire (« root B ») est elle aussi inoculée par rhizobium mais à différents temps après la première inoculation.
En bas, le graphe correspond au comptage des nodosités 21 jours après la 2ème inoculation par rhizobium.
(modifié d'après Kosslak et Bohlool, 1984)

d'approches perte de fonction n'est disponible.

B. Les peptides de signalisation impliqués dans la régulation du nombre de nodosités

1. Les peptides CLE et l'AON

a) Modification et perception des peptides CLE liés à l'AON

Des peptides de signalisation de type CLE ont été associés à une voie de régulation du nombre de nodosités, appelée « autorégulation de la nodulation » (AON), identifiée chez différentes légumineuses (Caetano-Anolles et Gresshoff, 1991; Okamoto et al., 2009; Mortier et al., 2010). L'interaction symbiotique fixatrice d'azote est coûteuse en énergie pour la plante, car celle-ci doit fournir des composés carbonés issus de sa photosynthèse pour assurer l'organogénèse des nodosités et le métabolisme des bactéroïdes présents dans les nodosités. Ainsi, la plante légumineuse doit réguler finement le nombre de nodosités formées afin d'optimiser son activité globale de fixation d'azote en relation avec ses besoins en azote, sa capacité photosynthétique, mais aussi en fonction de la disponibilité d'autres sources d'azote minéral dans le sol. Lorsque de l'azote minéral est disponible dans le sol, la plante privilégie en effet son prélèvement par les racines plutôt que d'entretenir une association symbiotique avec des rhizobia, plus couteuse énergétiquement (Singleton et van Kessel, 1987).

Des travaux anciens ont montré l'existence de voies de rétrocontrôle négatif de la nodulation, telles que la « régulation rapide » de la nodulation décrite chez le soja par Pierce et Bauer en 1983, où il a été démontré que le nombre de nodosités formées était inhibé dans un intervalle de 15 heures après l'inoculation par *Bradyrhizobium japonicum*. Peu après, des expériences de « split-root » ont été réalisées chez le soja, dans lesquelles le système racinaire est séparé en deux compartiments qui sont inoculés avec le partenaire symbiotique à différents temps (Kosslak et Bohlool, 1984). Ainsi, lorsqu'un compartiment racinaire est pré-inoculé par rhizobium quatre jours avant l'inoculation du deuxième compartiment, ce dernier développe un nombre de nodosités réduit par rapport à celui formé sur la première partie de la racine,

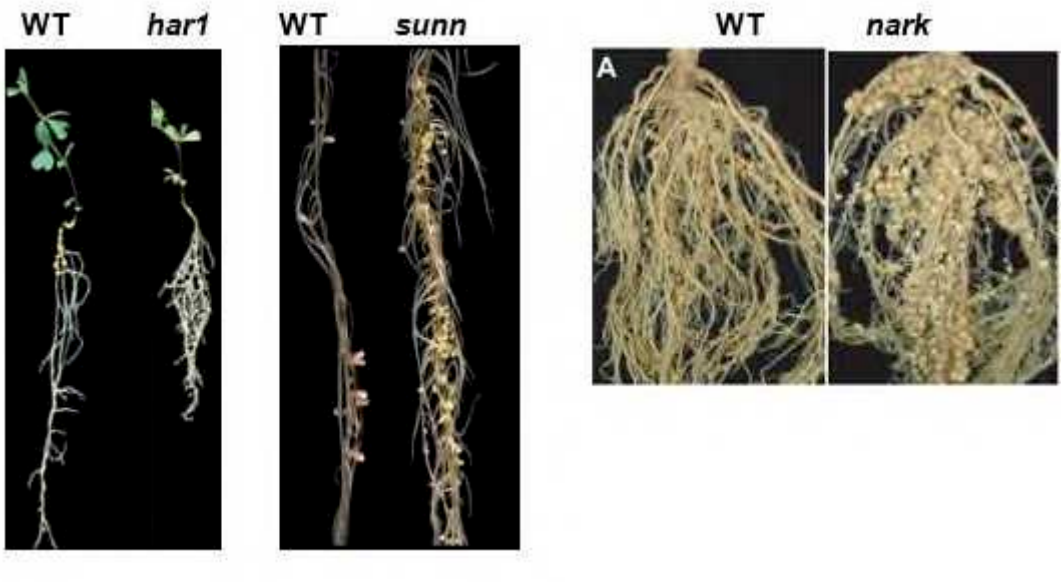


Figure 41 : Phénotype des mutants super/hypernodulateurs.

Images représentatives des mutants *har1* (*hypernodulation and aberrant root formation 1)* (à gauche)*, sunn (super numeric nodules)* (au milieu), et *nark (nodule autoregulation receptor kinase)* (à droite), caractérisés respectivement chez *Lotus japonicus, Medicago truncatula* et *Glycine max.*
(modifié d'après Wopereis et al., 2000; Schnabel et al., 2005; Searle et al., 2003)

mettant ainsi en évidence un effet inhibiteur systémique -à distance- de la mise en place de nouvelles nodosités, de par la préexistence de nodosités dans des parties distantes du système racinaire (**Figure 40**) (Kosslak et Bohlool, 1984). Des mutants supernodulateurs, affectés dans leur capacité à réguler négativement le nombre de nodosités formées ont ensuite été identifiés chez le soja, le lotier et *M. truncatula* (Carroll et al., 1985; Wopereis et al., 2000; Penmetsa et al., 2003). Ces mutants se sont révélés aussi capables de former des nodosités même en présence d'azote, qui a un effet inhibiteur sur la nodulation dans les plantes sauvages (Streeter, 1988), suggérant un lien entre l'inhibition de la nodulation par l'azote et par la préexistence de nodosités fixatrices d'azote. Enfin, des expériences de greffes réalisées entre certains de ces mutants supernodulateurs et des plantes sauvages ont montré que la régulation négative du nombre de nodosités formées était contrôlée par les parties aériennes de la plante, en accord avec l'existence de régulations systémiques inhibitrices mises en évidence par les expériences de « split-root » précédemment décrites (Delves et al., 1986; Nishimura et al., 2002; Penmetsa et al., 2003). Les gènes affectés dans ces différents mutants super/hypernodulateurs codent pour un récepteur kinase à domaine riche en répétitions de leucines (LRR-RLK) nommé HAR1 (pour « Hypernodulation and Aberrant Root formation 1 ») chez *L. japonicus* (Krusell et al., 2002), NARK (pour « Nodule Autoregulation Receptor Kinase ») chez le soja (Searle et al., 2003; Miyahara et al., 2008), et SUNN (pour « Super Numeric Nodules ») chez *M. truncatula* (Schnabel et al., 2005) (**Figure 41**). Ces récepteurs étant homologues au gène CLAVATA1 d'Arabidopsis, qui perçoit des peptides de signalisation de type CLAVATA3, l'existence de peptides CLAVATA-like (ou CLE) associés à ces voies de régulations négatives de la nodulation a été investiguée. La recherche *in silico* de gènes présentant le domaine conservé caractéristique des peptides CLE, associée à l'analyse de l'expression de ces gènes en conditions symbiotiques, ont permis l'identification de gènes codant pour les peptides MtCLE12 et MtCLE13 (Mortier et al., 2010), LjCLE-RS1 (pour « CLE-Root Signal »), LjCLE-RS2 et LjCLE-RS3 (Okamoto et al., 2009; Nishida et al., 2016), GmRIC1 (pour « Rhizobia-Induced CLE ») et GmRIC2 (Reid et al., 2011) chez *M. truncatula, L. japonicus* et *G. max*, respectivement.

La dynamique d'expression des gènes codant pour ces peptides CLE révèle que certains comme *MtCLE13*, *LjCLE-RS1/2* et *GmRIC1* sont induits précocement, par un traitement avec des NFs ou dès un jour après inoculation (jai) par rhizobium, alors que

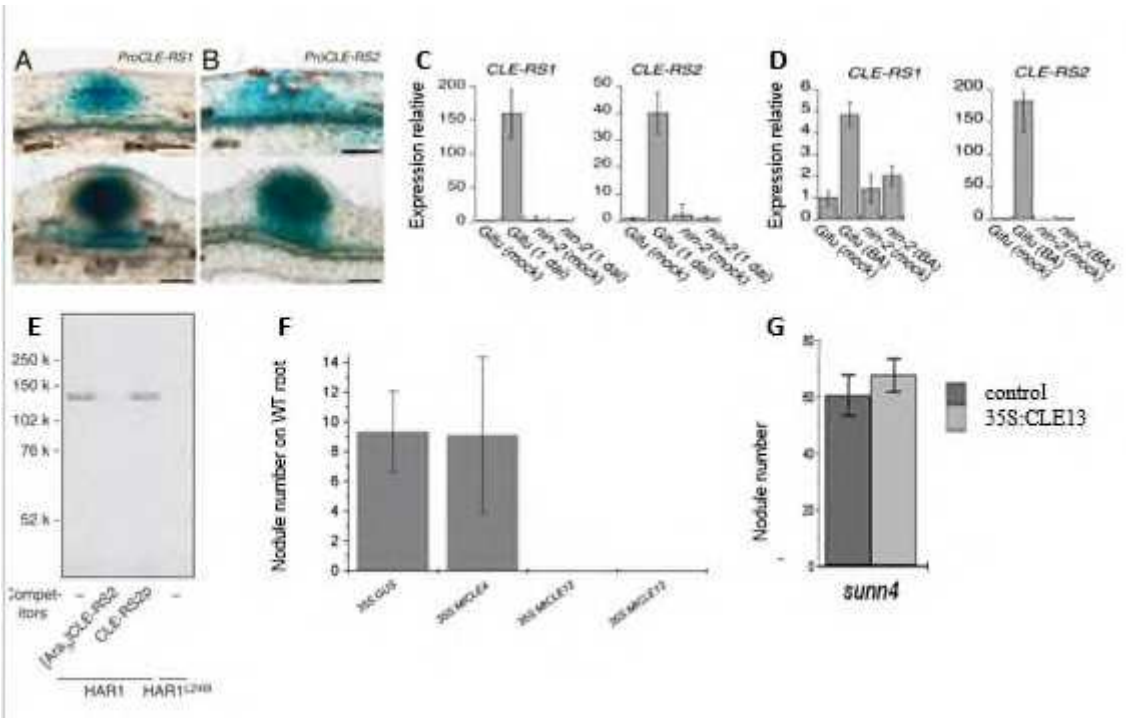


Figure 42 : Des peptides CLE induits par rhizobium lient le récepteur LjHAR1 et inhibent la nodulation de manière dépendante de ce récepteur.

(A-B) Localisation de l'activité des constructions *pCLE-RS1:GUS* (A) et *pCLE-RS2:GUS* (B) par coloration histologique GUS sur des primordia de nodosités (en haut) et sur de jeunes nodosités en cours de développement (en bas) chez *L. japonicus*.
(C-D) Quantification par PCR en temps réel de l'expression des gènes *CLE-RS1* et *CLE-RS2* dans des racines de *L. japonicus* (génotype Gifu) et du mutant *nin*, en condition contrôle (« mock »), en réponse à l'inoculation par rhizobium (1 jour après inoculation, « dai ») (C), ou en réponse à un traitement cytokinine (BA, pour BenzylAdenine, 50 nM durant 20 h) (D).
(E) Liaison directe d'un peptide CLE-RS2 photoactivable (10nM) avec le récepteur LRR-RLK HAR1. La spécificité de la liaison est démontrée en ajoutant un excès (300 X) de peptide CLE-RS2 arabinosylé (Ara3 CLE-RS2) pour « déplacer » la liaison du peptide marqué. Un peptide équivalent mais non modifié post-traductionnellement (CLE-RS2p) ne permet pas de compétition, indiquant l'importance de cette modification pour la liaison au récepteur. Un récepteur HAR1 muté (« L246F ») ne peut pas non plus lier le peptide CLE-RS2.
(F-G) Quantification du nombre de nodosités formées chez *M. truncatula* sur des racines transformées par des constructions *p35S:GUS* (contrôle), *p35S:CLE4, p35S:CLE12* ou *p35S:CLE13* dans des plantes sauvages (F) ou dans le mutant *sunn4* (G).
(modifié d'après Soyano et al., 2014 (A-D) ; Okamoto et al., 2013 (E) ; Mortier et al., 2010 (F) ; Mortier et al., 2012 (G))

l'induction de *MtCLE12, LjCLE-RS3* et *GmRIC2* est plus tardive, à 3 ou 4 jai (Okamoto et al., 2009; Reid et al., 2011; Mortier et al., 2012; Van Zeijl et al., 2015; Nishida et al., 2016). Au niveau spatial, les gènes *MtCLE13* et *LjCLE-RS1/2* sont exprimés dans la racine au niveau des cellules du cortex interne qui se divisent, puis dans les primordia de nodosités (**Figure 42**) (Mortier et al., 2010; Soyano et al., 2014). Leur induction en condition symbiotique étant chevauchante avec celle du régulateur transcriptionnel NIN, Soyano et al. (2014) a pu démontrer que la production des peptides LjCLE-RS en réponse à rhizobium était directement induite par le régulateur transcriptionnel NIN, celui-ci liant les promoteurs des gènes *LjCLE-RS1/2* et activant leur transcription (Soyano et al., 2014). De plus, les cytokinines, hormones centrales dans la mise en place des nodosités et induisant l'expression du facteur de transcription NIN (Gonzalez-Rizzo et al., 2006; Heckmann et al., 2011; Plet et al., 2011) induisent l'expression des gènes *MtCLE13* et *LjCLE-RS1/2* de manière dépendante de NIN, mimant ainsi leur induction symbiotique (Mortier et al., 2010, 2012; Soyano et al., 2014).

Lorsque les gènes codant pour ces différents peptides CLE sont surexprimés, ou si des peptides de synthèse sont ajoutés dans le milieu de culture, une inhibition du nombre de nodosités est observée (**Figure 42**) (Okamoto et al., 2009; Mortier et al., 2010; Reid et al., 2011). En surexprimant simultanément *LjCLE-RS1* et la *GFP* comme marqueur de la transformation des racines, Okamoto et al. (2009) ont montré que l'inhibition de la nodulation était observée à la fois dans les racines transformées, exprimant la GFP, et dans les racines non-transformées, n'exprimant pas la GFP, indiquant que l'inhibition de la nodulation médiée par ce peptide CLE est systémique, en accord avec les expériences précédentes de greffes et de « split-root ». La surexpression du gène *LjCLE-RS1* dans le mutant hypernodulateur *har1* a montré que la nodulation n'était pas réprimée (Okamoto et al., 2009), indiquant que le récepteur LjHAR1 homologue à AtCLV1 était nécessaire pour permettre l'action de ce peptide CLE. De manière similaire chez Medicago et le soja, l'effet suppresseur de la nodulation des peptides CLE est perdu dans les mutants super/hypernodulateurs *sunn* et *nark* (**Figure 42**) (Reid et al., 2011; Mortier et al., 2012).

Des mutants affectés dans un gène codant une hydroxyproline O-arabinosyltransferase, *PLENTY* chez *L. japonicus* et *RDN1* chez *M. truncatula*, ont aussi perdu la capacité à réguler le nombre de nodosités et sont donc super/hypernodulateurs (Kassaw et al., 2017; Imin et al., 2018; Yoro et al., 2019). Il a été montré que les peptides

LjCLE-RS3 ou MtCLE12 sont arabinosylés de manière dépendante de LjPLENTY ou MtRDN1, respectivement. Des expériences d'applications exogènes de peptides modifiés ou non modifiés indiquent que l'arabinosylation de certains peptides CLE semble essentielle pour leur fonction, révélant ainsi l'importance des PTMs pour permettre l'activité biologique des peptides CLE (Imin et al., 2018). Bien que l'arabinosylation des peptides LjCLE-RS1, LjCLE-RS2 ou MtCLE13 par LjPLENTY ou MtRDN1 n'ait pas été démontrée à ce jour, il n'est pas exclu qu'ils ne soient pas arabinosylés par d'autres enzymes de modification encore inconnues.

Okamoto et al. (2013) ont ensuite montré par des analyses de chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse que lorsque le peptide LjCLE-RS2 était surexprimé dans les racines, il pouvait être transporté via le xylème jusqu'aux parties aériennes. De plus, la liaison d'un peptide LjCLE-RS2 photoactivable au récepteur LjHAR1 a été démontrée dans des cellules de tabac (**Figure 42**). Une compétition entre les peptides AtCLV3 et LjCLE-RS2 a permis de démontrer la spécificité de sa liaison avec LjHAR1, ainsi que l'utilisation d'un variant du récepteur HAR1 muté dans un domaine LRR connu pour être crucial chez Arabidopsis pour la liaison du peptide AtCLV3 aux récepteurs CLV1/BAM (Shinohara et al., 2012; Okamoto et al., 2013).

L'interaction des peptides CLE avec le récepteur SUNN/HAR1/NARK implique d'autres partenaires, comme CLV2, CORYNE et KLAVIER, qui sont respectivement une protéine transmembranaire à LRR, une protéine kinase associée à la membrane, et un récepteur kinase LRR-RLK (Schnabel et al., 2005; Miyazawa et al., 2010; Crook et al., 2016). La perte de fonction de chacun de ces trois gènes dans l'ensemble de la plante, ou seulement au niveau des parties aériennes lorsque des greffes ont été réalisées, induit aussi un phénotype d'hyper/supernodulation (Miyazawa et al., 2010; Crook et al., 2016). Le phénotype de nodulation des doubles mutants *har1;klv* ou *har1;clv2* ne révélant pas d'effet additif, ces récepteurs agiraient donc dans une même voie de signalisation (Miyazawa et al., 2010; Krusell et al., 2011). De plus, HAR1/SUNN, KLAVIER et CORYNE étant exprimés dans les tissus vasculaires, une interaction physique entre ces protéines a été recherchée (Schnabel et al., 2005; Miyazawa et al., 2010; Crook et al., 2016). D'une part, une interaction directe entre HAR1 et KLAVIER a été démontrée, par co-immunoprécipitation dans des cellules de tabac exprimant les deux protéines (Miyazawa et al., 2010), et d'autre part, une interaction directe

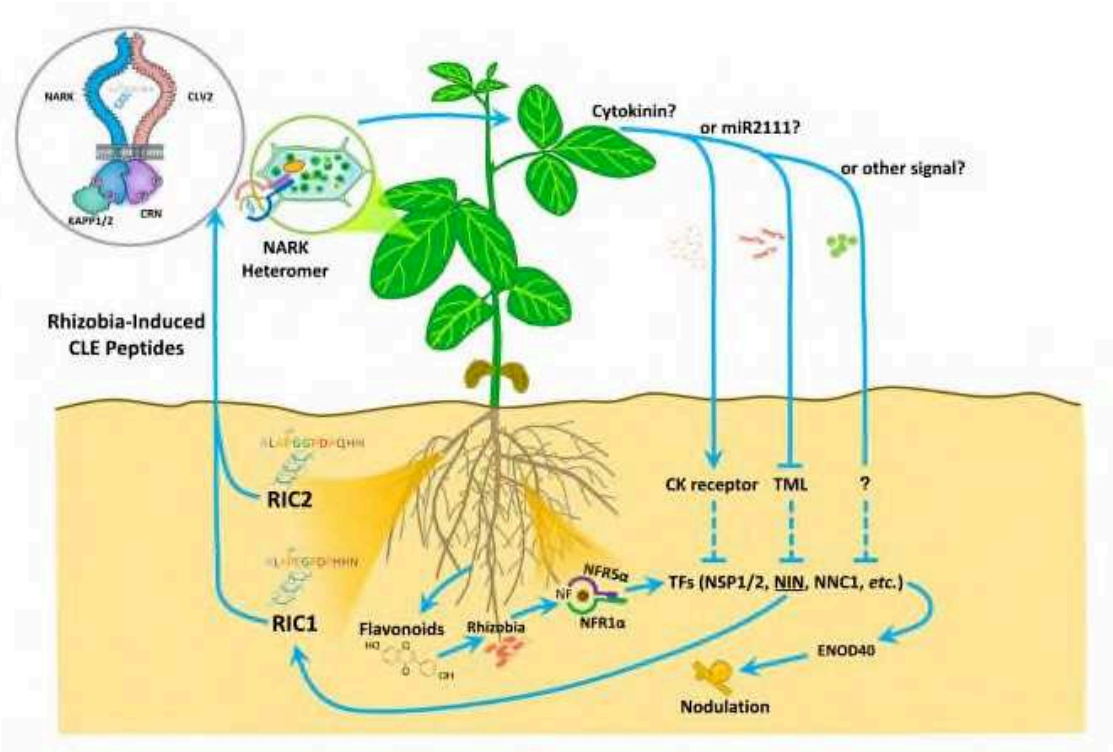


Figure 43 : Schéma de l'autorégulation de la nodulation (AON) chez les légumineuses.

Les légumineuses sécrètent dans le sol des flavonoïdes qui attirent les rhizobia compatibles et stimulent la production de signaux, les facteurs Nod (NFs), par les bactéries. Les NFs sont perçus par des récepteurs (NFR1α/NFR5α chez le soja), induisant la production d'une cascade de signalisation impliquant notamment des facteurs de transcription (« Nodulation Signaling Pathway 1 and 2 » (NSP1/NSP2), « Nodule INception » (NIN)…) et des gènes de nodulines précoces (« Early NODulins », eg *ENOD40*), pour initier le développement des nodosités. Des peptides CLE inhibiteurs de la nodulation sont produits dans les racines en réponse à rhizobium (« RHIZOBIA-INDUCED CLE 1» (RIC1) et RIC2 chez le soja), et transportés dans le xylème vers les parties aériennes où ils sont perçus par le récepteur kinase « NODULE AUTOREGULATION RECEPTOR KINASE » (NARK) chez le soja, formant un complexe avec CLAVATA2, CORYNE, et/ou KLAVIER. Ce module CLE/Récepteur kinase régule la production de signaux systémiques descendants via le phloème des parties aériennes vers les racines : le microARN miR2111, et peut-être aussi les cytokinines ou d'autre signaux encore non identifiés. Ces signaux systémiques descendants interagissent avec des facteurs régulant la mise en place des nodosités, tels que « TOO MUCH LOVE » (TML) dont les transcrits sont ciblés post-transcriptionnellement par le miR2111, et probablement NIN, pour au final inhiber la formation de nouvelles nodosités.
(modifié d'après Ferguson et al., 2019)

entre les protéines CLV2, SUNN et CORYNE a été démontrée par Complémentation Fluorescente Bi-moléculaire (BiFC) dans des cellules de tabac (Crook et al., 2016). L'ensemble de ces résultats suggère que les peptides CLE liés à l'AON sont perçus par un complexe récepteur hétéromérique impliquant SUNN/HAR1/NARK mais aussi CLV2, CORYNE et/ou KLAVIER.

Au final, un modèle de l'autorégulation négative de la nodulation (AON) a été établi, dans lequel des peptides CLE spécifiques, produits dans les racines en réponse à rhizobium, lors de l'initiation des nodosités, migrent vers les parties aériennes pour activer le récepteur HAR1/SUNN/NARK au sein d'un complexe hétéromérique, induisant ensuite la production d'un signal systémique inhibiteur de la formation de nouvelles nodosités sur les racines. Ce modèle de l'AON comprend ainsi des signaux systémiques permettant la communication, dans les deux sens, entre racines et parties aériennes (**Figure 43**) (Ferguson et al., 2019).

b) Signaux systémiques descendants agissant en aval du module CLE/récepteur dans l'AON

Plusieurs signaux descendants candidats ont été proposés. L'un des signaux systémique proposé est impliqué dans la régulation de l'expression d'un autre acteur de l'AON identifié chez *L. japonicus*. Il s'agit du mutant *« too much love »* (*tml*), hypernodulateur et dont la nodulation est partiellement sensible au nitrate (Magori et al., 2009). Des expériences de greffes et de « split-root » ont révélé que le phénotype hypernodulateur du mutant *tml* dépendait de l'activité du gène *TML* dans la racine. Comme dans le double mutant *tml;har1*, un effet additif des deux mutations n'a pas été observé (Magori et al., 2009), et que l'effet suppresseur de la nodulation induit par la surexpression des peptides CLE était perdu dans le mutant *tml* (Takahara et al., 2013), il a été suggéré que TML agirait en aval de la voie de signalisation CLE/HAR1. TML code pour une protéine nucléaire de type protéine à « F-box », potentiellement impliquée dans la dégradation par la voie de l'ubiquitination et du protéasome de protéines nucléaires liées à la mise en place des nodosités (Takahara et al., 2013), ces cibles restant à identifier. Plus récemment, deux homologues de TML ont été identifiés chez *M. truncatula*, et nommés MtTML1 et MtTML2 (Gautrat et al., 2019). Comme chez le lotier, la surexpression de l'un ou l'autre de ces gènes

inhibe la nodulation, et l'inhibition de l'expression de ces deux gènes par ARN interférence provoque une augmentation de la capacité de nodulation de la plante, en accord avec un rôle négatif de TML1 et TML2 sur le nombre de nodosités formées. Par ailleurs, l'activation de l'expression de *MtTML1* et *MtTML2* induite par la surexpression de *MtCLE13* requiert le récepteur SUNN, les positionnant aussi dans la voie AON en aval de la voie CLE/SUNN (Gautrat et al., 2019). Récemment chez *L. japonicus*, un microARN, le *miR2111*, exprimé au niveau des parties aériennes et régulé négativement par rhizobium, a été identifié comme régulant négativement l'accumulation des transcrits de *TML* au niveau des racines (Tsikou et al., 2018). La régulation négative de ce module miR2111/TML par rhizobium, aboutissant à l'accumulation de transcrits *TML* dans les racines, est perdue dans les mutants *lhk1* et *har1*, indiquant une action en aval du récepteur aux cytokinines LHK1 dans les racines et de HAR1 dans les parties aériennes. Au final, ces résultats suggèrent un modèle où la voie CLE/HAR1 réprime en réponse à rhizobium la production de miR2111 dans les parties aériennes, cette diminution du miR2111 provoquant en conséquence l'accumulation de transcrits *TML* dans les racines et donc une inhibition de la capacité de nodulation. Ainsi, le système racinaire en déficit azoté serait activement maintenu dans un état compétent pour interagir avec rhizobium et noduler via la production du miR2111, qui correspond à un signal systémique descendant promoteur de la nodulation (Tsikou et al., 2018).

Les cytokinines ont aussi été proposées chez *L. japonicus* comme étant cette fois un signal descendant inhibiteur (« SDI » pour Shoot Derived Inhibitor) potentiel. En effet, l'activation par rhizobium du module CLE-RS1/2-HAR1 induit au niveau des parties aériennes l'expression d'un gène de biosynthèse des cytokinines codant pour l'Isopentyltransférase 3 (IPT3), associée à une augmentation de la quantité de cytokinines (Sasaki et al., 2014). L'application exogène de cytokinines via les cotylédons a un effet inhibiteur sur la nodulation indépendamment de HAR1, suggérant une action des cytokinines en aval de la voie CLE/HAR1. De plus, cet effet inhibiteur des cytokinines nécessite TML, indiquant à nouveau un lien avec la voie AON (Sasaki et al., 2014). Sachant que ces phytohormones sont mobiles et capables de migrer des parties aériennes vers les racines via le phloème (Liu et al., 2019b), ces données suggèrent qu'un mouvement des cytokinines induites via la voie CLE/HAR1 pourrait participer à générer un signal systémique inhibiteur de la nodulation.

c) Inhibition de la nodulation par le nitrate via des peptides CLE

Certains peptides CLE suppresseur de la nodulation et liés à l'AON ne sont pas induits seulement par rhizobium, mais peuvent aussi être induits par une concentration élevée en azote dans le milieu. Ainsi, chez le soja, l'expression des gènes *GmNIC1* et *GmNIC2* (pour « NITRATE-INDUCED CLE ») est induite rapidement -dès 8h pour *GmNIC1*- dans des racines traitées par du KNO_3 10mM, et chez le lotier, l'expression des peptides LjCLE-RS2 et LjCLE-RS3 est inductible à la fois par le nitrate et en conditions symbiotiques (Reid et al., 2011; Lim et al., 2014; Okamoto et Kawaguchi, 2015; Nishida et al., 2016). La surexpression des gènes *CLE-RS2/3* de *L. japonicus,* comme précédemment indiqué pour CLE-RS1, inhibe systémiquement la nodulation, alors que chez le soja, la surexpression de *GmNIC1/2* suggère un effet inhibiteur local de la nodulation, ces données étant corroborées par des expériences de greffes qui montrent que l'inhibition de la nodulation par le nitrate (KNO_3 10mM) est partiellement dépendante de l'activité du récepteur NARK dans les racines (Reid et al., 2011; Lim et al., 2014; Okamoto et Kawaguchi, 2015). Enfin, en s'appuyant sur l'observation qu'en présence d'azote les nodosités sont physiologiquement moins développées (i.e. non fixatrices) dans le mutant *har1* comme dans des plantes sauvages, Okamoto et Kawaguchi (2015), en accord avec des données obtenues chez Medicago (Jeudy et al., 2010), proposent que le nitrate inhibe le nombre de nodosités formées et leur développement via une combinaison de voies dépendantes et indépendantes de la voie CLE/HAR1.

L'ensemble de ces données suggère que d'une part, l'inhibition systémique de la formation de nouvelles nodosités implique la perception par le récepteur SUNN/HAR1 de peptides CLE induits par l'interaction symbiotique et/ou par la présence d'azote dans le milieu ; et d'autre part, que le nitrate inhibe le développement et l'activité de fixation d'azote des nodosités localement et de manière indépendante de SUNN/HAR1.

En relation avec l'inhibition de la nodulation par le nitrate, le mutant de lotier *nitrate unresponsive symbiosis 1* (*nrsym1*) s'est récemment révélé affecté dans une « NIN-LIKE PROTEIN » (NLP) impliquée dans la régulation négative de la nodulation par le nitrate, non seulement au niveau du nombre des nodosités formées mais aussi sur leur taille et leur activité

fixatrice d'azote (Nishida et al., 2018). Cette protéine LjNLP4, exprimée dans les tissus vasculaires et dans les nodosités en développement, induit l'expression de *LjCLE-RS2* en réponse au nitrate, bien que son expression ne soit pas modulée par le nitrate. Des expériences de ChIP, d'EMSA et de transactivation dans les racines de lotier ont montré que NLP4 régulait directement l'expression de *LjCLE-RS2*. Un mutant *nlp* présentant des phénotypes similaires a été identifié chez Medicago, *nlp1* (Lin et al., 2018). Si le niveau d'expression de *NLP1*, dans les tissus vasculaires des racines et nodosités, n'est pas affecté par la présence d'azote, comme précédemment observé chez le lotier, une relocalisation de la protéine NLP1 au noyau est par contre rapidement observée, dès 10 min après traitement par du KNO_3 10mM. Des expériences de double hybride et de BiFC, ou de purification de protéines par affinité avec une protéine appât (« pull down ») *in vitro*, ont montré que la protéine NLP1, mais aussi les autres protéines NLP de la même famille qui sont au nombre de cinq chez Medicago comme chez le lotier, interagissait physiquement avec NIN. Bien que NIN et NLP1 puissent lier le promoteur du gène codant le récepteur aux cytokinines CRE1 dans des expériences d'EMSA, seule la protéine NIN peut activer l'expression de *CRE1* dans des essais de transactivation en système hétérologue de feuilles de tabac. En réponse au nitrate, la présence simultanée de NLP1 et de NIN dans le noyau provoquerait une diminution de l'activité de régulation transcriptionnelle de NIN, et en conséquence de l'expression de *CRE1*. En accord avec ces résultats, l'inhibition de l'expression de *CRE1* dans les nodosités en réponse à un traitement par le nitrate dépend de NLP1.

2. Les peptides CEP

Une deuxième famille de peptides de signalisation régulant systémiquement le nombre de nodosités a été découverte plus récemment (Ohyama et al., 2008). Chez Arabidopsis, les peptides CEP interviennent dans différents aspects du développement des plantes, ainsi que dans la réponse à la demande en azote de la plante, comme décrit dans la section II.C. Chez les légumineuses, cette réponse à la demande en azote doit intégrer non seulement la régulation du développement racinaire et des transporteurs d'azote minéral, mais aussi la capacité à former des nodosités fixatrice d'azote atmosphérique.

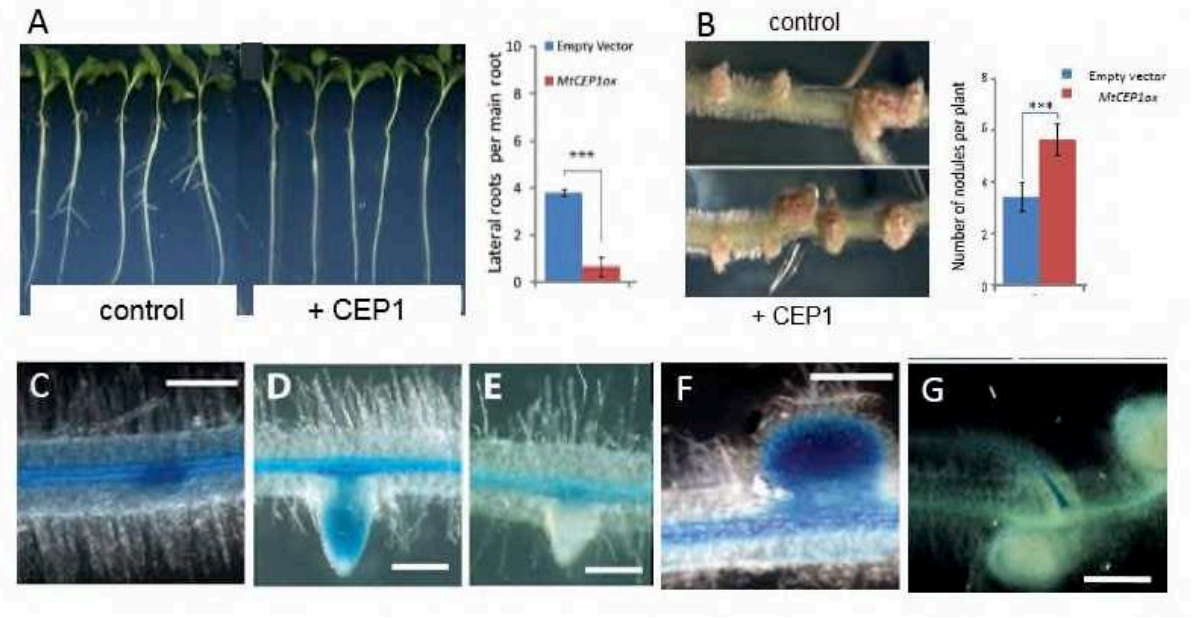


Figure 44 : Le peptide CEP1 a un effet inhibiteur sur le nombre de racines latérales et un effet stimulateur sur le nombre de nodosités.

(A) Images représentatives de racines de plantes non-traitées (« control ») ou traitées par une application exogène de peptide CEP1 (+ CEP1). A droite, quantification de l'effet de la surexpression du gène *CEP1* (*MtCEP1*ox) sur le nombre de RLs.
(B) Images représentatives de nodosités formées sur des plantes non-traitées (« control ») ou traitées par une application exogène de peptide CEP1 (+ CEP1). A droite, quantification de l'effet de la surexpression du gène *CEP1* (*MtCEP1*ox) sur le nombre de nodosités.
(C-G) Images représentatives de l'expression d'une construction *pCEP1:GUS* après coloration histochimique GUS. *CEP1* est fortement exprimé en condition de carence azotée dans les tissus vasculaires et au niveau du site d'initiation des RLs (C), ainsi que dans les RLs émergées (D). L'expression de *CEP1* n'est pas détectable dans des RLs émergées cultivées en présence d'azote (5mM KNO_3) (E). Au cours du développement des nodosités, *CEP1* est exprimé dans la nodosité jeune cinq jours après inoculation par rhizobium (F), mais pas dans les nodosités matures deux semaines après inoculation (G).
(modifié d'après Imin et al., 2013)

Chez *M. truncatula*, 17 gènes codant des peptides CEP ont été identifiés (Delay et al., 2013; de Bang et al., 2017), parmi lesquels les gènes *CEP1* à *CEP11* appartenant aux peptides CEP canoniques du groupe I, et qui présentent à la fois un peptide signal de sécrétion dans leur partie N-terminale et au moins un domaine conservé correspondant au peptide de signalisation dans leur partie C-terminale. Les gènes *CEP12* à *CEP17*, dont le ou les domaine(s) CEP est (sont) plus divergent(s), appartiennent au groupe II (Delay et al., 2013). Les travaux d'Imin et al. (2013), focalisés sur les gènes *CEP* canoniques, montrent que quasiment tous ceux qui sont détectés dans la racine de *M. truncatula* sont induits par un déficit en azote. Taleski et al. (2018) proposent ainsi que les peptides CEP soient des acteurs centraux pour coordonner la nutrition azotée assurée chez les légumineuses d'une part par les racines, et d'autre part par les nodosités (Taleski et al., 2018). En effet, la surexpression ou l'application exogène d'un de ces peptides, MtCEP1, régule à la fois positivement le nombre de nodosités et négativement le nombre de RLs (**Figure 44**) (Imin et al., 2013). De plus, l'addition de peptide CEP1 en présence de nitrate (KNO_3 5mM et 25 mM) permet de diminuer l'effet inhibiteur du nitrate à la fois sur le nombre et sur l'activité de fixation d'azote des nodosités. Au niveau spatial, le gène codant pour le peptide MtCEP1 s'exprime faiblement dans la pointe racinaire et au niveau des tissus vasculaires en présence de nitrate, mais s'exprime plus fortement en condition de carence azotée dans les mêmes tissus ainsi que dans les primordia de RLs et de nodosités, puis dans ces mêmes organes après leur émergence. Par la suite, l'expression de CEP1 n'est plus détectable dans des nodosités âgées de plus d'une semaine (Imin et al., 2013).

De manière indépendante, un mutant « *compact root architecture 2* » (*cra2*) présentant à la fois un nombre réduit de nodosités et un plus grand nombre de RLs par rapport à des plantes sauvages, ainsi que des racines plus courtes, a été identifié chez *M. truncatula* (Huault et al., 2014). De manière intéressante, ce phénotype correspond au phénotype opposé à un traitement ou à une surexpression de peptides MtCEP1. Des expériences de greffes ont montré que la fonction de ce récepteur CRA2 était nécessaire dans les parties aériennes pour promouvoir la nodulation, alors que le nombre de RLs était contrôlé négativement par l'action de CRA2 dans les racines (Huault et al., 2014) (**Figure 45**). Ainsi, la greffe d'une racine mutée *cra2* avec des parties aériennes sauvages présente une architecture racinaire « compacte » -avec plus de RLs et des racines courtes- associée à une densité de nodosités

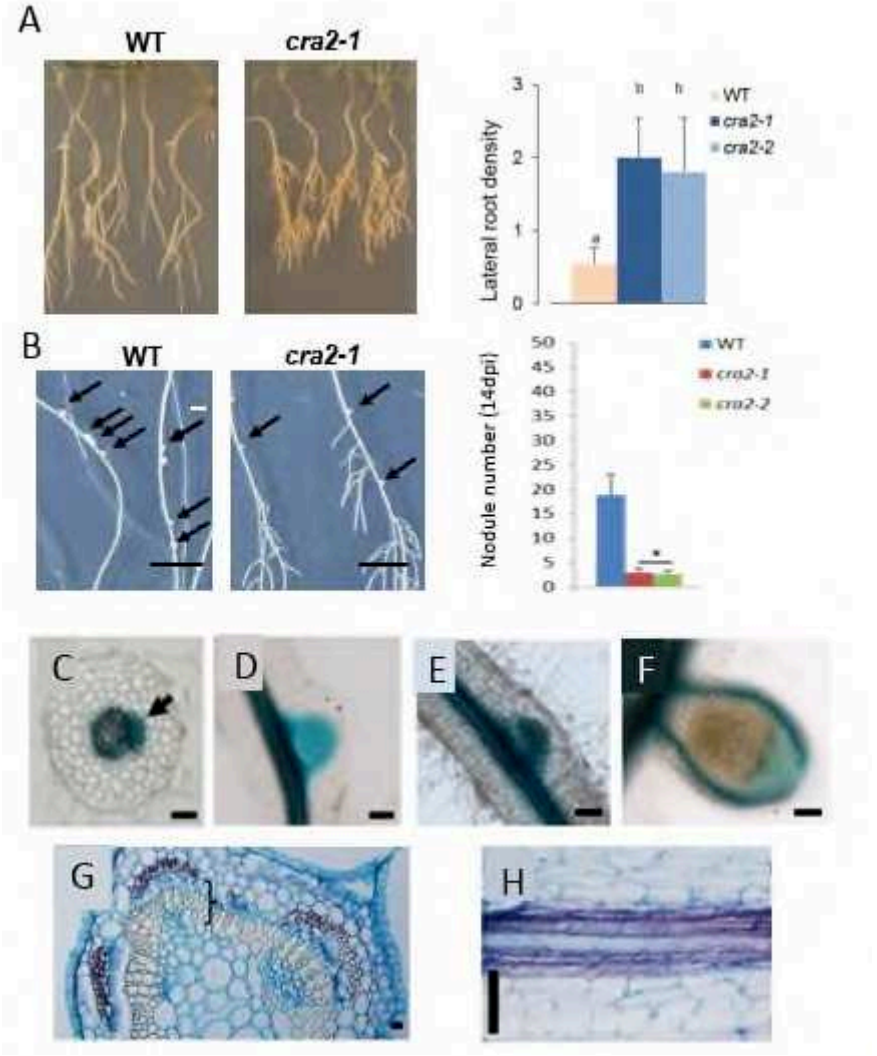


Figure 45 : Phénotype du mutant *cra2 (compact root architecture 2*) de *M. truncatula*

Le mutant *compact root architecture 2* (*cra2*) forme plus de RLs et moins de nodosités qu'une plante sauvage.

(A-B) A gauche, images représentatives de plantes sauvages (« Wild-Type », WT) ou mutantes (*cra2*) cultivées *in vitro* en déficit azoté, 14 jours après germination (A), ou sept jours après inoculation par rhizobium (B). A droite, quantification de la densité de RLs (A) 10 jours après inoculation par rhizobium, et du nombre de nodosités (B) 7 et 14 jours après inoculation.

(C-F) Profils d'expression d'une fusion transcriptionnelle *pCRA2:GUS*, indiquant que *CRA2* est exprimé lors de l'initiation (C) et dans les primordia de RLs (D), ainsi que dans les primordia de nodosités (E) et dans les tissus vasculaires des nodosités matures (F).

(G-H) Localisation spatiale des transcrits *CRA2* par *hybridation in situ*, montrant une expression dans les tissus vasculaires des tiges (G) et des racines (H).

(modifié d'après Huault et al., 2014)

similaire à celle d'une plante sauvage, ce qui démontre sans ambiguïté que c'est la régulation du nombre de nodosités qui est altérée dans le mutant *cra2*, mais pas sa capacité intrinsèque à former des nodosités. Le gène CRA2 code pour un récepteur kinase de la sous-classe XI de la famille LRR-RLK, et donc apparenté aux récepteurs CLV1/SUNN/HAR1 et CEPR1/2 (Clark et al., 1997; Krusell et al., 2002; Schnabel et al., 2005; Tabata et al., 2014). De par les phénotypes racinaires opposés du mutant *cra2* et ceux induits par la surexpression de CEP1, et du fait que le plus proche homologue du récepteur CRA2 est CEPR1/2 chez Arabidopsis (anciennement nommé XIP1) (Bryan et al., 2012; Tabata et al., 2014), l'hypothèse de travail que le récepteur CRA2 puisse percevoir des peptides CEP aussi chez *M. truncatula* est apparue au début de cette thèse.

IV. Objectifs de la thèse

L'adaptation des plantes aux changements environnementaux est déterminée par leur plasticité développementale, notamment au niveau de leur système racinaire en réponse à l'hétérogénéité en eau et nutriments des sols. Cette plasticité développementale implique une coordination des signaux nutritionnels perçus localement par certaines racines et de signaux systémiques associés au statut nutritionnel global de demande ou de satiété de la plante. L'architecture du système racinaire des légumineuses intègre non seulement sa capacité de ramification via la formation de RLs, mais aussi la formation d'un autre organe spécialisé dans la fixation de l'azote atmosphérique, la nodosité symbiotique. La formation et le maintien de ces organes racinaires latéraux représentent un cout énergétique important pour la plante, et ils sont donc finement régulés afin d'établir un équilibre entre les couts et les bénéfices associés à la formation de ces organes –import d'eau et de minéraux pour les RLs, et fixation d'azote atmosphérique pour les nodosités.

Chez les légumineuses, une voie systémique de contrôle négatif du nombre de nodosités formées existe, appelée Autorégulation de la Nodulation (AON). Elle implique la production dans les racines nodulées de peptides CLE (CLE12 et CLE13 chez *M. truncatula*) qui interagissent dans la partie aérienne avec le récepteur SUNN, déclenchant un signal systémique descendant vers les racines pour inhiber la formation de nodosités. L'équipe d'accueil a par ailleurs identifié chez la légumineuse modèle *M. truncatula* deux voies de signalisation régulant positivement le développement des nodosités fixatrices d'azote et négativement la formation des RLs. La première voie, impliquant le récepteur aux cytokinines CRE1 (Gonzalez-Rizzo et al., 2006; Plet et al., 2011), et la seconde impliquant le récepteur CRA2, tout juste caractérisé au début de cette thèse (Huault et al., 2014), et identifié uniquement chez la légumineuse *M. truncatula*.

Dans ce contexte, l'objectif majeur de cette thèse était d'une part d'identifier quel signal agit via le récepteur CRA2 pour induire la nodulation et réprimer la formation des

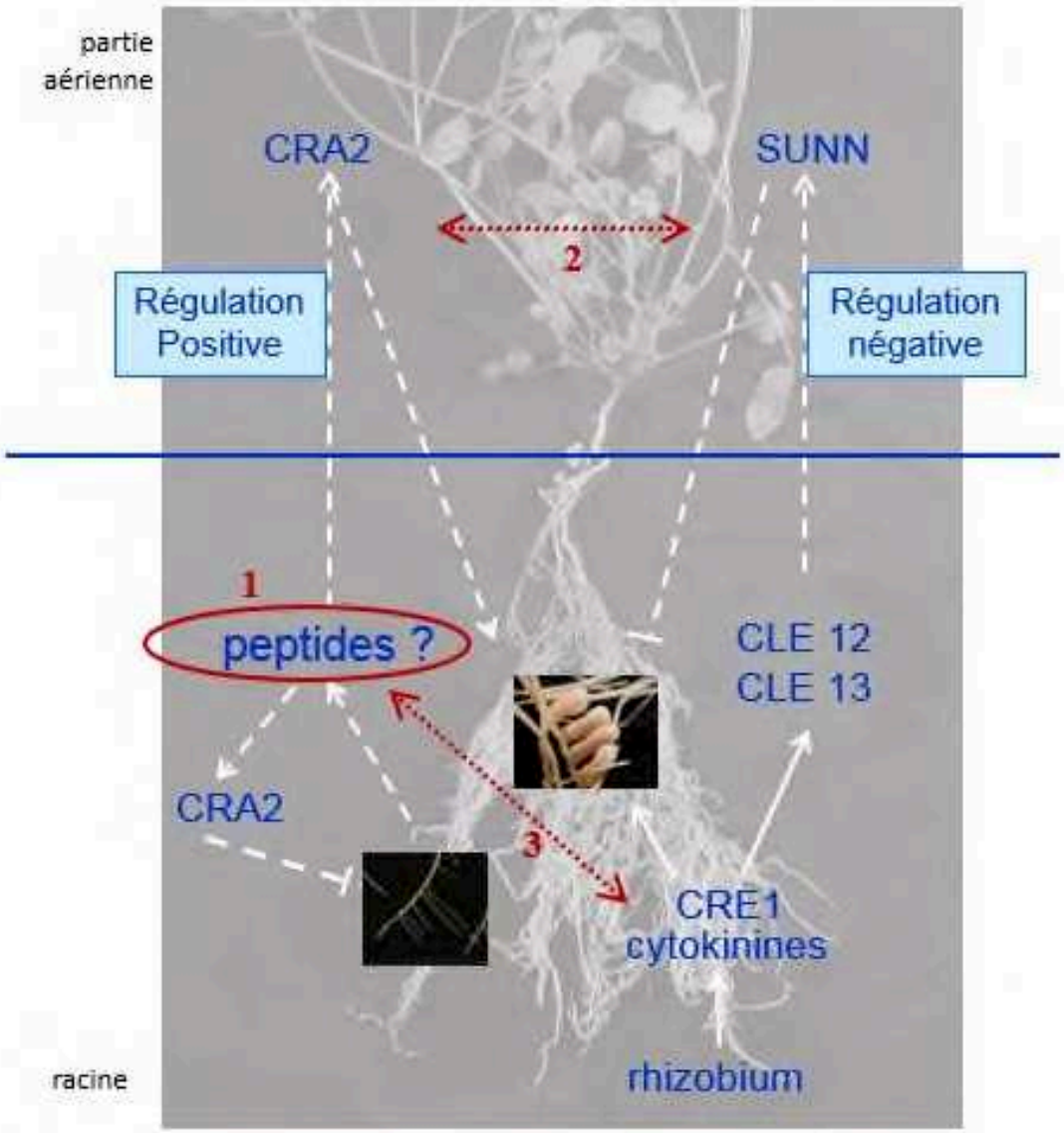


Figure 46 : Deux voies systémiques contrôlent le nombre de nodosités formées sur le système racinaire de manière antagoniste.

La voie médiée par le récepteur SUNN régule négativement le nombre de nodosités après activation par les peptides CLE12/CLE13 produits dans les racines en réponse à rhizobium de manière dépendante de la voie de signalisation des cytokinines et du récepteur aux cytokinines CRE1. La voie médiée par le récepteur CRA2 favorise la nodulation après activation par des signaux inconnus. Le premier objectif de cette thèse (« 1 ») était donc d'identifier les signaux agissant via le récepteur CRA2. Un deuxième objectif (« 2 ») de la thèse était d'établir si une coordination entre les voies médiées par CRA2 et SUNN existe. Enfin, un troisième objectif (« 3 ») était d'établir si une connexion existe entre les deux voies de signalisation régulant positivement l'initiation de la nodulation, à savoir la voie CRA2 et la voie de signalisation des cytokinines via le récepteur CRE1.
(d'après Plet et al., 2011 ; Reid et al., 2011 ; Mortier et al., 2012 ; Huault et al., 2014)

RLs ; et d'autre part, d'identifier comment cette voie de signalisation s'intègre avec d'autres voies contrôlant l'architecture racinaire, et notamment avec les cytokinines qui régulent similairement positivement la nodulation et négativement les RLs, ainsi qu'avec la voie systémique CLE/SUNN qui régule la nodulation de manière opposée à la voie CRA2, ie négativement (**Figure 46**).

Concernant le premier objectif de la thèse, considérant que le récepteur CRA2 appartient à la même famille que SUNN et CLV1, l'hypothèse d'un signal peptidique a été privilégiée. Peu de temps avant le début de la thèse, une famille de peptides sécrétés, les CEP, avait été identifiée chez *M. truncatula*, comme contenant des gènes majoritairement induits lorsque la plante est en déficit en azote, et qui sont capables d'inhiber la formation des RLs et de stimuler la formation des nodosités (Imin et al., 2013), ces phénotypes étant opposés à ceux du mutant *cra2*. A peu près au même moment chez Arabidopsis, un récepteur CEPR1 a été identifié comme interagissant physiquement avec des peptides CEP (Tabata et al., 2014), ce récepteur étant le plus proche homologue de CRA2 chez Medicago. Ainsi, la combinaison de ces différentes données a permis de suggérer que les peptides CEP étaient des candidats prometteurs pour agir via le récepteur CRA2. Dans le Chapitre 1 des Résultats, nous avons donc testé si l'action du peptide CEP1 requiert le récepteur CRA2 pour réguler le nombre de RLs et/ou de nodosités, en collaboration avec l'équipe du Pr. Michael Djordjevic à l'Université de Canberra (Australian National University, ANU) qui travaillait déjà sur ces peptides (Imin et al., 2013).

Concernant le deuxième objectif de la thèse, l'objectif était de déterminer comment la voie de signalisation médiée par le récepteur CRA2 interagissait avec d'autres voies régulant la mise en place des nodosités. Dans un premier temps (Chapitre 2), nous avons émis l'hypothèse qu'une coordination entre les deux voies systémiques, médiées par les récepteurs CRA2 et SUNN, et régulant le nombre de nodosités de manière antagoniste, devait exister. Cette coordination permettrait à la plante, en fonction des conditions environnementales fluctuantes dans l'espace et le temps rencontrées au niveau de ses racines (présence/absence d'azote et de rhizobium) et de ses parties aériennes (conditions de lumière déterminant la capacité de photosynthèse), d'activer ou d'inhiber de manière dynamique la formation de nouvelles nodosités symbiotiques fixatrices d'azote. Ainsi, nous avons cherché à déterminer

par une combinaison d'approches génétiques si les voies CRA2 et SUNN fonctionnaient de manière interconnectée ou indépendante pour réguler le nombre de nodosités formées. Dans un deuxième temps (Chapitre 3), nous avons testé l'existence d'une éventuelle interaction entre la voie CRA2 et la voie des cytokinines agissant via le récepteur CRE1, sachant que ces deux voies de signalisation régulaient positivement la mise en place des nodosités, la première systémiquement depuis les parties aériennes, et la seconde localement dans les racines. Nous avons émis l'hypothèse qu'une coordination entre ces deux voies pourrait s'établir dans les racines via une régulation de l'expression des signaux peptidiques -identifiés dans la première partie de la thèse- agissant via le récepteur CRA2 et régulés par rhizobium, sachant aussi qu'il était déjà connu que l'expression du peptide CLE13 agissant dans la voie de régulation systémique négative AON dépendant de SUNN était régulée par les cytokinines via le récepteur CRE1 (Mortier et al., 2012).

CHAPITRE I:

Identification d'un signal peptidique agissant via le récepteur LRR-RLK CRA2 pour réguler le nombre de racines latérales et de nodosités chez **Medicago truncatula**

Introduction et article 1 :

"Different Pathways Act Downstream of the CEP Peptide Receptor CRA2 to Regulate Lateral Root and Nodule Development" Mohd-Radzman N., Laffont C., Ivanovici A., Patel N., Reid D., Stougaard J., Frugier F., Imin N., and Djordjevic M. Plant Physiology, 171:2536-2548 (2016)

Cette partie du travail de thèse a été réalisée en collaboration avec le laboratoire du Pr. Michael Djordjevic à l'Université de Canberra (Australian National University, ANU), et notamment avec l'implication de Nadia Mohd-Radzman. Cette équipe avait précédemment établi que la plupart des gènes *CEP* étaient induits par un déficit azoté, et que par ailleurs le gène *CEP1,* exprimé au cours du développement des racines latérales (RLs) et des nodosités, agissait comme un signal pour réguler positivement la formation des nodosités et négativement celle des RLs chez *M. truncatula* (Imin et al., 2013). En particulier, un traitement exogène par le peptide CEP1 est associé à un agrandissement de la zone de la racine compétente pour la nodulation et à un plus grand nombre d'évènements d'infections par les rhizobia.

Le mutant *cra2*, récemment identifié dans l'équipe d'accueil (Huault et al., 2014) ayant un phénotype opposé à celui d'un traitement par les peptides CEP1, et sachant par ailleurs que CRA2 est le plus proche homologue du récepteur de peptides CEP chez Arabidopsis (CEPR1/2), l'hypothèse que CRA2 soit nécessaire pour l'action des peptides CEP1 chez Medicago a été testée. Des approches de surexpression et d'application exogènes de peptides CEP1 ont été réalisées en parallèle sur des plantes contrôles et dans deux allèles mutants de *cra2*, qui ont révélé qu'à la fois la stimulation du nombre de nodosités et l'inhibition de la formation des RLs nécessitaient l'activité du récepteur CRA2.

Cet article a permis d'établir d'une part que la voie de signalisation médiée par le peptide CEP1 impliquait le récepteur CRA2 pour réguler le nombre de RLs et de nodosités ; et d'autre part, qu'en aval de ce module de régulation CEP1/CRA2, la voie de signalisation de l'éthylène est spécifiquement recrutée pour réguler négativement le nombre d'infections par les rhizobia, alors qu'elle ne semble pas associée à la régulation du nombre de RLs. Ma participation à ce travail concerne les expériences réalisées avec le mutant *cra2*, soit l'intégralité de la Figure 8 de l'article.

Different Pathways Act Downstream of the CEP Peptide Receptor CRA2 to Regulate Lateral Root and Nodule Development[1][OPEN]

Nadiatul A. Mohd-Radzman[2], Carole Laffont, Ariel Ivanovici, Neha Patel, Dugald Reid, Jens Stougaard, Florian Frugier, Nijat Imin, and Michael A. Djordjevic

Plant Science Division, Research School of Biology, College of Medicine, Biology and the Environment, Australian National University, Canberra, ACT 2601, Australia (N.A.M.-R., A.I., N.P., N.I., M.A.D.); Institute of Plant Sciences Paris-Saclay, Centre National de la Recherche Scientifique, Institut National de la Recherche Agronomique, Universités Paris Sud, Evry, Paris-Diderot, and Paris-Saclay, 91190 Gif sur Yvette, France (C.L., F.F.); and Plant Molecular Biology, Department of Molecular Biology and Genetics, 8000 Aarhus C, Denmark (D.R., J.S.)

ORCID IDs: 0000-0002-8447-1736 (C.L.); 0000-0002-2651-9228 (N.P.); 0000-0001-9291-9775 (D.R.); 0000-0002-9312-2685 (J.S.); 0000-0002-4060-1316 (N.I.).

C-TERMINALLY ENCODED PEPTIDEs (CEPs) control root system architecture in a non-cell-autonomous manner. In *Medicago truncatula*, MtCEP1 affects root development by increasing nodule formation and inhibiting lateral root emergence by unknown pathways. Here, we show that the MtCEP1 peptide-dependent increase in nodulation requires the symbiotic signaling pathway and ETHYLENE INSENSITIVE2 (EIN2)/SICKLE (SKL), but acts independently of SUPER NUMERIC NODULES. MtCEP1-dependent inhibition of lateral root development acts through an EIN2-independent mechanism. MtCEP1 increases nodulation by promoting rhizobial infections, the developmental competency of roots for nodulation, the formation of fused nodules, and an increase in frequency of nodule development that initiates at proto-phloem poles. These phenotypes are similar to those of the *ein2/skl* mutant and support that MtCEP1 modulates EIN2-dependent symbiotic responses. Accordingly, MtCEP1 counteracts the reduction in nodulation induced by increasing ethylene precursor concentrations, and an ethylene synthesis inhibitor treatment antagonizes MtCEP1 root phenotypes. MtCEP1 also inhibits the development of EIN2-dependent pseudonodule formation. Finally, mutants affecting the COMPACT ROOT ARCHITECTURE2 (CRA2) receptor, which is closely related to the Arabidopsis CEP Receptor1, are unresponsive to MtCEP1 effects on lateral root and nodule formation, suggesting that CRA2 is a CEP peptide receptor mediating both organogenesis programs. In addition, an ethylene inhibitor treatment counteracts the *cra2* nodulation phenotype. These results indicate that MtCEP1 and its likely receptor, CRA2, mediate nodulation and lateral root development through different pathways.

Root system architecture is determined by complex interactions between intrinsic root developmental and extrinsic environmental cues. In legumes, the formation of nitrogen (N) fixing root nodules and lateral roots (LRs) predominantly determine root system architecture. Cells that become competent for root nodule and LR formation are both similarly located close to the root apical meristem (RAM; Bhuvaneswari et al., 1980; Sargent et al., 1987; Herrbach et al., 2014). The N_2-fixing nodules induced by rhizobia provide considerable N to legumes and enable them to grow in N-poor environments. As a result of this symbiosis, legumes provide protein-rich food, oil, fiber, and feed to agro-ecosystems, and they contribute to sustainable agriculture (Herridge et al., 2008; Jensen et al., 2012). Similarly, the improvement of LR deployment in crops is of significant interest to breeders to maximize water, nutrient, and fertilizer acquisition and alleviate pollution issues that arise from poor fertilizer uptake (Gamuyao et al., 2012); therefore legumes provide a system to study both nodule and LR organogenesis programs and how they interact. Although both LRs and nodules are induced by common environmental cues such as low N-availability (Ruffel et al., 2008; Jeudy et al., 2010; Jin et al., 2012), the common and specific pathways that regulate these different developmental competencies are poorly understood. Therefore, understanding signaling molecules, receptors, and downstream pathways that regulate both nodule and LR development in legumes under different environmental conditions is essential to improve nutrient acquisition by the root system.

C-TERMINALLY ENCODED PEPTIDEs (CEPs) have recently been implicated in controlling major aspects of root development (Ohyama et al., 2008; Delay et al., 2013; Imin et al., 2013; Tabata et al., 2014; Djordjevic et al., 2015; Mohd-Radzman et al., 2015). CEP peptides are signaling molecules that positively regulate nodulation and negatively regulate LR emergence in several legumes (Imin et al., 2013; Mohd-Radzman et al., 2015). An archetypal gene from the *Medicago truncatula* CEP family, *MtCEP1*, is induced under low-N and expresses during nodule and LR formation (Imin et al., 2013). Biochemical and mass spectrometry analyses demonstrated that *MtCEP1*-overexpressing and control root cultures both secrete a

 © 2016 American Society of Plant Biologists. All Rights Reserved.
Downloaded from on July 7, 2020 - Published by www.plantphysiol.org
Copyright © 2016 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

mixture of hydroxylated, 15-amino acid, MtCEP1 peptides. In root cultures, MtCEP1-dependent inhibition of lateral root formation occurs independently of shoots (Mohd-Radzman et al., 2015). In *Medicago*, the hydroxylation patterns of MtCEP1 peptides strongly influence how CEPs modify the extent of nodule and LR formation (Imin et al., 2013; Mohd-Radzman et al., 2015). How CEP peptides simultaneously regulate both root nodule and LR formation is unknown. At early developmental stages LRs and nodules share developmental genes (Franssen et al., 2015; Larrainzar et al., 2015) and morphological features, such as reactivation of cortical, pericycle, and endodermal cell divisions (Imin et al., 2013; Herrbach et al., 2014; Xiao et al., 2014; Mohd-Radzman et al., 2015), and it is therefore possible that overlapping genetic mechanisms may be involved. In addition, these two developmental pathways are initiated in cells in close proximity to the RAM (Imin et al., 2013; Herrbach et al., 2014; Xiao et al., 2014). It is not known if MtCEP1 peptides affect LR and nodule development through the same or different pathways, or if common developmental components are involved.

Medicago nodule formation is tightly associated with *Sinorhizobium meliloti* Nod factor (NF) production (Lerouge et al., 1990). *S. meliloti* induces two, parallel, nodule-specific processes to form indeterminate nodules adjacent to root proto-xylem poles: (1) the rhizobial infection pathway, which involves infection thread formation in root hairs and cortical cells; and (2) the nodule organogenesis pathway, which involves the activation of cell divisions in root cortical, endodermal, and pericycle cell layers to form a nodule primordium and, subsequently, a nodule meristem (Timmers et al., 1999; Desbrosses and Stougaard, 2011; Oldroyd et al., 2011, 2013; Xiao et al., 2014; Djordjevic et al., 2015). Rhizobial NFs rapidly trigger nuclear calcium oscillations in root hair cells (Lévy et al., 2004; Miwa et al., 2006), which transcriptionally activate key symbiotic (SYM) genes (e.g. *NODULE INCEPTION* and *NODULATION SIGNALING PATHWAY1* and *2* [Kaló et al., 2005; Smit et al., 2005] and *MtCLV3/ESR-RELATED12* and *13* [*MtCLE12* and *13*; Mortier et al., 2010; Saur et al., 2011]). Nodulation is also positively and negatively controlled by complex, context-dependent interactions with various hormones and peptides (Penmetsa and Cook, 1997; Gonzalez-Rizzo et al., 2006; Penmetsa et al., 2008; Mortier et al., 2010; Plet et al., 2011; Saur et al., 2011; Mortier et al., 2012; Larrainzar et al., 2015; van Zeijl et al., 2015). Collectively, these signals, along with the NF/SYM pathway, determine how, when, and where nodules form, as well as the overall nodule number on the root system (Penmetsa and Cook, 1997; Oldroyd et al., 2011). It is also noteworthy that the vast majority of infection threads that initiate fail to make a nodule (Djordjevic et al., 1985, 1986; Penmetsa and Cook, 1997), and this highlights the influence of negative regulatory circuits mediated by ethylene-related and CLE-related pathways (Penmetsa and Cook, 1997; Mortier et al., 2010; Kassaw et al., 2015).

Ethylene has a well-established negative role in *M. truncatula* nodulation, which is illustrated by the ethylene-insensitive, MtEIN2-defective mutant, *sickle* (*skl*; Penmetsa et al., 2008; Larrainzar et al., 2015). Rhizobia hyperinfect *skl* and form numerous underdeveloped nodules that are often fused (Penmetsa and Cook, 1997). Fused nodules have been defined as having two or more nodule meristems coalescing into one nodule structure confined by a single layer of endodermis (Xiao et al., 2014). In addition, *skl* nodules show spatially aberrant initiation sites in roots and can develop proximal to proto-xylem and -phloem poles (Penmetsa et al., 2003), whereas in wild-type roots, a localized ethylene production adjacent to proto-phloem poles is thought to prevent nodules developing in this area (Heidstra et al., 1997). Consistently, ethylene synthesis inhibitors such as aminoethoxyvinyl-Gly (AVG) promote both proto-phloem pole- and fused-nodule formation (Heidstra et al., 1997), as well as an increase in infection thread and nodule numbers (Guinel and Larue, 1992; Xiao et al., 2014). Conversely, the ethylene precursor, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic-acid (ACC), reduces nodule number and, at high concentration, inhibits calcium oscillations and abolishes nodulation (Penmetsa and Cook, 1997; Oldroyd et al., 2001). Recently, a comprehensive transcriptional profiling of the *Mtein2/skl* mutant revealed a complex MtEIN2-dependent negative control of NF-mediated responses (Larrainzar et al., 2015).

Apart from the ethylene-mediated local inhibition of infection and nodule formation, nodule number is also negatively and systemically regulated by an autoregulation of nodulation (AON) pathway (Searle et al.,

[1] This work was supported by an Australian Research Council grant to M.A.D. (grant No. DP150104250); N.A.M.-R. was supported by an Australian National University International PhD Scholarship and an A.W. Howard Fellowship; A.I. was supported by a Grains Research and Development Corporation Hons scholarship and an A.W. Howard fellowship; N.P. was supported by an Endeavour fellowship; and work in the F.F. laboratory was supported by Centre National de la Recherche Scientifique, the Agence Nationale de la Recherche Labex Saclay Plant Science, and the Lidex "Plant Phenotyping Pipeline."

[2] Present address: Computational and Systems Biology Department, John Innes Centre, Norwich Research Park, Colney Lane, Norwich NR4 7UH, UK.

* Address correspondence to michael.djordjevic@anu.edu.au.

The authors responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors (www.plantphysiol.org) are: Florian Frugier (florian.frugier@ips2.universite-paris-saclay.fr) and Michael A. Djordjevic (michael.djordjevic@anu.edu.au).

M.A.D., N.I., N.A.M.-R., F.F., C.L., J.S., and D.R. conceived the research plans; N.A.M.-R. performed most of the experiments; C.L. and F.F. provided *cra2*-related data; A.I. provided data on MtCEP1-related effect on infection on nodulation and some fused nodule data; N.I. and N.P. provided assessments of nodulation competency; N.I. provided data for the nodulation and LR formation in nodulation-defective mutants; D.R. and J.S. provided data for ethylene evolution; N.A.M.-R., N.I., F.F., and M.A.D. provided input to the model; and M.A.D., N.I., N.A.M.-R., F.F., and C.L. wrote the article.

[OPEN] Articles can be viewed without a subscription.
www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.16.00113

Downloaded from on July 7, 2020 - Published by www.plantphysiol.org
Copyright © 2016 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

2003). In *M. truncatula*, AON is mediated by the interaction between nodule-specific CLE peptides, MtCLE12 and MtCLE13, and the SUPER NUMERIC NODULES (SUNN) Leu-rich repeat receptor-like kinase acting in shoots (Mortier et al., 2010; Saur et al., 2011). Similarly to *skl*, the *sunn* mutant has a supernumerary nodulation phenotype (Schnabel et al., 2005) but, unlike *skl*, *sunn* nodules form adjacent to xylem poles (Penmetsa et al., 2003). The combined negative action of ethylene and AON pathways leads to a tight restriction of the developmental competency to form symbiotic nodules (Bhuvaneswari et al., 1980; Sargent et al., 1987; Kassaw et al., 2015). Indeed, when a root is inoculated, nodule formation results from infections initiated in young, developing root hairs, and competency for further root hair infection and nodule organogenesis diminishes rapidly due to the activation of the local ethylene/EIN2-dependent (Penmetsa and Cook, 1997) and systemic CLE/AON-dependent responses (Kassaw et al., 2015). This tight control of nodulation capacity allows the determination of the duration of the competency for root nodulation and offers insights into how signaling molecules can alter this developmental competency.

Recently, a COMPACT ROOT ARCHITECTURE2 mutant (*cra2*) defective in a Leu-rich repeat receptor-like kinase distinctive from SUNN, was identified in *M. truncatula*. In contrast to SUNN, CRA2 positively controls root nodule formation systemically from shoots, and negatively regulates LR development locally (Huault et al., 2014). The *cra2* phenotypes, therefore, are opposite to those observed by raising MtCEP1 levels (Imin et al., 2013). CRA2 is most closely related to the Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*) XYLEM INTERMIXED IN PHLOEM (XIP1)/CEP RECEPTOR1 (CEPR1) receptor (Bryan et al., 2012) that specifically binds CEP peptides (Tabata et al., 2014). This makes CRA2 a candidate receptor for MtCEP1 peptides.

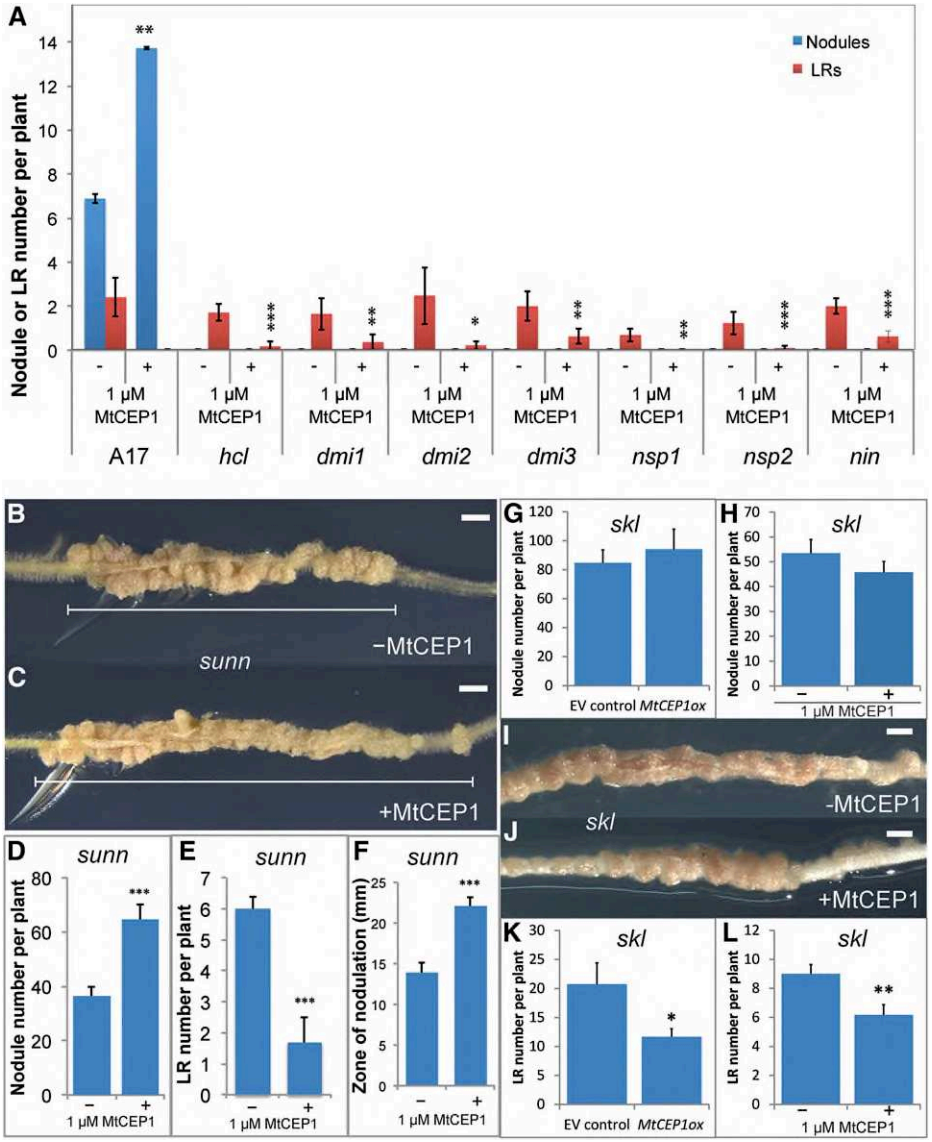


Figure 1. MtCEP1 requires the SYM and EIN2/SKL pathways to modulate nodule but not LR formation and acts independently of SUNN. A, Nodule number and emerged LR number were scored in the wild type and in SYM pathway mutants defective in NF perception (*hcl*), signal transduction (*dmi1*, *dmi2*, *dmi3*), and transcriptional regulation (*nsp1*, *nsp2*, *nin*; $n \geq 6$; Student's *t* test, *: $P \leq 0.05$, **: $P \leq 0.01$, ***: $P \leq 0.001$). B to F, Effects of the MtCEP1 peptide application on *sunn* root phenotypes. B, C, and F, Representative images showing the effect of the MtCEP1 peptide application on the size of the root nodulation zone (scale bars = 2 mm). D and E, Effect of the MtCEP1 peptide application on nodule and LR number, respectively ($n \geq 5$; Student's *t* test, ***: $P \leq 0.001$). G to L, The effects of raising MtCEP1 levels on *skl* phenotypes. G and H, Effect of *MtCEP1* overexpression ($n \geq 21$) or MtCEP1 peptide application (H, $n \geq 26$), respectively, on the *skl* root nodule number. I and J, Representative images of the effect of the MtCEP1 peptide application on the width of the *skl* nodulation zone (scale bars = 2 mm). K and L, Effect of *MtCEP1* overexpression or peptide application on the *skl* ELRs number. In all cases, the *S. meliloti* WSM1022 strain was used to nodulate plants and measurements were performed 2 weeks pi. Errors bars represent SE.

Downloaded from on July 7, 2020 - Published by www.plantphysiol.org
Copyright © 2016 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

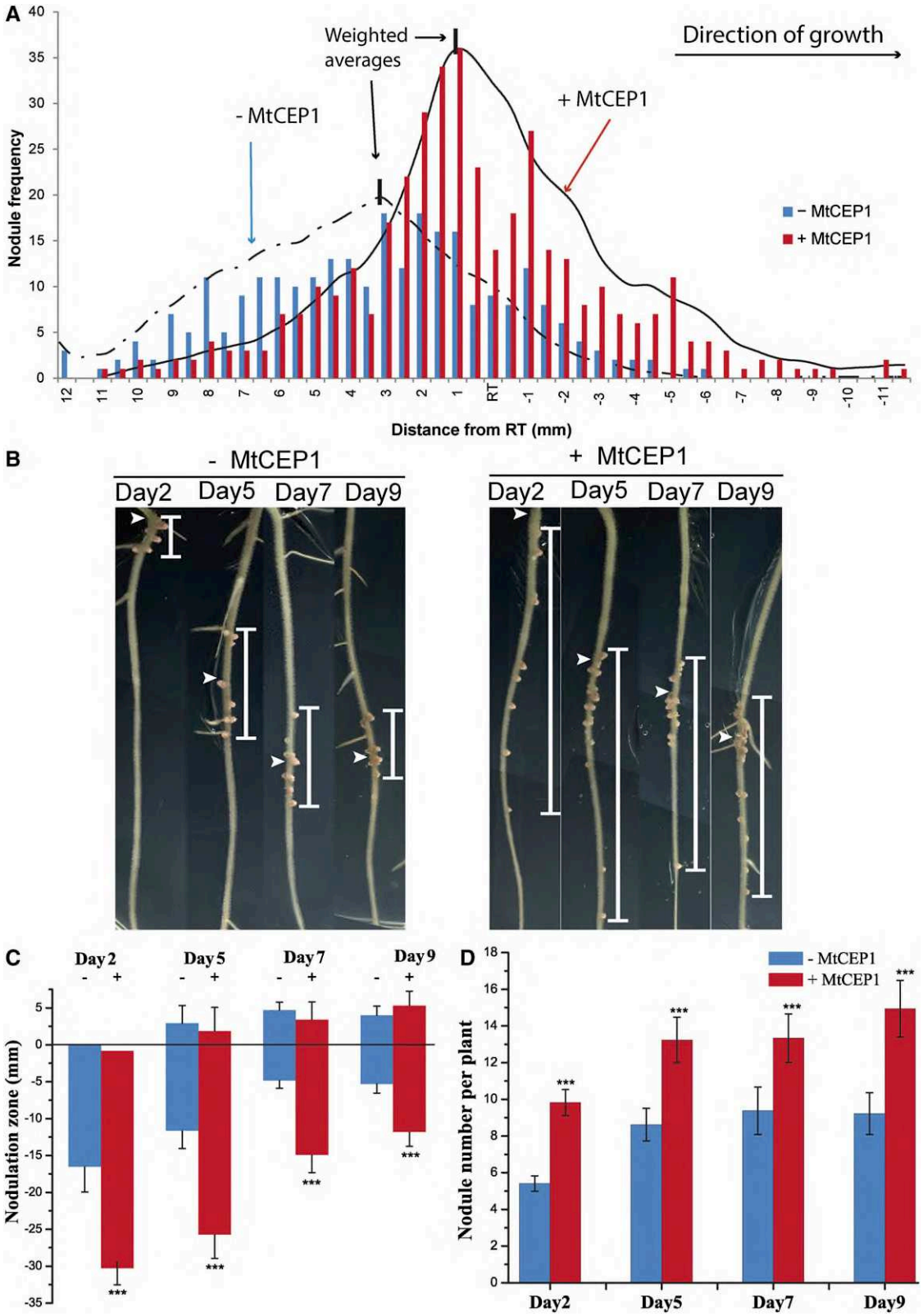


Figure 2. MtCEP1 increases the root developmental competency for nodulation. A, The locations of *S. meliloti* WSM1022 nodules were scored relative to the position of the root tip at the time of inoculation in control (blue bars) and MtCEP1 peptide-treated roots (red bars; $n = 18$). Most control nodules formed within a 15-mm zone (+10 mm to −5 mm relative to the root tip) and 81% of nodules formed above the position of the root tip at the time of inoculation. The MtCEP1 peptide-treatment shifted

Downloaded from on July 7, 2020 - Published by www.plantphysiol.org
Copyright © 2016 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

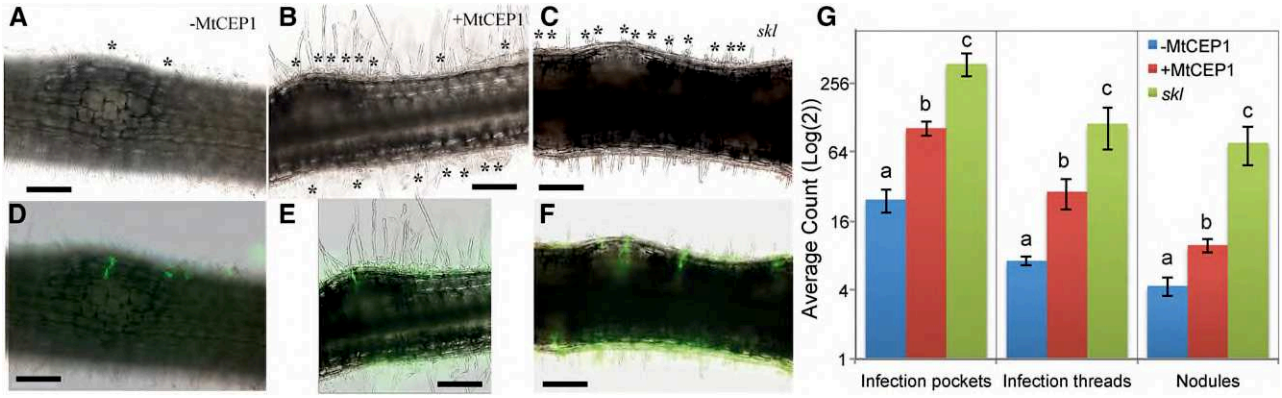


Figure 3. MtCEP1 increases infection and nodulation capacities. A to C, Representative light micrographs of roots 120 h post-inoculation (early nodulation stages) with a *S. meliloti* 1021-GFP strain in the zone of maximal nodulation susceptibility of wild-type (A and B) or ethylene-insensitive *skl* mutant (C) roots. Curled root hairs are indicated by asterisks. D to F, Green fluorescence images are merged with bright-field pictures shown (A–C), and infection threads penetrating into the cortex are detected in green fluorescence (bars in A–F = 200 μm). G, Quantification of infection pockets, infection threads, and nodules along root segments of equivalent length corresponding to the zone of maximal nodulation susceptibility (n = 12; ANOVA; $P < 0.05$). Error bars represent SE.

In this study, pathways acting downstream of MtCEP1 peptides to regulate nodule and LR development were identified. A genetic analysis was used to dissect the role of the NF/SYM, EIN2, and AON pathways in the developmental responses controlled by the MtCEP1 domain1 peptide with Pro hydroxylation at the 4 and 11 positions, which is produced in roots and affects their development (Mohd-Radzman et al., 2015). We showed that MtCEP1 requires the SYM pathway and EIN2, but not SUNN, to stimulate nodulation, whereas MtCEP1 effects on LR regulation occur independently of the SYM pathway, EIN2, and SUNN. The phenotypic basis of MtCEP1-mediated increase in nodulation was then investigated in detail, by (1) measuring the developmental competency of roots and the rhizobial infection capacity and by (2) assessing nodule developmental features such as the level of fused nodule formation. The phenotypes induced by MtCEP1 were reminiscent of those of the ethylene-insensitive mutant *skl*, and accordingly, the ability of MtCEP1 peptide to stimulate nodule formation in the presence of a stimulator and an inhibitor of ethylene synthesis (e.g. ACC and AVG) was altered. We also tested if MtCEP1 affects overall ethylene production levels. Finally, we showed that MtCEP1 regulation of LR and nodules was dependent upon the CRA2 receptor, and that an ethylene synthesis inhibitor can counteract the *cra2* nodulation phenotype.

RESULTS

The SYM Pathway Is Required for MtCEP1 Effects on Nodule But Not LR Formation

Mutants defective in the SYM pathway were treated with MtCEP1 peptides and assessed for root nodule and LR formation (Fig. 1A). In contrast to wild-type plants, which showed a significant increase in nodule number upon MtCEP1 peptide addition, no nodule was formed on roots of any of the MtCEP1 peptide-treated SYM pathway mutants tested (*hcl*, *dmi1*, *dmi2*, *dmi3*, *nsp1*, *nsp2*, and *nin*). The MtCEP1 peptide treatment, however, inhibited LR formation in all mutants. Therefore, MtCEP1 requires the presence of SYM pathway genes to enhance nodulation and is epistatic to the SYM pathway. In addition, the inhibitory effect of MtCEP1 on LR emergence occurs through an independent pathway.

Figure 2. (*Continued.*)
nodulation positions to developmentally younger root regions. Smoothed curves were overlayed with nodule frequency data for MtCEP1 peptide (1 μM)-treated (continuous line) or -untreated (discontinuous line) wild-type plants. The weighted average (see "Materials and Methods") for the nodulation peak is 3.4 mm above the root tip (dashed vertical line) for untreated plants and 0.5 mm above the root tip for MtCEP1-treated plants (continuous vertical line; n = 18). B, The nodulation zone relative to the root tip at the time of inoculation is shown for seedlings at four different times pg. A wider zone of nodulation (represented by the white vertical bar) was observed on MtCEP1 peptide-treated roots inoculated with the *S. meliloti* WSM1022 strain on seedlings 2, 5, 7, or 9 dpg. White arrowheads indicate the root tip position at the time of inoculation. C, Quantification of the nodulation zone size with or without a MtCEP1 peptide-treatment relative to the root tip position. The root tip position is defined at 0 mm; positive numbers are above the root tip, negative numbers are below the root tip. D, Nodule number with or without a MtCEP1 peptide-treatment on seedlings at different times pg. $n \geq 16$; Student's t test, ***: $P \leq 0.001$ in C and D. Error bars represent SE. RT, Root tip.

Downloaded from on July 7, 2020 - Published by www.plantphysiol.org
Copyright © 2016 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

MtEIN2/SKL But Not SUNN Is Required for MtCEP1-Mediated Effects on Nodule Formation

We examined if *Mtein2/sickle* (*skl*) and *sunn* retain phenotypic responsiveness to MtCEP1 (Fig. 1, B–K). In *sunn*, MtCEP1 peptides significantly increased nodule number and reduced LR number (Fig. 1, B–F). In addition, all *sunn* nodules clustered in a tight region of the root (hereafter termed the "nodulation zone") and exposure to the MtCEP1 peptide increased the width of this nodulation zone by over 50% (Fig. 1E). In contrast to *sunn*, MtCEP1 peptide application, or *MtCEP1* overexpression, did not increase nodule number in *skl* (Fig. 1, G–J) or the size of the nodulation zone (Fig. 1, I and J) and was unable to rescue the nodule development phenotype of *skl* (Fig. 1I). The ability of the MtCEP1 peptide or *MtCEP1* overexpression to inhibit LR emergence was, however, retained in *skl* (Fig. 1, K and L).

MtCEP1 Increases the Root Developmental Competency for Nodule Formation

As MtCEP1 peptide treatment enabled *sunn* to support increased nodulation over a wider root area (Fig. 1E), this suggested that MtCEP1 increases the root

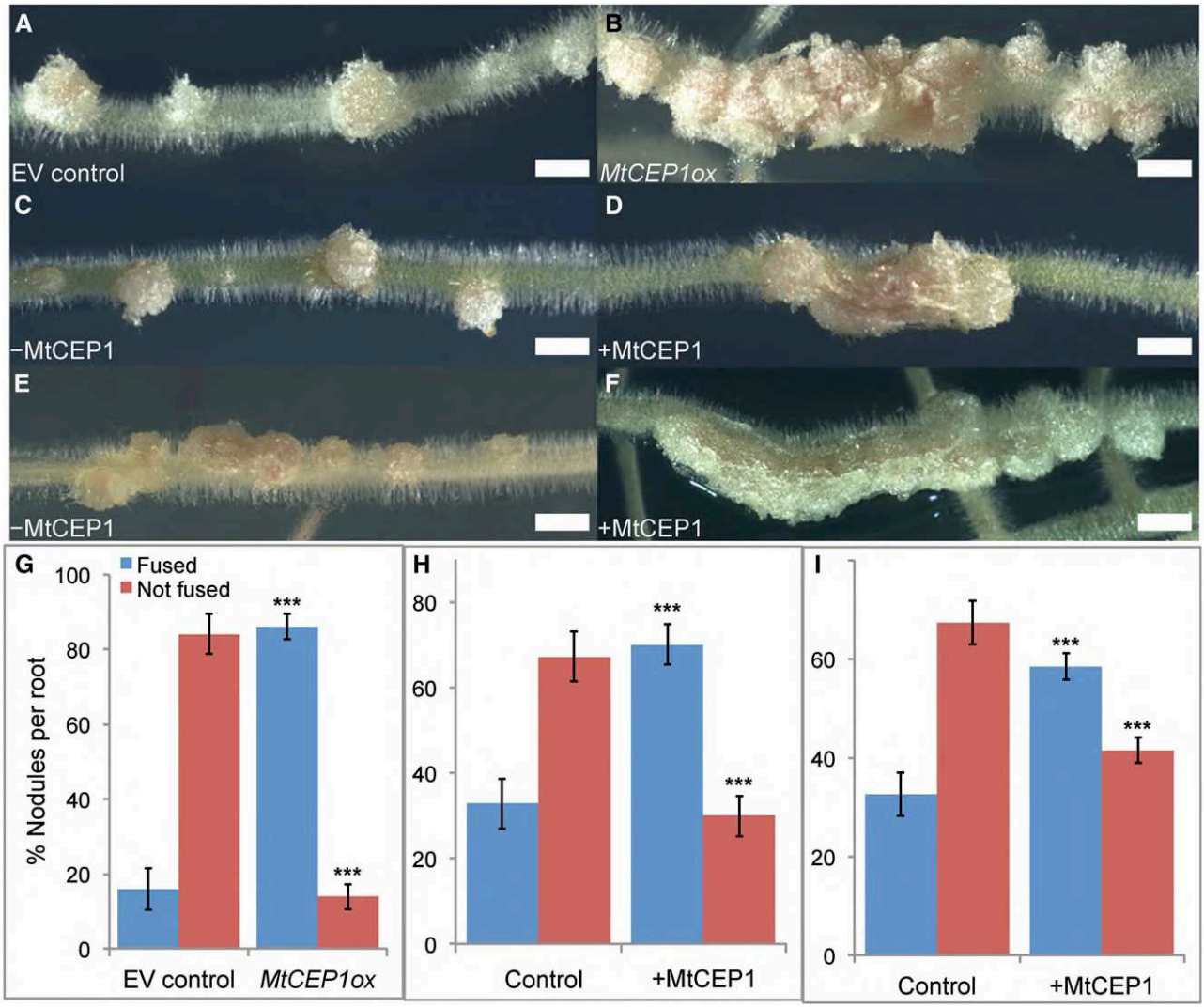


Figure 4. MtCEP1 promotes the formation of fused nodules. A and B, Representative EV and MtCEP1-overexpressing (*MtCEP1ox*) roots were infected with *S. meliloti* Sm1021. C to F, Wild-type controls (C and E) and MtCEP1 peptide-treated roots (D and F) were inoculated with the Sm1021 (C and D) or the *S. meliloti* WSM1022 (E and F) strain (bars in A–F = 2 mm). G, Quantification of fused nodules forming on roots transformed with *MtCEP1ox* compared with EV-transformed roots ($n \geq 18$; Student's *t* test, ***: $P \leq 0.001$). H and I, Quantification of fused nodules formed on MtCEP1 peptide-treated plants compared to nontreated plants, inoculated with the Sm1021 (H) or the WSM1022 (I) strain ($n \geq 25$; Student's *t* test, ***: $P \leq 0.001$). In G to I, error bars represent SE. EV, Empty vector.

Downloaded from on July 7, 2020 - Published by www.plantphysiol.org
Copyright © 2016 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

developmental competency to form nodules. This feature was therefore assessed in more detail by determining the location of nodule development relative to the position of the root tip at the time of *Rhizobium* inoculation in a large cohort of wild-type plants in the presence or in the absence of a MtCEP1 pretreatment. In untreated plants, 81% of *S. meliloti* nodules occurred above the root tip position at the time of inoculation and more than 98% nodules formed within a tight 15-mm root region similar to that observed in *sunn* (Figs. 2A and 1, B–E). As with *sunn*, no nodule formed above or below this 15-mm region. The 15-mm zone corresponds to an approximately 48 h competency period, as the root growth rate is approximately 7 $mm \cdot d^{-1}$ in the presence or absence of MtCEP1. Similar to the response of *sunn*, in MtCEP1 peptide-treated roots, 98% of nodules formed within a 20-mm zone and a change in nodule distribution relative to the position of the root tip was observed compared to controls. With MtCEP1 treatment, only 64% of nodules formed above the initial position of the root tip, which represents a 21% decrease relative to controls. By contrast, 36% of nodules formed below the initial position of the root tip after MtCEP1 treatment and this represents a 1.9-fold increase compared to controls. The 20-mm zone corresponded to an approximately 72 h competency period. These results indicate that MtCEP1 increases nodule number and the duration of the root nodulation competency period, and it shifts successful nodulation toward developmentally younger root regions. Smoothed curves describing the response of treated and untreated roots (Fig. 2A) highlight the shift in the positioning of MtCEP1-treated nodules on roots. The location of the nodulation capacity peak was calculated by determining the weighted averages. The peak of nodulation formation in the untreated- and treated-roots was 3.4 mm and 0.5 mm, respectively, above the root tip position at the time of inoculation (Fig. 2A). This also indicates that MtCEP1 shifts the peak of nodulation to developmentally younger root regions.

The effect of MtCEP1 on the size of the root competency zone for nodulation was then assessed in seedlings at different times postgermination (pg; Fig. 2, B–D). Consistent with Figure 2A, nodules in control roots formed within a tight zone (approximately 15 mm in 2 d and 5 d postgermination [dpg] seedlings and approximately 10 mm in 7- and 9-dpg seedlings), and the MtCEP1 peptide treatment significantly widened the zone of nodule formation by 1.5- to 2-fold (Fig. 2, B and C). As expected, the MtCEP1 peptide treatment increased total nodule number in seedlings of all ages (Fig. 2D).

MtCEP1 Increases the Level of Root Hair Infection and Infection Thread Formation

The MtCEP1-dependent increase in nodule number could be explained by elevating infection thread number. The number of infections was therefore audited on MtCEP1 peptide-treated and -untreated wild-type roots compared to *skl* hyperinfected roots (Fig. 3, A–F). Infection pockets (defined as "initiated infection thread foci in tightly curled root hairs"), infection threads, and

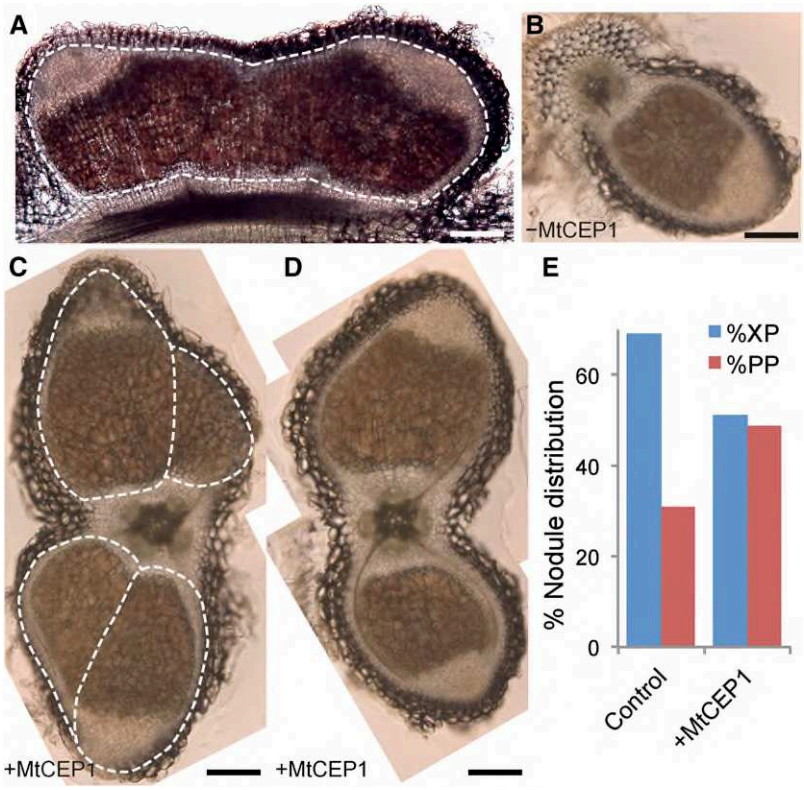


Figure 5. MtCEP1 promotes nodule formation adjacent to phloem poles. A, Longitudinal section of a fused (multimeristematic) nodule comprising two nodule meristems and a single endodermal layer. At least two independent vascular bundles connect the fused nodule to the root. B to D, Transverse sections of a wild-type nodule forming near a xylem pole (B) or of nodules forming in the presence of MtCEP1 peptide (C and D). MtCEP1 peptide enables larger phloem pole-oriented nodules to form, often with multilobes as in (C). Bars in A to D = 500 μm. E, Quantification of nodule spatial distribution in MtCEP1 peptide-treated and untreated plants, in percentage, relative to XP poles or PP poles. ($n \geq 43$; χ^2 test, $P \leq 0.05$.) WSM1022 was used as the inoculum. XP, Proto-xylem; PP, proto-phloem.

Downloaded from on July 7, 2020 - Published by www.plantphysiol.org
Copyright © 2016 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

nodules were counted using a *S. meliloti* GFP-labeled Sm1021 strain (Fig. 3G). The MtCEP1 peptide significantly increased the number of infection pockets, infection threads, and nodules compared to untreated controls. The numbers measured were found to be intermediate between the nontreated control and *skl*, which has an extreme hyperinfected phenotype (Fig. 3G). Similar trends were also observed using a Methylene Blue staining to assess the number of infection pockets, infection threads, and nodules in *S. meliloti* WSM1022-inoculated roots of wild-type and *MtCEP1*-overexpressing (*MtCEP1ox*) transgenic plants (Supplemental Figs. S1 and S2). *MtCEP1ox* roots have an approximately 4-fold increase in the number of infection pockets and infection threads and an approximately 3-fold increase in the total nodule number at 14 dpi compared to the empty vector control.

MtCEP1 Induces the Development of Fused Nodules with an Altered Spatial Patterning

Because MtCEP1 increased infection number and the phenotypes depended on *skl*, we determined if it induced other phenotypic effects previously observed in the *Mtein2/skl* mutant (Penmetsa and Cook, 1997). We determined if the MtCEP1 peptide induced fused nodules or nodules with altered spatial development. Distinct, well-spaced nodules form on control Sm1021- or WSM1022-inoculated roots (Fig. 4, A, C, and E). MtCEP1 induced a significantly higher fused nodule number when inoculated with either strain Sm1021 or WSM1022 (Fig. 4, B, D, and F–I). Fused nodules formed along and across the root axis (Fig. 4, B, D, and F). Sm1021 formed 5.6-fold more fused nodules on roots overexpressing *MtCEP1* and a significant decrease in nonfused nodules was observed (Fig. 4G). Similarly, Sm1021 or WSM1022 strains induced significantly more fused nodules and significantly fewer nonfused nodules when roots were treated with MtCEP1 peptide (Fig. 4, H and I).

Longitudinal sections of a typical fused nodule (e.g. similar to Fig. 4D) showed two meristems, distinct vascular traces entering the fused nodule, and a single endodermal layer (Fig. 5A). In untreated roots, transverse sections confirmed that wild-type nodules preferentially formed adjacent to xylem poles (Fig. 5, B and E), whereas in MtCEP1 peptide-treated roots, nodules showed no preference for forming in the proximity of xylem or phloem poles (Fig. 5, C–E). The MtCEP1 peptide also enabled longer, wider, and multilobed nodules to form, which spanned two xylem poles and the phloem pole in between. These larger and multilobed nodules are connected by vascular bundles linked to two root xylem poles (Fig. 5, C and D). The larger nodules induced by the MtCEP1 peptide were not observed on untreated wild-type plants.

MtCEP1 Can Alleviate the Effects of Increased ACC Concentrations

The observed increase in nodule and infection thread numbers and the formation of fused nodules in response to MtCEP1 are typical features observed in *skl/ein2* (Penmetsa and Cook, 1997). In addition, MtEIN2 is required for MtCEP1-mediated effects on root nodulation (Fig. 1, G–J). This suggests that MtCEP1 stimulation of nodulation may involve a suppression of the MtEIN2-mediated ethylene signaling. To test this, we determined if MtCEP1 suppressed the effects of increasing concentrations of the ethylene precursor ACC. As expected, increasing ACC concentrations reduced nodulation levels progressively (Fig. 6, A–E). The MtCEP1 peptide cotreatment, however, significantly increased nodule numbers at 0.01 and 0.1 μM ACC (Fig. 6, A–C, versus Fig. 6, F–H and K) and enabled the formation

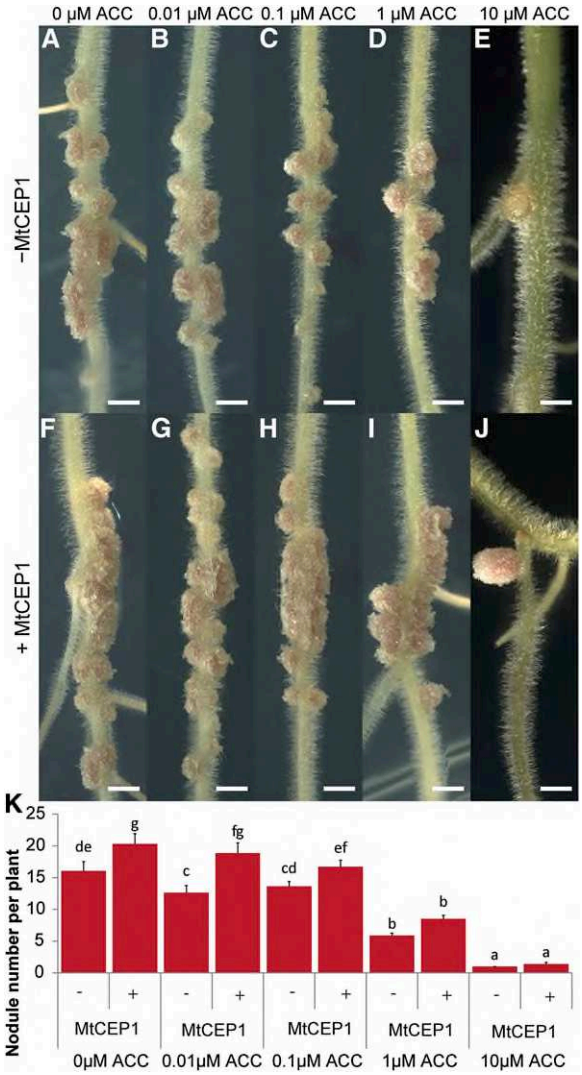


Figure 6. MtCEP1 alleviates ACC suppression of nodule formation. A to J, Plants were grown in N-free Fåhraeus medium without (−MtCEP1; A–E) or with MtCEP1 peptide (+MtCEP1; F–J) with increasing concentrations of the ethylene precursor ACC (0–10 μM). Nodules were counted 2 weeks postinoculation with the WSM1022 strain (bars = 2 mm). K, Quantification of the nodule number in response to increasing ACC concentrations, with or without MtCEP1 ($n \geq 22$; two-way ANOVA, $P \leq 0.001$). Error bars represent SE.

Downloaded from on July 7, 2020 - Published by www.plantphysiol.org
Copyright © 2016 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

of fused nodules up to 1 μM ACC concentrations (Fig. 6, F–I). ACC at 10 μM severely suppressed nodule number and only white nodules formed. By contrast, the MtCEP1 peptide-treatment allowed the development of larger pink nodules, suggesting an active N-fixation metabolic activity (Fig. 6, E and J).

MtCEP1 Enhancement of Nodulation Does Not Occur in the Presence of AVG

We tested the ability of MtCEP1 to affect development in the presence of an ethylene synthesis inhibitor as well as the effect of MtCEP1 on processes regulated by ethylene signaling. We first tested if the ethylene synthesis inhibitor, AVG, affected MtCEP1-stimulation of nodulation or inhibition of LR emergence. No MtCEP1 peptide-dependent enhancement of nodulation was observed in the presence of AVG, which significantly increased nodule numbers in both presence and absence of MtCEP1 (Fig. 7A). By contrast, AVG did not affect the ability of MtCEP1 to suppress LR emergence (Fig. 7B), in agreement with results obtained in the *skl* mutant (Fig. 1, J and K).

We then tested if MtCEP1 affected ethylene production over a 24-h period (Fig. 7C) using a very sensitive laser-based detection system enabling ethylene to be measured from single seedlings. Negative and positive controls were defined by measuring ethylene levels in response to a BAP treatment with or without AVG, respectively. As expected, BAP increased ethylene production and AVG counteracted this increase (Cary et al., 1995). In response to a MtCEP1 treatment, however, no significant change in ethylene content was detected and the effect of BAP on ethylene production was also not affected (Fig. 7C), suggesting that the MtCEP1 peptide does not affect the overall root pool of ethylene. Finally, the MtCEP1 peptide effect on pseudonodules induced by the auxin transport inhibitor TIBA was examined (Rightmyer and Long, 2011). Interestingly, pseudonodules form independently of the SYM pathway but are MtEIN2-dependent (Rightmyer and Long, 2011). We reasoned that if MtCEP1 reduced signaling through MtEIN2, then pseudonodule formation but not LR formation would be inhibited by the MtCEP1 peptide. A MtCEP1 and TIBA cotreatment indeed significantly reduced pseudonodule number, but not LR number (Fig. 7D).

LR and Nodule Development in *cra2* Is Unaffected by MtCEP1 and the *cra2* Nodulation Phenotype Can Be Counteracted by AVG

The CRA2 receptor mutant has opposite LR and nodulation phenotypes to those imposed by MtCEP1 peptide application (Imin et al., 2013; Huault et al., 2014; Mohd-Radzman et al., 2015), and CRA2 is most closely related to the AtCEP1 peptide receptor XIP1/CEPR1 in Arabidopsis (Huault et al., 2014). Therefore, we tested if MtCEP1 affected LR and nodule formation in *cra2* (Fig. 8, A and B). In contrast to wild-type plants, MtCEP1 peptides failed to decrease LR development or to increase nodule number in two independent *cra2* mutant alleles. To determine if ethylene levels affect *cra2* LR and nodulation phenotypes, an AVG treatment was performed, which enabled a significant increase in *cra2* nodule number but did not significantly affect LR number (Fig. 8, C and D). The ability of AVG to counteract the low *cra2* nodulation phenotype is in agreement with a model where MtCEP1 peptides would inhibit the ethylene/MtEIN2 pathway, depending on CRA2, to increase nodulation.

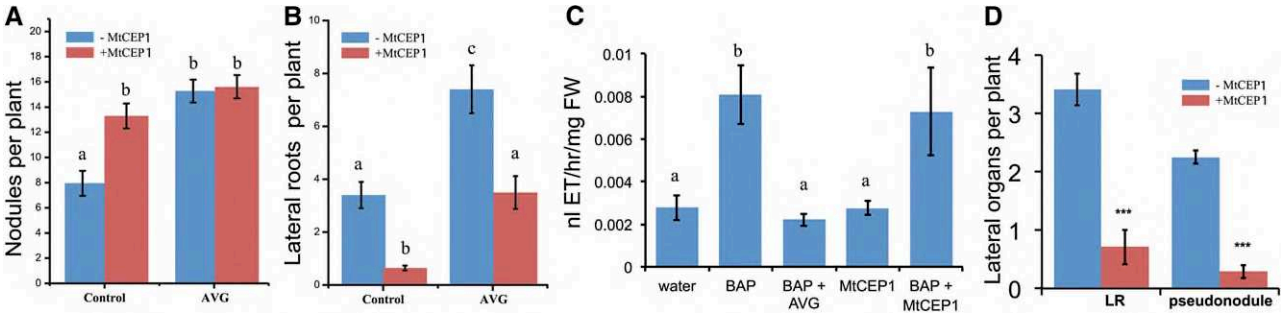


Figure 7. The MtCEP1 effect on nodule number but not LR or pseudonodules numbers is impaired by AVG. A, Quantification of nodule number in *S. meliloti* WSM1022-inoculated plants grown on N-free Fåhraeus medium with or without the MtCEP1 peptide and/or AVG (1 μM). Nodules were counted 2 weeks postinoculation. Error bars represent SE ($n \geq 6$; one-way ANOVA, $P \leq 0.05$). B, Quantification of emerged LRs in plants grown on a 5 mM KNO_3 Fåhraeus medium with or without the MtCEP1 peptide and/or AVG (1 μM). LR number was quantified 14 d after germination. Error bars represent SE ($n \geq 20$; one-way ANOVA, $P \leq 0.05$). C, Quantification of the ethylene production in single seedlings treated with or without the MtCEP1 peptide or the cytokinin BAP (0.01 μM), and/or the ethylene synthesis inhibitor AVG (1 μM). BAP and AVG were used as positive and negative controls, respectively, for the detection of increased or decreased ethylene levels. Ethylene was measured using laser-based trace gas detection 24 h after treatment. Error bars represent confidence interval ($\alpha < 0.05$; $n \geq 6$). D, Quantification of TIBA-induced pseudonodule and LR numbers with or without the MtCEP1 peptide. The numbers of LRs (left side) and pseudonodules (right side) were counted 2 weeks post-TIBA addition. Error bars represent SE ($n \geq 52$; Student's *t* test, ***: $P \leq 0.001$). FW, Fresh weight.

Downloaded from on July 7, 2020 - Published by www.plantphysiol.org
Copyright © 2016 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

DISCUSSION

Legumes have evolved mechanisms to simultaneously regulate the initiation, emergence, and growth of root nodules and LRs. The modulation of root lateral organ formation depends on intrinsic developmental and extrinsic environmental cues such as N availability. Previous work showed independently that MtCEP1 peptides and the MtCRA2 receptor play an unexpected major role in controlling both LR and nodule formation (Imin et al., 2013; Huault et al., 2014; Djordjevic et al., 2015; Mohd-Radzman et al., 2015). A common feature of LR and nodule development in *M. truncatula* is that these lateral organs are initiated from root cells located close to the RAM. Because MtCEP1 affects both LR and nodule developmental processes but not main root growth, this root region near the *M. truncatula* RAM is particularly receptive to MtCEP1 peptides (Imin et al., 2013). Prior work also showed that MtCEP1 acted rapidly to affect LR organogenesis in a shoot-independent manner (Imin et al., 2013; Mohd-Radzman et al., 2015). In addition, *MtCEP1* and *MtCRA2* both show gene expression in the vicinity of the root tip, which could enable a direct interaction between them (Imin et al., 2013; Huault et al., 2014), and *MtCRA2* is also expressed in shoots, which is a prerequisite to be involved in systemic regulations from roots (Huault et al., 2014). The potential involvement of MtCRA2 and the underlying downstream pathways that enable MtCEP1 peptides to control these developmental processes and, therefore, to shape root system architecture depending on environmental conditions were, however, not yet described.

Here, we show that the SYM pathway is required for, and epistatic to, the MtCEP1 regulation of nodule number and that the MtCEP1-dependent inhibition of LR emergence occurs through an independent pathway. This clearly separates the MtCEP1-dependent downstream pathway stimulating nodulation from the MtCEP1 negative effects on LR emergence. Furthermore, MtCEP1 was unable to promote nodule formation in the ethylene-insensitive *ein2/skl* mutant but could still regulate LR number, whereas both MtCEP1 effects on LR and nodule formation were maintained in *sunn*. This shows that ethylene signaling through MtEIN2/SKL is an additional requirement for MtCEP1 action on nodulation, but not on LRs. Consistent with this model, the ethylene biosynthesis inhibitor AVG

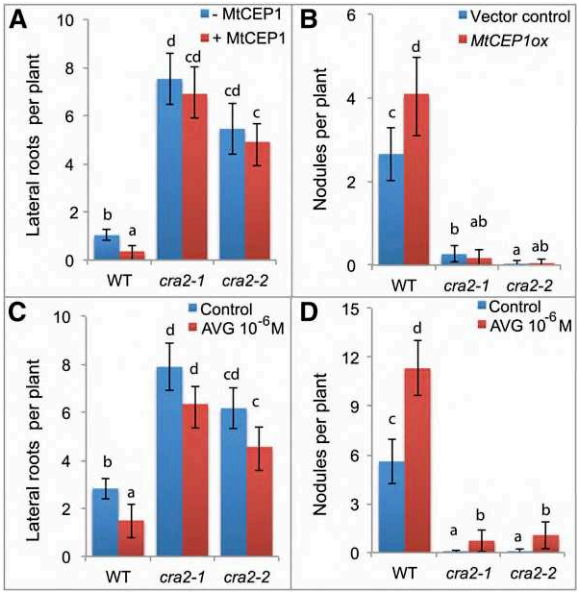


Figure 8. CEP1 effect on nodulation and LRs depends on CRA2 and the *cra2* nodulation phenotype is counteracted by AVG. A, LR and B, nodule number formed on wild-type and *cra2* plants with or without MtCEP1. Due to the variability of *A. rhizogenes* composite plant root system architecture, the LR phenotype was assessed on MtCEP1 peptide-treated 7-d-old seedlings, whereas the nodulation phenotype was determined in *MtCEP1* overexpressing roots compared to the empty vector control, 15 d after *S. meliloti* inoculation ($n > 20$). C, LR and D, nodule number of wild-type and *cra2* plants with or without AVG (1 μM). The LR phenotype was assessed 7 d posttreatment, and nodulation 15 d after *S. meliloti* inoculation ($n > 20$). In all graphs, error bars represent confidence intervals ($\alpha = 0.05$), and a Kruskal-Wallis test ($\alpha < 0.05$) was performed to identify significant differences, indicated by letters.

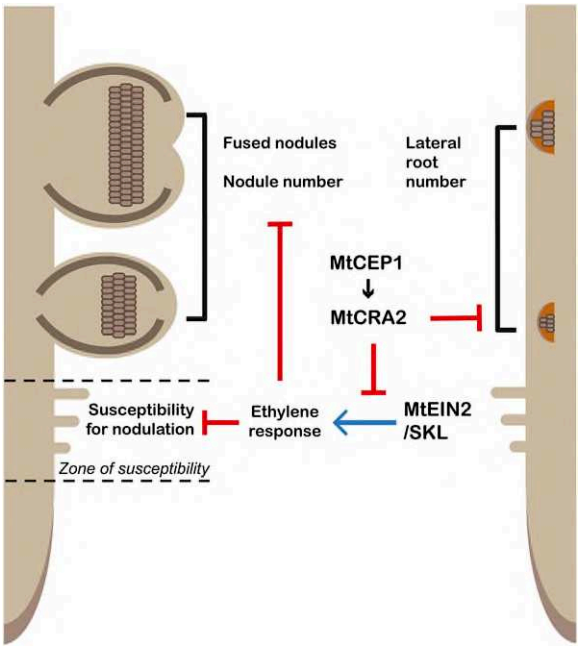


Figure 9. A model for MtCEP1/MtCRA2 interaction during nodule and lateral root development. The MtCEP1 peptide requires the MtCRA2 receptor to regulate two different pathways determining *M. truncatula* root system architecture: LR development is inhibited independently of the EIN2/SKL pathway, whereas root nodule number is increased depending on the modulation of the EIN2/SKL signaling pathway. The MtCEP1 interaction with MtCRA2 is hypothesized to dampen the EIN2/SKL-mediated ethylene response during nodulation. This consequently leads to an increased number of rhizobial infection events, an extended developmental susceptibility of roots for nodulation, the formation of fused nodules, and the formation of nodules close to protoxylem and -phloem poles.

Downloaded from on July 7, 2020 - Published by www.plantphysiol.org
Copyright © 2016 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

abolished the MtCEP1-dependent stimulation of nodule number but did not affect MtCEP1 inhibition of LR number. Hence, collectively, the genetic and pharmacological evidence presented here indicate that MtCEP1 affects LR and nodule number by independent pathways.

A model to explain the positive effect of the MtCEP1 peptide on nodulation (Fig. 9) is that the peptide dampens MtEIN2/SKL-dependent ethylene signaling, therefore attenuating its negative effect on rhizobial infections. Consistent with such MtEIN2/SKL-related action, MtCEP1 peptide also increases the number of infection events, as well as fused nodule formation and nodule number, which are phenotypes that resemble those of *skl* (Penmetsa and Cook, 1997; Penmetsa et al., 2003, 2008; Xiao et al., 2014). Additionally, similarly to *skl* phenotypes, MtCEP1 peptides increased the root competency zone for nodulation, the frequency of nodules forming in the proximity of phloem poles, and the number of nodules that spanned two xylem poles and the phloem pole in between. Furthermore, MtCEP1 provokes an attenuation of the ACC inhibition of nodulation and AVG inhibits the MtCEP1-dependent increase of nodule number. Finally, TIBA-induced and EIN2-dependent pseudonodule formation is inhibited by MtCEP1. This raises the possibility that MtCEP1 may affect ethylene metabolism and/or signaling, which is supported by our finding that MtCEP1 has no detectable effect on the root ethylene production.

Finally, the *cra2* mutant, which is characterized by an increased LR number and a decrease in nodule number, is unresponsive to MtCEP1 peptide-dependent effects in these two developmental contexts, suggesting that CRA2 is a receptor for MtCEP1. In addition, treatment with an ethylene inhibitor can counteract the low *cra2* nodulation phenotype. This supports a model where MtCEP1-CRA2 interactions modulate MtEIN2/SKL ethylene signaling to regulate nodule number (Fig. 9). This also implies that the CRA2 receptor is pivotal for MtCEP1 regulation of root lateral organ formation. It remains to be determined how the same peptide-receptor module can activate different downstream pathways depending on the root lateral organ considered. Because *CEP* gene expression is primarily regulated by environmental cues, and notably by N-availability (Delay et al., 2013; Imin et al., 2013), the MtCEP-CRA2 regulatory pathway is likely an important route for plants to control root system architecture in response to environmental influences such as N-availability. The widespread distribution of *CEP* genes in seed plants and their absence in early plant lineages (Delay et al., 2013; Ogilvie et al., 2014) suggests that CEP-dependent regulatory pathways are likely to operate widely. It is also expected that CEP signaling pathways contribute to the root system plasticity of various plant species. For instance, *cepr1* phenotypes in Arabidopsis are somewhat different compared to *cra2* phenotypes in *M. truncatula* (Tabata et al., 2014, Huault et al., 2014). In addition, the phenotypic effects of CEP peptides on lateral root and main root growth are different in Arabidopsis and *Medicago* (Delay et al., 2013; Imin et al., 2013; Tabata et al., 2014). Therefore, modulating CEP pathways may be a way to generate different root system architectures in various plants depending on their environments. In summary, the results support a model where CRA2 is a receptor for MtCEP1 peptides, and ethylene-MtEIN2/SKL is a downstream pathway required for MtCEP1 action on nodule formation.

MATERIALS AND METHODS

Medicago truncatula Lines and Growth Conditions

Seeds of *M. truncatula* wild-type genotypes Jemalong A17 or R108 and mutant lines were stratified and germinated on Fåhraeus medium (Kusumawati et al., 2008; Imin et al., 2013) and transferred to petri plates containing Fåhraeus medium without AVG (unless specified). Six seedlings per plate were grown in a growth chamber at 22°C with a 16 h photoperiod and a photon flux density of 100 μmol m^{-2} s^{-1} (Imin et al., 2013). To minimize light exposure to roots, and to optimize the phenotypic effects of CEP peptides on roots, the plates were 3/4 covered in black paper pockets. The following mutants were used in the A17 genotype: *sickle1-1* (Penmetsa and Cook, 1997), *sunn-4* (Schnabel et al., 2005), *hcl-1* (B56), *dmi1-4* (FN1), *dmi2-1* (TR25), *dmi3-1* (TRV25), *nsp1-2* (C54), *nsp2-2*, and *nin-1* (Catoira et al., 2000; Ané et al., 2002; Smit et al., 2005; Arrighi et al., 2006); and in the R108 genotype: *cra2-1* and *cra2-2* (Huault et al., 2014).

Chemicals

The MtCEP1 Domain1 Hyp 4, 11 peptide (Mohd-Radzman et al., 2015) was synthesized at the Biomolecular Resource Facility (Australian National University) or by GL BioChem with a greater than 95% purity, and validated by HPLC and mass spectrometry (Djordjevic et al., 2011). The peptide was resuspended in sterile water and added to media at 1 M. AVG (Olchemin), ACC, BAP (Sigma-Aldrich), or TIBA was added to media at the concentrations indicated.

Nodulation Assays

Standardly, 4-d-old germinated seedlings were grown on an N-free Fåhraeus medium before being inoculated with *Sinorhizobium meliloti* to induce nodule formation. The MtCEP1 peptide was added to the growth medium to provide continuous exposure. The *S. meliloti* strain WSM1022 (OD_{600} = 0.1), previously grown overnight at 28°C in a Bergersen's modified medium, was centrifuged, resuspended in sterile water, and flood-inoculated onto roots (Imin et al., 2013). WSM1022 was used to assess the size of the root competency zone for nodulation, which is defined as the distance between the position of the first and the last emerged nodules on the primary root. The position and frequency of nodule formation relative to the root tip position at the time of inoculation was determined as described previously in Sargent et al. (1987). To determine the peak of nodulation, the distance of the nodule from the initial position of the root tip (A) and the nodulation frequency at each individual value (B) was used to calculate the weighted nodulation average using the formula = SUMPRODUCT(arrayA,arrayB)/SUM(arrayB) in Excel. The *S. meliloti* Sm1021 strain was used for nodulation on R108 and *cra2* plants (Huault et al., 2014). In a separate experiment, MtCEP1 peptide-treated and control seedlings 2, 5, 7, and 9 dpg were used to assess the size of the nodulation zone using the WSM1022 strain.

Composite Plants

The *MtCEP1* overexpression or the empty vector constructs were transformed into *Agrobacterium rhizogenes* strain ARqua1 and grown with spectinomycin (100 mg·L^{-1}) and streptomycin (100 mg·L^{-1}; Imin et al., 2013). Root transformation was performed as previously described in Saur et al. (2011) using kanamycin 25 mg·L^{-1} for selection. Given the highly branched phenotype of *cra2* mutants and the heterogeneity of composite plant production, especially in R108, it was not possible to obtain meaningful results when comparing *cra2* plants that were transformed with *MtCEP1ox* or vector control. Thus, for the observation of lateral root phenotypes of *cra2* and R108, MtCEP1 synthetic peptide was used instead.

Downloaded from on July 7, 2020 - Published by www.plantphysiol.org
Copyright © 2016 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

Visualization and Quantification of Infection Thread Formation

Infection thread and pocket formation was visualized using a GFP-labeled *S. meliloti* Sm1021 strain (Fournier et al., 2015) or a Methylene Blue staining for the *S. meliloti* WSM1022 strain (Vasse and Truchet, 1984). Methylene Blue staining was used both as an independent method for assessing infection thread and pocket formation and as the preferred method when transgenic roots expressing GFP were analyzed. Germinated seedlings were grown on Fåhraeus medium supplemented with or without the MtCEP1 peptide. After 3 d of growth, plants were flood-inoculated with either Sm1021 constitutively expressing GFP (OD_{600} = 0.01) or WSM1022 (OD_{600} = 0.001). The starting *OD* was carefully calibrated to minimize overcolonization of the root by rhizobia without compromising nodule number. Infection thread quantification for the GFP-labeled Sm1021 strain was microscopically accessed using approximately 15-mm root-nodulation-zone root segments at 96- and 120-h postinoculation (model no. DM550 B; Leica Microsystems), scoring infection pockets and infection threads separately. Nodule numbers were scored at 14 d postinoculation. For Methylene Blue staining, root segments corresponding to the approximately 15-mm root nodulation zone were observed 72 and 96 h postinoculation and stained with 0.01% (w/v) Methylene Blue for 30 min, then transferred to distilled water for 2 h for partial destaining. Root segments were briefly rinsed with 1 M NaCl, then replaced by distilled water for imaging.

Vibratome Sectioning and Microscopy

Root segments were embedded in 3% agarose and 100 μm sections were obtained using a vibratome (1000 Plus; Vibratome). The sections were then mounted on glass slides with water and observed with a DMBL microscope (Leica Microsystems). The root samples were observed using an SZX16 stereomicroscope (model no. SZX2-FGFPA; Olympus), and for higher magnifications with an SMZ1500 microscope (Nikon).

Induction of Pseudonodules

Induction of pseudonodules was done according to the protocol described in Rightmyer and Long (2011). Germinated *M. truncatula* seedlings were first grown on an N-free Fåhraeus medium with or without the MtCEP1 peptide. After 5 d, seedlings were flooded with 200 μM TIBA (Rightmyer and Long, 2011). The pseudonodules were then counted after 3 weeks.

Ethylene Measurement

Ethylene accumulation over 24 h was measured using an ETD-300 laser-based detection system (SensorSense) on 4-d-old seedlings grown in 5 mL glass vials and exposed to BAP (10 nM) in combination with AVG (Cayman Chemical; 1 M), or MtCEP1 (1 M). Measurements were conducted in sampling mode with a flow rate of 2.5 L/min and a 6-min sample period. The greater sensitivity of the laser-based system (Cristescu et al., 2013) enabled measurements to be made from individual seedlings, in contrast to other equipment types, which require pooled samples to generate detectable signals.

Accession Numbers

Sequence data from this article can be found in the GenBank/EMBL data libraries under the following accession numbers: for MtCEP1, EMBL: AL378645.1, CR495947.1, and AL378646.1; Affymetrix: Mtr.7265.1.S1_at; JCVI: contig_59554_1.1 (Mt3.5v5).

Supplemental Data

The following supplemental materials are available.

Supplemental Figure S1. Assessment of the MtCEP1 peptide effect on infection thread and infection pocket formation.

Supplemental Figure S2. *MtCEP1ox* effect on infection thread and infection pocket formation.

ACKNOWLEDGMENTS

Douglas Cook, Julia Frugoli, and Jean-Michel Ané provided *sickle*, *sunn*, and SYM pathway mutants, respectively. Ulrike Mathesius (Australian National University, Canberra) provided the GFP-labeled *S. meliloti* Sm1021 strain. The authors declare no conflict of interest.

Received February 2, 2016; accepted June 21, 2016; published June 24, 2016.

LITERATURE CITED

Ané J-M, Lévy J, Thoquet P, Kulikova O, de Billy F, Penmetsa V, Kim D-J, Debellé F, Rosenberg C, Cook DR, et al (2002) Genetic and cytogenetic mapping of DMI1, DMI2, and DMI3 genes of *Medicago truncatula* involved in Nod factor transduction, nodulation, and mycorrhization. Mol Plant Microbe Interact **15:** 1108–1118

Arrighi J-F, Barre A, Ben Amor B, Bersoult A, Soriano LC, Mirabella R, de Carvalho-Niebel F, Journet E-P, Ghérardi M, Huguet T, et al (2006) The *Medicago truncatula* lysin [corrected] motif-receptor-like kinase gene family includes NFP and new nodule-expressed genes. Plant Physiol **142:** 265–279

Bhuvaneswari TV, Turgeon BG, Bauer WD (1980) Early events in the infection of soybean (*Glycine max* L. Merr) by *Rhizobium japonicum*: I. Localization of infectible root cells. Plant Physiol **66:** 1027–1031

Bryan AC, Obaidi A, Wierzba M, Tax FE (2012) XYLEM INTERMIXED WITH PHLOEM1, a leucine-rich repeat receptor-like kinase required for stem growth and vascular development in *Arabidopsis thaliana*. Planta **235:** 111–122

Cary AJ, Liu W, Howell SH (1995) Cytokinin action is coupled to ethylene in its effects on the inhibition of root and hypocotyl elongation in *Arabidopsis thaliana* seedlings. Plant Physiol **107:** 1075–1082

Catoira R, Galera C, de Billy F, Penmetsa RV, Journet E-P, Maillet F, Rosenberg C, Cook D, Gough C, Dénarié J (2000) Four genes of *Medicago truncatula* controlling components of a nod factor transduction pathway. Plant Cell **12:** 1647–1666

Cristescu SM, Mandon J, Arslanov D, De Pessemier J, Hermans C, Harren FJM (2013) Current methods for detecting ethylene in plants. Ann Bot **111:** 347–360

Delay C, Imin N, Djordjevic MA (2013) CEP genes regulate root and shoot development in response to environmental cues and are specific to seed plants. J Exp Bot **64:** 5383–5394

Desbrosses GJ, Stougaard J (2011) Root nodulation: a paradigm for how plant-microbe symbiosis influences host developmental pathways. Cell Host Microbe **10:** 348–358

Djordjevic MA, Innes RW, Wijffelman CA, Schofield PR, Rolfe BG (1986) Nodulation of specific legumes is controlled by several distinct loci in *Rhizobium trifolii*. Plant Mol Biol **6:** 389–401

Djordjevic MA, Mohd-Radzman NA, Imin N (2015) Small-peptide signals that control root nodule number, development, and symbiosis. J Exp Bot **66:** 5171–5181

Djordjevic MA, Oakes M, Wong A, Singh M, Bhalla P, Kusumawati L, Imin N (2011) Border sequences of *Medicago truncatula* CLE36 are specifically cleaved by a subtilisin present in the extracellular fluids of *Medicago* and soybean. J Exp Bot **62:** 4649–4659

Djordjevic MA, Schofield PR, Rolfe BG (1985) Tn5 mutagenesis of *Rhizobium trifolii* host-specific nodulation genes result in mutants with altered host-range ability. Mol Gen Genet **200:** 463–471

Fournier J, Teillet A, Chabaud M, Ivanov S, Genre A, Limpens E, de Carvalho-Niebel F, Barker DG (2015) Remodeling of the infection chamber before infection thread formation reveals a two-step mechanism for rhizobial entry into the host legume root hair. Plant Physiol **167:** 1233–1242

Franssen HJ, Xiao TT, Kulikova O, Wan X, Bisseling T, Scheres B, Heidstra R (2015) Root developmental programs shape the *Medicago truncatula* nodule meristem. Development **142:** 2941–2950

Gamuyao R, Chin JH, Pariasca-Tanaka J, Pesaresi P, Catausan S, Dalid C, Slamet-Loedin I, Tecson-Mendoza EM, Wissuwa M, Heuer S (2012) The protein kinase Pstol1 from traditional rice confers tolerance of phosphorus deficiency. Nature **488:** 535–539

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 **18:** 2680–2693

Guinel FC, Larue TA (1992) Ethylene inhibitors partly restore nodulation to pea mutant E 107 (*brz*). Plant Physiol **99:** 515–518

Heidstra R, Yang WC, Yalcin Y, Peck S, Emons AM, van Kammen A, Bisseling T (1997) Ethylene provides positional information on cortical

Downloaded from on July 7, 2020 - Published by www.plantphysiol.org
Copyright © 2016 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

cell division but is not involved in Nod factor-induced root hair tip growth in *Rhizobium*-legume interaction. Development **124:** 1781–1787

Herrbach V, Remblière C, Gough C, Bensmihen S (2014) Lateral root formation and patterning in *Medicago truncatula*. J Plant Physiol **171:** 301–310

Herridge DF, Peoples MB, Boddey RM (2008) Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. Plant Soil **311:** 1–18

Huault E, Laffont C, Wen J, Mysore KS, Ratet P, Duc G, Frugier F (2014) Local and systemic regulation of plant root system architecture and symbiotic nodulation by a receptor-like kinase. PLoS Genet **10:** e1004891

Imin N, Mohd-Radzman NA, Ogilvie HA, Djordjevic MA (2013) The peptide-encoding CEP1 gene modulates lateral root and nodule numbers in *Medicago truncatula*. J Exp Bot **64:** 5395–5409

Jensen E, Peoples M, Boddey R, Gresshoff P, Hauggaard-Nielsen H, Alves B, Morrison M (2012) Legumes for mitigation of climate change and the provision of feedstock for biofuels and biorefineries. A review. Agron Sustain Dev **32:** 329–364

Jeudy C, Ruffel S, Freixes S, Tillard P, Santoni AL, Morel S, Journet E-P, Duc G, Gojon A, Lepetit M, Salon C (2010) Adaptation of *Medicago truncatula* to nitrogen limitation is modulated via local and systemic nodule developmental responses. New Phytol **185:** 817–828

Jin J, Watt M, Mathesius U (2012) The autoregulation gene SUNN mediates changes in root organ formation in response to nitrogen through alteration of shoot-to-root auxin transport. Plant Physiol **159:** 489–500

Kaló P, Gleason C, Edwards A, Marsh J, Mitra RM, Hirsch S, Jakab J, Sims S, Long SR, Rogers J, et al (2005) Nodulation signaling in legumes requires NSP2, a member of the GRAS family of transcriptional regulators. Science **308:** 1786–1789

Kassaw T, Jr., Jr WB, Frugoli J (2015) Multiple autoregulation of nodulation (AON) signals identified through split root analysis of *Medicago truncatula sunn* and *rdn1* mutants. Plants (Basel) **4:** 209–224

Kusumawati L, Imin N, Djordjevic MA (2008) Characterization of the secretome of suspension cultures of *Medicago* species reveals proteins important for defense and development. J Proteome Res **7:** 4508–4520

Larrainzar E, Riely BK, Kim SC, Carrasquilla-Garcia N, Yu HJ, Hwang HJ, Oh M, Kim GB, Surendrarao AK, Chasman D, et al (2015) Deep sequencing of the *Medicago truncatula* root transcriptome reveals a massive and early interaction between Nod factor and ethylene signals. Plant Physiol **169:** 233–265

Lerouge P, Roche P, Faucher C, Maillet F, Truchet G, Promé JC, Dénarié J (1990) Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. Nature **344:** 781–784

Lévy J, Bres C, Geurts R, Chalhoub B, Kulikova O, Duc G, Journet EP, Ané JM, Lauber E, Bisseling T, et al (2004) A putative Ca^{2+} and calmodulin-dependent protein kinase required for bacterial and fungal symbioses. Science **303:** 1361–1364

Miwa H, Sun J, Oldroyd GED, Downie JA (2006) Analysis of calcium spiking using a cameleon calcium sensor reveals that nodulation gene expression is regulated by calcium spike number and the developmental status of the cell. Plant J **48:** 883–894

Mohd-Radzman NA, Binos S, Truong TT, Imin N, Mariani M, Djordjevic MA (2015) Novel MtCEP1 peptides produced *in vivo* differentially regulate root development in *Medicago truncatula*. J Exp Bot **66:** 5289–5300

Mortier V, Den Herder G, Whitford R, Van de Velde W, Rombauts S, D'Haeseleer K, Holsters M, Goormachtig S (2010) CLE peptides control *Medicago truncatula* nodulation locally and systemically. Plant Physiol **153:** 222–237

Mortier V, De Wever E, Vuylsteke M, Holsters M, Goormachtig S (2012) Nodule numbers are governed by interaction between CLE peptides and cytokinin signaling. Plant J **70:** 367–376

Ogilvie HA, Imin N, Djordjevic MA (2014) Diversification of the C-TERMINALLY ENCODED PEPTIDE (CEP) gene family in angiosperms, and evolution of plant-family specific CEP genes. BMC Genomics **15:** 870

Ohyama K, Ogawa M, Matsubayashi Y (2008) Identification of a biologically active, small, secreted peptide in *Arabidopsis* by in silico gene screening, followed by LC-MS-based structure analysis. Plant J **55:** 152–160

Oldroyd GED (2013) Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. Nat Rev Microbiol **11:** 252–263

Oldroyd GE, Engstrom EM, Long SR (2001) Ethylene inhibits the Nod factor signal transduction pathway of *Medicago truncatula*. Plant Cell **13:** 1835–1849

Oldroyd GED, Murray JD, Poole PS, Downie JA (2011) The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. Annu Rev Genet **45:** 119–144

Penmetsa RV, Cook DR (1997) A legume ethylene-insensitive mutant hyperinfected by its rhizobial symbiont. Science **275:** 527–530

Penmetsa RV, Frugoli JA, Smith LS, Long SR, Cook DR (2003) Dual genetic pathways controlling nodule number in *Medicago truncatula*. Plant Physiol **131:** 998–1008

Penmetsa RV, Uribe P, Anderson J, Lichtenzveig J, Gish J-C, Nam YW, Engstrom E, Xu K, Sckisel G, Pereira M, et al (2008) The *Medicago truncatula* ortholog of Arabidopsis EIN2, sickle, is a negative regulator of symbiotic and pathogenic microbial associations. Plant J **55:** 580–595

Plet J, Wasson A, Ariel F, Le Signor C, Baker D, Mathesius U, Crespi M, Frugier F (2011) MtCRE1-dependent cytokinin signaling integrates bacterial and plant cues to coordinate symbiotic nodule organogenesis in *Medicago truncatula*. Plant J **65:** 622–633

Rightmyer AP, Long SR (2011) Pseudonodule formation by wild-type and symbiotic mutant *Medicago truncatula* in response to auxin transport inhibitors. Mol Plant Microbe Interact **24:** 1372–1384

Ruffel S, Freixes S, Balzergue S, Tillard P, Jeudy C, Martin-Magniette ML, van der Merwe MJ, Kakar K, Gouzy J, Fernie AR, et al (2008) Systemic signaling of the plant nitrogen status triggers specific transcriptome responses depending on the nitrogen source in *Medicago truncatula*. Plant Physiol **146:** 2020–2035

Sargent L, Huang SZ, Rolfe BG, Djordjevic MA (1987) Split-root assays using *Trifolium subterraneum* show that *Rhizobium* infection induces a systemic response that can inhibit nodulation of another invasive *Rhizobium* strain. Appl Environ Microbiol **53:** 1611–1619

Saur IM, Oakes M, Djordjevic MA, Imin N (2011) Crosstalk between the nodulation signaling pathway and the autoregulation of nodulation in *Medicago truncatula*. New Phytol **190:** 865–874

Schnabel E, Journet EP, de Carvalho-Niebel F, Duc G, 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

Searle IR, Men AE, Laniya TS, Buzas DM, Iturbe-Ormaetxe I, Carroll BJ, Gresshoff PM (2003) Long-distance signaling in nodulation directed by a CLAVATA1-like receptor kinase. Science **299:** 109–112

Smit P, Raedts J, Portyanko V, Debellé F, Gough C, Bisseling T, Geurts R (2005) NSP1 of the GRAS protein family is essential for rhizobial Nod factor-induced transcription. Science **308:** 1789–1791

Tabata R, Sumida K, Yoshii T, Ohyama K, Shinohara H, Matsubayashi Y (2014) Perception of root-derived peptides by shoot LRR-RKs mediates systemic N-demand signaling. Science **346:** 343–346

Timmers AC, Auriac MC, Truchet G (1999) Refined analysis of early symbiotic steps of the *Rhizobium-Medicago* interaction in relationship with microtubular cytoskeleton rearrangements. Development **126:** 3617–3628

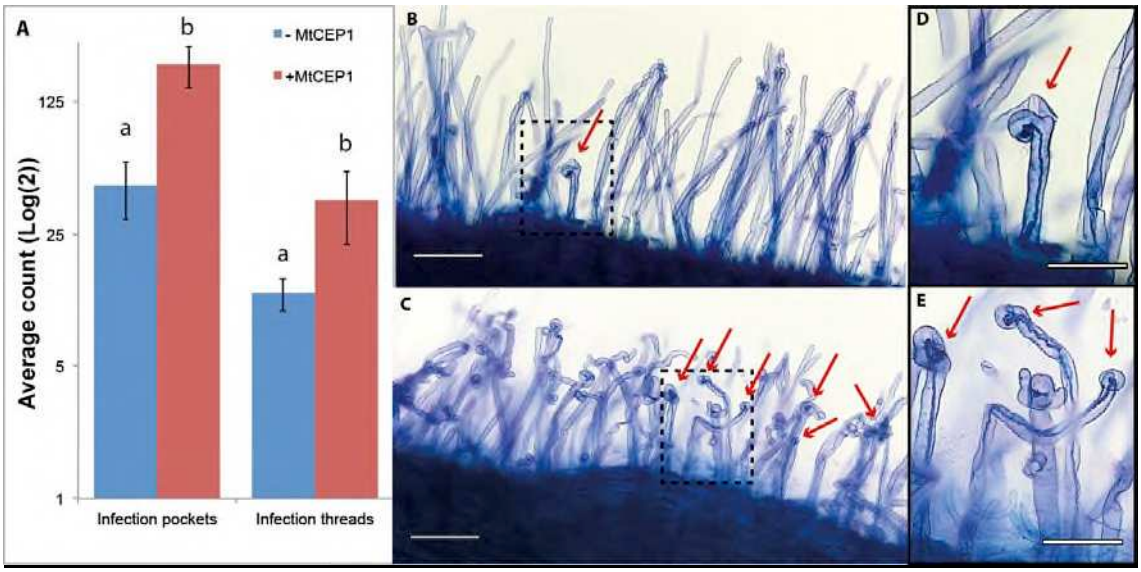
van Zeijl A, Op den Camp RH, Deinum EE, Charnikhova T, Franssen H, Op den Camp HJ, Bouwmeester H, Kohlen W, Bisseling T, Geurts R (2015) *Rhizobium* lipo-chitooligosaccharide signaling triggers accumulation of cytokinins in *Medicago truncatula* roots. Mol Plant **8:** 1213–1226

Vasse JM, Truchet GL (1984) The Rhizobium-legume symbiosis: observation of root infection by bright-field microscopy after staining with methylene blue. Planta **161:** 487–489

Xiao TT, Schilderink S, Moling S, Deinum EE, Kondorosi E, Franssen H, Kulikova O, Niebel A, Bisseling T (2014) Fate map of *Medicago truncatula* root nodules. Development **141:** 3517–3528

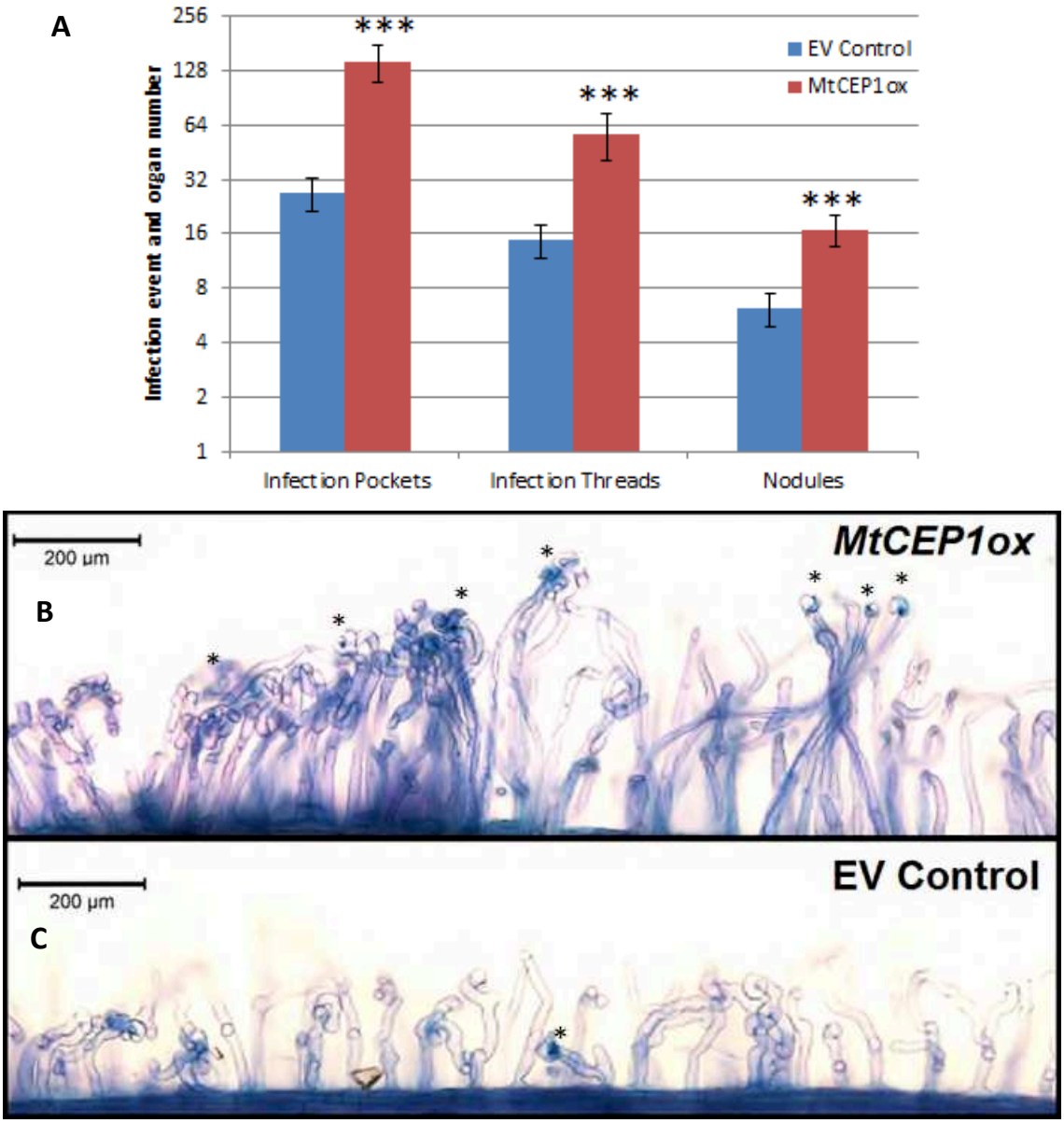
Downloaded from on July 7, 2020 - Published by www.plantphysiol.org
Copyright © 2016 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

Supplemental information



Supplemental Figure S1. Assessment of the MtCEP1 peptide effect on infection thread and infection pocket formation.

(A) Plants were grown on an N-free Fåhraeus medium with or without the MtCEP1 peptide and analysed 72 h post inoculation with the *S. meliloti* WSM1022 strain. A methylene blue staining was used to assess the number of infection pockets and infection threads (One-way ANOVA, $P < 0.001$, N=12). (B-E) Representative images of infection threads (indicated by red arrows) formed on roots without (B) or with (C) MtCEP1. The corresponding boxed regions are magnified in D and E (Scale bars in B-C = 200 µm and in D-E = 100 µm).



Supplemental Figure 2. *MtCEP1ox* effect on infection thread and infection pocket formation.

(A) Transformed plants were transferred to an N-free Fåhraeus medium for four days before inoculation with the *S. meliloti* WSM1022 strain. A methylene blue staining was used to assess the number of infection pockets, infection threads and nodule number in *MtCEP1*oxerexpressing plants *(MtCEP1ox*) relatively to an empty vector (EV) control (Student's t-test, $p<0.001$, n=9 for infection pockets and threads; and Student's t-test, $p<0.001$, n=7 for nodule number). (B,

26 C) Representative images of infection threads formed in *MtCEP1ox*
27 transformed roots (B) or EV control roots (C).

28

29

CHAPITRE II:

Relations entre la voie de signalisation médiée par le récepteur CRA2 et la voie de l'AON médiée par SUNN

I. Introduction et article 2 :

"Independent Regulation of Symbiotic Nodulation by the SUNN Negative and CRA2 Positive Systemic Pathways" Laffont C., Huault E., Gautrat P., Endre G., Kalo P., Bourion V., Duc G., and Frugier F. Plant Physiology, 180:559-570 (2019)

Dans le chapitre précédent, nous avons montré que la voie de signalisation impliquant le peptide CEP1 et le récepteur CRA2 régule systémiquement et positivement le nombre de nodosités formées, et donc agit de manière antagoniste avec la voie systémique AON inhibitrice de la nodulation médiée par les peptides CLE12/13 et le récepteur SUNN **(Figure 46)**. Le fonctionnement de ces deux voies de régulations systémiques implique une production locale de peptides dans les racines en réponse à la carence en azote (CEP) ou en réponse à rhizobium (CLE), et leur perception par des récepteurs, CRA2 et SUNN respectivement, au niveau des parties aériennes. Ces deux voies systémiques régulant le nombre de nodosités de manière opposée, nous avons émis l'hypothèse qu'une coordination devrait exister afin de permettre à la plante d'activer ou d'inhiber la formation de nodosités de manière dynamique en fonction des variations temporelles et spatiales des conditions nutritionnelles perçues par les racines (présence/carence d'azote et de rhizobia) et par les parties aériennes (conditions de lumière déterminant la capacité de photosynthèse), ainsi que du statut nutritionnel global de demande ou de satiété de la plante en azote.

Afin d'établir s'il existe ou non un lien entre les voies systémiques CRA2 et SUNN, nous avons tout d'abord développé une approche génétique en analysant le phénotype de nodulation d'un double mutant *cra2;sunn*, ainsi que les effets croisés des peptides CLE13 chez le mutant *cra2* et des peptides CEP1 chez le mutant *sunn*. Un allèle nul du mutant *sunn,* insensible à la surexpression du peptide CLE13, ayant été identifié seulement dans le génotype Jemalong A17 de *M. truncatula* (*sunn4* ; Mortier et al., 2012), et les mutants *cra2* n'étant disponibles que dans le fond génétique R108 (Huault et al., 2014), nous avons tout d'abord recherché des mutants *cra2* dans le fond génétique Jemalong A17. Nous avons ainsi pu caractériser cinq nouveaux allèles mutants *cra2*, identifiés dans des banques de mutants issus de mutagénèse chimique, en collaboration avec le Dr. Gérard Duc (Unité d'Agroécologie, INRAE-Dijon), ou insertionnelle, en collaboration avec les Dr. Peter Kalo et

Gabriella Endre (National Agricultural and Innovation Center, Agricultural Biotechnology Institute, Godollo, Hongrie ; et Institute of Plant Biology, Biological Research Centre, Szeged, Hongrie, respectivement), ces mutants ayant une force phénotypique équivalente aux allèles précédemment identifiés dans le fond génétique R108 (Huault et al., 2014), à la fois pour leur nombre de RLs et de nodosités.

Afin de comprendre plus précisément quelle(s) étape(s) de la formation des nodosités étai(en)t affectée(s) dans le mutant *cra2*, nous avons analysé la capacité du mutant (i) à activer le marqueur d'infection symbiotique *ENOD11*, (ii) à être infecté par les rhizobia, et (iii) à former des nodosités spontanées, en l'absence de rhizobia. Nos données montrent que la réponse du mutant *cra2* est altérée au niveau de ces trois processus symbiotiques. Comme dans le cas des allèles *cra2* identifiés dans le fond génétique R108 (Huault et al., 2014), des expériences de greffes ont permis de montrer que le récepteur CRA2 agit depuis les parties aériennes pour contrôler la nodulation, et dans la racine pour réguler le nombre de RLs.

Après avoir caractérisé ces nouveaux allèles mutants *cra2*, nous avons donc généré un double mutant *cra2;sunn* et analysé ses phénotypes de nodulation par rapport aux simples mutants et aux plantes sauvages. Le nombre de nodosités du double mutant *cra2;sunn* est intermédiaire entre celui, réduit, du simple mutant *cra2*, et celui, élevé, du mutant *sunn*, suggérant une indépendance des deux voies de signalisation systémiques. Afin de valider ce résultat par une approche alternative, nous avons ensuite d'une part surexprimé le peptide CLE13 dans le mutant *cra2*, et montré que malgré la capacité de nodulation déjà réduite de ce mutant, le peptide CLE13 pouvait inhiber encore plus le nombre de nodosités de *cra2* ; et d'autre part, diminué par une stratégie d'ARN interférence le niveau des transcrits de *CLE13*, ce qui a permis d'augmenter le nombre de nodosités non seulement dans les plantes sauvages mais aussi dans le mutant *cra2*. Ces données indiquent au final que l'action inhibitrice du peptide CLE13 sur la nodulation ne requiert pas l'activité du récepteur CRA2, et que ces deux voies systémiques régulant la formation des nodosités de manière antagoniste fonctionnent indépendamment.

J'ai réalisé la plupart des expériences de cet article, à l'exception des greffes. En ce qui concerne les applications exogènes de peptide CEP1, j'ai réalisé la moitié des répliques biologiques utilisées dans l'article. Enfin, j'ai aussi réalisé l'ensemble des figures et écrit une première version du manuscrit.

Check for updates

Independent Regulation of Symbiotic Nodulation by the SUNN Negative and CRA2 Positive Systemic Pathways[1]

Carole Laffont,[a] Emeline Huault,[a] Pierre Gautrat,[a] Gabriella Endre,[b] Peter Kalo,[c] Virginie Bourion,[d] Gérard Duc,[d] and Florian Frugier[a,2,3]

[a]Institute of Plant Sciences Paris-Saclay, Centre National de la Recherche Scientifique, Université Paris Sud, Université Paris Diderot, Institut National de la Recherche Agronomique, Université d'Evry, Université Paris-Saclay, 91190 Gif-sur-Yvette, France
[b]Institute of Plant Biology, Biological Research Centre, 6726 Szeged, Hungary
[c]National Agricultural and Innovation Center, Agricultural Biotechnology Institute, 2100 Godollo, Hungary
[d]Agroécologie, Institut National de la Recherche Agronomique, AgroSup Dijon, Université Bourgogne Franche-Comté, 21065 Dijon, France

ORCID IDs: 0000-0002-8447-1736 (C.L.); 0000-0002-0404-8904 (P.K.); 0000-0002-2921-3152 (G.D.); 0000-0002-9783-7418 (F.F.).

Plant systemic signaling pathways allow the integration and coordination of shoot and root organ metabolism and development at the whole-plant level depending on nutrient availability. In legumes, two systemic pathways have been reported in the *Medicago truncatula* model to regulate root nitrogen-fixing symbiotic nodulation. Both pathways involve leucine-rich repeat receptor-like kinases acting in shoots and proposed to perceive signaling peptides produced in roots depending on soil nutrient availability. In this study, we characterized in the *M. truncatula* Jemalong A17 genotype a mutant allelic series affecting the Compact Root Architecture2 (CRA2) receptor. These analyses revealed that this pathway acts systemically from shoots to positively regulate nodulation and is required for the activity of carboxyl-terminally encoded peptides (CEPs). In addition, we generated a double mutant to test genetic interactions of the CRA2 systemic pathway with the CLAVATA3/EMBRYO SURROUNDING REGION peptide (CLE)/Super Numeric Nodule (SUNN) receptor systemic pathway negatively regulating nodule number from shoots, which revealed an intermediate nodule number phenotype close to the wild type. Finally, we showed that the nitrate inhibition of nodule numbers was observed in *cra2* mutants but not in *sunn* and *cra2 sunn* mutants. Overall, these results suggest that CEP/CRA2 and CLE/SUNN systemic pathways act independently from shoots to regulate nodule numbers.

Plant growth capacity is linked to the developmental plasticity of the root system, allowing acclimatization to heterogenous and changing soil nutrient availability and stress environmental conditions (Malamy, 2005; Giehl and von Wirén, 2014). These extrinsic signals are perceived locally and relayed by endogenous cues that can act either locally and/or at long distance through the whole plant (De Kroon et al., 2009). This implies that systemic signaling pathways acting between organs through the vasculature allow an integration of local environmental conditions and the coordination of root and shoot metabolism, development, and growth. These systemic pathways are critical to allow plants to optimize nutrient uptake and to set up a foraging behavior adapted to local environmental conditions (De Kroon et al., 2009; Giehl and von Wirén, 2014). Root system architecture is determined by root growth and branching to generate lateral roots. Various endogenous cues have been shown to locally and systemically regulate root system architecture, including nonpeptide and peptide hormones (Malamy, 2005; Giehl and von Wirén, 2014). Among those, CLAVATA3/EMBRYO SURROUNDING REGION (CLE)-secreted signaling peptides are produced within a specific domain of Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*) shoot and root apical meristems and act locally on stem cell division and/or differentiation (Tavormina et al., 2015; Oh et al., 2018). These CLE peptides bind to the CLAVATA1 leucine-rich repeat receptor-like kinase (LRR-RLK) that is specifically expressed in a neighboring domain as the one where CLE peptides are produced, allowing the definition of positional information. A related CLE/LRR-RLK signaling module involving CLE peptides induced

[1]This work was supported by the French-Hungarian bilateral NKTH-ANR LEGUMICS project (TÉT_10-1-2011-0397) and the ANR (2010-INTI3-1602-01 project) as well as the Hungarian National Research Fund (OTKA-105852). P.G was supported by a fellowship from the Paris Sud/Paris-Saclay University and E.H. by the LEGUMICS ANR project.

[2]Author for contact: florian.frugier@cnrs.fr.
[3]Senior author.
The author responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors (www.plantphysiol.org) is: Florian Frugier (florian.frugier@cnrs.fr).

F.F. designed the study; C.L., E.H., and P.G. performed the experiments; G.E., P.K., V.B., and G.D. provided the genetic material; C.L. and F.F. wrote the article.

www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.18.01588

 © 2019 American Society of Plant Biologists. All Rights Reserved.

by N deficiency was more recently shown to repress lateral root primordia expansion, therefore contributing to the regulation of root foraging responses, and was proposed to act systemically (Araya et al., 2014a, 2014b).

In legume (Fabaceae) plants, the root system forms another type of lateral organ, the symbiotic N-fixing nodule (Oldroyd, 2013; Suzaki et al., 2015), which is a metabolic and developmental adaptation to N-limiting conditions. Root nodules are formed following a symbiotic interaction with specific soil bacteria collectively referred to as rhizobia. Nodule initiation relies on the coordination of different processes: first, the perception of environmental conditions permissive for symbiotic nodulation, namely, a limited soil N availability and the presence of compatible rhizobia; second, rhizobial infections initiating in epidermal root hairs and leading to the formation of infection threads (ITs) that allow bacteria to progress from root hairs to root inner cortical cell layers; and third, an organogenesis program that is simultaneously initiated, involving cortical and pericycle cell divisions as well as the breaching of the endodermis to form a nodule primordium that will be reached by ITs filled with rhizobia progressing from root outer cell layers (Timmers et al., 1999; Xiao et al., 2014). The nodule primordium then differentiates into a mature nodule in which symbiotic bacteria fix atmospheric N into ammonium, an N source that can be metabolized by plant cells. The interaction between plant and rhizobia initiates a molecular dialog where N-limited plants secrete flavonoids that attract bacteria, which in turn produce nodulation factors (NFs; Oldroyd, 2013; Suzaki et al., 2015). Perception of NFs by the plant triggers the transcriptional regulation of nodulation genes, so-called early nodulin genes, such as *EARLY NODULIN11* (*ENOD11*) that is expressed at symbiotic recognition (preinfection) and infection stages (Journet et al., 2001). *ENOD11* is therefore considered as a quantitative marker to evaluate the strengths of early symbiotic signaling and infection responses to rhizobia.

Nodule formation is an energy-consuming process that plants tightly control for costs and benefits depending on their photosynthetic capacities or on soil N availability (Suzaki et al., 2015). A regulatory pathway negatively controlling nodule number, so-called Autoregulation of Nodulation (AON; Caetano-Anollés and Gresshoff, 1991), was initially characterized through the identification of hypernodulation or supernodulation mutants that were affected in an LRR-RLK from the subclass XI acting in shoots, as shown by grafting experiments. This receptor is most closely related to the Arabidopsis CLAVATA1 protein and is referred to as Super Numeric Nodules (SUNN) in *Medicago truncatula*, Hypernodulation and Aberrant Root in *Lotus japonicus*, and Nodule Autoregulation Receptor Kinase in soybean (*Glycine max*; Krusell et al., 2002; Searle et al., 2003; Schnabel et al., 2005). The current AON model proposes that the expression of CLE peptide-encoding genes is induced at an early nodulation stage, such as *CLE12* and *CLE13* in *M. truncatula*, *CLE-Root Signal1* (*CLE-RS1*), *CLE-RS2*, and *CLE-RS3* in *L. japonicus*, and *Rhizobia-Induced CLE1* (*GmRIC1*) and *GmRIC2* in soybean (Okamoto et al., 2009; Mortier et al., 2010; Reid et al., 2011; Nishida et al., 2016). More recently, additional *CLE* genes regulated by rhizobium inoculation were identified (Jardinaud et al., 2016; de Bang et al., 2017; Imin et al., 2018; Hastwell et al., 2019). These peptides would be then translocated from nodulated roots to shoots through the xylem vasculature to bind the LRR-RLK receptors previously mentioned (Okamoto et al., 2013; Suzaki et al., 2015; Imin et al., 2018). Integration of shoot metabolic signals would modulate the production of shoot-to-root systemic signals moving across the phloem to inhibit the formation of additional supernumerary nodules (Suzaki et al., 2015). A striking feature of the supernodulation/hypernodulation mutants is that the excessive nodulation phenotype is also observed under high-nitrate conditions that are inhibitory to the wild-type plant nodulation (Carroll et al., 1985; Sagan et al., 1995; Krusell et al., 2002; Schnabel et al., 2005; Jeudy et al., 2010; Okamoto and Kawaguchi, 2015). This suggested that AON and nitrate inhibitory pathways may be at least partially overlapping.

A second systemic pathway acting from shoots to positively regulate nodulation was more recently identified in the *M. truncatula* model. The *cra2* (*compact root architecture2*) mutant identified in the R108 genotype indeed forms a reduced number of nodules but also an increased number of lateral roots (Huault et al., 2014). The *CRA2* gene encodes an LRR-RLK receptor from the same subclass XI as SUNN, and grafting experiments indicated that CRA2 positively controls nodule number from shoots and negatively controls the number of lateral roots from roots. The expression of genes encoding another family of secreted signaling peptides than CLE, referred to as CEPs (for C-terminally Encoded Peptides), was found to be mostly associated with N deficiency conditions, and exogenous applications of MtCEP1 peptides negatively regulated lateral root formation and positively regulated nodulation (Imin et al., 2013). Interestingly, these exogenous applications of MtCEP1 peptides required the CRA2 receptor to regulate both nodule and lateral root number (Mohd-Radzman et al., 2016). Accordingly, the LRR-RLK most closely related to CRA2 in Arabidopsis is a CEP Receptor (CEPR1) directly binding AtCEP1 peptides to regulate N-demand signaling (Tabata et al., 2014). This highlights that in *M. truncatula* also, CEP peptides are likely candidates to be CRA2 ligands, although no direct binding evidence has been provided yet (Mohd-Radzman et al., 2016).

Altogether, these results indicate that at least in the *M. truncatula* model legume, two systemic pathways regulate the number of nodules from shoots: under N-limiting conditions, the CEP/CRA2 pathway positively regulates nodulation, whereas during

nodule formation, activation of the CLE/SUNN negative AON pathway limits the number of additional nodules formed. Plants are continuously challenged by fluctuating environmental conditions (Giehl and von Wirén, 2014): different parts of root and shoot systems perceive spatial heterogeneity for beneficial or detrimental conditions as well as a temporal heterogeneity of resources availability throughout the plant life cycle. We therefore hypothesized that a dynamic regulation of negative and positive systemic pathways regulating nodulation should exist to fine-tune nodule number depending on nutrient availability. We then analyzed the genetic interaction between CRA2 and SUNN pathways. To this aim, we first identified and characterized a *cra2* mutant allelic series in the *M. truncatula* Jemalong A17 genotype where a presumptive null *sunn* mutant allele was previously reported (*sunn-4*; Saur et al., 2011; Mortier et al., 2012). This allowed us to generate a *cra2 sunn* double mutant to analyze the genetic interaction between these two systemic pathways. We additionally tested interactions between AON-related CLE peptides and the CRA2 pathway. Finally, as the nitrate inhibition of nodule numbers is lost in the *sunn* mutant, we analyzed how *cra2* and *cra2 sunn* mutant nodulation was affected by nitrate.

RESULTS

The *cra2* Mutant Forms an Increased Number of Lateral Roots and a Reduced Number of Symbiotic Nodules

Forward genetic screens in a *Tnt1* insertional mutant collection generated in the *M. truncatula* Jemalong A17-2HA genotype and in a γ-ray mutant collection generated in the Jemalong A17 genotype were performed to identify mutants showing a compact root system architecture phenotype (so-called *cra*; Fig. 1A). As mutants with a *cra* phenotype were previously identified in the *M. truncatula* R108 genotype and shown to be affected in an LRR-RLK referred to as MtCRA2 (Huault et al., 2014), the entire *MtCRA2* locus was sequenced in the five *cra* mutant lines recovered. Genetic lesions were identified in the MtCRA2 coding region in these five allelic lines, corresponding to insertions of a transposon in the *cra2-11* and *cra2-14* alleles, to a nucleotide insertion in the *cra2-12* allele leading to a frame shift, or to nucleotide substitutions in the *cra2-13* (previously

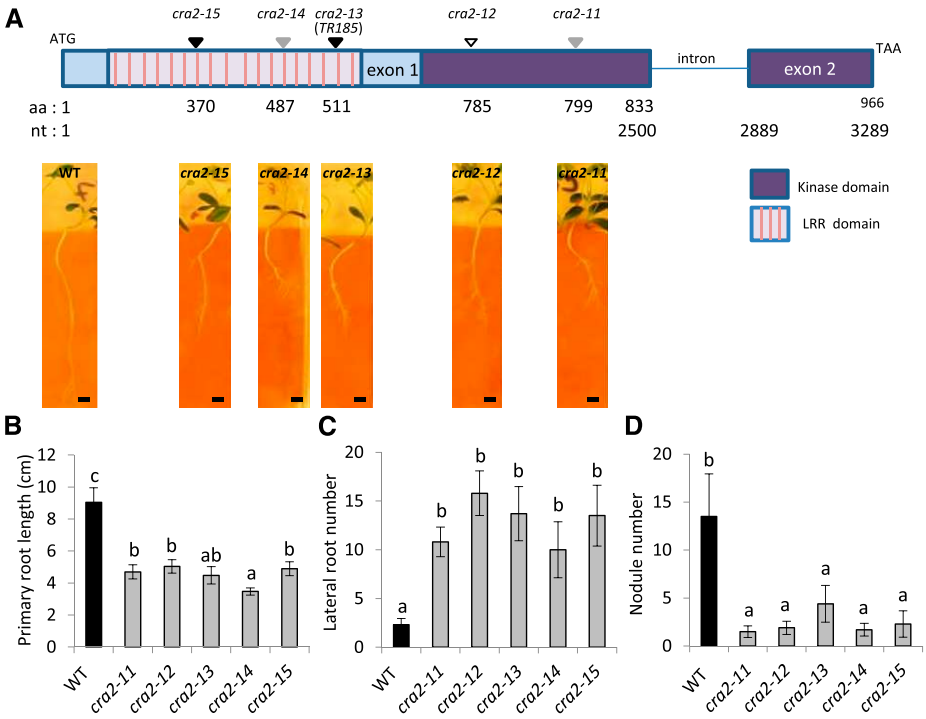


Figure 1. Identification of *cra2* mutant alleles in the *M. truncatula* Jemalong A17 genotype. A, Localization of transposon insertions (gray arrowheads), a nucleotide insertion (white arrowhead), or point mutations (black arrowheads) in *cra2* mutants identified in the *M. truncatula* Jemalong A17 genotype, as well as representative images of the phenotypes of the mutant alleles grown in vitro on a low-N medium for 14 d. aa, Amino acid; nt, nucleotide. Bars = 0.5 cm. B, Quantification of the primary root length of wild-type (WT) or *cra2-11* to *cra2-15* mutant plants grown in vitro on a low-N medium. C, Quantification of the lateral root number of wild-type or *cra2-11* to *cra2-15* mutant plants grown in vitro on a low-N medium. D, Quantification of nodule number of wild-type or *cra2-11* to *cra2-15* mutant plants 4 weeks postinoculation with rhizobium. In B to D, error bars represent confidence intervals (α = 0.05; n = 10), and a Kruskal-Wallis test was used to assess significant differences, as indicated by lowercase letters ($\alpha < 0.01$). One representative biological experiment out of two is shown.

named *TR185*; Bourion et al., 2014) and *cra2-15* alleles (Supplemental Fig. S1A). These mutations consequently introduced premature stop codons in the LRR region (at positions 487 and 511 in *cra2-14* and *cra2-13* alleles, respectively), in the kinase domain (at positions 785 and 799 in *cra2-12* and *cra2-11* alleles, respectively), or in an Asn-to-Tyr amino acid conversion in the LRR region at position 370 in the case of the *cra2-15* allele (Fig. 1A; Supplemental Fig. S1B).

To evaluate the strength of these different *cra2* mutant alleles, a quantification of root length and of the number of lateral roots was performed, revealing that all mutants similarly have a shorter primary root (Fig. 1B) as well as an increased number of emerged lateral roots (Fig. 1C). Despite this strong root phenotype, *cra2* mutant plants grown on N-rich medium were not dwarfs, as illustrated 2 months after germination in Supplemental Figure S2A. In agreement with this, quantification of shoot dry weight at the end of the plant growth cycle was not significantly different from that of wild-type plants (Supplemental Fig. S2B).

The symbiotic nodulation phenotype of the different *cra2* alleles was then analyzed, revealing that all mutant alleles developed a similarly lower number of nodules (Fig. 1D), indicating that the five Jemalong A17 alleles are also similar for their nodule phenotypic strength. To determine if the *cra2* low-nodulation phenotype may be the consequence of a shoot growth defect, we quantified shoot and root biomass in a nodulation kinetic from 8 d postinoculation (dpi) with rhizobium to 35 dpi (Supplemental Fig. S3). This analysis revealed that at the early stage (8 dpi), a lower number of nodules was already detected in *cra2* mutants (Supplemental Fig. S3A), whereas their shoot and root biomass was not significantly different from the wild type (Supplemental Fig. S3, B–D). At later stages, shoot and root biomass of the *cra2* mutants becomes significantly lower.

We additionally analyzed the nodule weight of *cra2* mutant nodules, which was similar to the wild type (Supplemental Fig. S4A). We then assessed the capacity of the nodules to fix atmospheric N using an acetylene reduction assay (ARA; Supplemental Fig. S4, B and C). Even though, overall, *cra2* plants had a significantly reduced ability to fix atmospheric N due to the lower number of nodules formed (Supplemental Fig. S4D), *cra2* nodules maintained a wild-type capacity to fix N when the nodule weight was considered to normalize ARA (specific ARA activity; Supplemental Fig. S4B). This was in agreement with the observation that both wild-type and *cra2* mutant nodules have a similar elongated shape and a pink color associated with leghemoglobin pigments that are required for an active N fixation (Supplemental Fig. S4E).

Early Symbiotic Signaling, Rhizobial Infections, and Spontaneous Nodule Formation Are Reduced in *cra2* Mutants

To determine which early symbiotic processes were altered in the *cra2* mutant, we analyzed successively their ability to (1) activate an early nodulation response, (2) become infected by rhizobia, and (3) form so-called spontaneous nodules independently of the presence of rhizobia. The expression of the *MtENOD11* symbiotic marker was first analyzed by real-time reverse transcription (RT)-PCR shortly after rhizobium inoculation, revealing that the induction observed in wild-type roots was reduced in *cra2* mutants (Fig. 2A). However, the comparison of expression levels between 1 and 2 dpi with rhizobium suggested rather a delayed response in the *cra2* mutant than an inability to perceive rhizobial bacteria and to activate an early symbiotic response.

We then analyzed if the number and progression of symbiotic ITs were affected in *cra2* mutants, using a rhizobium strain constitutively expressing a *LacZ* marker. An overall reduced number of ITs was detected in *cra2* roots, and the number of ITs that reached the root epidermis or the root cortex was lower than in wild-type roots (Fig. 2B). This suggests that the *cra2* mutant has a reduced ability to be infected by symbiotic rhizobia.

Finally, the ability of *cra2* mutants to form nodules in the absence of symbiotic bacteria was evaluated in roots ectopically expressing the kinase domain of the *Does Not Make Infections2/Symbiosis Receptor Kinase* (*DMI2/SYMRK*) early symbiotic gene, previously shown to efficiently induce the formation of spontaneous nodules in *M. truncatula* and other legumes, which are notably characterized by a peripheral vasculature similar to infected N-fixing nodules (Ried et al., 2014; Saha et al., 2014; Fig. 2C). *cra2* mutants formed significantly fewer spontaneous nodules in the absence of rhizobia than wild-type plants (Fig. 2D), indicating that independently of a symbiotic bacterial infection trigger, the ability to form nodules is reduced in *cra2* mutants.

CRA2 Regulates Antagonistically Lateral Root Formation and Symbiotic Nodule Formation and Is Required for MtCEP1 Peptide Action

To determine if the CRA2 pathway regulates nodule and lateral root number depending on its activity on roots and/or shoots, we performed grafting experiments with *cra2-11* and *cra2-12* alleles (Fig. 3; Supplemental Fig. S5). The compact root phenotype was observed only in grafting combinations associating *cra2* mutant roots with wild-type shoots (Fig. 3, A and B; Supplemental Fig. S5, A and B), indicating that CRA2 activity is required in roots to regulate root system architecture. No significant difference in shoot dry weight was observed between the various grafting combinations (Fig. 3, C and D; Supplemental Fig. S5, C and D), suggesting that the compact root architecture phenotype is not indirectly caused by a major shoot growth phenotype. Concerning nodulation, only the *cra2*/wild-type grafts showed the low-nodulation phenotype (Fig. 3, B and E; Supplemental Fig. S5, B and E), indicating that CRA2 activity is required in shoots to systemically regulate nodule

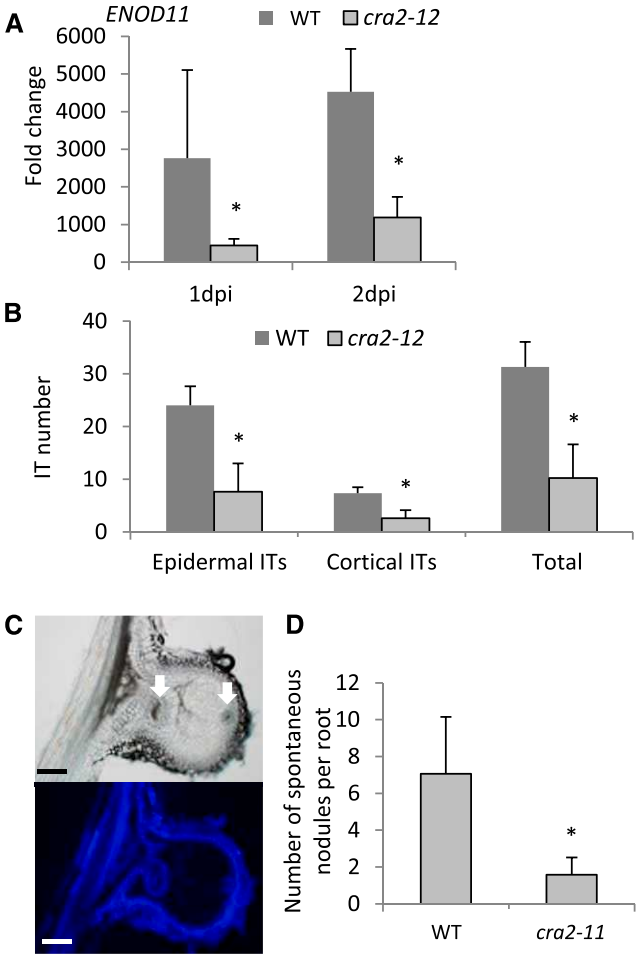


Figure 2. *ENOD11* expression, ITs, and spontaneous nodule number are reduced in *cra2* mutants. A, Expression analysis by real-time RT-PCR of the early nodulation marker *MtENOD11* in wild-type (WT) or *cra2-12* roots 1 or 2 dpi with rhizobium, normalized relative to expression levels in uninoculated control roots. Error bars represent SD from one representative biological experiment out of three. A Mann-Whitney test was used to assess significant differences indicated by asterisks ($\alpha < 0.05$; $n = 2$). B, Quantification of IT number in wild-type and *cra2-12* roots 6 dpi with a rhizobium strain constitutively expressing a LacZ reporter. ITs that reached the epidermis (Epidermal ITs) were distinguished from ITs that reached the cortex (Cortical ITs). Error bars represent confidence intervals ($\alpha = 0.05$; $n = 5$), and a Mann-Whitney test was used to assess significant differences, as indicated by asterisks ($\alpha < 0.05$). One representative biological experiment out of two is shown. C, Representative images of a section (50 μm) of a spontaneous nodule induced by the ectopic expression of a SYMRK-KD construct, in bright field (top) or under UV illumination (bottom) to visualize the blue autofluorescence of lignified cells and of the endodermis. White arrows indicate vascular bundles. Bars = 100 μm. D, Number of spontaneous nodules induced by the ectopic expression of a SYMRK-KD construct, per root of wild-type or *cra2-11* plants grown on a low-N medium for 5 weeks without rhizobium inoculation. Error bars represent confidence intervals ($\alpha = 0.05$; $n > 9$), and a Mann-Whitney test was used to assess significant differences, as indicated by the asterisk ($\alpha < 0.01$). One representative biological experiment out of two is shown.

number. Finally, the link with MtCEP signaling peptides was tested. An exogenous treatment with MtCEP1 peptides significantly decreased lateral root number and conversely increased nodule number in the wild type, and these two responses were abolished in *cra2* mutants (Fig. 4).

SUNN and CRA2 Pathways Act Independently to Regulate Nodule Number

To determine if a genetic interaction exists between the systemic positive CRA2 and negative SUNN pathways regulating nodulation, we generated *cra2 sunn* double mutants by crossing the *cra2-11* mutant with the *sunn-4* presumptive null allele available in the Jemalong A17 genotype (Mortier et al., 2012). Nodulation phenotyping revealed that *cra2* and *sunn* single mutants develop fewer and more nodules, respectively, than wild-type plants, as expected (Fig. 5, A–C). The *cra2 sunn* double mutant formed an intermediate number of nodules between *cra2* and *sunn* single mutants, which was also significantly different from wild-type plants (~2.5-fold higher). It was noticed that compared with wild-type plants, the nodule number in *cra2* mutants is decreased by a factor of about 3, whereas the nodule number is increased in *sunn* mutants by a factor of about 7. Thus, this likely explains that the nodule number in the *cra2 sunn* double mutant is approaching but not similar to the nodule number of wild-type plants. Interestingly, *cra2 sunn* double mutants develop a number of nodules that is even higher than wild-type plants despite a compact root architecture phenotype equivalent to that of *cra2* single mutants, as illustrated by representative images for each genotype in Figure 5B. This result first unambiguously demonstrates that the *cra2* mutation does not affect the ability of plants to form nodules but instead decreases their number, and second, that CRA2 and SUNN pathways independently regulate nodule number positively and negatively, respectively.

As an alternative to demonstrate relationships between CRA2 and SUNN systemic pathways, wild-type and *cra2* roots were transformed with an RNA interference (RNAi) construct designed to silence either GUS as a negative control or the *MtCLE13* gene previously shown to encode peptides negatively regulating nodule number depending on the SUNN receptor (Mortier et al., 2012). As expected, down-regulation of *MtCLE13* expression (Supplemental Fig. S6A) increased nodule number in wild-type plants (Fig. 5D). In the *cra2* mutant, an increased nodulation was similarly observed, indicating that the negative regulation of nodule number exerted by MtCLE13 peptides occurs independently or downstream of the CRA2 LRR-RLK receptor. Conversely, wild-type roots ectopically expressing *MtCLE13* (Supplemental Fig. S6B) strongly decreased the number of nodules in wild-type plants, as expected (Fig. 5E), compared with a non-nodulation-related

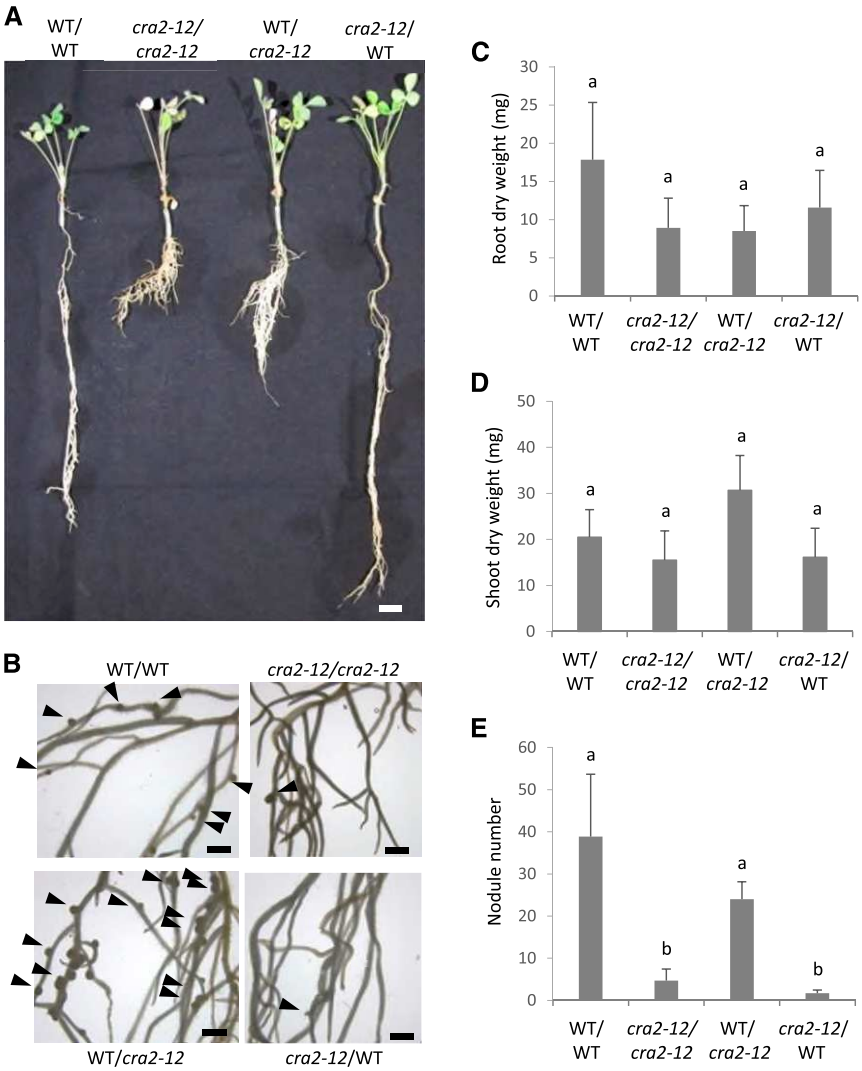


Figure 3. Symbiotic nodule number is controlled by CRA2 activity in shoots and lateral root number by CRA2 activity in roots. A, Representative images of different grafting combinations between wild-type (WT) or *cra2-12* plants grown in a perlite-sand mixture on a low-N medium 2 weeks postinoculation with rhizobium. Shoot/root grafting combinations are indicated above each plant. Bar = 2 cm. B, Details of nodulated roots of the different grafting combinations shown in A. Arrowheads indicate nodules. Bars = 0.2 cm. C, Quantification of the root dry weight (in milligrams) of the different wild-type/*cra2* grafting combinations. D, Quantification of the shoot dry weight (in milligrams) of the different wild-type/*cra2* grafting combinations. E, Quantification of the nodule number of the different wild-type/*cra2* grafting combinations. In C to E, error bars represent confidence intervals ($\alpha = 0.05$; $n > 9$), and a Kruskal-Wallis test was used to assess significant differences, as indicated by lowercase letters ($\alpha < 0.05$). One representative biological experiment out of two is shown.

MtCLE4 gene used as a negative control (Mortier et al., 2010). These results indicate that the inhibitory action of MtCLE13 peptides on nodulation is not compromised in *cra2* mutants.

The Nitrate Inhibition of Nodulation Occurs in *cra2* Mutants But Not in *sunn* or *cra2 sunn* Mutants

As the *sunn* mutant was previously reported to form more nodules than wild-type plants, not only in low-N conditions but also in the presence of N (Sagan et al., 1995), we tested if the nodulation capacity of the *cra2* and *cra2 sunn* mutants was affected or not by a nitrate treatment. The number of nodules was then comparatively analyzed in plants grown on a medium supplemented with 0.1 mM (low N) or 10 mM (high N) KNO_3 (Fig. 6A). On low N, the nodulation phenotype of all mutants grown in vitro was similar to the one previously observed with plants grown in a pot (Fig. 5, A–C), as illustrated in Figure 6B. On high N, the nodule number was reduced in wild-type plants, as expected, as well as in *cra2* mutants, despite its already low-nodulation phenotype (Fig. 6A). In contrast, the nodule number in *sunn* mutants was not affected by nitrate, as previously reported (Sagan et al., 1995), and the *cra2 sunn* double mutant behaved similarly to the *sunn* mutant. These results indicate that the negative regulation of nodulation exerted by nitrate is still acting in *cra2* mutants and that this regulation is lost in *sunn* and *cra2 sunn* mutants.

DISCUSSION

In this study, we identified *M. truncatula* mutants affecting the CRA2 LRR-RLK receptor involved in the systemic regulation of legume root system architecture. This revealed an early defect in the regulation of nodulation affecting the interaction from the primary steps (i.e. symbiotic signaling and rhizobial infections). These new mutants also allowed to analyze relationships of the CRA2 systemic pathway with the SUNN systemic pathway negatively regulating symbiotic nodulation.

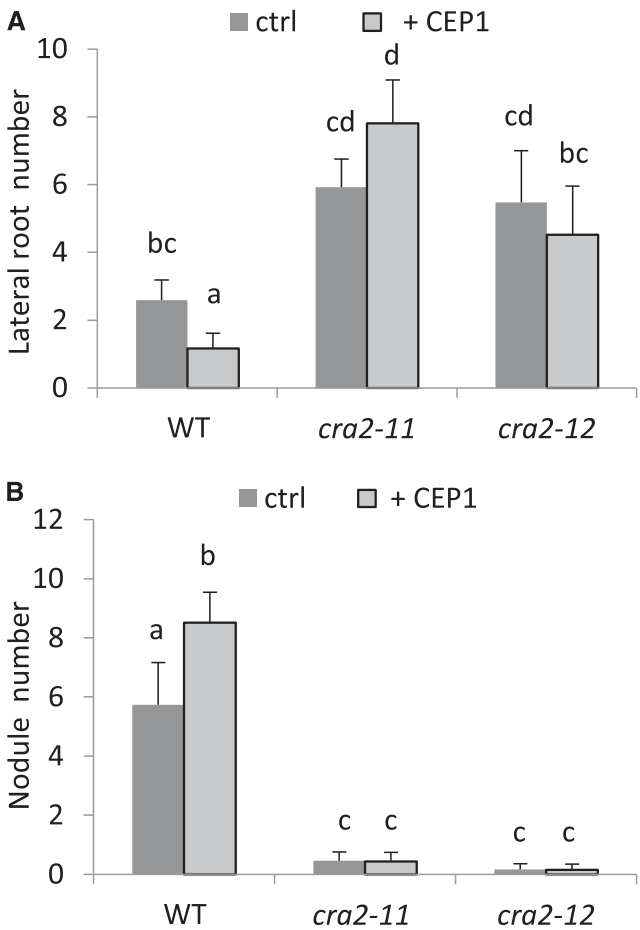


Figure 4. MtCEP1 peptides decrease lateral root number and increase nodule number depending on the CRA2 receptor. A, Quantification of the lateral root number of wild-type (WT), *cra2-11*, or *cra2-12* plants grown in vitro on a low-N medium for 14 d with or without MtCEP1 peptides. Error bars represent confidence intervals ($\alpha = 0.05$; $n > 20$), and a Kruskal-Wallis test was used to assess significant differences, as indicated by lowercase letters ($\alpha < 0.05$). B, Quantification of the nodule number of wild-type, *cra2-11*, or *cra2-12* plants grown in vitro on a low-N medium for 14 dpi with rhizobium with or without MtCEP1 peptides. Error bars represent confidence intervals ($\alpha = 0.05$; $n > 20$), and a Kruskal-Wallis test was used to assess significant differences, as indicated by lowercase letters ($\alpha < 0.05$). One representative biological experiment out of three is shown.

Finally, as the *sunn* mutant has an excessive nodulation also under nitrate inhibitory conditions, we tested the relationship between nitrate and these systemic pathways.

To characterize the new *cra2* allelic series identified, we evaluated the strength of root and nodulation phenotypes. All five Jemalong A17 *cra2* mutant alleles have a similarly reduced root growth, increased lateral root branching, and reduced nodule number, in agreement with phenotypes previously reported in the *M. truncatula* R108 genotype (Huault et al., 2014). The strength of the five alleles is therefore independent of the location and of the nature of mutations (transposon insertion or nucleotide substitution/insertion leading to frame shifts in most of the cases), suggesting that they are null alleles. Interestingly, the nucleotide substitution in the *cra2-15* allele led to an Asn-to-Tyr amino acid conversion at position 370, which suggests a functional role of this specific residue.

Discrepancies between grafting results were reported for *cra2* mutants identified in different genotypes, R108 (Huault et al., 2014) or Jemalong A17 for the *cra2-13* allele previously referred to as *TR185* (Bourion et al., 2014). Indeed, the compact root architecture phenotype was either linked to CRA2 activity in roots in R108 alleles (Huault et al., 2014) or to shoot control in Jemalong A17 (Bourion et al., 2014), whereas in both genotypes, the *cra2* low-nodulation phenotype was linked to CRA2 activity in shoots (Huault et al., 2014; this study). In this study, we now show using different *cra2* mutant alleles in the Jemalong A17 genotype, *cra2-11*, and *cra2-12*, but also *cra2-13/TR185*, that the compact root phenotype is root controlled, as previously observed in the R108 genotype. This result was validated by PCR genotyping of the *CRA2* locus in the different grafted plant combinations to unambiguously separate successful grafts from adventitious root contaminations that are prone to form in the Jemalong A17 genotype, in contrast to the R108 genotype. The formation of adventitious roots with a high frequency in the grafting junction of Jemalong A17 plants likely explains the discrepancy with the Bourion et al. (2014) study, wherein the verification of the genotype of the grafts was not possible as the causal mutation was not known. In agreement with the phenotype of lateral root number controlled locally by roots, the effect of MtCEP1 peptides on lateral root formation was observed in Jemalong A17 isolated hairy roots missing shoots (Mohd-Radzman et al., 2015). Finally, the antagonistic effect of MtCEP1 peptides on lateral root and nodule numbers requires the CRA2 receptor acting in roots and shoots, respectively, both in Jemalong A17 and R108 *M. truncatula* genotypes (Huault et al., 2014; Mohd-Radzman et al., 2016; this study). This result is consistent with the identification in Arabidopsis of AtCEPR1 and AtCEPR2 receptors, most closely related to MtCRA2, as required for the systemic regulation of AtCEP1 target genes (Huault et al., 2014; Tabata et al., 2014).

It remained unclear from previous studies conducted in the R108 genotype (Huault et al., 2014) which root symbiotic processes were affected by the CRA2 systemic pathway. To more precisely evaluate the nodulation phenotype of *cra2* mutants, we analyzed the three main stages of nodule initiation classically defined: the symbiont recognition (preinfection) stage; the rhizobium infection stage initially affecting epidermal root hairs and then the root cortex; and nodule organogenesis occurring in the inner cortex in *M. truncatula*. To determine which of these processes was affected in *cra2* mutants, we analyzed (1) the expression of one of the most specific early-nodulation markers, *ENOD11*; (2) the number and progression of ITs; and (3) the number of spontaneous nodule organs that can form in the

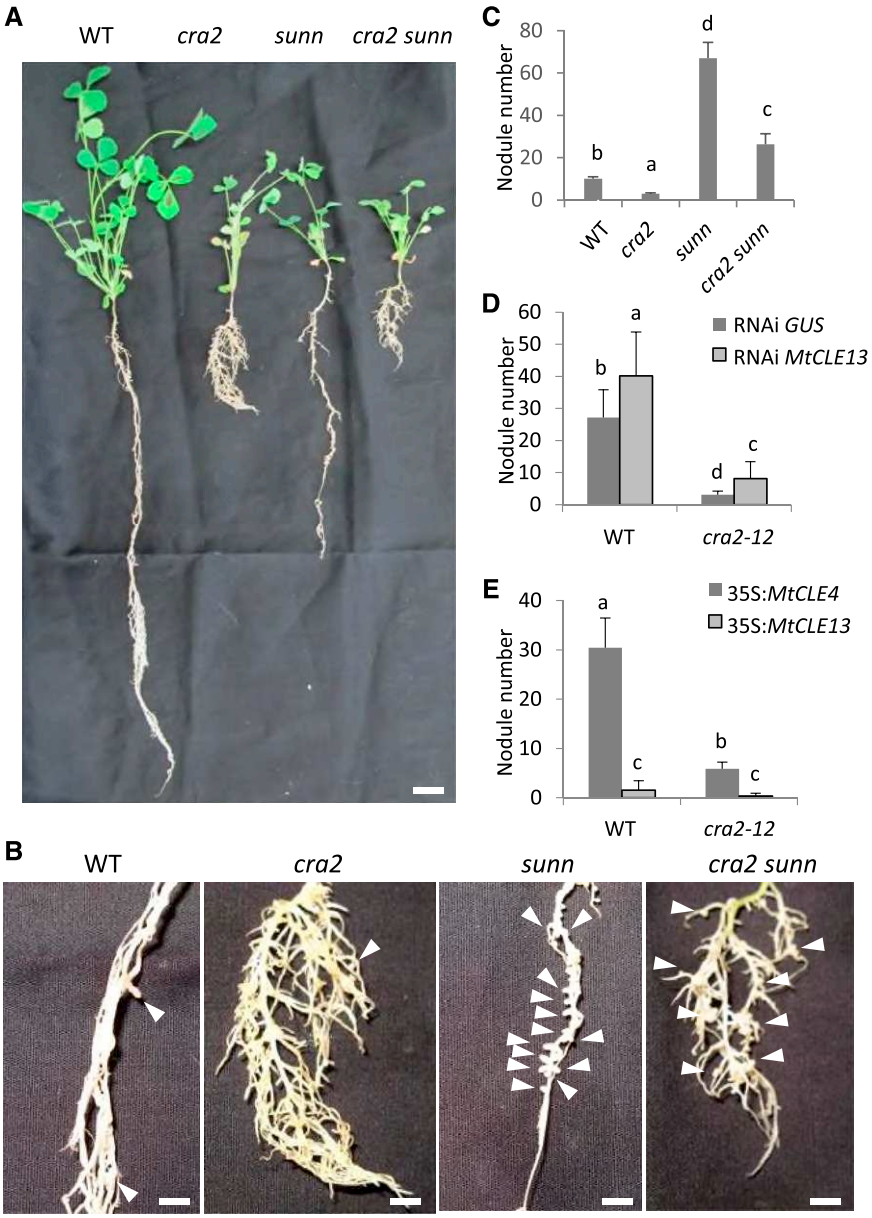


Figure 5. SUNN and CRA2 pathways act independently to regulate nodule number. A, Representative images of wild-type (WT), *cra2*, *sunn*, or *cra2 sunn* mutant plants grown in a perlite-sand mixture on low-N medium 4 weeks postinoculation with rhizobium. Bar = 2 cm. B, Detail of nodulated roots of the different mutants shown in A. Arrowheads indicate nodules. Bars = 0.5 cm. C, Quantification of nodule number of wild-type, *cra2*, *sunn*, or *cra2 sunn* mutant plants grown as described in A. Error bars represent confidence intervals (α = 0.05; $n > 20$), and a Kruskal-Wallis test was used to assess significant differences, as indicated by lowercase letters ($\alpha < 0.01$). One representative biological experiment out of three is shown. D, Quantification of the nodule number of wild-type or *cra2-12* plants expressing an RNAi construct driven by the 35S Cauliflower mosaic virus promoter and targeting either *GUS* as a negative control or the *MtCLE13* gene. Plants were grown in a perlite-sand mixture on low-N medium, and nodules were quantified 4 weeks postinoculation with rhizobium. Error bars represent confidence intervals (α = 0.05; $n > 15$), and a Kruskal-Wallis test was used to assess significant differences, as indicated by lowercase letters ($\alpha < 0.05$). One representative biological experiment out of two is shown. E, Quantification of the nodule number of wild-type or *cra2-12* plants overexpressing (35S Cauliflower mosaic virus) either the *MtCLE13* gene or the nonnodulation-related *MtCLE4* gene as a negative control. Plants were grown in a perlite-sand mixture on low-N medium, and nodules were quantified 4 weeks postinoculation with rhizobium. Error bars represent confidence intervals (α = 0.05; $n > 10$), and a Kruskal-Wallis test was used to assess significant differences, as indicated by lowercase letters ($\alpha < 0.05$). One representative biological experiment out of two is shown.

absence of a rhizobial trigger. These three parameters were affected in *cra2* mutants, suggesting that multiple symbiotic stages may be targeted by the CRA2 systemic pathway. In agreement with an action on rhizobial infections, MtCEP1 peptides, previously shown to act depending on the CRA2 receptor, conversely increased the number of symbiotic ITs formed as well as N fixation and nodulation at moderate levels of nitrate (Imin et al., 2013; Mohd-Radzman et al., 2016). When analyzing later nodulation phenotypes, such as nodule size and capacity to reduce atmospheric N, a similar phenotype to wild-type nodules was identified in *cra2* mutant nodules, as observed for alleles in the R108 genotype (Huault et al., 2014). This therefore confirms that a primary function of the CRA2 pathway is to regulate the number of nodules but not their differentiation or metabolic activity.

A major reason to generate this novel *cra2* allelic series in the Jemalong A17 genotype was to analyze genetic interactions between the SUNN and CRA2 antagonistic systemic pathways regulating nodulation using the *sunn-4* mutant, a presumptive null allele available only in this genotype (Saur et al., 2011; Mortier et al., 2012). Analysis of the nodulation phenotype of *cra2 sunn* double mutants revealed a nodule number intermediate between the two single mutants. Interestingly, this unambiguously shows that the CRA2 pathway regulates the number of nodules but is not required per se to form a nodule, as *cra2* mutants can still generate a wild-type number of nodules in the *sunn* mutant background. This result is consistent with grafting outcomes, as the wild type/*cra2* grafting combination formed a wild-type number of nodules on a highly branched root system, highlighting that *cra2*

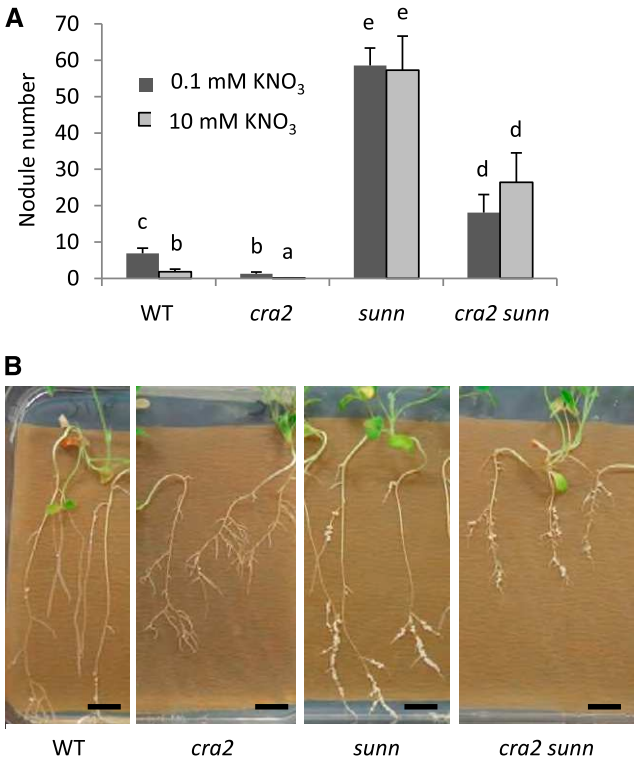


Figure 6. Nodulation phenotypes of *cra2 sunn* double mutants in low or high N. A, Quantification of the nodule number of wild-type (WT), *cra2*, *sunn*, or *cra2 sunn* mutant plants grown in vitro with 0.1 or 10 mM KNO_3 14 dpi with rhizobium. Error bars represent confidence intervals ($\alpha = 0.05$; $n > 15$), and a Kruskal-Wallis test was used to assess significant differences indicated by lowercase letters ($\alpha < 0.05$). One representative biological experiment out of two is shown. B, Representative images of nodulated wild-type, *cra2*, *sunn*, or *cra2 sunn* mutant plants. Bars = 1 cm.

mutant roots can recover a wild-type ability to nodulate when grafted onto wild-type shoots. The *cra2 sunn* nodulation phenotype additionally strongly suggests that the CRA2 and SUNN pathways act independently. This is in agreement with previous results showing that MtCEP1 peptides can still increase nodulation in the *sunn* supernodulation mutant (Mohd-Radzman et al., 2016). Conversely, we now show that the strong inhibition of nodulation exerted by the MtCLE13 ectopic expression is still occurring in the already low-nodulating *cra2* mutant, indicating that this AON-related CLE peptide acts independently of the CRA2 pathway. Strikingly, both CRA2 and CLE13/SUNN pathways antagonistically affect the NF induction of the *ENOD11* marker in *M. truncatula* (Mortier et al., 2010; this study). However, an independent action of CRA2 and SUNN signaling to antagonistically regulate nodule number does not exclude that a coordination between these systemic pathways exists over time, notably depending on soil N availability and on the plant C/N metabolic status, as suggested both in *M. truncatula* and Arabidopsis (Imin et al., 2013; Araya et al., 2014a, 2014b; Tabata et al., 2014). Further work is thus needed to determine at which level such coordination between these systemic regulations might exist.

Finally, in contrast to *cra2* mutant alleles in the R108 genotype that were nearly nonnodulating, *cra2* Jemalong A17 alleles still form some nodules, even though to a much lower extent than wild-type plants. This allowed testing the relevance of the CRA2 pathway in relation to the inhibitory effect of nitrate on nodulation. Indeed, previous studies reported that a nitrate treatment strongly inhibiting nodulation in wild-type plants was not able to inhibit *sunn* excessive nodulation, suggesting that the *sunn* nodulation is nitrate tolerant (Schnabel et al., 2005; Jeudy et al., 2010). *cra2* nodulation was still inhibited by nitrate, whereas nodulation of *sunn* and of the *cra2 sunn* double mutant was nitrate tolerant. This suggests that the nitrate control of nodule number seems at best partially overlapping with the systemic regulation of nodule number. In agreement with this result, depending on plant species, a nitrate-local or systemic negative regulation of nodulation was reported in soybean and in *L. japonicus*, respectively (Reid et al., 2011; Okamoto and Kawaguchi, 2015). In *M. truncatula*, depending on the N source used, local and systemic regulations of nodule number and function have been reported, and the SUNN pathway was

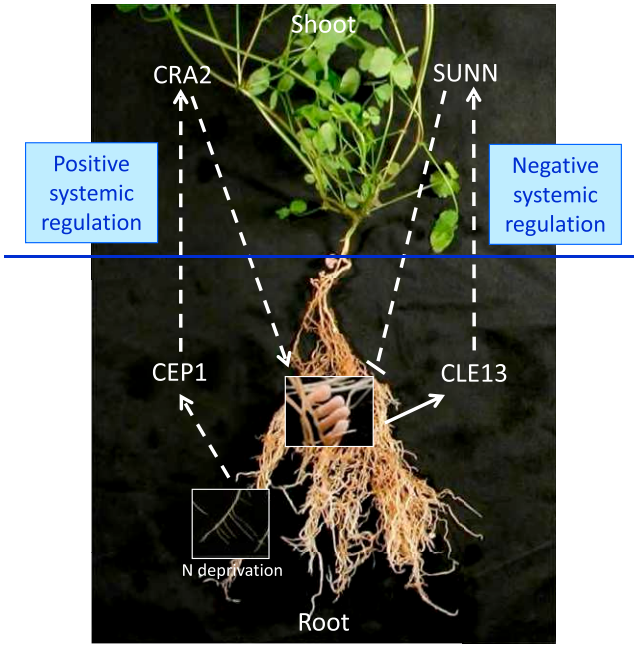


Figure 7. A model for the systemic regulation of symbiotic nodulation in *M. truncatula*. The positive systemic regulation of nodulation is initiated in N-deficient roots by the production of CEP peptides that would be transported to shoots through the xylem to activate the CRA2 CEPR-like receptor, leading to the production of a downstream systemic signal positively regulating nodulation in roots. In the presence of compatible rhizobia, symbiotic nodulation is triggered and leads to the production of specific CLE peptides such as MtCLE13 that would be transported to shoots through the xylem to act depending on the SUNN CLAVATA1-like receptor, leading to the production of a downstream systemic signal negatively regulating nodulation in roots. These two pathways act independently of each other to systemically regulate nodulation depending on N and rhizobium availability.

linked to the systemic inhibition of nodule number by nitrate (Jeudy et al., 2010).

CONCLUSION

The antagonistic CEP/CRA2 and CLE/SUNN pathways systemically regulating nodulation from shoots act independently, pointing to a working model where under N-limiting conditions, the production of several CEP peptides (Imin et al., 2013), acting through the CRA2 receptor in shoots, generates a downstream signal(s) positively affecting the nodulation capacity of roots by regulating notably NF signaling and rhizobial infections (Fig. 7). In response to compatible rhizobia, nodule primordia initiate and AON-related CLE peptides are produced, leading to the SUNN-dependent activation in shoots of inhibitory shoot-to-root systemic signals (Fig. 7). Further work is needed to determine more precisely which potential signaling peptides are involved, beyond the already characterized MtCEP1 and MtCLE12/MtCLE13 peptides, and how their production is dynamically coordinated over time depending on soil N availability and whole-plant metabolic capacity and needs. Finally, systemic molecular signals and targets of SUNN and CRA2 pathways linked to nodule initiation should be identified to determine if some of those can be common and which nodulation stages are targeted.

MATERIALS AND METHODS

Biological Material and Growth Conditions

The *cra2* mutants were identified by a forward genetics approach carried out in community screens of the *Tnt1* insertional mutant collection generated in the *Medicago truncatula* Jemalong A17 (2HA) genotype for *cra2-11* and *cra2-14* alleles (Domonkos et al., 2017) or in a γ-ray mutant collection generated in the Jemalong A17 genotype for the *cra2-12*, *cra2-13/TR185* (Bourion et al., 2014), and *cra2-15* alleles. The *sunn-4* mutant allele was isolated by Sagan et al. (1995). The *cra2 sunn* double mutant was generated in this study by crossing *cra2-11* and *sunn-4* alleles. The PCR genotyping of homozygous *cra2* and *cra2 sunn* mutants was achieved using primers indicated in Supplemental Table S1. PCR amplification products were sequenced for the different mutant alleles.

In all cases, *M. truncatula* seeds were scarified in sulfuric acid (Sigma) for 3 min, washed four times with distilled water, and then sterilized for 20 min in bleach (12% [v/v] sodium hypochlorite). After washing with sterilized water, seeds were sown onto 1.5% (w/v) water-agar plates (Bactoagar; Becton Dickinson), stratified for 2 d in the dark at 4°C, and then germinated overnight at 24°C. Germinated seedlings were grown in vitro vertically in a growth chamber at 24°C under a long-day photoperiod (16 h of light, 150 μE intensity) on square plates on a Fahraeus low-N medium (Truchet et al., 1989). Low-N versus high-N experiments were performed in vitro on a Fahraeus medium supplemented with 0.1 or 10 mM KNO_3, respectively. Alternatively, germinated seedlings were gown in pots containing a perlite:sand 3:1 mixture watered every 2 d with i medium (Blondon, 1964) in a growth chamber (24°C, 16 h of light, 150 μE, relative humidity of 60%). Finally, to perform a full growth cycle and quantify biomass, plants were grown on soil watered with SN/2 N-rich medium in a greenhouse (Gonzalez-Rizzo et al., 2006).

For nodulation experiments, the *Sinorhizobium meliloti* 1021 strain (Sm1021) was used for in vitro experiments or the *Sinorhizobium medicae* WSM419 strain for plants grown in perlite/sand pots and notably for ARA experiments, as this strain was previously shown to be a better N fixer than Sm1021 (Terpolilli et al., 2008). Sm1021 (GMI6526; Ardourel et al., 1994) carrying a pXLGD4 plasmid expressing a Pro_{HemA}:*LacZ* marker was used to follow bacterial progression from root hairs to cortical cells and quantify infection phenotypes. A β-galactosidase histochemical assay was performed overnight on 5-dpi roots as described by Ardourel et al. (1994). Stained roots were observed using a stereomicroscope (Olympus, BX53). *Sinorhizobium* strains were grown at 28°C on a yeast extract broth medium (Vervliet et al., 1975) supplemented with 50 mg L^{-1} streptomycin, 25 mg L^{-1} chloramphenicol, or 10 mg L^{-1} tetracycline for Sm1021, WSM419, and Sm1021-*LacZ* strains, respectively. Plants were inoculated with an OD_{600nm} = 0.05 dilution.

Constructs and *Agrobacterium rhizogenes*-Mediated Root Transformation

An RNAi construct targeting the *MtCLE13* gene was generated by introducing a 200-nucleotide *MtCLE13* PCR product into the pEntr/D-Topo vector (Life Technologies) and then recombined (Gateway technology) into the pFRN vector (Gonzalez-Rizzo et al., 2006) and checked by sequencing (primers indicated in Supplemental Table S1). The GUS RNAi pFRN control vector was previously described by Gonzalez-Rizzo et al. (2006). The 35S:CLE13 and 35S:CLE4 vectors were previously generated by Mortier et al. (2010). The SYMRK-KD vector allowing an efficient formation of spontaneous nodules in *M. truncatula* was previously described by Saha et al. (2014).

Constructs of interest were introduced into the *A. rhizogenes* Arqua1 strain, and recombinant Arqua1 bacteria were used to transform roots according to the protocol described by Boisson-Dernier et al. (2001). The *A. rhizogenes* strains were grown at 28°C for 2 d on a yeast extract broth-agar medium supplemented with streptomycin and kanamycin (50 mg L^{-1}). Infected seedlings were grown in vitro on a Fahraeus medium supplemented with 1 mM NH_4NO_3 (Truchet et al., 1989) and with kanamycin (25 mg L^{-1}) for 1 week at 20°C, and another 1 week at 24°C, under a 16-h-light photoperiod (150 μE intensity). Then, composite plants with wild-type shoots and transformed roots selected on kanamycin were transferred either in vitro on growth paper (Mega International) dropped off on Fahraeus without N agar medium, grown for 5 d, and then inoculated with the Sm1021 strain as described before, or transferred in pots containing a perlite:sand 3:1 mixture for 5 d and then inoculated with the WSM419 strain as described before. For generating spontaneous nodules, 35S:SYMRK-KD composite plants were transferred in vitro on a Fahraeus low-N medium without rhizobium inoculation, and spontaneous nodules were scored 5 weeks after transfer. Sections (50 μm) of spontaneous nodule were obtained using a vibratome (Leica, VTS1200) on 3% agarose (Sigma)-embedded material and imaged with a stereomicroscope (Olympus, BX53) in a bright field or under UV illumination.

Root and Nodule Phenotyping

Nodule number was either scored on seedlings grown in vitro at 14 dpi with rhizobium or in pots at time points indicated in the figure legends. Lateral root number was scored on seedlings grown in vitro at 14 d postgermination. Primary root length was measured using ImageJ software (http://imagej.nih.gov).

Peptide exogenous treatments were performed by adding 1 μM MtCEP1 to the low-N Fahraeus medium or to Fahraeus medium supplemented with 5 mM KNO_3 for nodulation or lateral root phenotyping experiments, respectively, according to Imin et al. (2013).

Grafting

Grafts were generated as described in the Medicago Handbook (chapter Cuttings and Grafts; http://www.noble.org/medicagohandbook/). Grafts were generated in vitro and then transferred after 3 weeks to pots containing a perlite:sand 3:1 mixture and watered with a low-N liquid medium, in the same growth conditions as previously described. Grafts were inoculated 1 week after the transfer, and the nodule number was scored 2 weeks postinoculation with rhizobium. Root and shoot dry weights were measured after drying in an oven at 60°C for 48 h. As in the Jemalong A17 genotype, grafted junctions were highly prone to form adventitious roots, roots were genotyped to determine their CRA2 wild-type versus homozygous mutant status, allowing exclusion of adventitious root contaminations. Details of nodulated roots were imaged using an AxioZoom V16 macroscope (Zeiss).

Real-Time RT-PCR Gene Expression Analysis

Total RNA was isolated from frozen roots with the RNeasy Plant mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Total RNAs (1.5 μg) were

used for cDNA synthesis with SuperScript II Reverse Transcriptase (Thermo Fisher). RT-quantitative PCR experiments were performed with a LightCycler480 SYBR Green I Master Kit on a LightCycler 480 apparatus (Roche Diagnostics) according to the manufacturer's instructions. Cycling conditions were 95°C for 10 min followed by 40 cycles at 95°C for 15 s, 60°C for 15 s, and 72°C for 15 s. A threshold for minimal efficiency was set at 90% to retain primers. A dissociation curve (55°C–95°C) was performed to assess the specificity of the amplification, and amplicons were additionally sequenced. The expression of the genes of interest was normalized against the reference genes *MtACTIN11* and *MtRBP1* (*RNA BINDING PROTEIN1*) previously selected using the Genorm software (https://genorm.cmgg.be/; Vandesompele et al., 2002). All primers used in real-time RT-PCR are indicated in Supplemental Table S1. Values obtained for the two reference genes were averaged to calculate ratios, and the value of the experimental control condition was set to 1 as a reference to determine fold changes.

N Fixation Activity

The nitrogenase activity of symbiotic nodules was evaluated through an ARA performed on individual plants, as reported by Koch and Evans (1966). Briefly, plants grown in pots with a perlite:sand 3:1 mixture were harvested 4 weeks after inoculation with rhizobium and placed into glass vials sealed with rubber septa. Acetylene was injected into each vial and incubated for 3 h at 22°C before injection into the gas chromatographer (7820A; Agilent Technologies) to determine the amount of ethylene produced by the nodule nitrogenase activity. The total ARA activity was calculated as nanomoles of ethylene produced per hour per plant. The specific ARA activity was determined by normalizing ARA values with the nodule fresh weight (in milligrams). A negative control was performed by incubating acetylene with noninoculated plants.

Statistical Analyses

Two to three independent biological replicates were performed. Nonparametric tests (available in the Xlstat software; http://www.xlstat.com/) were used to assess significant differences: a Mann-Whitney test when two conditions were compared, and a Kruskal-Wallis test when more than two conditions were considered.

Accession Numbers

Sequence data from this article can be found in the GenBank/EMBL data libraries under accession numbers Medtr3g110840 (*M. truncatula* genome version 4.0, https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html; Tang et al., 2014) or MtrunA17Chr3g0140861 (*M. truncatula* genome version 5.0, https://medicago.toulouse.inra.fr/MtrunA17r5.0-ANR/; Pecrix et al., 2018) for MtCRA2; Medtr4g070970 or MtrunA17Chr4g0035451 for MtSUNN; Medtr4g079610 or MtrunA17Chr4g0040951 for MtCLE13; Medtr3g415670 or MtrunA17Chr3g0082991 for MtENOD11; Medtr6g034835 or MtrunA17Chr6g0463441 for MtRBP1; and Medtr7g026230 or MtrunA17Chr7g0223901 for MtACTIN11.

Supplemental Data

The following supplemental materials are available.

Supplemental Figure S1. Localization of mutations in the different *cra2* Jemalong A17 mutant alleles.

Supplemental Figure S2. Shoot growth phenotypes of *cra2* mutants.

Supplemental Figure S3. The *cra2* low-nodulation phenotype is detected before scoring for shoot or root biomass phenotypes.

Supplemental Figure S4. N fixation capacity of *cra2* mutant nodules and plants.

Supplemental Figure S5. Symbiotic nodule number is controlled by CRA2 activity in shoots and lateral root number by CRA2 activity in roots.

Supplemental Figure S6. *MtCLE13* expression in RNAi or overexpressing roots.

Supplemental Table S1. Primers used in this study.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Krisztina Miró, Sandor Jenei, Ágota Domonkos, Aniko Gombár, Beatrix Horváth, Gyongyi Kováts, and Szilard Kovács for participating in screening *Tnt1* insertional mutant alleles in the frame of the French-Hungarian bilateral NKTH-ANR LEGUMICS project. Insertional mutants were generated in the frame of the EU Grain Legumes Integrated Project. We thank Henri de Larambergue and Véronique Aubert for participating in screening the γ-ray mutant collection at the Agroécologie Institute (Institut National de la Recherche Agronomique). We thank Maitrayee DasGupta (Kolkata, India) and Sofie Goormachtig (Ghent, Belgium) for providing 35S:SYMRK-KD and 35S:CLE4/35S:CLE13 plasmids, respectively. Microscopy was done at the Institute of Plant Sciences Paris-Saclay imaging facility.

Received January 3, 2019; accepted February 6, 2019; published February 19, 2019.

LITERATURE CITED

Araya T, Miyamoto M, Wibowo J, Suzuki A, Kojima S, Tsuchiya YN, Sawa S, Fukuda H, von Wirén N, Takahashi H (2014a) CLE-CLAV-ATA1 peptide-receptor signaling module regulates the expansion of plant root systems in a nitrogen-dependent manner. Proc Natl Acad Sci USA **111:** 2029–2034

Araya T, von Wirén N, Takahashi H (2014b) CLE peptides regulate lateral root development in response to nitrogen nutritional status of plants. Plant Signal Behav **9:** e29302

Ardourel M, Demont N, Debellé F, Maillet F, de Billy F, Promé JC, Dénarié J, Truchet G (1994) *Rhizobium meliloti* lipooligosaccharide nodulation factors: Different structural requirements for bacterial entry into target root hair cells and induction of plant symbiotic developmental responses. Plant Cell **6:** 1357–1374

Blondon F (1964) Contribution à l'Étude du Développement des Graminées Fourragères Ray-grass et Dactyle. Faculté des Sciences, Paris

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

Bourion V, Martin C, de Larambergue H, Jacquin F, Aubert G, Martin-Magniette ML, Balzergue S, Lescure G, Citerne S, Lepetit M, et al (2014) Unexpectedly low nitrogen acquisition and absence of root architecture adaptation to nitrate supply in a *Medicago truncatula* highly branched root mutant. J Exp Bot **65:** 2365–2380

Caetano-Anollés G, Gresshoff PM (1991) Plant genetic control of nodulation. Annu Rev Microbiol **45:** 345–382

Carroll BJ, McNeil DL, Gresshoff PM (1985) A supernodulation and nitrate-tolerant symbiotic (nts) soybean mutant. Plant Physiol **78:** 34–40

de Bang TC, Lundquist PK, Dai X, Boschiero C, Zhuang Z, Pant P, Torres-Jerez I, Roy S, Nogales J, Veerappan V, et al (2017) Genome-wide identification of *Medicago* peptides involved in macronutrient responses and nodulation. Plant Physiol **175:** 1669–1689

De Kroon H, Visser EJW, Huber H, Mommer L, Hutchings MJ (2009) A modular concept of plant foraging behaviour: The interplay between local responses and systemic control. Plant Cell Environ **32:** 704–712

Domonkos Á, Kovács S, Gombár A, Kiss E, Horváth B, Kováts GZ, Farkas A, Tóth MT, Ayaydin F, Bóka K, et al (2017) NAD1 controls defense-like responses in *Medicago truncatula* symbiotic nitrogen fixing nodules following rhizobial colonization in a BacA-independent manner. Genes (Basel) **8:** E387

Giehl RFH, von Wirén N (2014) Root nutrient foraging. Plant Physiol **166:** 509–517

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 **18:** 2680–2693

Hastwell AH, Richard J, Corcilius L, Williams JT, Gresshoff PM, Ferguson BJ (2019) Triarabinosylation is required for nodulation-suppressive CLE peptides to systemically inhibit nodulation in *Pisum sativum*. Plant Cell Environ **42:** 188–197

Huault E, Laffont C, Wen J, Mysore KS, Ratet P, Duc G, Frugier F (2014) Local and systemic regulation of plant root system architecture and symbiotic nodulation by a receptor-like kinase. PLoS Genet **10:** e1004891

Imin N, Mohd-Radzman NA, Ogilvie HA, Djordjevic MA (2013) The peptide-encoding CEP1 gene modulates lateral root and nodule numbers in *Medicago truncatula*. J Exp Bot **64:** 5395–5409

Imin N, Patel N, Corcilius L, Payne RJ, Djordjevic MA (2018) CLE peptide tri-arabinosylation and peptide domain sequence composition are essential for SUNN-dependent autoregulation of nodulation in Medicago truncatula. New Phytol **218:** 73–80

Jardinaud MF, 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

Jeudy C, Ruffel S, Freixes S, Tillard P, Santoni AL, Morel S, Journet EP, Duc G, Gojon A, Lepetit M, et al (2010) Adaptation of *Medicago truncatula* to nitrogen limitation is modulated via local and systemic nodule developmental responses. New Phytol **185:** 817–828

Journet EP, El-Gachtouli N, Vernoud V, de Billy F, Pichon M, Dedieu A, Arnould C, Morandi D, Barker DG, Gianinazzi-Pearson V (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

Koch B, Evans HJ (1966) Reduction of acetylene to ethylene by soybean root nodules. Plant Physiol **41:** 1748–1750

Krusell L, Madsen LH, Sato S, Aubert G, Genua A, Szczyglowski K, Duc G, Kaneko T, Tabata S, de Bruijn F, et al (2002) Shoot control of root development and nodulation is mediated by a receptor-like kinase. Nature **420:** 422–426

Malamy JE (2005) Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture. Plant Cell Environ **28:** 67–77

Mohd-Radzman NA, Binos S, Truong TT, Imin N, Mariani M, Djordjevic MA (2015) Novel MtCEP1 peptides produced in vivo differentially regulate root development in *Medicago truncatula*. J Exp Bot **66:** 5289–5300

Mohd-Radzman NA, Laffont C, Ivanovici A, Patel N, Reid D, Stougaard J, Frugier F, Imin N, Djordjevic MA (2016) Different pathways act downstream of the CEP peptide receptor CRA2 to regulate lateral root and nodule development. Plant Physiol **171:** 2536–2548

Mortier V, Den Herder G, Whitford R, Van de Velde W, Rombauts S, D'Haeseleer K, Holsters M, Goormachtig S (2010) CLE peptides control *Medicago truncatula* nodulation locally and systemically. Plant Physiol **153:** 222–237

Mortier V, De Wever E, Vuylsteke M, Holsters M, Goormachtig S (2012) Nodule numbers are governed by interaction between CLE peptides and cytokinin signaling. Plant J **70:** 367–376

Nishida H, Handa Y, Tanaka S, Suzaki T, Kawaguchi M (2016) Expression of the CLE-RS3 gene suppresses root nodulation in *Lotus japonicus*. J Plant Res **129:** 909–919

Oh E, Seo PJ, Kim J (2018) Signaling peptides and receptors coordinating plant root development. Trends Plant Sci **23:** 337–351

Okamoto S, Kawaguchi M (2015) Shoot HAR1 mediates nitrate inhibition of nodulation in *Lotus japonicus*. Plant Signal Behav **10:** e1000138

Okamoto S, Ohnishi E, Sato S, Takahashi H, Nakazono M, Tabata S, Kawaguchi M (2009) Nod factor/nitrate-induced CLE genes that drive HAR1-mediated systemic regulation of nodulation. Plant Cell Physiol **50:** 67–77

Okamoto S, Shinohara H, Mori T, Matsubayashi Y, Kawaguchi M (2013) Root-derived CLE glycopeptides control nodulation by direct binding to HAR1 receptor kinase. Nat Commun **4:** 2191

Oldroyd GED (2013) Speak, friend, and enter: Signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. Nat Rev Microbiol **11:** 252–263

Pecrix Y, Staton SE, Sallet E, Lelandais-Brière C, Moreau S, Carrère S, Blein T, Jardinaud MF, Latrasse D, Zouine M, et al (2018) Whole-genome landscape of *Medicago truncatula* symbiotic genes. Nat Plants **4:** 1017–1025

Reid DE, Ferguson BJ, Gresshoff PM (2011) Inoculation- and nitrate-induced CLE peptides of soybean control NARK-dependent nodule formation. Mol Plant Microbe Interact **24:** 606–618

Ried MK, Antolín-Llovera M, Parniske M (2014) Spontaneous symbiotic reprogramming of plant roots triggered by receptor-like kinases. eLife **3:**

Sagan M, Morandib D, Tarenghib E, Due G (1995) Selection of nodulation and mycorrhizal mutants in the model plant Medicago truncatula (Gaertn.) after γ-ray mutagenesis. Plant Sci **111:** 63–71

Saha S, Dutta A, Bhattacharya A, DasGupta M (2014) Intracellular catalytic domain of symbiosis receptor kinase hyperactivates spontaneous nodulation in absence of rhizobia. Plant Physiol **166:** 1699–1708

Saur IM, Oakes M, Djordjevic MA, Imin N (2011) Crosstalk between the nodulation signaling pathway and the autoregulation of nodulation in *Medicago truncatula*. New Phytol **190:** 865–874

Schnabel E, Journet EP, de Carvalho-Niebel F, Duc G, 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

Searle IR, Men AE, Laniya TS, Buzas DM, Iturbe-Ormaetxe I, Carroll BJ, Gresshoff PM (2003) Long-distance signaling in nodulation directed by a CLAVATA1-like receptor kinase. Science **299:** 109–112

Suzaki T, Yoro E, Kawaguchi M (2015) Leguminous plants: Inventors of root nodules to accommodate symbiotic bacteria. Int Rev Cell Mol Biol **316:** 111–158

Tabata R, Sumida K, Yoshii T, Ohyama K, Shinohara H, Matsubayashi Y (2014) Perception of root-derived peptides by shoot LRR-RKs mediates systemic N-demand signaling. Science **346:** 343–346

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

Tavormina P, De Coninck B, Nikonorova N, De Smet I, Cammue BPA (2015) The plant peptidome: An expanding repertoire of structural features and biological functions. Plant Cell **27:** 2095–2118

Terpolilli JJ, O'Hara GW, Tiwari RP, Dilworth MJ, Howieson JG (2008) The model legume Medicago truncatula A17 is poorly matched for N2 fixation with the sequenced microsymbiont Sinorhizobium meliloti 1021. New Phytol **179:** 62–66

Timmers ACJ, Auriac MC, Truchet G (1999) Refined analysis of early symbiotic steps of the Rhizobium-Medicago interaction in relationship with microtubular cytoskeleton rearrangements. Development **126:** 3617–3628

Truchet G, Barker D, Camut S, de Billy F, Vasse J, Huguet T (1989) Alfalfa nodulation in the absence of Rhizobium. Mol Gen Genet **219:** 65–68

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biol **3:** RESEARCH0034

Vervliet G, Holsters M, Teuchy H, Van Montagu M, Schell J (1975) Characterization of different plaque-forming and defective temperate phages in Agrobacterium. J Gen Virol **26:** 33–48

Xiao TT, Schilderink S, Moling S, Deinum EE, Kondorosi E, Franssen H, Kulikova O, Niebel A, Bisseling T (2014) Fate map of *Medicago truncatula* root nodules. Development **141:** 3517–3528

A

ATGAACCATCATCAACCATTCTTCTTCTTTGGACTAATAGTTATTATTTCCATGACCAACATGTCACATGTTATCAGCACAAACCAATCTGA
GTTTTTTTCTCTAATGAAAGAGTCTCTCTCAGGAAACTACCCTTTTGATTGGGGTGTAAGCAAAGTGGATAAACCAATCTGCGACTTCACC
GGAATCACCTGTGACAACAAAGGAGACATCATAAGTCTTGATTTTTCAGGTTGGTCATCACTTTCCGGAAACTTCCCGTCAAATATTTGCT
CTTACCTTCCAAATTTACGTGTCCTAAACCTCGGTAATACAAAATTCAAGTTCCCAACAAACAGCATAATCAACTGTTCTCACTTAGAACTA
CTCAACATGAACAAGATGCACCTGTCAGGAACACTTCCTGATTTCTCGTCTTTAAAATATCTCAGAGTCCTCGACTTATCATACAACTCCTT
CACCGGCGATTTTCCCATGTCTGTTTTCAACCTCACCAATCTTGAAATTCTCAACTTCAACGAAAACAGTAAACTCAATCTTTGGGAATTAC
CAAAAAGCTTTGTAAGATTGAGAAGTCTTAAATCCATGATTTTATCAACATGCATGTTGCATGGTCAAATTCCACCATCCATATCAAATAT
AACAACACTCATTGATCTTGAATTAAGTGGAAATTTCCTCACAGGTCAAATTCCAAAAGAACTTGGATTGTTGAAAAACTTGCAACAGCTT
GAACTTTACTATAACTACTTCCTTGTTGGCAGCATCCCTGAAGAGCTTGGAAATTTAACAGAACTTGTCGATTTAGATATGTCGGTAAACA
AGTTAACTGGAACAATCCCTTCTTCTGTTTGTAAACTTCCAAAGCTTCAGGTTCTCCAATTCTACAATAACAGTCTCACAGGTGAAATTCCA
AAATCAATTGAAAACTCAAAAACACTTAGAATATTGTCACTTTACGACAATTTCTTAAGTGGACACGTTCCTGCGAAACTAGGACAATCCT
CCGGAATGGTTGTTCTTGATTTGTCCGAAAACAAGTTGTCTGGCCCTTTGCCAGAACATGTCTGTCAAGGAGGTAAACTGTTATATTTTCT

A1108T (*cra2-15*)

TGTTTTGGATAACTTTTTCTCTGGTGTTATACCAGAAAGTTATTCAAATTGCATGTTTCTGTTAAGGTTTCGTGTCAGTAATAACCGTTTGG
AAGGTTCTGTTCCAAAAGGACTCTTGAGTTTATCACATGTTTCAATCATTGATTTGAGCAGCAACAATCTGACCGGTCCGATTCCCGAGAT
CAACGGAAATTCTAGAAACTTGTCTGAGCTTTTCCTTCAGAGGAACAAGATTTCAGGACAAATAACACCAACAATCTCTAGTGCTTATAAC

1458insertion (*cra2-14*)

CTTGTCAAAATTGATTTCAGTTATAACTTTCTTTCTGGTCCAATTCCTTCTGAGATTGGTAACCTTAGAAAGCTTAACTTGCTTATGCTACAA

CC1535AA (*cra2-13*)

GCAAACAAGCTGAACTCTTCTATTCCTGATTCATTCTCTTCCTTGGAATCACTCAACCTTCTAGATCTTTCCAGTAATCTCTTAACCGGAAAC
ATCCCTGAAAGCCTCTCTGTGTTGTTGCCTAATTCTATAAACTTTTCACACAATCTTCTTTCTGGTCCTATTCCTCCTAAATTGATTAAAGGA
GGGTTAGTTGAAAGCTTTGCAGGGAATCCTGGTTTATGTGTGATGATGCCGGTTAATGCTAATTCATCTGATCAAAGAAACTTTCCATTAT
GTTCACATGGTTACAAGAGTAAGAAGATGAACACTATATGGGTGGCCGGTGTATCTGTGATTTTGATTTTTGTAGGTGCTGCTTTGTTCTT
GAAAAAAAGGTGTGGCAAAAATGTGTCTGCGGTTGAACACGAATACACACTCTCTTCATCATTTTTCTCTTATGATGTTAAGAGTTTTCAC
ATGATTAGTTTTGATCAAAGAGAGATTGTTGAGTCTTTGGTTGATAAGAATATAATGGGACATGGAGGGTCAGGGACAGTGTACAAAAT
CGAGCTGAAAACCGGAGATGTTGTGGCGGTTAAGAGGCTTTGGAGTCGAAGTTCGAAGGATTCTTCGCCAGAAGATGCATTATTTGTGG
ACAAGGCATTGAAAGCTGAGGTGGAAACACTTGGAAGCATAAGACACAAGAACATTGTTAAGTTGTATTGTTGCTTCTCAAGTTTGGATT
GTAGCTTGTTGGTTTATGAGTATATGCCAAATGGTACTTTGTATGATTCTCTTCACAAGGGTTGGATTCATTTGGATTGGCCTACAAGGTA

2353A (*cra2-12*)

TAGGATTGCACTTGGAATTGCTCAGGGTGTTGCATACCTTCACCATGATTTGGTTTTTCCTATTATCCATAGAGATATTAAGTCAACAAATA

2402insertion (*cra2-11*)

TTCTCTTGGATGAAGATTACCATCCTAAGGTTGCAGATTTTGGGATTGCTAAGGTTTTGCAGGCAAGAGGAGCAAAGGATTCCACAACCA
CGGTCATTGCTGGAACTTATGGTTACCTAGCCCCAGGTAAATAAATTCTCAATTTAACCTATTAATGTCATCGACCAAATCACGAGAATTA
AGAAAGTTGACCTTAATATGAAATTTGTTGCCAATTAATATTGTTTACAAGCTTATCCTTTAGAGAACACGTTTAATTTATATTTTCATCAT
AGGACTTACTTATTACAGGTTGCAGAAAACTAAATATAATTAGAAGTATGTTGGTAAAATAATAATTAACACAGTTAAAACTTCAAAAGG
ATTATATATTTAGGGACAGAGGTAGGATTTGATTAAACAGTATTTTGTATTAGGGTATTAGTGATGTGGTTAACTTAAGCGGTAAGTAAT
CTTATTATCATATTGTAAGCTTGTTTAAATCTATTTAATTTGTTTTGATGGATGGTGTGACAGAATATGCATATTCACCAAGAGCAACCACA
AAGTGTGATGTGTACAGTTTTGGTGTGATTTTGTTGGAATTATTAACTGGGAGGAAGCCAATTGAGTCAGAATTTGGAGAAAACAGAAA
CATTGTATTTTGGGTTGCAAACAAAGTTGAAGGCAAAGAAGGAGCTAGACCAAGTGAGGTTTTTGATCCAAAGTTATCATGTTCATTCAA
AGATGATATGGTTAAAGTATTAAGGATTGCCATTAGATGCAGCTACAAAGCACCAGCTAGTAGACCAACCATGAAAGAAGTTGTTCAGC
TTCTGATTGAGGCAGAGCCAAGAAAATCTGATTCTTGCAAGTTGTCAACCAAAGACGTATCGACAAATGTCACCTTAGTAAAGAAATCAT
TTGAATTATAATTATTAATATCATTAAGTAGCTTAATTAAGGGGTAAGAGGGAGCATAAATCTATAGTTTAGTAACAACTAAGAACATAA
GCAGTCTCTCTTTTGTTGTGATG

B

MNHHQPFFFFGLIVIISMTNMSHVISTNQSEFFSLMKESLSGNYPFDWGVSKVDKPICDFTGITCDNKGDIISLDFSG
WSSLSGNFPSNICSYLPNLRVLNLGNTKFKFPTNSIINCSHLELLNMNKMHLSGTLPDFSSLKYLRVLDLSYNSFTGDF
PMSVFNLTNLEILNFNENSKLNLWELPKSFVRLRSLKSMILSTCMLHGQIPPSISNITTLIDLELSGNFLTGQIPKELGLL
KNLQQLELYYNYFLVGSIPEELGNLTELVDLDMSVNKLTGTIPSSVCKLPKLQVLQFYNNSLTGEIPKSIENSKTLRILSL

N370Y

YDNFLSGHVPAKLGQSSGMVVLDLSENKLSGPLPEHVCQGGKLLYFLVLDNFFSGVIPESYSNCMFLLRFRVSNNRL
EGSVPKGLLSLSHVSIIDLSSNNLTGPIPEINGNSRNLSELFLQRNKISGQITPTISSAYNLVKIDFSYNFLSGPIPSEIGNL

487 GYERSAGDRPHRG* 511*

RKLNLLMLQANKLNSSIPDSFSSLESLNLLDLSSNLLTGNIPESLSVLLPNSINFSHNLLSGPIPPKLIKGGLVESFAGNPG
LCVMMPVNANSSDQRNFPLCSHGYKSKKMNTIWVAGVSVILIFVGAALFLKKRCGKNVSAVEHEYTLSSSFFSYDV
KSFHMISFDQREIVESLVDKNIMGHGGSGTVYKIELKTGDVVAVKRLWSRSSKDSSPEDALFVDKALKAEVETLGSIR

785KRY*

HKNIVKLYCCFSSLDCSLLVYEYMPNGTLYDSLHKGWIHLDWPTRYRIALGIAQGVAYLHHDLVFPIIHRDIKSTNILLD

800 NVSGRVTKYYHAAKIRDEKRGTEHTIFYVETPQQIRGKNHGARVENFH*

EDYHPKVADFGIAKVLQARGAKDSTTTVIAGTYGYLAPEYAYSPRATTKCDVYSFGVILLELLTGRKPIESEFGENRNIV
FWVANKVEGKEGARPSEVFDPKLSCSFKDDMVKVLRIAIRCSYKAPASRPTMKEVVQLLIEAEPRKSDSCKLSTKDVS
TNVTLVKKSFEL*

Figure S1. Localization of mutations in the different *cra2* Jemalong (A17) mutant alleles.

A. Localization of insertions or nucleotide substitutions in the *CRA2* genomic sequence for *cra2-11* to *cra2-15* mutant alleles. The nucleotide(s) underlined indicate the position of mutations or the nucleotide just before the insertion.

B. Predicted consequences of mutations reported in A on the CRA2 protein in the different mutant alleles. Predicted Leucine-Rich Repeats (LRRs) are highlighted in yellow and the kinase domain in blue. Asterisks indicate premature stop codons. Residues underlined indicate the position of substitutions or the residue just before the insertion.

Figure S2. Shoot growth phenotypes of *cra2* mutants.

A. Representative examples of Wild-Type (WT), *cra2-11* or *cra2-12* mutant plants grown in soil on an N rich medium for two months. Bar = 2 cm.

B. Quantification of the shoot dry weight (in mg) of WT, *cra2-11* or *cra2-12* mutant plants grown in soil on a N rich medium at the end of their growth cycle. Error bars represent confidence intervals ($\alpha = 0.05$; n = 6), and a Kruskal and Wallis test was used to assess significant differences indicated by letters ($\alpha < 0.05$). One representative biological experiment out of two is shown.

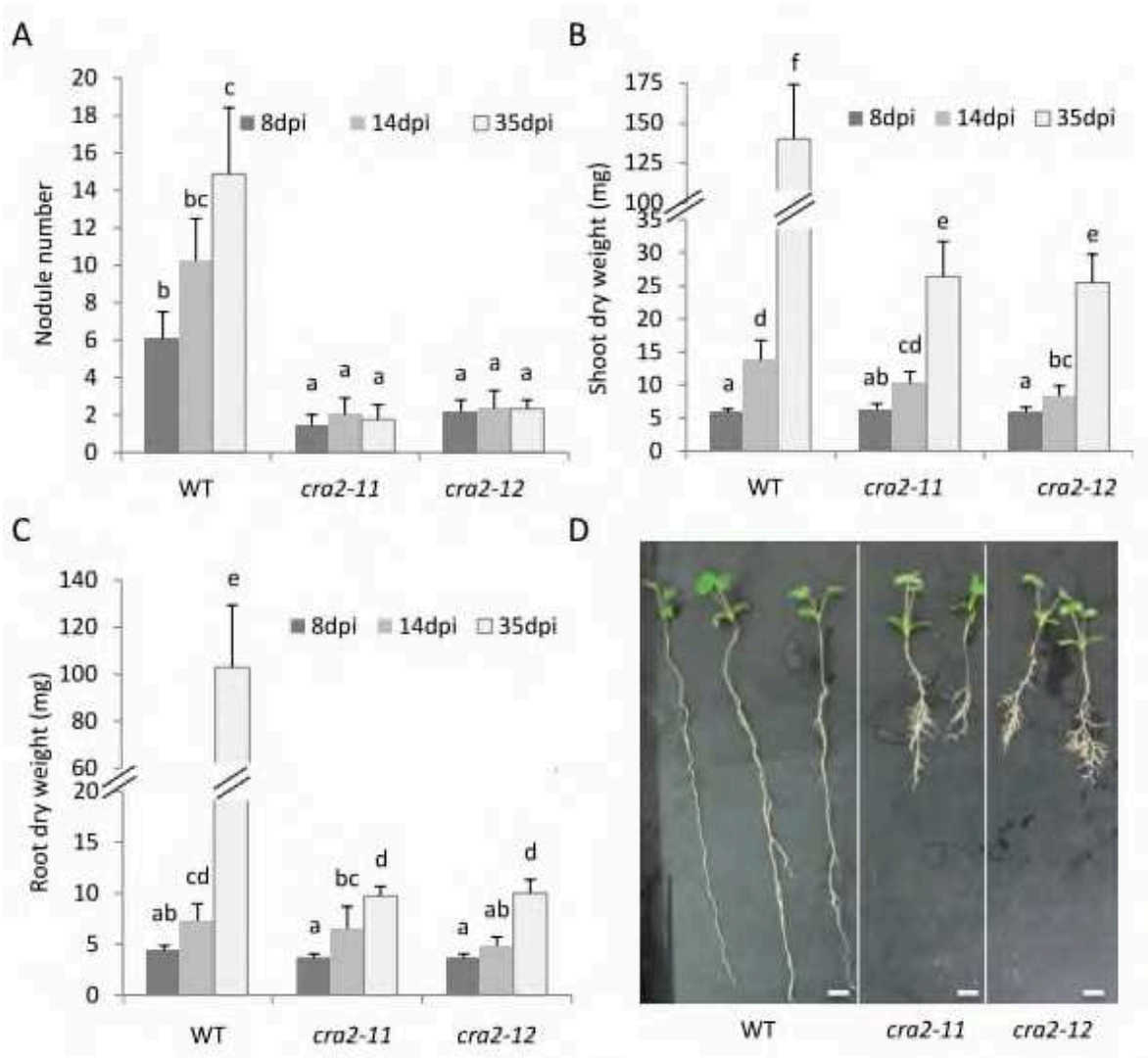


Figure S3.The *cra2* low nodulation phenotype is detected before scoring for shoot or root biomass phenotypes.

A. Quantification of the nodule number of WT, *cra2-11* or *cra2-12* mutant plants grown in perlite/sand pots on a low N medium for 8, 14 or 35 days post-inoculation with rhizobium.

B. Quantification of the shoot dry weight of WT, *cra2-11* or *cra2-12* nodulated plants grown as described in A.

C. Quantification of the root dry weight of WT, *cra2-11* or *cra2-12* nodulated plants grown as described in A.

D. Representative image of WT, *cra2-11* or *cra2-12* nodulated plants grown as described in A, 8 days post-inoculation with rhizobium. Bar = 1 cm.

In A-C, error bars represent confidence intervals ($\alpha = 0.05$, n = 10), and a Kruskal and Wallis test was used to assess significant differences indicated by letters ($\alpha < 0.01$). One representative biological experiment out of two is shown.

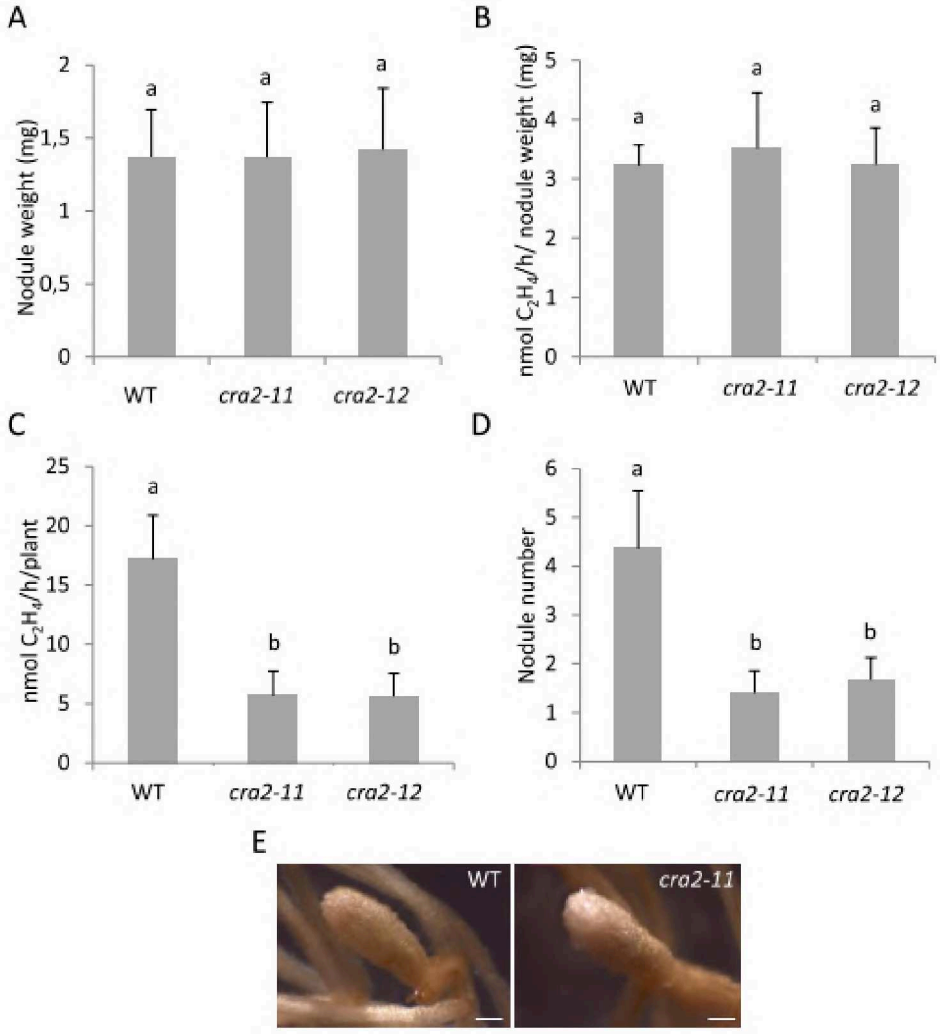


Figure S4. Nitrogen fixation capacity of *cra2* mutant nodules and plants.

A-C. The N fixation capacity of Wild-Type (WT), *cra2-11* or *cra2-12* mutant plants grown in a perlite-sand mixture on a low N medium was estimated using an Acetylene Reduction Assay (ARA), four weeks post-inoculation with rhizobium. (**A**) Fresh nodule weight (in mg). (**B**) Specific ARA activity per nodule fresh weight (in nmole of C_2H_4 per h per mg). (**C**) ARA activity per plant (in nmole of C_2H_4 per h).

D. Nodule number of WT, *cra2-11* or *cra2-12* mutant plants grown as described in A.

In A-D, error bars represent confidence intervals ($\alpha = 0.05$; n = 10), and a Kruskal and Wallis test was used to assess significant differences indicated by letters ($\alpha < 0.05$). One representative biological experiment out of two is shown.

E. Representative images of WT and *cra2-11* nitrogen fixing nodules as described in A, four weeks post-inoculation with rhizobium. Bar = 0,5mm.

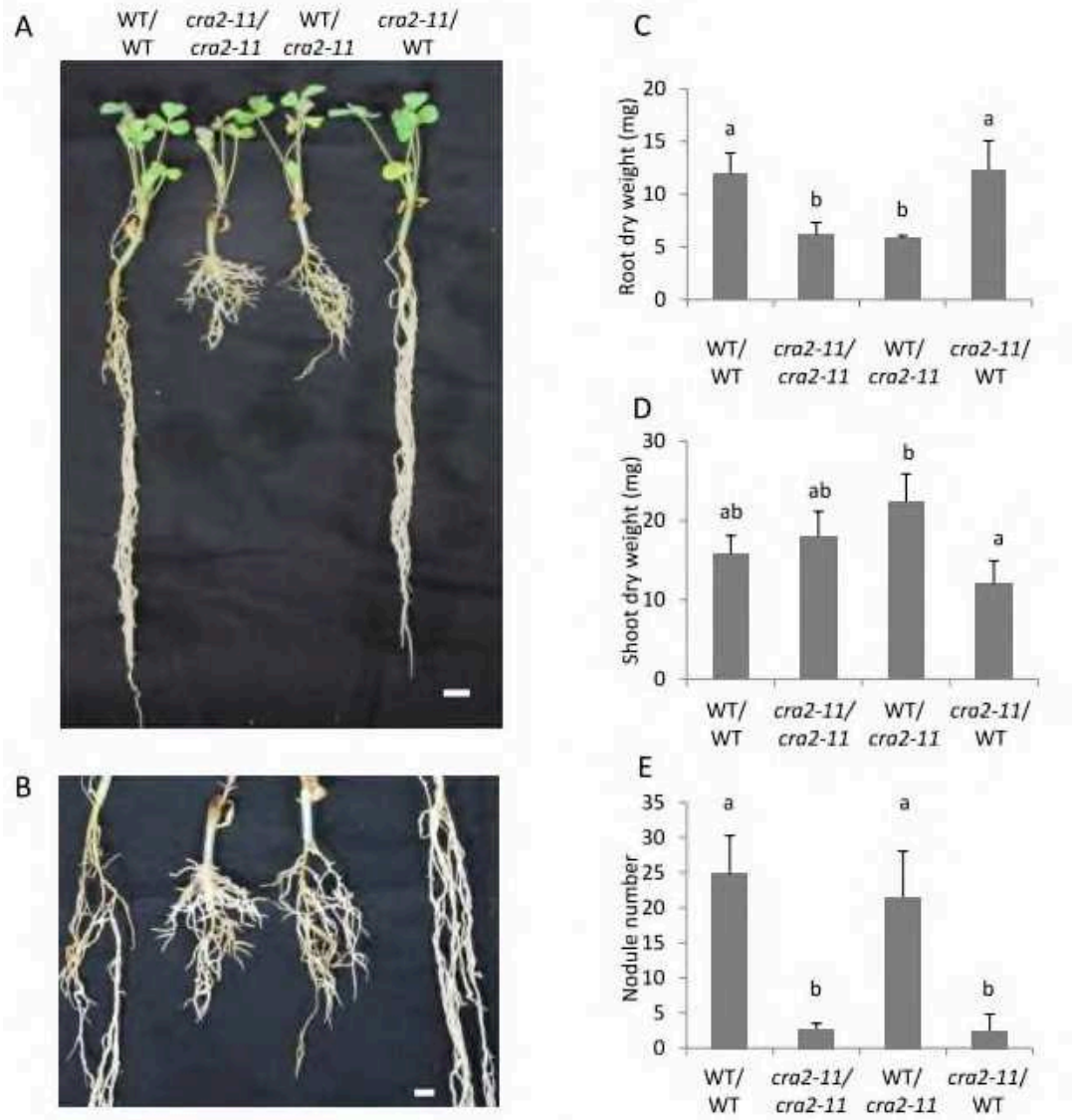


Figure S5. Symbiotic nodule number is controlled by CRA2 activity in shoots and lateral root number by CRA2 activity in roots.

A. Representative images of different grafting combinations between Wild-Type (WT) or *cra2-11* plants grown in a perlite-sand mixture for four weeks on a low N medium, two weeks post-inoculation with rhizobium. Shoot/root grafting combinations are indicated above each picture. Bar = 2cm.

B. Detail of nodulated roots of the different grafting combinations shown in (A). Bar = 0.2 cm.

C. Quantification of the root dry weight (in mg) of the different WT/*cra2* grafting combinations.

D. Quantification of the shoot dry weight (in mg) of the different WT/*cra2* grafting combinations.

E. Quantification of the nodule number of the different WT/*cra2* grafting combinations.

In C to E, error bars represent confidence intervals ($\alpha = 0.05$; $n > 9$) and a Kruskal and Wallis test was used to assess significant differences indicated by letters ($\alpha < 0.05$). One representative biological experiment out of two is shown.

A

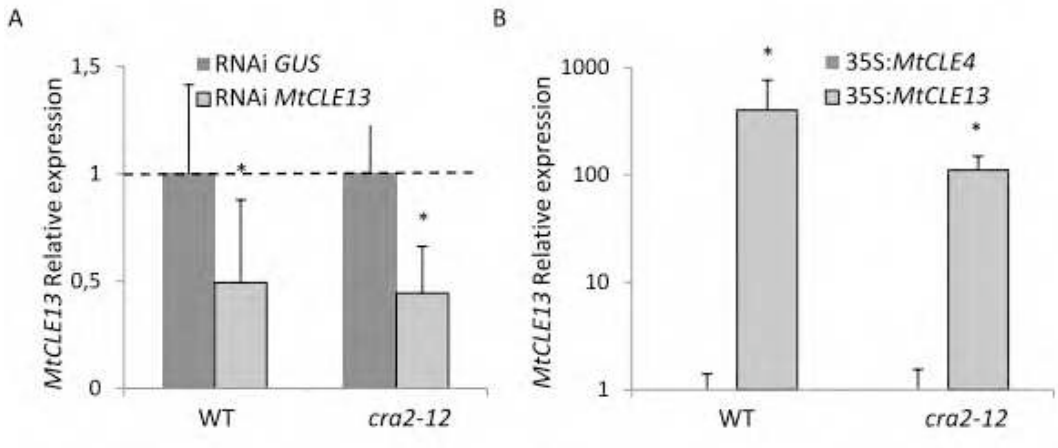


Figure S6. *MtCLE13* expression in RNA interference or overexpressing roots.

A. Real-time RT-PCR analysis of *MtCLE13* expression in roots inoculated for two weeks with rhizobium and expressing a RNA interference (RNAi) construct targeting either *GUS* as a negative control or the *MtCLE13* gene. Expression data are normalized relatively to the *GUS* control in each genotype, as indicated by the dotted line.

B. Real-time RT-PCR analysis of *MtCLE13* expression in roots inoculated for two weeks with rhizobium and overexpressing from the 35S:CaMV promoter either *MtCLE4* as a negative control or the *MtCLE13* gene. Expression data are normalized relatively to the *MtCLE4* control in each genotype.

In both cases, error bars represent standard deviation (n = 4) and a Mann-Whitney test was used to assess significant differences indicated by asterisks ($\alpha < 0.05$). One representative biological experiment out of two is shown.

Table S1. Primers used in this study.

qRT-PCR	*MtCLE13*	CCGAAGCCTTCTACAGAAACTACG	TCTTGGTGGTGATCTTCCATTATGC
	MtENOD11	GCGTATTTGCAAGCAACAAG	CCACATGCAAAGATGGGACG
	MtActin11	TGGCATCACTCAGTACCTTTCAACAG	ACCCAAAGCATCAAATAATAAGTCAACC
	MtRBP1	AGGGGCAAGTTCCTTCATTT	AAACGGACGGAAAATGTGAG
Genotyping for insertional mutants	*cra2-11 insertion*	AAGATGCATTATTTGTGGACAAGGC	TTCCCCTTATTTGTTGAGGGG
	cra2-11 endogenous	AAGATGCATTATTTGTGGACAAGGC	TTGGCAACAAATTTCATATTAAGG
	cra2-14 insertion	TCGTTGCTGCTTTCTGCGC	GTTGAAAGCTTTGCAGGGA
	cra2-14 endogenous	GGTTTCGTGTCAGTAATAACCG	GTTGAAAGCTTTGCAGGGA
Genotyping for genetic lesions	*cra2-12*	AAGATGCATTATTTGTGGACAAGGC	TTGGCAACAAATTTCATATTAAGG
	cra2-13	GGTTTCGTGTCAGTAATAACCG	TCCCTGCAAAGCTTTCAACT
	cra2-14 insertion	TCGTTGCTGCTTTCTGCGC	GTTGAAAGCTTTGCAGGGA
	cra2-14 endogenous	GGTTTCGTGTCAGTAATAACCG	GTTGAAAGCTTTGCAGGGA
	cra2-15	ACTTCCTTGTTGGCAGCATC	GGAAGGTTCTGTTCCAAAAGG
	sunn-4	CACCATGAAAAACATCACATGTTATTTG	TCCCGAGAGAATTGCCAGAA
Cloning	MtCLE13 RNAi construct 1	CACCTCCTGAGATATCCCTAACTTGTTT	GCCGGTATACAACCGATCAA
	MtCLE13 RNAi construct 2	CACCATTCCTTCTTCCATTCA	GCCTGCTGGGGAGAGTCTAT

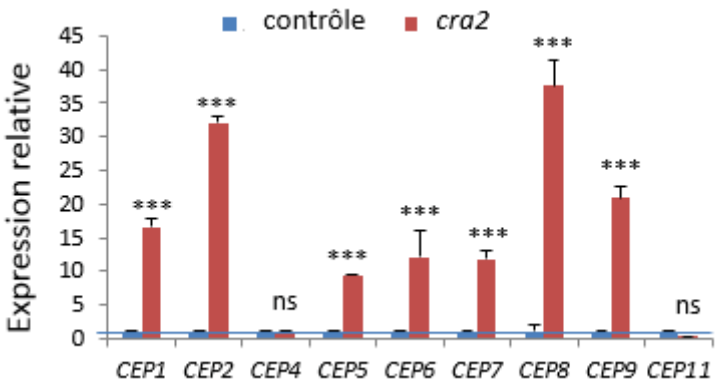


Figure 47 : Expression relative des gènes codant pour des « C-terminally Encoded Peptides » (CEP) chez le mutant *cra2*.

L'expression des neuf gènes *CEP* canoniques du groupe I et détectables dans des racines de *M. truncatula* (Jemalong A17) a été analysée par qRT-PCR dans des racines de plantes sauvages (contrôle) ou du mutant *cra2-11* cultivés en milieu carencé en azote (« i »; Blondon, 1964). Les valeurs obtenues pour le génotype mutant sont normalisées par rapport au génotype sauvage. Une réplique biologique représentative parmi trois expériences indépendantes est représentée, les barres d'erreur indiquant l'écart-type (n≥ 8 plantes par réplique). Un test de Mann & Whitney a été réalisé pour comparer les niveaux d'expression de chaque gène dans les racines du sauvage et du mutant *cra2*. (ns : non significatif ; *** p<0,001)

II. Résultats complémentaires

A. Expression « basale » des gènes CEP dans le mutant cra2

Les analyses par PCR en temps réel de l'expression du gène codant pour le peptide CEP1 ont révélé que les transcrits *CEP1* étaient largement plus abondants dans les racines du mutant *cra2* que dans celles des plantes sauvages (**Figure 47**). Nous avons alors testé l'expression de l'ensemble des gènes canoniques codant pour des peptides CEP, c'est-à-dire du groupe I (*CEP1* à *CEP11*) dans des racines de plantes sauvages (A17) et du mutant *cra2* en conditions de carence azotée et non-inoculées par rhizobium. Ainsi, la majorité des transcrits *CEP* détectables, à l'exception de *CEP4* et *CEP11,* sont exprimés à un niveau plus important dans les racines du mutant *cra2* par rapport au sauvage (**Figure 47**). De manière intéressante, ces gènes *CEP4* et *CEP11* sont ceux qui sont déjà les plus fortement exprimés dans les conditions expérimentales sélectionnées, à savoir des racines jeunes cultivées en milieu carencé en azote.

Ces résultats suggèrent qu'une boucle de régulation négative existe entre la production des signaux peptidiques CEP et la voie de signalisation médiée par le récepteur CRA2, à l'exception de CEP4 et CEP11. Cette expression différentiellement régulée des gènes *CEP* dans le mutant *cra2* pourrait être testée à la suite dans d'autres conditions expérimentales, telles qu'en présence d'azote ou de rhizobium, voire dans un mutant *cra2* obtenu dans le génotype R108 (Huault et al., 2014), pour voir si ce comportement se généralise ou si ces dérégulations sont dépendantes des conditions environnementales et/ou du génotype. A la suite, l'existence d'un rôle spécifique éventuel par rapport au récepteur CRA2 des peptides CEP4 et CEP11 qui montrent une régulation différente dans le mutant *cra2* par rapport aux autres peptides CEP pourrait être testé.

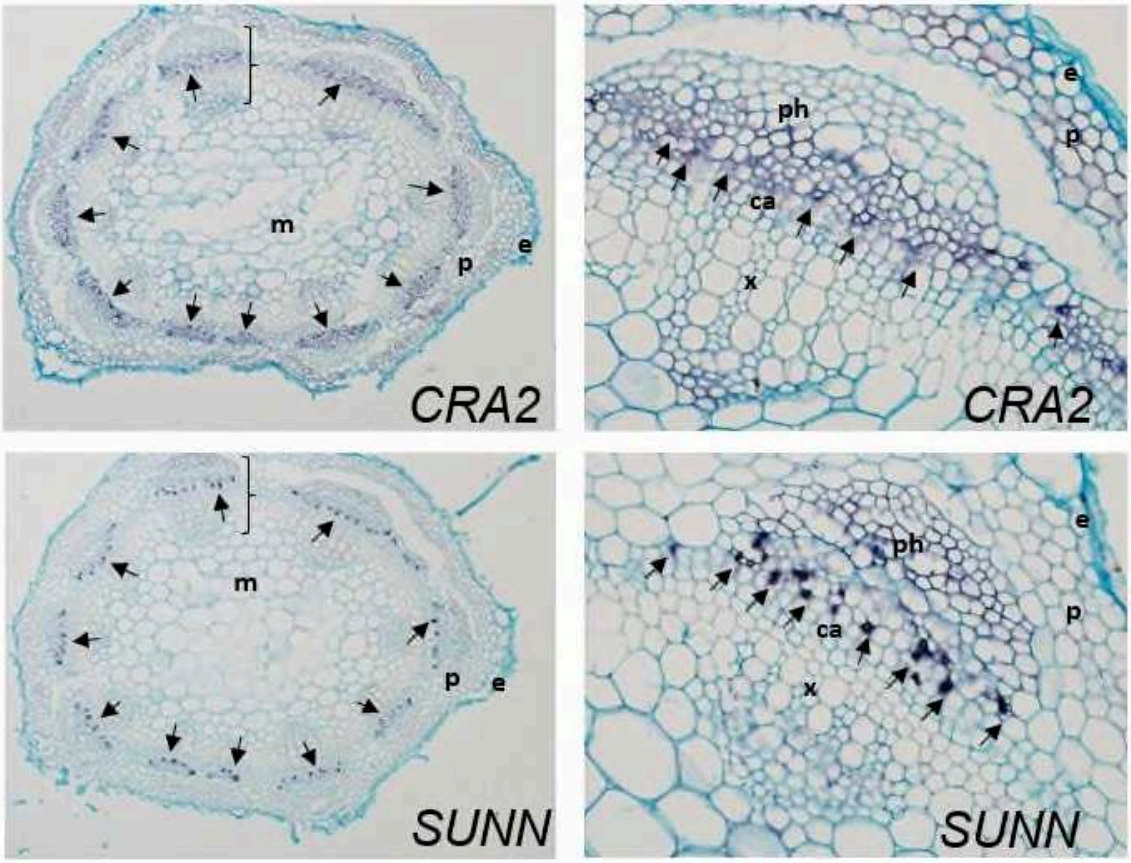


Figure 48 : Expression spatiale de CRA2 et SUNN dans des tiges de plantes sauvages.

Images représentatives de coupes de tiges de plantes sauvages (Jemalong A17) observées en microscopie à fond clair après une hybridation *in situ* réalisée selon le protocole décrit dans Bustos-Sanmamed et al. (2013) à l'aide de sondes antisens correspondant aux transcrits de *CRA2* ou de *SUNN* (signal indiqué par des flèches noires). La sonde *CRA2* est complémentaire à la région située entre les nucléotides 1428 et 1688 après l'ATG, et la sonde *SUNN* correspond à la région située entre les nucléotides 2311 et 2653 après l'ATG. Au minimum 15 coupes de tiges issues de trois plantes différentes ont été observées. Les images de droite montrent le détail d'un faisceau cribro-vasculaire (indiqué par une accolade sur l'image de gauche).

(e) épiderme, (p) parenchyme, (m) moelle ou parenchyme médullaire (ph) phloème, (x) xylème, (ca) cambium.

B. Localisation spatiale des transcrits CRA2 *et* SUNN *dans des tiges et analyse d'une interaction physique des récepteurs en système hétérologue*

Dans le cadre de l'hypothèse sous-tendant ce chapitre d'une coordination entre les voies systémiques médiées par CRA2 et SUNN pour permettre à la plante d'adapter sa capacité de nodulation de manière dynamique aux fluctuations des conditions environnementales, nous avions envisagé la possibilité d'une action conjointe des récepteurs CRA2 et SUNN au sein d'un même complexe de récepteurs, potentiellement via le recrutement d'un co-récepteur commun inconnu à ce jour. Le ratio de production de peptides CEP ou CLE, différent en fonction des conditions de culture, sans azote ou en présence de rhizobium, serait alors perçu via un même complexe CRA2/SUNN/co-récepteur pour réguler différentiellement des effecteurs agissant en aval. Dans cette hypothèse, un prérequis serait que les profils d'expression de ces récepteurs soient chevauchants au niveau de certaines cellules dans les parties aériennes depuis lesquelles les récepteurs CRA2 et SUNN régulent la nodulation de manière antagoniste. Les fusions transcriptionnelles *pCRA2:GUS* et *pSUNN:GUS* analysées en amont de la Thèse indiquent que ces récepteurs sont tous deux exprimés dans les tissus vasculaires au niveau des racines et des parties aériennes (Schnabel et al., 2012; Huault et al., 2014). Afin de valider ce résultat par une approche indépendante, ainsi que pour analyser plus en détail la présence éventuelle de transcrits codant pour ces deux récepteurs dans les mêmes cellules, nous avons réalisé des expériences d'*hybridation in situ* sur des coupes en séries de tiges avec des sondes ARN antisens correspondant aux transcrits de ces deux gènes (**Figure 48**). Les transcrits *SUNN* et *CRA2* sont bien co-exprimés dans les tissus vasculaires des tiges, plus précisément au niveau des pôles de phloème. Ces résultats suggèrent donc que les récepteurs CRA2 et SUNN sont co-exprimés au sein des mêmes cellules, ce qui valide le prérequis nécessaire pour tester l'hypothèse d'une co-existence des deux récepteurs au sein d'un même complexe.

Nous avons alors ensuite testé par BiFC (« Bimolecular Functional Complementation ») si les récepteurs CRA2 et SUNN pouvaient potentiellement interagir. Les séquences codantes de CRA2 ou SUNN ont été fusionnées à la partie N-terminale ou C-terminale de la protéine fluorescente YFP (« Yellow Fluorescent Protein »), puis cotransformées via *Agrobacterium tumefasciens* dans des feuilles de tabac (*Nicotiana*

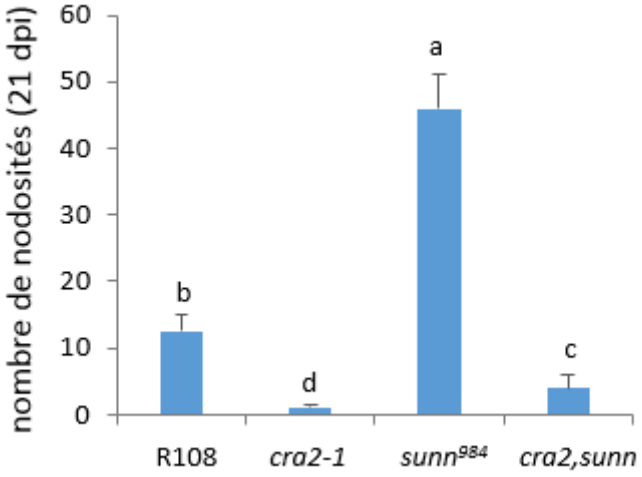


Figure 49 : Phénotype de nodulation du double mutant *cra2-1;sunn* dans le génotype R108.

Quantification du nombre de nodosités de plantes sauvages (génotype R108), des mutants *cra2-1*, *sunn* ^{NF984}, et du double mutant *cra2-1;sunn* cultivés en perlite/sable en condition de carence azotée (solution « i »; Blondon, 1964), 21 jours après inoculation par la souche de rhizobium *S. meliloti Sm1021*. La moyenne de trois répliques biologiques est représentée, les barres d'erreur indiquant l'intervalle de confiance ($\alpha < 0,05$; $n \geq 19$ plantes par réplique). Un test de Kruskall et Wallis a été réalisé et les différences significatives sont indiquées par des lettres.

benthamiana), en mélangeant en quantités égales soit la construction CRA2-YFPn avec SUNN-YFPc, soit la construction CRA2-YFPc avec SUNN-YFPn. Aucun signal fluorescent n'a été détecté à l'aide d'un microscope à épifluorescence, alors qu'un contrôle positif déjà validé précédemment associant SUNN-YFPn avec CRN-YFPc (Crook et al., 2016) a permis de détecter de la fluorescence dans cette même expérience (données non montrées). Ces résultats, bien que préliminaires, ne valident donc pas l'hypothèse d'une interaction physique entre les deux récepteurs CRA2 et SUNN, même si l'implication d'un co-récepteur inconnu reste envisageable. Suite aux résultats obtenus *à postériori* de ces expériences avec le double mutant *cra2;sunn*, révélant l'indépendance génétique des deux voies CRA2 et SUNN, ces expériences d'interactions entre CRA2 et SUNN n'ont pas été poursuivies.

C. Phénotype de nodulation d'un double mutant cra2;sunn *généré dans le fond génétique R108*

En parallèle de l'analyse du double mutant *cra2;sunn* généré dans le fond génétique Jemalong A17 (Article 2), nous avons aussi croisé les mutants d'insertion *Tnt1 cra2-1* (lignée NF0186 ; Huault et al., 2014) et *sunn* (lignée NF0984 ; Pislariu et al., 2012) issus de la collection de la « Noble Foundation » (NF, USA) générée dans le fond génétique R108 de *M. truncatula*. Le nombre de nodosités formées chez ce double mutant *cra2-1;sunn* est intermédiaire entre celui de plantes sauvages et du mutant simple *cra2-1* (**Figure 49**). Ce phénotype, corroboré par celui du double mutant *cra2-2;sunn5* généré indépendamment, mais aussi dans le fond génétique R108, par Nowak et al. (2019), est donc sensiblement différent de celui observé dans le double mutant *cra2-11;sunn4* obtenu dans le fond génétique Jemalong A17, qui lui était intermédiaire entre le phénotype de plantes sauvages et du mutant simple *sunn4* (Article 2, Figure 5). On peut réconcilier ces résultats apparemment divergents en considérant le fait que la force des phénoypes de nodulation des simples mutants par rapport aux plantes sauvages est différente dans ces deux fonds génétiques. Ainsi, dans le fond R108, l'allèle mutant *cra2-1* forme environ 9 fois moins de nodosités qu'une plante sauvage, et l'allèle $sunn^{NF0984}$ forme environ 3,5 fois plus de nodosités que le sauvage ; tandis que dans le fond A17, *cra2-11* a un nombre de nodosités réduit d'environ 3,5 fois seulement, alors que l'allèle mutant *sunn4* développe environ 7 fois plus de nodosités, soit le double du

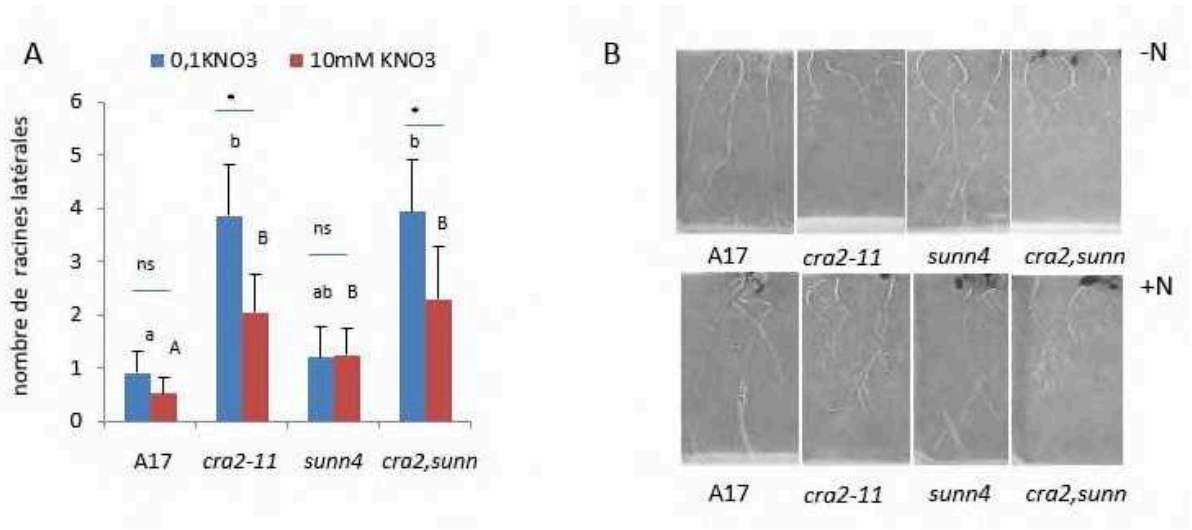


Figure 50 : Phénotype racinaire du double mutant *cra2-11;sunn4* dans le génotype Jemalong A17.

(A) Quantification du nombre de racines latérales neuf jours après germination (soit deux jours après l'inoculation par la souche de rhizobium *Sm 1021*) de plantes sauvages, des mutants *cra2-11*, *sunn4,* et du double mutant *cra2-11;sunn4,* cultivés *in vitro* sur un milieu Farhaeus (Truchet et al., 1989) supplémenté de KNO_3 0,1mM (faible azote, « -N ») ou KNO_3 10mM (fort azote, « +N »). Une réplique biologique représentative parmi trois expériences indépendantes est représentée, et les barres d'erreur indiquent l'intervalle de confiance ($\alpha < 0,05$; $n \geq 16$ plantes par réplique). Un test de Kruskall et Wallis a été réalisé pour mettre en évidence les différences significatives entre les génotypes cultivés en faible azote (différences indiquées par des lettres minuscules) ou en fort azote (différences indiquées par des lettres majuscules). Un test de Mann & Whitney a été réalisé pour comparer les conditions de faible et fort azote pour chaque génotype (ns : non significatif ; * $p<0,05$).

(B) Images représentatives des plantes des différents génotypes sur un milieu pauvre en azote (« -N ») ou riche en azote (« + N »), 14 jours après germination.

mutant *sunn* obtenu dans R108. En d'autres termes, le phénotype de nodulation du mutant *cra2* est plus drastique dans le fond génétique R108, alors que c'est le phénotype du mutant *sunn* qui est le plus fort dans le fond génétique Jemalong A17. En conséquence, le phénotype supernodulateur de *sunn* ne peut pas contrecarrer totalement le phénotype très fort de nodulation réduite du mutant *cra2* chez R108, alors que chez Jemalong A17, c'est le phénotype du mutant *cra2* qui ne peut pas contrecarrer totalement le phénotype fort du mutant *sunn*. En tenant compte de ces différences de forces phénotypiques pour interpréter les doubles mutants obtenus dans les deux fonds génétiques, il est donc de fait attendu que le nombre de nodosités ne soit pas identique aux plantes sauvages dans le cas d'une indépendance des deux voies génétiques, et que le phénotype de nodulation réduite de *cra2* « domine » chez R108 alors que le phénotype de nodulation accrue de *sunn* « domine » chez A17. Ainsi, on peut réconcilier les résultats apparemment différents obtenus chez Jemalong A17 et R108, y compris par Nowak et al. (2019). Cette indépendance génétique des deux voies est par ailleurs validée par l'analyse « croisée » de l'action des peptides CLE et CEP, l'effet inhibiteur de CLE13 sur la nodulation étant toujours observé chez le mutant *cra2* (Article 2, Figure 5), et l'action promotrice de CEP1 étant toujours observée dans le mutant *sunn* (Imin et al., 2013).

D. Phénotype de nombre de racines latérales du double mutant cra2;sunn

Pour compléter la caractérisation du double mutant *cra2;sunn,* nous avons aussi analysé son phénotype racinaire en parallèle du phénotype de nodulation. Le comptage des RLs des mutants simples et du double mutant *cra2;sunn* a été réalisé sur un milieu contenant soit une forte concentration d'azote (10mM KNO_3), soit une faible concentration d'azote (0,1mM KNO_3). Tout d'abord, si on considère l'effet du génotype sur le phénotype racinaire, le mutant *cra2* ainsi que le double mutant *cra2;sunn* forment un nombre de RLs supérieur au sauvage, et ce quelle que soit la concentration en azote (**Figure 50**). Le mutant *sunn* forme lui un nombre de RLs équivalent au sauvage en condition de déficit azoté, mais un nombre supérieur en présence d'azote. Il est à noter qu'en présence d'azote le nombre de RLs du mutant *sunn* ne devient alors pas significativement différent de celui du mutant *cra2* en présence d'azote.

Dans un deuxième temps, si on considère l'effet de l'azote, on ne voit pas d'effet significatif de la concentration en azote sur le nombre de RLs du sauvage ou du mutant *sunn*, en accord avec Lagunas et al. (2019). La présence d'azote a par contre un effet inhibiteur sur la formation des RLs du mutant *cra2,* et un effet similaire est observé dans le double mutant *cra2;sunn.*

L'ensemble de ces données indiquent d'une part que la formation des RLs du mutant *cra2* est affectée de manière plus sensible par la présence d'azote que des plantes sauvages ou que le mutant *sunn*, qui dans nos conditions expérimentales ne sont pas significativement affectés par la présence d'azote, comme observé par Lagunas et al. (2019). D'autre part, en déficit azoté, le mutant *sunn* n'ayant pas de phénotype racinaire, il était attendu que le double mutant ait un phénotype racinaire similaire au simple mutant *cra2*. En présence d'azote cependant, les mutants *cra2* et *sunn* présentant tous deux une augmentation du nombre de RLs par rapport au sauvage, un effet additif des deux mutations dans le double mutant aurait pu être attendu, ce qui n'a pas été le cas.

Au final, ces résultats indiquent que contrairement au phénotype de nodulation où les mutations *cra2* et *sunn* sont à l'origine de phénotypes forts et opposés, qui donnaient lieu à une compensation dans le double mutant, le phénotype racinaire de *sunn* étant faible par rapport à celui de *cra2*, le double mutant présente sans surprise un phénotype racinaire similaire au simple mutant *cra2*, indépendamment de la mutation *sunn*. Le fait que le sauvage ne présente pas de différence significative du nombre de RLs en présence ou en déficit d'azote ne simplifie pas les interprétations de cette expérience, et en perspective, la caractérisation du phénotype de RL du double mutant *cra2;sunn* en fonction de la présence d'azote pourrait être réalisée en absence de rhizobium, ainsi qu'en utilisant comme source d'azote du NH_4NO_3 comme dans l'étude de Lagunas et al. (2019).

E. Effet local de CEP1 sur le nombre de racines latérales

Les greffes réalisées entre les plantes sauvages et le mutant *cra2* ayant mis en évidence qu'une fonction de CRA2 était requise dans les racines pour contrôler le nombre de RLs (Huault et al., 2014 ; Article 2), et sachant que le récepteur CRA2 est exprimé dans les tissus vasculaires des parties aériennes et des racines, nous avons voulu tester par une

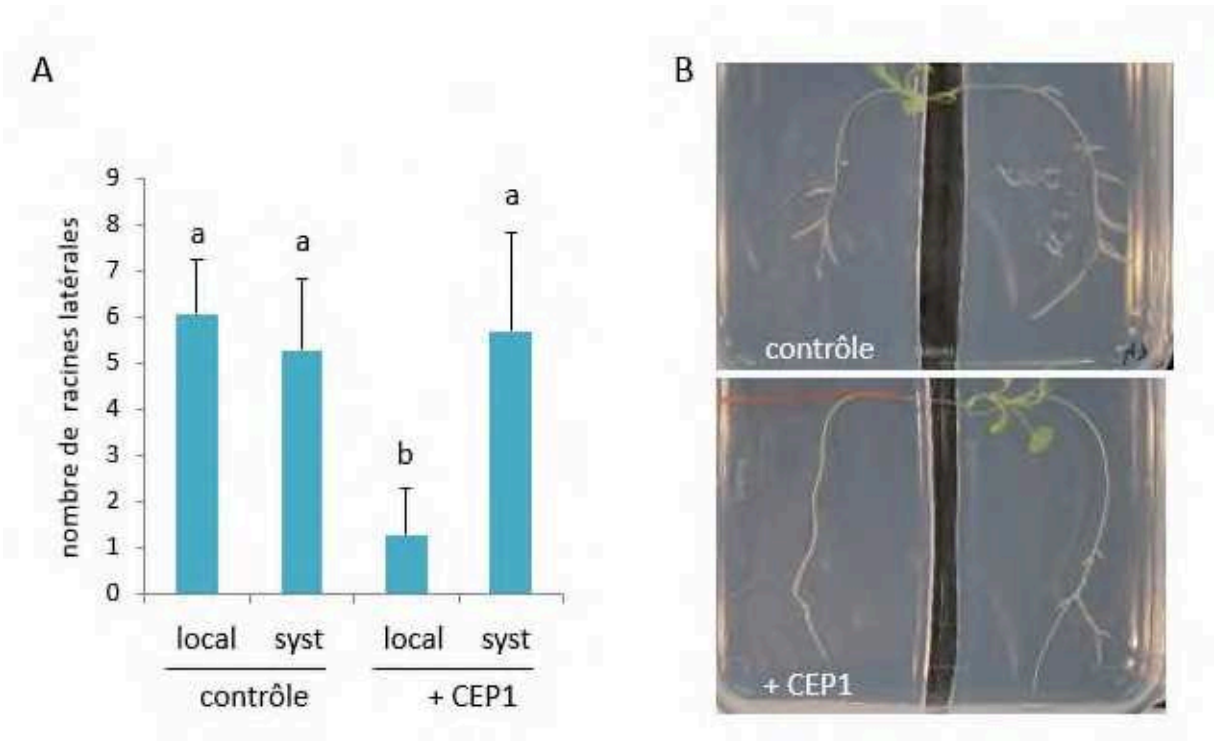


Figure 51 : Le peptide CEP1 inhibe localement le nombre de racines latérales.

(A) Quantification du nombre de racines latérales formées sur les demi-systèmes racinaires de plantes Jemalong A17 cultivées en « split-root » sur un milieu Fahraeus avec azote (1mM NH_4NO_3; Truchet et al., 1989), 16 jours après traitement avec des peptides CEP1 1µM dans le compartiment racinaire « local », ou après addition d'eau dans un des deux compartiments du « split-root » contrôle. Les racines sont comptées séparément dans chaque compartiment (local ou systémique). Une réplique biologique représentative parmi deux expériences indépendantes est représentée, et les barres d'erreur indiquent l'intervalle de confiance ($\alpha<0,05$; $n\geq10$ plantes par réplique). Un test de Kruskall et Wallis a été réalisé et les différences significatives sont indiquées par des lettres.

(B) Images représentatives de racines cultivées en « split-root » huit jours après addition d'eau (contrôle) ou de peptide CEP1 1µM dans un des deux compartiments, dit « local ».

approche indépendante si l'effet inhibiteur de CEP1 sur la formation des RLs était local ou systémique. En effet, les greffes permettent de conclure si l'activité du produit d'un gène est requise au niveau de la partie aérienne et/ou racinaire, mais elles ne permettent pas de distinguer si la signalisation peptide/récepteur est directement locale ou si elle pourrait impliquer potentiellement en aval du récepteur un signal systémique agissant sur les racines distantes via les parties aériennes. Des expériences de « split-root » ont donc été réalisées, où les demi-systèmes racinaires de plantes sauvages (Jemalong A17) ont été traités ou non avec le peptide CEP1, et où le nombre de RLs formées sur chaque demi-système racinaire a ensuite été quantifié (**Figure 51**). Cette expérience indique que le nombre de RLs formées dans le compartiment systémique du « split–root » traité par le peptide CEP1 est équivalent à celui du nombre de RLs formées dans les compartiments locaux et systémiques des plantes contrôles (ie non traitées par le peptide CEP1), et que seul le demi-système racinaire traité localement par CEP1 présente un nombre réduit de RLs. En accord avec les résultats des greffes (Huault et al., 2014 ; Article 2), ces données indiquent donc que les peptides CEP1 régulent localement et négativement la formation des RLs.

CHAPITRE III:

Intégration de la voie de signalisation CEP/CRA2 avec la voie cytokinine/CRE1 et la voie CLE/SUNN

I. Introduction et article 3 :

"The NIN transcription factor coordinates CEP and CLE signaling peptides that regulate nodulation antagonistically" Laffont C., Ivanovici A., Gautrat P., Brault M., Djordjevic M. and Frugier F. Nature Communications 11:3167 (2020)

L'indépendance des voies systémiques CRA2 et SUNN régulant de manière antagoniste la nodulation démontrée dans le chapitre précédent nous a amenés à faire évoluer nos hypothèses sur les mécanismes qui permettraient d'assurer une coordination dynamique entre ces deux voies de signalisation, en proposant qu'une co-régulation locale de l'expression de peptides CEP et CLE puisse exister pour moduler positivement ou négativement le nombre de nodosités formées en fonction des conditions environnementales et du statut métabolique de la plante. Nous avons donc recherché l'existence de gène(s) *CEP(s)* induit(s) rapidement suite à l'interaction symbiotique avec les rhizobia, mais aussi en réponse aux NFs et aux cytokinines, deux signaux essentiels pour l'initiation de la nodulation, les cytokinines végétales agissant en aval de l'activation de la voie des NFs bactériens (Tirichine et al., 2007; Plet et al., 2011). Un gène *CEP* unique, *CEP7*, a ainsi été identifié comme étant rapidement induit à la fois en réponse aux rhizobia, aux NFs, et aux cytokinines, et ce de manière dépendante du récepteur des NFs, NFP, du récepteur des cytokinines, CRE1, mais aussi du facteur de transcription NIN. L'induction du gène *CEP7* dans ces trois conditions rappelle celle du gène *CLE13*, ainsi que celle du régulateur transcriptionnel NIN qui est lui-même induit transcriptionnellement dans ces conditions. Le domaine d'expression symbiotique de *CEP7* est associé à l'épiderme racinaire -où ont lieu les infections par les rhizobia- et aux primordia de nodosités, cette expression étant chevauchante avec les domaines d'expression de *CLE13* et de *NIN* (Mortier et al., 2010; Soyano et al., 2014). L'hypothèse d'un rôle de NIN dans l'activation transcriptionnelle de ces deux gènes a été validée par une combinaison d'expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChiP) et de transactivation dans des protoplastes ou dans les racines de *M. truncatula*. De manière intéressante, les séquences promotrices de *CLE13* et *CEP7* contiennent dans leur région proximale un site prédit comme pouvant être lié par le facteur de transcription NIN (NBS, pour « NIN Binding Site »), comparable à ceux identifiés préalablement chez *L. japonicus*. Lorsque cet élément *cis* NBS prédit est éliminé du promoteur de *CEP7*, l'activation de la transcription de *CEP7* en réponse

à rhizobium est fortement réduite. Enfin, l'activité biologique de CEP7 a été analysée par une combinaison d'approches de surexpression, de traitement exogène, et de réduction de l'expression par des stratégies d'ARN interférence et de microARN artificiel, indiquant un rôle positif de CEP7 sur la formation des nodosités, et en particulier sur le nombre d'infections. Le rôle positif de CEP7 sur la nodulation est dépendant du récepteur CRA2 et systémique car d'une part, des expériences de greffe indiquent que l'effet stimulateur des peptides CEP7 requiert la fonction de CRA2 dans la partie aérienne ; et d'autre part, des expériences de « split-root » montrent que l'application locale des peptides CEP7 a un effet positif sur la nodulation dans le compartiment racinaire systémique.

Ainsi, nous avons mis en évidence que le facteur de transcription NIN régulait en réponse à différents signaux - présence de rhizobia, de NFs et de cytokinines - l'expression de gènes codant pour des peptides appartenant à deux familles différentes, *CEP7* et *CLE13*, et présentant un rôle antagoniste dans le contrôle du nombre de nodosités formées, suggérant un modèle de régulation fine et dynamique de la capacité de nodulation des plantes légumineuses.

Dans cet article, j'ai réalisé la plupart des expériences à l'exception des analyses du domaine d'expression de *CEP7* (Figure 3), des applications exogènes de peptides CEP7 dans les « split-roots » (Figure S4B), et des traitements avec le peptide CEP7 sur les greffes (Figure S4A). J'ai par ailleurs réalisé seulement la moitié des répliques biologiques des expériences d'application exogène de peptide CEP7 sur les mutants *cra2* (Figure 6B), et les expériences de *trans*-activation dans les protoplastes de *M. truncatula* ont été effectuées avec l'expertise et l'aide de Mathias Brault dans l'équipe d'accueil. Enfin, j'ai écrit la première version du manuscrit et réalisé l'ensemble des figures.

nature COMMUNICATIONS

ARTICLE

https://doi.org/10.1038/s41467-020-16968-1 OPEN

The NIN transcription factor coordinates CEP and CLE signaling peptides that regulate nodulation antagonistically

Carole Laffont[1], Ariel Ivanovici[2], Pierre Gautrat[1], Mathias Brault[1], Michael Anthony Djordjevic[2] & Florian Frugier[1✉]

Legumes tightly regulate nodule number to balance the cost of supporting symbiotic rhizobia with the benefits of nitrogen fixation. C-terminally Encoded Peptides (CEPs) and CLAVATA3-like (CLE) peptides positively and negatively regulate nodulation, respectively, through independent systemic pathways, but how these regulations are coordinated remains unknown. Here, we show that rhizobia, Nod Factors, and cytokinins induce a symbiosis-specific *CEP* gene, *MtCEP7*, which positively regulates rhizobial infection. Via grafting and split root studies, we reveal that MtCEP7 increases nodule number systemically through the MtCRA2 receptor. *MtCEP7* and *MtCLE13* expression in rhizobia-inoculated roots rely on the MtCRE1 cytokinin receptor and on the MtNIN transcription factor. MtNIN binds and trans-activates *MtCEP7* and *MtCLE13*, and a NIN Binding Site (NBS) identified within the proximal *MtCEP7* promoter is required for its symbiotic activation. Overall, these results demonstrate that a cytokinin-MtCRE1-MtNIN regulatory module coordinates the expression of two antagonistic, symbiosis-related, peptide hormones from different families to fine-tune nodule number.

[1] Institute of Plant Sciences Paris-Saclay (IPS2), CNRS, INRA, Univ d'Evry, Université de Paris; Université Paris-Saclay, Gif-sur-Yvette, France. [2] Division of Plant Sciences, Research School of Biology, The Australian National University, Canberra, ACT 2601, Australia. ✉email: florian.frugier@cnrs.fr

About 60 million years ago, members of the *Fabaceae* (legume) plant family evolved the ability to enter into a symbiotic relationship with nitrogen-fixing soil bacteria, generically called rhizobia, to build a dedicated organ on their root system, the root nodule[1]. When mineral nitrogen is limiting in soils, symbiotic rhizobia can provide the nitrogen necessary to support plant growth from the unlimited atmospheric reservoir, thus giving legume plants a competitive advantage in these environments. Legume root nodules initiate following the secretion of rhizobial Nod factor (NF) signals that are perceived at the root epidermis, preferentially in a susceptible region located above the root apical meristem in compatible host plants[2–4]. This symbiotic partner recognition triggers a signaling cascade that activates the rhizobial infection of root hairs and subsequently the formation of infection threads (ITs) that grow toward root inner cortical cells. Simultaneously, rhizobium and NF perception (NFP) at the root epidermis activate cell divisions mostly in the inner cortical and pericycle cells to initiate a nodule organ primordium[5,6], which is reached by growing ITs filled with rhizobia. This primordium then differentiates into a root nodule to accommodate the nitrogen-fixing rhizobia. The legume plant then provides carbon sources to rhizobia, as well as a low oxygen environment that is required to enable the bacterial nitrogenase to fix atmospheric nitrogen in root nodules.

Rhizobial NF signaling in host plant roots rapidly activates the transcription of early nodulation genes such as *ENOD11* (for *early nodulin 11*) in the root epidermis. *ENOD11* expression then follows IT progression from the root epidermis to the cortex[7]. Therefore, *ENOD11* can be considered as a marker for early symbiotic signaling activation and rhizobial infections[8]. Downstream of NF signaling activation, nodule organogenesis requires cytokinin since cytokinin receptor loss-of-function mutants (e.g., *lotus histidine kinase 1* [*lhk1* in *Lotus japonicus*] or *cytokinin response 1* [*cre1* in *Medicago truncatula*]) have a reduced nodulation capacity[9–13]. Consistently, the constitutive activation of LHK1 in the *L. japonicus spontaneous nodule formation2* (*snf2*) mutant triggers ectopic cortical cell divisions and spontaneous nodulation in the absence of rhizobia[14]. Cytokinin additionally negatively regulates rhizobial infections or NF signaling in *L. japonicus* and *M. truncatula*, respectively[10,15–17].

Combined molecular and genetic analyses allowed the identification of genes critical for nodule initiation. Among those, a *L. japonicus* mutant defective in rhizobial entry into root hairs was affected in the nodule inception (NIN) transcription factor (TF)[18]. *NIN* expression is rapidly activated after the perception of NF, and a root hair-specific transcriptomic analysis suggests that NIN regulates rhizobial infections[18–20]. Accordingly, NIN is required for the initiation of symbiotic infections in root hairs[21]. In addition, *NIN* expression is induced rapidly by cytokinin depending on the CRE1 receptor[9,11], and the constitutive expression of *NIN* in *L. japonicus* is sufficient to activate ectopic cortical cell divisions in the absence of rhizobia[22]. Furthermore, *M. truncatula* NIN also restricts the extent of *ENOD11* expression in the root rhizobial susceptible zone, and *nin* presumptive null mutants are impaired in IT formation[18,23]. The *L. japonicus* nin^{daphne} allele, however, shows a non-nodulation phenotype associated with a high number of ITs, indicating that the root zone susceptible for rhizobial infection is enlarged in *daphne*[24]. The *daphne* nodulation phenotype is associated with a broader epidermal expression of *NIN* than in the wild type (WT). In *M. truncatula*, a *daphne-like* mutant was recently identified, and the NIN coding sequence expressed from a 5 kb proximal *NIN* promoter region was sufficient to rescue its hyperinfection phenotype, even though this region was not sufficient to restore nodule organogenesis[25]. Indeed, an additional remote *cis*-regulatory sequence located 18 kb upstream from the *NIN* gene start codon was required to complement nodule organogenesis of the *daphne-like nin* mutant. Hence, NIN coordinates NF responses, rhizobial infection, and nodule organogenesis.

NIN additionally controls nodule number, since this TF triggers the expression of secreted Clavata3/embryo surrounding region (CLE) signaling peptides involved in the negative autoregulation of nodulation (AON) pathway[26]. These AON signaling peptides are referred to as CLE12 and CLE13 in *M. truncatula*, CLE-RS (CLE-root signal) 1, CLE-RS2, and CLE-RS3 in *L. japonicus*, and RIC (rhizobium-induced CLE) in *Glycine max*[27–31]. *CLE-RS1* and *CLE-RS2* genes are expressed within 1 day post rhizobial inoculation[32], and both in *L. japonicus* and *G. max*, NIN directly binds promoters and activates the expression of these nodulation-related CLE peptide-encoding genes to initiate the long distance (systemic) AON pathway[31,32]. Shoot-to-root AON signals then generate a negative feedback loop on *NIN* expression, thus allowing a homeostatic regulation of the root nodule number[32]. CLE peptides produced in roots inoculated with rhizobia are proposed to be translocated through the xylem vasculature to the shoot where they are perceived by the leucine-rich repeat-receptor like kinase (LRR-RLK) SUNN (super numeric nodules) in *M. truncatula* or HAR1 (hypernodulation and aberrant root 1) in *L. japonicus*[33–36]. The activation of this systemic root-to-shoot pathway leads to the production of shoot-to-root signals that further inhibit the formation of new nodules in roots[2,16,37].

Beside this negative systemic AON pathway, C-terminally encoded peptides (CEPs) regulate an independent systemic pathway in *M. truncatula* that promotes rhizobial infections and nodule number[3,38–41]. Low nitrogen and nitrogen starvation enhances the expression of several *Arabidopsis thaliana* and *M. truncatula CEP* genes, indicating that activation of the CEP pathway is tightly linked to nitrogen deficiency[37,38,42]. CEP peptide activation of nodulation depends on the LRR-RLK compact root architecture 2 (CRA2) acting in shoots[39]. Indeed, the exogenous application or overexpression of *M. truncatula* CEP1 peptides promote nodulation[3,38,40], and *cra2* mutants form a reduced number of nodules[39,41]. The closest homolog of CRA2 in Arabidopsis, CEPR1 (CEP receptor 1), directly binds CEP peptides and mediates an N-demand systemic signaling pathway[43] and the allocation of nutrients to roots[44]. In *M. truncatula*, a functional redundancy between CEP peptide-encoding genes required for the regulation of nodulation is anticipated since an RNA interference (RNAi) silencing of *CEP1* and *CEP2* genes did not reveal any nodulation phenotype, despite an increased lateral root phenotype was clearly observed, validating the efficient knockdown of these genes[38]. Symbiosis-specific *CEP* genes required for the positive control of root nodulation thus remain to be characterized.

In this study, we identify a *M. truncatula* CEP peptide-encoding gene, *MtCEP7*, with a unique symbiotic expression pattern. *MtCEP7* is induced rapidly in response to rhizobia or by short-term treatments with NF or cytokinin. *MtCEP7* expression depends on the MtCRE1 cytokinin receptor and on the MtNIN TF, and we show that MtNIN binds to the *MtCEP7* and *MtCLE13* promoters and can transactivate their expression. The addition of MtCEP7 peptides promotes nodulation systemically through the MtCRA2 receptor, and consistently, *MtCEP7* downregulation reduces nodule number and the number of rhizobial infections. *MtCEP7* expression is rapidly induced by rhizobia in the root epidermis and the 5 kb MtNIN promoter is sufficient to restore *MtCEP7* and *MtCLE13* induction by rhizobia, indicating that MtNIN activity induces the coordinated expression of specific nodulation-related signaling peptides from two different families. Strikingly, the expression of the *MtCEP7* gene driven by *MtCLE13* promoter sequences mitigates the onset of AON, suggesting that the balance between *MtCLE13* and *MtCEP7*

expression might determine the number of successful infections in *M. truncatula* roots. Overall, these results indicate that a single cytokinin/MtCRE1/MtNIN regulatory module regulate two antagonistic, nodulation-related, signaling peptides, which allows a dynamic fine-tuning of the level of rhizobial infection and of the number of nodules.

Results

***MtCEP7* is induced by rhizobium, NFs, and cytokinin**. To identify CEP peptides involved in the regulation of symbiotic nodulation, we analyzed *CEP* gene expression in response to rhizobia as well as to NF or cytokinin signals that are required for nodule initiation. Only *MtCEP7* expression was induced within 1 day post inoculation (dpi) and in response to a short-term treatment with NFs (10^{-9} M, 3 h), whereas the other *CEP* genes were either weakly regulated or showed a reduced expression (e.g., *MtCEP5* and *MtCEP8*; Fig. 1a, b). An independent validation of the NF-dependent regulation of *MtCEP7* expression was obtained by using a mutant affecting the previously characterized *NFP* gene[45]. Indeed, the fast rhizobial induction of *MtCEP7* expression was abolished in the *nfp* mutant, as expected (Supplementary Fig. 1).

CEP gene expression was then analyzed in response to a 3-h treatment with another signal that promotes nodule initiation, namely, cytokinin (benzyl amino purine [BAP] 10^{-7} M). Once more, only *MtCEP7* was induced, whereas the expression of most of *CEP* genes (i.e., *MtCEP2*, *MtCEP4*, *MtCEP5*, *MtCEP6*, and *MtCEP8*) was reduced (Fig. 1c). These analyses therefore highlight that *MtCEP7* has a unique expression pattern, being rapidly induced by rhizobia as well as by the two key signals required for nodule initiation, NFs and cytokinin.

***MtCEP7* symbiotic expression relies on MtCRE1 and MtNIN**. As the role of cytokinin in early nodulation relies predominantly on the MtCRE1 cytokinin receptor[11,12], we investigated whether the rhizobia-, NF- and cytokinin-regulated *MtCEP7* expression depended on MtCRE1. The induction of *MtCEP7* by these treatments was strongly reduced in the *cre1* mutant (Fig. 2a–c). These results indicate that the rhizobia, NF, and cytokinin upregulation of *MtCEP7* expression depends on the MtCRE1 cytokinin receptor, which further links MtCEP7 to rhizobial infections. As the induction of *MtCLE13* in response to cytokinin depended on MtCRE1[46], its expression was tested in response to a 24-h treatment with rhizobia and to a 3-h treatment with NFs or cytokinins. As expected, *MtCLE13* expression was induced by these treatments and was diminished in the *cre1* mutant (Fig. 2a–c).

As the expression of *MtNIN* was previously shown to be induced by both NF and cytokinin treatments[9,11,12] and that *MtCLE13* expression depends on MtNIN[46], we analyzed the ability of MtNIN to regulate *MtCLE13* and *MtCEP7* expression. The results showed that the upregulation of *MtNIN* expression by rhizobia, NF, or cytokinin treatments was consistent with the rapid induction of *MtCEP7* and *MtCLE13* expression (Fig. 2d–f), suggesting that these regulations might be mediated by MtNIN. By contrast, an analysis of *MtCEP7* and *MtCLE13* expression after a rhizobial, NF or cytokinin treatment in the *nin* mutant revealed that *MtCLE13* and *MtCEP7* gene induction was compromised (Fig. 2g–i). Overall, these results indicate that the MtCRE1 cytokinin receptor and the MtNIN TF are required for the regulation of *MtCLE13* and *MtCEP7* expression by rhizobia, NFs, and cytokinins.

***MtCEP7* is induced in the root epidermis by rhizobium**. *MtNIN* and *MtCLE13* genes were previously shown to be expressed in the epidermis as well as in the cortex of roots inoculated with rhizobia[15,25,28], whereas the *MtCEP7* expression pattern was never investigated. We used a *pCEP7:GUS* transcriptional fusion to determine the spatiotemporal expression of *MtCEP7*. Uninoculated roots showed basal expression in the stele (Fig. 3a), whereas the rhizobial inoculation rapidly induced *pCEP7:GUS* expression in epidermal cells within 4–24 h post inoculation (hpi;

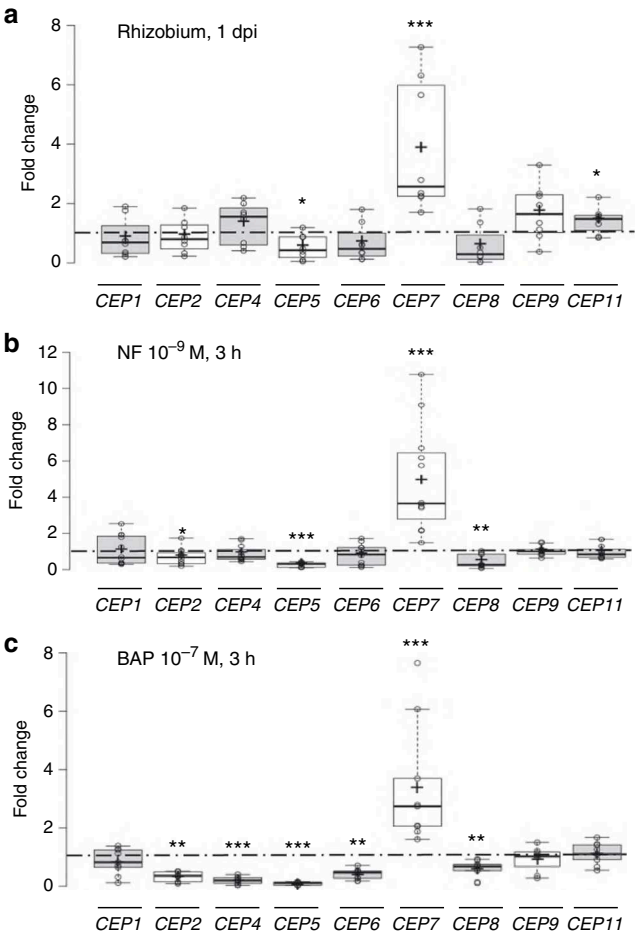


Fig. 1 Expression of CEP peptide-encoding genes in response to rhizobia, Nod factors, or cytokinins. a Expression analysis of *CEP* genes in wild-type (WT) roots 1 day post rhizobial inoculation (1 dpi). qRT-PCR was used to measure the *CEP* gene expression levels, normalized relative to uninoculated roots. To highlight fold changes, the dotted line corresponds to a ratio of 1. Data points from four biological replicates are plotted as open circles ($n = 8$). **b** Expression analysis of *CEP* genes in WT roots in response to a Nod factor (NF) 10^{-9} M treatment for 3 h. qRT-PCR was used to measure the *CEP* expression levels in treated roots. The results were normalized relative to untreated roots. To highlight fold changes, the dotted line corresponds to a ratio of 1. Data points from six biological replicates are plotted as open circles ($n \geq 11$). **c** Expression analysis of *CEP* genes in WT roots in response to a cytokinin (BAP 10^{-7} M) treatment for 3 h. qRT-PCR was used to measure the *CEP* gene expression levels in treated roots. The results were normalized relative to untreated roots. To highlight fold changes, the dotted line corresponds to a ratio of 1. Data points from four biological replicates are plotted as open circles ($n \geq 8$). In **a**–**c**, center lines show the medians; box limits indicate the 25th and 75th percentiles as determined by the R software; whiskers extend 1.5 times the interquartile range from the 25th and 75th percentiles, outliers are represented by dots; and crosses represent sample means. Mann–Whitney test was used for each gene to assess significant differences between treated and control conditions, as indicated by asterisks (*$\alpha < 0.05$; **$\alpha < 0.01$; ***$\alpha < 0.001$).

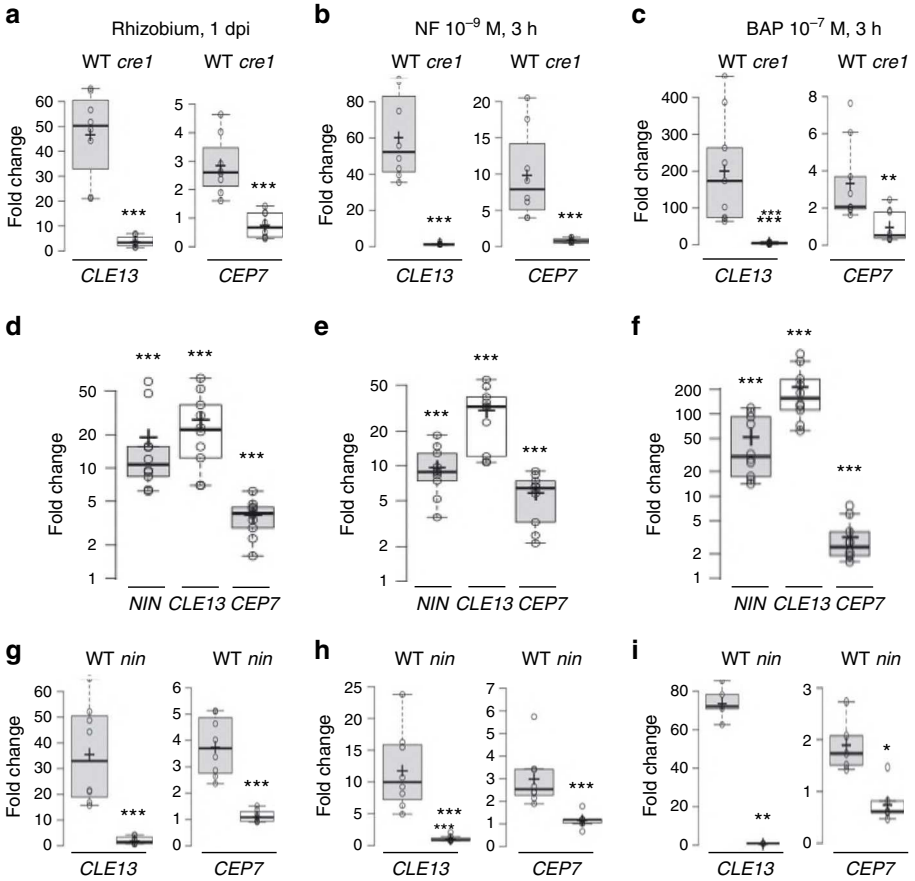


Fig. 2 Rhizobia, Nod factor, and cytokinin regulation of *CEP7* and *CLE13* expression relies on the CRE1 cytokinin receptor and on the NIN transcription factor. **a**–**c** Expression analysis of the *MtCEP7* and *MtCLE13* genes in wild-type (WT) or *cre1* mutant roots in response to a 1 day post rhizobial inoculation (1 dpi) (**a**), to a Nod factor (NF) 10^{-9} M treatment for 3 h (**b**), or to a cytokinin (BAP 10^{-7} M) treatment for 3 h (**c**). qRT-PCR was used to measure the gene expression levels in treated roots, normalized relative to untreated roots. Data points from four biological replicates are plotted as open circles ($n \geq 8$). **d**–**f** Expression analysis of *MtNIN*, *MtCLE13*, and *MtCEP7* genes in WT roots in response to a rhizobial inoculation 1 dpi (**d**), to an NF 10^{-9} M treatment for 3 h (**e**), or to a cytokinin (BAP 10^{-7} M) treatment for 3 h (**f**). qRT-PCR was used to measure the gene expression levels in treated roots, normalized relative to untreated roots. Data points from five biological replicates are plotted as open circles ($n \geq 10$). **g**–**i** Expression analysis of *MtCLE13* and *MtCEP7* genes in WT and *nin* mutant roots in response to a rhizobial inoculation 1 dpi (**g**), to an NF 10^{-9} M treatment for 3 h (**h**), or to a cytokinin (BAP 10^{-7} M) treatment for 3 h (**i**). qRT-PCR was used to measure the gene expression levels in treated roots, normalized relative to untreated roots. Data points from at least three biological replicates are plotted as open circles ($n = 8$ except **i**, $n \geq 5$). In **a**–**i**, center lines show the medians; box limits indicate the 25th and 75th percentiles as determined by the R software; whiskers extend 1.5 times the interquartile range from the 25th and 75th percentiles, outliers are represented by dots; and crosses represent sample means. Mann–Whitney test was used for each gene to assess significant differences between treatments in the WT and in the mutant (in **a**–**c** and **g**–**i**) or between treated and control conditions (in **d**–**f**), as indicated by asterisks (*$\alpha < 0.05$; **$\alpha < 0.01$; ***$\alpha < 0.001$).

Fig. 3b–e). At 4 dpi, *MtCEP7* expression then followed the progression of rhizobial infections and was detected in nodule primordia (Fig. 3f–h). In mature nodules, *MtCEP7* expression was expressed in dividing cells at the nodule apex and in the vascular bundles (Supplementary Fig. 2A, B). Concordantly, a quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (qRT-PCR) analysis of the *GUS* transgene revealed the increased activity of the *MtCEP7* promoter in roots inoculated with rhizobia (24 hpi and 4 dpi; Fig. 3i). As anticipated from previous qRT-PCR analyses, the symbiotic expression of *MtCEP7* in the root epidermis is detected in the WT but not in the *nin* mutant (Fig. 3j, k).

MtNIN binds and transactivates *MtCLE13* and *MtCEP7*. As NIN directly regulates *CLE-RS* genes in *L. japonicus*[32], we tested whether such regulation was conserved in *M. truncatula*, and whether it could be shared for the regulation of the *MtCEP7* gene. The analysis of *MtCLE13* and *MtCEP7* proximal promoters revealed the presence of a sequence similar to the NIN-binding site (NBS) previously described in *L. japonicus* (ref. [32]; Fig. 4a, b). We thus performed chromatin immunoprecipitation (ChIP) in rhizobia-inoculated roots of WT plants and *nin* mutants, with a native antibody targeting MtNIN previously validated in Vernié et al.[47], or with immunoglobulin G (IgG) used as a negative control to evaluate non-specific binding. The IP enrichment of each promoter was measured by quantitative PCR (qPCR) using primers designed in the proximal regions of the *MtCLE13* and *MtCEP7* promoters that contained the predicted NBS *cis*-element identified, or in distal regions (Fig. 4b). An enrichment of the proximal region of the *MtCLE13* promoter was detected in the MtNIN IP, compared to the more distal region (Fig. 4c, left panel). This enrichment was not detected for MtNIN IPs performed in the *nin* mutant, as expected for a negative control. This result indicates a conservation of the NIN interaction with the promoter of a nodulation-related CLE peptide encoding gene between *M. truncatula* and *L. japonicus*. Furthermore, the MtNIN ChIP also revealed enrichment for the *MtCEP7* proximal promoter region, relative either to the more distal promoter region or to the MtNIN IP performed in the *nin* mutant, as negative

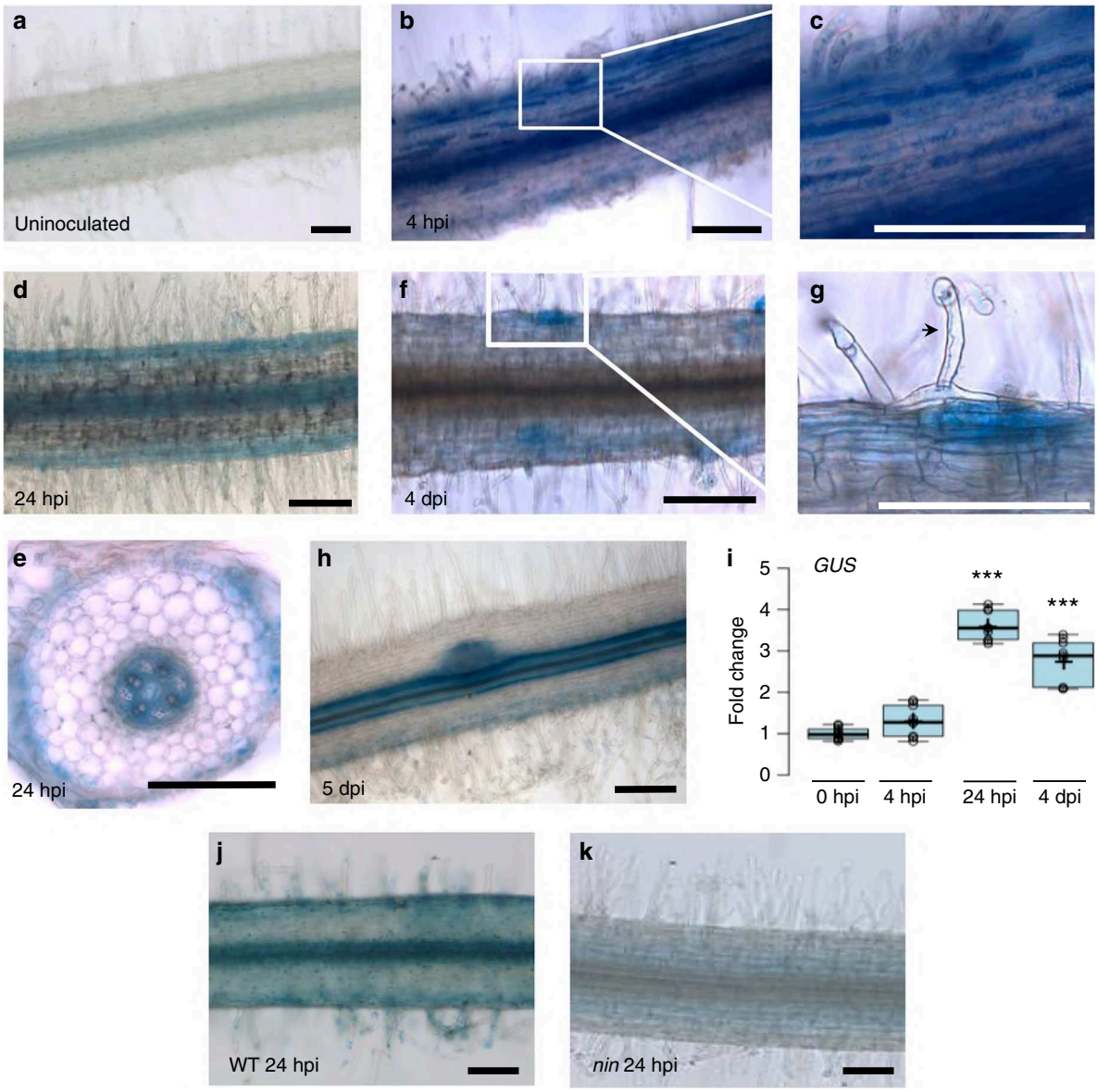
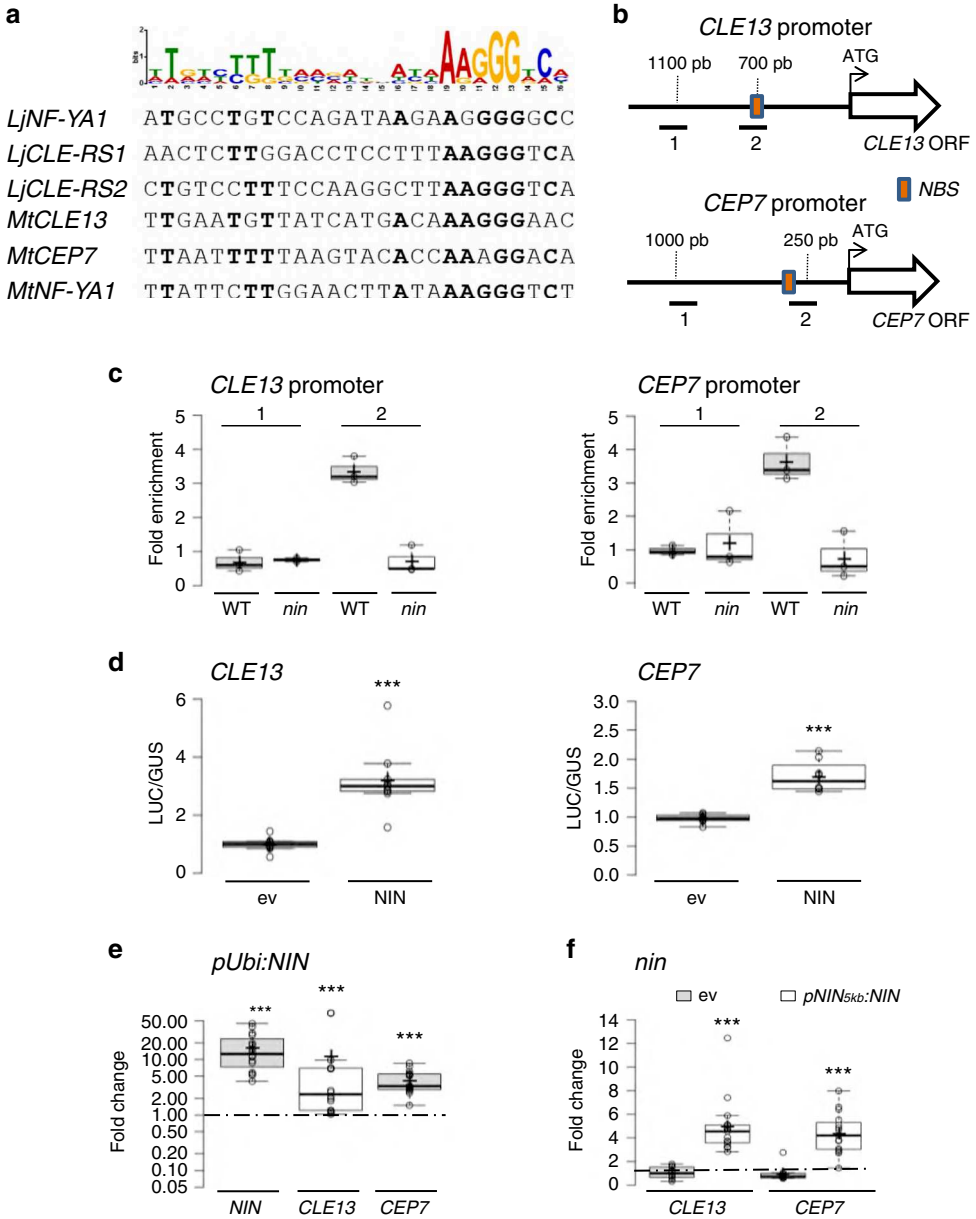


Fig. 3 *MtCEP7* expression pattern in rhizobium-inoculated roots. a–h Expression pattern of a *pCEP7:GUS* transcriptional fusion. The GUS activity was analyzed in roots uninoculated (**a**) or inoculated with rhizobia 4 h post inoculation (hpi; **b**, **c**), 24 hpi (**d**, **e**), 4 days post rhizobial inoculation (dpi; **f**, **g**), or in a nodule primordium (5 dpi; **h**). **c** is a detail of **b**, and **g** is a detail of **f**, as indicated by white squares. All images show longitudinal roots, except e that is a transversal section. All images show the GUS staining as a blue signal in bright field microscopy. The arrowhead in **g** indicates an infection thread. At least eight independent roots were analyzed for each condition from five independent experiments. Scale bars = 200 µm. **i** Expression analysis of *GUS* transcripts in *pCEP7:GUS* transgenic roots, assessed by qRT-PCR. Expression levels were normalized relative to uninoculated roots (0 hpi). To highlight fold changes, the dotted line corresponds to a ratio of 1. Center lines show the medians; box limits indicate the 25th and 75th percentiles as determined by the R software; whiskers extend 1.5 times the interquartile range from the 25th and 75th percentiles, outliers are represented by dots; crosses represent sample means; and data points from three biological replicates are plotted as open circles ($n = 9$). Mann–Whitney test was used to assess significant differences between each time point and the non-treated control, as indicated by asterisks (***$\alpha < 0.001$). **j**, **k** Expression pattern of the *pCEP7:GUS* transcriptional fusion in WT (**j**) versus *nin* mutant roots 4 dpi (**k**). In **a**–**h**, **j**, **k**, a minimum of eight independent roots per experiment were analyzed for each time point, and five independent experiments were performed. Images show the GUS staining as a blue signal in bright field microscopy. Scale bars = 200 µm.

controls (Fig. 4c, right panel). This suggests that NIN co-regulates *MtCLE13* and *MtCEP7* expression. In order to determine whether MtNIN is sufficient to transactivate *MtCLE13* and *MtCEP7* gene expression, transient transformation assays were performed in *M. truncatula* mesophyll protoplasts (Fig. 4d). To this aim, either a *p35S:3xHA-NIN* construct or the corresponding empty vector was co-transformed with a luciferase reporter gene driven either by the *MtCLE13* or the *MtCEP7* promoter region. After normalization of transfection efficiency with a *pAtUbi:GUS* control, the *pMtCLE13:LUC* and *pMtCEP7:LUC* activities were found as significantly enhanced by MtNIN ectopic expression (Fig. 4d). These results indicate that MtNIN transactivates the expression of *MtCLE13* and *MtCEP7*.

To determine whether the ectopic expression of MtNIN could activate *MtCEP7* and/or *MtCLE13* expression in *M. truncatula* roots, *MtNIN* was constitutively expressed using the *AtUbi* promoter, and *MtNIN*, *MtCLE13*, and *MtCEP7* transcript levels were analyzed in uninoculated transformed roots (Fig. 4e). In these conditions, the high expression level of *MtNIN* corresponds to the transgene ectopic expression, which was sufficient to



increase the expression of both *MtCLE13* and *MtCEP7* genes. Accordingly, ectopic expression of *MtNIN* from the *pUbi* promoter was sufficient to induce the expression of the *MtCEP7:GUS* fusion in the absence of any symbiotic treatment, notably in the root epidermis (Fig. 5a–c). The ectopic expression of *MtNIN* therefore bypasses the need for rhizobium, NF, or cytokinin treatments to induce *MtCLE13* and *MtCEP7* expression.

We next determined whether the MtNIN-dependent regulation of *MtCEP7* relied on the putative NBS *cis*-element previously identified in the proximal region of the promoter. To this aim, we generated a version of the *CEP7* promoter deleted from this NBS sequence and fused to the *GUS* reporter gene (Fig. 5d). After a short-term rhizobial inoculation (1 dpi), the symbiotic induction of the *pCEP7ΔNBS:GUS* promoter was abolished (Fig. 5e, h, i) compared to the WT promoter (Fig. 5e–g), notably in the root epidermis. This indicates that the NBS *cis*-element identified is required for the symbiotic regulation of *MtCEP7* expression.

Finally, to establish a link between *MtNIN* epidermal expression and the symbiotic regulation of *MtCEP7*, we used the recently characterized 5 kb *NIN* promoter region ($pNIN_{5kb}$:*NIN*) that is expressed in the root epidermis but not in the root cortex and that can specifically rescue the infection phenotype of the *nin* mutant[25]. This $pNIN_{5kb}$:*NIN* construct introduced in *nin* mutant roots was sufficient to restore expression of *MtCEP7* as well as of *MtCLE13* (Fig. 4f). These results suggest that the *MtNIN* expression domain associated with the root epidermis is sufficient to induce both *MtCEP7* and *MtCLE13* expression in response to rhizobia.

MtCEP7 peptides promote nodulation and rhizobial infections. To evaluate the function of MtCEP7 peptides in early nodulation, exogenous treatments were first performed using peptide sequences corresponding to the conserved Domain 1 (MtCEP7 D1) or Domain 2 (MtCEP7 D2) regions (Fig. 6a, Supplementary Fig. 3A). A similar enhancement of the number of nodules was observed compared to non-treated roots (Fig. 6b, c). As effects on nodulation of another CEP peptide, MtCEP1, were previously shown to rely on the MtCRA2 CEP receptor homolog[39,41], MtCEP7 peptides were thus exogenously applied on *cra2* mutant roots. Positive effects on nodule number induced

Fig. 4 NIN binds promoters and transactivates the expression of *CLE13* and *CEP7*. **a** Alignment of NIN-binding site (NBS) motifs previously identified in *LjNF-YA1*, *LjCLE-RS1*, and *LjCLE-RS2* promoters[32] with homologous regions of *MtNF-YA1*, *MtCLE13*, and *MtCEP7* promoters. Bold characters represent nucleotides conserved in more than four sequences out of the six identified. The sequence logo is derived from the six candidate NBSs, aligned using the MEME algorithm (http://meme-suite.org/index.html). **b** Schematic representation of *MtCLE13* and *MtCEP7* genes highlighting promoter regions used for ChIP-qPCR analyses. Red boxes represent the predicted NBSs identified on each promoter sequence. **c** NIN binds to the *MtCLE13* and *MtCEP7* promoters. Chromatin immunoprecipitation (ChIP)-qPCR analysis of NIN binding to *MtCLE13* (left panel) and *MtCEP7* (right panel) promoters, in wild-type (WT) or *nin* mutant roots 5 days post rhizobium inoculation (dpi) using either an anti-NIN antibody or IgG as a negative control. The fold enrichment of NIN binding was determined relative to IgG (control) IPs. One representative biological replicate out of two is shown. Data points from three technical replicates are plotted as open circles. **d** NIN transactivates *MtCLE13* and *MtCEP7* gene expression in *M. truncatula* mesophyll protoplasts. The promoter regions of *MtCLE13* (left panel) and *MtCEP7* (right panel) were fused to the luciferase (LUC) reporter gene and co-transformed in protoplasts with a p35S:NIN or an empty vector (ev). An AtUbi:GUS construct was used to measure the transformation efficiency. LUC/GUS ratios were normalized relative to values obtained in protoplasts transformed with an ev. To highlight fold changes, the dotted line corresponds to a ratio of 1. Data points from three biological replicates are plotted as open circles ($n = 6$). Mann–Whitney test was used for each promoter to assess significant differences between LUC/GUS ratios in the presence or absence of the NIN construct, as indicated by asterisks (***$\alpha < 0.001$). **e** NIN activates *MtCLE13* and *MtCEP7* gene expression in *M. truncatula* roots. Expression analysis by qRT-PCR of *MtNIN*, *MtCLE13*, and *MtCEP7* in wild-type (WT) uninoculated roots transformed with a pAtUbi:NIN construct or an ev. Plants were grown on a nitrogen-free Fåhraeus medium. To highlight fold changes, expression levels were normalized relative to roots transformed with the ev. Data points from six biological replicates are plotted as open circles ($n \geq 12$). Mann–Whitney test was used for each gene to assess significant differences between pUbi:NIN-transformed roots and control roots, as indicated by asterisks (***$\alpha < 0.001$). **f** *NIN* expression driven by the $pNIN_{5kb}$ promoter is sufficient to restore the regulation of *MtCLE13* and *MtCEP7* gene expression in response to rhizobium. *nin* mutant roots were transformed with either an ev or the $pNIN_{5kb}$:*NIN* construct. *MtCLE13* and *MtCEP7* gene expression was analyzed by qRT-PCR in roots grown in vitro on a nitrogen-free Fåhraeus medium, 2 dpi with rhizobium. Expression levels were normalized relative to uninoculated roots for each genotype. To highlight fold changes, the dotted line corresponds to a ratio of 1. Data points from five biological replicates are plotted as open circles ($n \geq 9$). Mann–Whitney test was used for each gene to assess significant differences between roots transformed with the $pNIN_{5kb}$:*NIN* construct and the control, as indicated by asterisks (***$\alpha < 0.001$). In **c**–**f**, center lines show the medians; box limits indicate the 25th and 75th percentiles as determined by the R software; whiskers extend 1.5 times the interquartile range from the 25th and 75th percentiles, outliers are represented by dots; and crosses represent sample means.

both by MtCEP7 D1 and D2 peptides relied on the MtCRA2 pathway (Fig. 6b, c). Grafting experiments revealed that the activity of the MtCRA2 receptor was required in shoots to mediate the MtCEP7 positive effect on nodule number (Supplementary Fig. 4A). In addition, split-root experiments were conducted where only half of the root system was treated with exogenous MtCEP7 peptides but nodule numbers quantified in parallel in locally treated roots and in distant non-treated (systemic) roots. This analysis revealed that the number of nodules was increased not only in MtCEP7-treated roots but also systemically in non-treated roots (Supplementary Fig. 4B). Collectively, these results indicate that MtCEP7 regulates positively nodule number depending on the MtCRA2 receptor and that this regulation occurs systemically in the root system thanks to the action of MtCRA2 in shoots.

To independently validate the function of MtCEP7 in early nodulation, loss-of-function approaches were additionally performed. Two independent strategies were used, namely, the silencing of *MtCEP7* expression by an RNAi (*MtCEP7* RNAi) or by an artificial microRNA (amiRNA) approach (amiRCEP7; regions targeted by each construct are shown in Supplementary Fig. 3B). The number of nodules of *MtCEP7* RNAi roots was lower than for *GUS* RNAi control roots (Supplementary Fig. 5A), which agrees with results of the previous exogenous peptide treatments. Similarly, amiRCEP7 roots formed a reduced number of nodules compared to control roots (Fig. 6d, e). The strength of nodule number phenotypes was correlated to the efficiency and specificity of these approaches, evaluated by qRT-PCR on the different CEP peptide-encoding genes (Supplementary Fig. 5B, C). Collectively, these results suggest that the MtCEP7 peptide has a positive role in nodulation but that a redundant function with other CEP peptide-encoding genes likely exists.

Since MtNIN expression in the root epidermis restores the symbiotic induction of *MtCEP7* expression (Fig. 4f), the role of MtCEP7 peptides in the regulation of rhizobial infections was further investigated using the amiRCEP7 construct shown previously to affect more strongly nodule number. To this aim, we used a *Sinorhizobium* strain expressing constitutively a LacZ marker to visualize infection events in roots (Fig. 6f). The number of ITs was reduced in roots expressing the amiRCEP7 construct relative to control roots, mostly in the root epidermis. As an independent validation, a stable line expressing the *pENOD11-GUS* symbiotic infection marker was used (Supplementary Fig. 6). The number of *MtENOD11*-positive infection foci was similarly significantly reduced in amiRCEP7 roots, mostly in epidermal cells but also in cortical cells (Supplementary Fig. 6A, B). Collectively, these results indicate that the MtNIN-dependent induction of *MtCEP7* expression positively regulates rhizobial infections.

To evaluate the functional relevance of the symbiotic activation of MtCEP7, we used the *MtCLE13* promoter to ectopically express *MtCEP7* in the same spatiotemporal symbiotic domain as this negatively acting CLE peptide[28,36]. The *MtCEP7* expression level increased ~35-fold in *pCLE13:MtCEP7* roots compared to p*CLE13:GUS* control roots (Supplementary Fig. 5D) and was associated with a significant increase in the number of nodules formed on p*CLE13:CEP7* roots relative to control roots (Fig. 6g, h). In addition, the number of ITs was evaluated, using the LacZ-expressing *Sinorhizobium* strain (Fig. 6i), revealing a significant increase in p*CLE13:CEP7* roots relative to control roots both in the epidermis and in the cortex. Overall, these results suggest that increasing the level of MtCEP7 activity may mitigate the CLE13-dependent negative AON regulation of nodule number and symbiotic infections.

Discussion

In this study, we show that the *MtCEP7* gene is rapidly upregulated by rhizobia as well as by NFs and cytokinins, suggesting that *MtCEP7* may have a function more specifically related to symbiotic nodulation. A combination of gain-of-function experiments, based on exogenous treatment applications and ectopic expression, as well as of loss-of-function experiments, based on RNAi and amiRNA strategies, support a positive function of MtCEP7 in promoting nodulation and rhizobial infections. The previously observed increased nodulation induced by the ectopic expression of *MtCEP1* or by the addition of MtCEP1 peptides

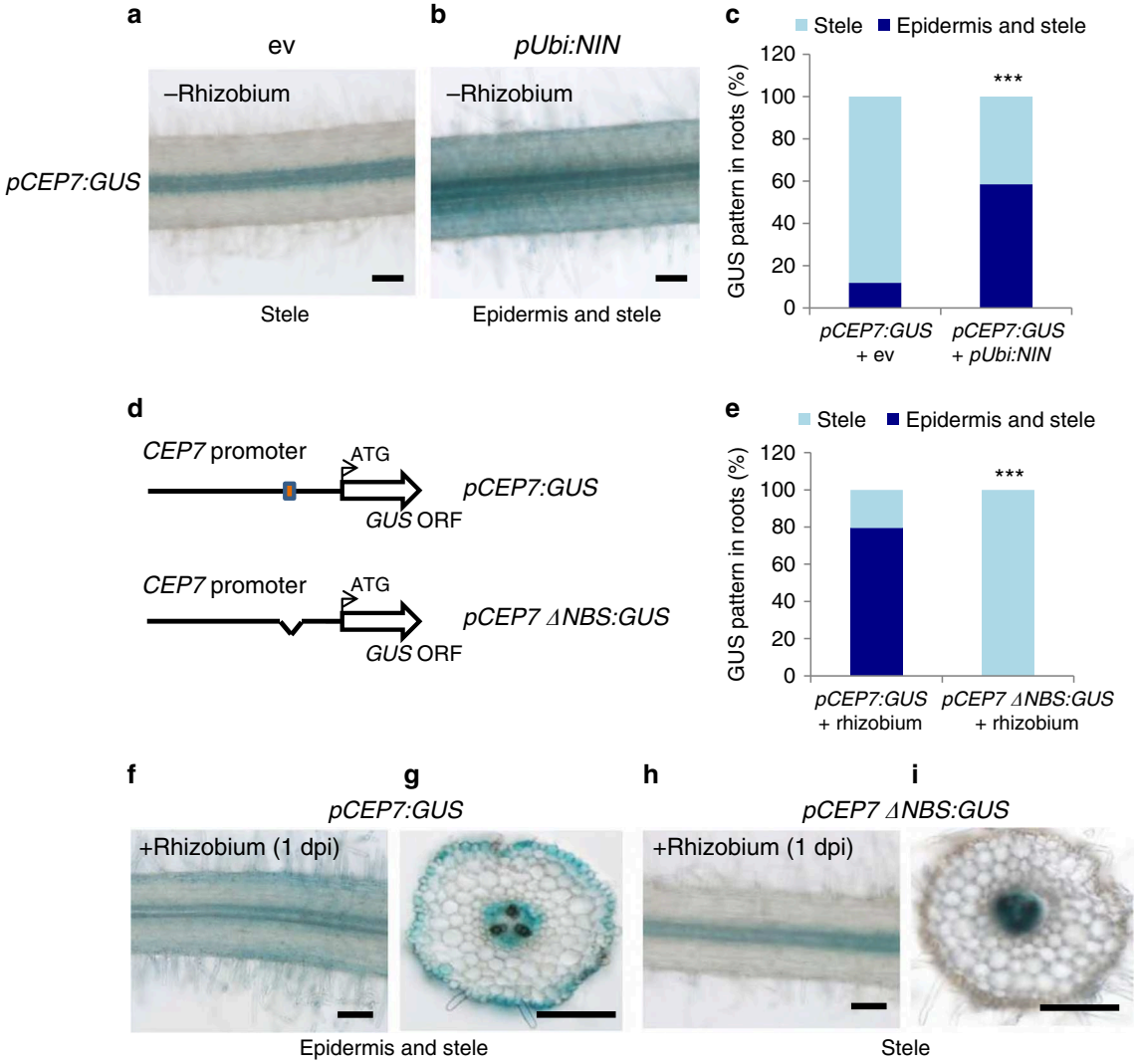
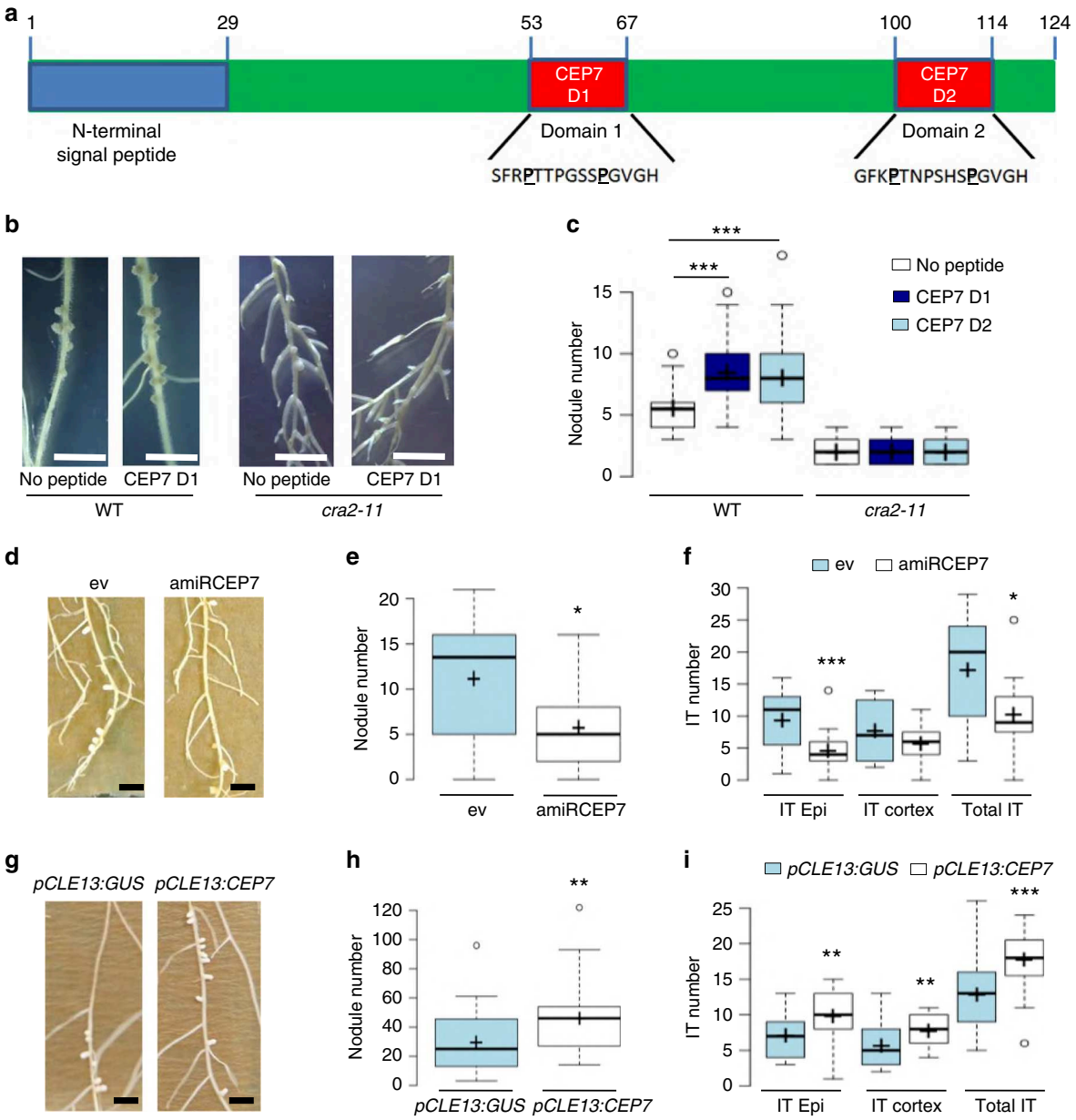


Fig. 5 The NIN-binding site *cis*-element predicted in the proximal region of the *CEP7* promoter is required for its induction by rhizobia. a–c *NIN* expression driven by the *pUbi* promoter is sufficient to induce the expression of a *MtCEP7:GUS* fusion in the absence of rhizobium (**b**), compared to an empty vector (ev) control (**a**). Representative images of the *GUS* expression pattern associated only with the root stele ("stele") or with both the root epidermis and stele ("epidermis and stele"). Wild-type plants were grown in vitro on a nitrogen-free Fåhraeus medium. In c, quantification of the proportion of roots ($n \geq 25$) showing a *GUS* expression pattern associated only with the root stele or with both the root epidermis and stele, as described in **a**, **b**. **d–h** The NIN-binding site (NBS) in the proximal region of the *MtCEP7* promoter is required for the induction of a *MtCEP7:GUS* fusion in response to rhizobium. In **d**, schematic representation of the *MtCEP7* promoter, highlighting the predicted NBS *cis*-element identified as a red box and the corresponding deletion construct (*pCEP7ΔNBS:GUS*). In **e**, quantification of the proportion of roots ($n \geq 34$) showing a *GUS* expression pattern associated only with the root stele ("stele") or with both the root epidermis and stele ("epidermis and stele"), as described in **f–i**. In **f**, **g**, representative images of the *GUS* expression pattern associated only with the root stele or with both the root epidermis and stele of *pCEP7ΔNBS:GUS* 1 day post rhizobium inoculation (dpi) in longitudinal (**f**) or transversal (**g**) sections. In **h**, **i**, representative images for the same *GUS* expression patterns for *MtCEP7:GUS* roots 1 dpi in longitudinal (**h**) or transversal (**i**) sections. In **a**, **b**, **f–i**, a minimum of eight independent roots were analyzed for each time point from three independent experiments. Images show the GUS staining as a blue signal in bright field microscopy. Scale bars = 100 µm. In **c**, **e**, Fisher exact test was performed to assess significant differences in the proportion of roots ($n \geq 25$) showing the different *GUS* expression patterns between the NIN overexpressing (**c**), or NBS-deleted *MtCEP7:GUS* (**e**) roots, and the control, as indicated by asterisks (***$\alpha < 0.001$).

mimics the effect of MtCEP7[3,38,40], even though a *MtCEP1* knock-down affecting also *MtCEP2* expression does not alter nodulation, despite promoting lateral root formation and thus indicating the efficiency of the RNAi approach[38]. Among all other CEP-encoding genes, the unique feature of the *MtCEP7* gene to be induced by rhizobia supports a role in maintaining a window for new nodule formation after the initial rhizobial infections occurred. Given that legume symbiotic nodulation emerged during evolution after the emergence of *CEP*[48] and *CLE* genes[49], the identification of a NF-dependent symbiotic expression pattern for *MtCEP7*, or *MtCLE12* and *MtCLE13*, suggests a sub-functionalization of these genes within their respective families. The loss-of-function approaches, however, highlight the possibility that a functional redundancy of *MtCEP7* likely exist with other CEP encoding gene(s) that is (are) not upregulated rapidly after *Sinorhizobium meliloti* inoculation.

The fast induction of *MtCEP7* expression in response to rhizobia led us to analyze its regulation in response to NF signals. In agreement with RNAseq datasets from Jardinaud et al.[15] showing an NF induction of *MtCEP7* in the root epidermis, we now show that rhizobia also rapidly induces the expression of this gene in a subset of root epidermal cells. This expression then follows the



progression of rhizobial infections to finally reach the growing nodule primordium. Since the MtCRA2 and MtSUNN receptors are not expressed in the root epidermis either with or without NF[15], the symbiotically induced expression of *MtCEP7* and *MtCLE13* likely acts non-cell autonomously. Previous work indicated that MtCEP1 phenotypes relied on the activity in shoots of the CRA2 receptor[39,41], which appears functionally orthologous to the CEPR1 CEP receptor of Arabidopsis[3,43,50]. Similarly, we now show using both hypocotyl grafts between the WT and the *cra2* mutant and split-root experiments with CEP7 peptides that the promotion of nodulation induced by MtCEP7 peptides relies on MtCRA2 and that this regulation occurs systemically in distant non-treated roots through the activity of the MtCRA2 receptor in shoots.

There is scarce knowledge on how peptide hormone signaling intersects with metabolite hormones, such as cytokinin[51,52]. An example in Arabidopsis is the regulation by WUSCHEL of *AtCLV3* expression in the shoot apical meristem, which is itself a direct target of cytokinin signaling[52,53]. The *M. truncatula* model offers a unique opportunity to dissect how two independent systemic signaling pathways regulate symbiotic nodulation antagonistically[36,41]. To our knowledge, we show here for the first time in plants that a single TF, MtNIN, which is upregulated by cytokinin, co-regulates the expression of two signaling peptides encoding genes from different families, *MtCEP7* and *MtCLE13*. Previously, MtCRE1 and MtNIN were shown to be required for the induction of *MtCLE13* in response to cytokinin[28,46]. We now show that MtCRE1 and MtNIN also are required for the induction of *MtCLE13* by NFs and rhizobia. This suggests that the direct regulation of AON-related *CLE* genes by NIN is evolutionary conserved between *L. japonicus* and *M. truncatula* (ref. [32]; this study). Indeed, *MtCLE13* expression is transactivated by MtNIN in a leaf mesophyll protoplast assay, its promoter bound by MtNIN in a ChIP-qPCR assay, and the ectopic induction of MtNIN in *M. truncatula* roots is sufficient to induce *MtCLE13* expression. Strikingly, the same set of approaches revealed that MtNIN similarly binds the *MtCEP7* promoter and transactivates its expression. As reported in *L. japonicus*[32], a conserved NBS *cis*-element was identified in the *MtCLE13* proximal promoter that corresponded to the NIN IP-enriched promoter region.

Fig. 6 CEP7 peptides regulate positively nodule number and rhizobial infections. a Schematic representation of the predicted MtCEP7 prepropeptide. The blue rectangle represents the N-terminal signal peptide predicted using SignalP 3.0 (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-3.0/). Red rectangles represent the predicted MtCEP7 Domain 1 (CEP7 D1) and Domain 2 (CEP7 D2) peptide sequences with hydroxyl modifications to proline as indicated in bold. **b** Representative images of the nodulation phenotype of wild-type (WT) and *cra2* mutants treated with synthetic CEP7 D1 or CEP7 D2. Scale bars = 1 cm. **c** Quantification of the nodule number in WT and *cra2* mutants, grown in vitro on a nitrogen-free Fåhraeus medium supplemented or not with 1 μM CEP7 D1 or CEP7 D2 peptides. Nodule number was scored at 14 days post rhizobium inoculation (dpi). Graphs are based on data points from three biological replicates ($n \geq 59$). Mann–Whitney test was used for each genotype to assess significant differences between peptide-treated and control plants, as indicated by asterisks (***$\alpha < 0.001$). **d** The nodulation phenotype of plants expressing an artificial microRNA targeting *MtCEP7* transcripts (amiRCEP7). Representative images of nodulated roots transformed either with an empty vector (ev) or with the amiRCEP7 construct described in **d**. Scale bars = 1 cm. **e** Quantification of the nodule number of plants transformed either with an ev or with an amiRCEP7 construct. Plants were grown in vitro on a nitrogen-free Fåhraeus medium and nodules were scored at 14 dpi. Graphs are based on data points from 1 representative biological replicate out of 3 ($n \geq 14$). Mann–Whitney test was used to assess significant differences, as indicated by asterisks (*$\alpha < 0.05$). **f** Quantification of infection thread (IT) number in six dpi roots transformed either with an ev or with the amiRCEP7 construct and inoculated with a rhizobium strain constitutively expressing a LacZ reporter. ITs that reached the epidermis (epidermal ITs) were distinguished from ITs that reached the cortex (cortical ITs). Graphs are based on data points from two biological replicates ($n \geq 15$). Mann–Whitney test was used to assess significant differences between amiRCEP7 roots and control roots, as indicated by asterisks (*$\alpha < 0.05$; ***$\alpha < 0.001$). **g** Representative images of the nodulation phenotype of plants transformed either with a *pCLE13:GUS* or a *pCLE13:CEP7* construct. Scale bars = 1 cm. **h** Quantification of the nodule number in plants transformed either with the *pCLE13:CEP7* construct or the *pCLE13:GUS* construct as a negative control. Plants were grown in pots containing a perlite/sand (3/1) mixture and watered with a "i" low nitrogen medium, and nodules were scored at 21 dpi. Graphs are based on data points from two biological replicates ($n \geq 28$). Mann–Whitney test was used to assess significant differences, as indicated by asterisks (**$\alpha < 0.01$). **i** Quantification of IT number in six dpi roots transformed either with the *pCLE13:CEP7* construct or the *pCLE13:GUS* construct as a negative control and inoculated with a rhizobium strain constitutively expressing a LacZ reporter. ITs that reached the epidermis (epidermal ITs) were distinguished from ITs that reached the cortex (cortical ITs). Graphs are based on data points from two biological replicates ($n \geq 15$). Mann–Whitney test was used to assess significant differences between the *pCLE13:CEP7* roots and control roots, as indicated by asterisks (**$\alpha < 0.01$; ***$\alpha < 0.001$). In **c**, **e**, **f**, **h**, **i**, center lines show the medians; box limits indicate the 25th and 75th percentiles as determined by the R software; whiskers extend 1.5 times the interquartile range from the 25th and 75th percentiles, outliers are represented by dots; and crosses represent sample means.

Interestingly, an NBS *cis*-element was also identified in the NIN IP-enriched region of the *MtCEP7* proximal promoter, which is required for its short-term regulation by rhizobia in the root epidermis. Our results also suggest that MtNIN regulates the expression of *CLE13* and *CEP7* in the same expression domain notably including the root epidermis. The identification of this MtNIN-mediated co-regulation opens perspectives to extrapolate this type of co-regulation for other nutritional contexts and in non-legume plants.

It could be surprising that, at about the same time during early nodulation, MtNIN upregulates two signaling peptides that antagonistically regulate nodule number. It has to be noted, however, that the strength of the induction of *MtCEP7* expression by rhizobia is different than for MtCLE13[28]. This suggests that other TFs may be differentially recruited in addition to MtNIN to regulate *MtCLE13* versus *MtCEP7* expression. We used this differential symbiotic induction pattern to explore a potential functional relevance of this simultaneous induction of antagonistic nodulation-related signaling peptides by expressing *MtCEP7* with the *MtCLE13* promoter. Interestingly, an increased number of nodules was observed, suggesting that enhancing *MtCEP7* in the *MtCLE13* expression domain was able to mitigate the onset of the negative AON pathway. We thus speculate that the modulation of *MtCEP7* and *MtCLE13* expression through the rhizobium-/NF- and cytokinin-induced MtCRE1- and MtNIN-dependent signaling pathway may enable a dynamic fine-tuning of nodule number depending on plant's metabolic capacities and needs. An attractive hypothesis is that the MtCEP7 pathway may be required to modulate the negative AON pathway during the plant life cycle, i.e., depending on growth needs that, for example, are driven by the shoot photosynthetic capacity. This implies that shoot-derived carbon signals may impact the MtCEP7 and MtCLE13 pathways, as recently shown in Arabidopsis for *CEP* genes[44]. In addition, an inhibitor of NIN function acting during early nodulation was identified recently in *G. max*, Nodule Number Control 1 (NNC1), which encodes an Apetala2-type TF that notably inhibits the NIN-dependent regulation of AON CLE peptide-encoding genes[31]. Further work is needed to determine whether this negative regulatory module is also recruited to modulate *MtCEP7* expression. In the future, we also need to better understand which molecular mechanisms allow environmental conditions or the plant metabolic status to impact the balance between CLE-dependent negative and CEP-dependent positive systemic pathways that fine tunes nodule number and the number of infection events.

Methods

Biological material, growth conditions, and treatments. The *M. truncatula* Jemalong A17 WT genotype, as well as the *cre1-1*, *nin-1*, *nfp-C31*, and *cra2-11* mutants were used in this study. These mutants are described in Plet et al.[11], Marsh et al.[23], Ben Amor et al.[45], and Laffont et al.[41], respectively. The *pENOD11:GUS* transgenic line was generated in Journet et al.[7]. Seeds were scarified in sulfuric acid (Sigma, www.sigmaaldrich.com) for 3 min, washed four times with distilled water, and then sterilized for 20 min in bleach (12% [v/v] sodium hypochlorite; Chlorifix, Bayrol, https://www.bayrol.fr/). After washings with sterile water, the seeds were placed on 1.5% water–agar plates (Bactoagar, Becton Dickinson), stratified for 2 days in the dark at 4 °C, and then germinated overnight at 24 °C. The germinated seedlings were grown in vitro vertically on square plates in a growth chamber at 24 °C under a long day photoperiod (16 h light; 150 μE intensity) on nitrogen-free Fåhraeus medium[54]. Alternatively, germinated seedlings were grown in pots containing a perlite:sand 3:1 mixture in a growth chamber (24 °C, 16 h light, 150 μmol m^{-2} s^{-1}; relative humidity 60%) and watered every 2 days with the "i" low nitrogen medium (0.25 mM KNO_3)[55].

For nodulation experiments, the *S. meliloti* 1021 strain was used for in vitro experiments or the *Sinorhizobium medicae* WSM419 strain for plants grown in perlite/sand pots. To quantify infection events, a *S. meliloti* strain *Sm*1021 carrying a pXLGD4 plasmid expressing a Pro_{HemA}:*LacZ* marker (GMI6526;[56]) was used to follow bacteria progression from root hairs to cortical cells. Five dpi roots were stained using a β-galactosidase histochemical assay as described in Ardourel et al.[56] and observed using a stereomicroscope (Olympus, BX53, www.olympus-lifescience.com/).

In all cases, rhizobial strains were grown at 28 °C on a Yeast Extract Broth medium (YEB; Vervliet et al.[57]) supplemented with streptomycin 50 mg L^{-1} for *Sm*1021 or chloramphenicol 25 mg L^{-1} for WSM419, and plants were inoculated with an $OD_{600nm} = 0.05$ bacterial suspension. For the nodulation kinetic experiments, roots or developing nodules from at least eight individual plants per biological replicate were harvested 0, 1, 4, 8, and 14 dpi and frozen in liquid nitrogen for further RNA extraction.

For cytokinin and NF treatments, about 25 germinated seedlings were grown on a grid in a Magenta box filled with "i" low nitrogen liquid medium, under gentle agitation at 24 °C and with a long day photoperiod (24 °C, 16 h light, 150 μmol m^{-2} s^{-1}). After 6 days, seedlings were treated or not with the cytokinin

BAP 10^{-7} M (Sigma-Aldrich), or with NF 10^{-9} M, and grown under the same conditions. Treated or untreated roots (mock) from at least 10 individual plants per biological replicate were harvested after 3 h and immediately frozen in liquid nitrogen prior to RNA extraction.

For peptide treatments, about 25 germinated seedlings were grown on nitrogen-free Fåhraeus medium with or without 1 µM synthetic peptides corresponding to the conserved domains of MtCEP7 (GL Biochem Ltd, China): MtCEP7 Domain 1 (CEP7 D1), SFRhyPTTPGSShyPGVGH; and MtCEP7 Domain 2 (CEP7 D2), GFKhyPTNPSHShyPGVGH (where "hyP" indicates proline hydroxylation). Plants were grown in a growth chamber (22 °C, 16 h light, 100 µmol m^{-2} s^{-1}).

Grafts were generated in vitro as described in the "Medicago handbook" (http://www.noble.org/medicagohandbook/) or according to the hypocotyl grafting technique described in Chapman et al.[50] and then transferred after 2 weeks on nitrogen-free Fåhraeus medium with or without 1 µM synthetic MtCEP7 D1 peptides in the same growth conditions as previously described. Grafts were inoculated 1 week after transfer, and the nodule number was scored 7 and 14 days post *Sinorhizobium* inoculation.

Split roots were generated in vitro using Fåhraeus medium supplemented with 5 mM KNO_3. Seedlings were grown for 24 h and root tips were cut and then grown for 4 days under the growth conditions previously described. Plants with two equivalent roots were then selected and transferred onto a nitrogen-free Fåhraeus medium where the agar was split. CEP7 D1 synthetic peptide (1 µM) was added, or not, to one half of the agar plate before the plants were transferred. Split roots were inoculated with rhizobia 3 days after transfer, and the nodule number was scored at 14 dpi in treated and untreated roots.

Cloning and *Agrobacterium rhizogenes* root transformation. Using the Gateway technology, an RNAi construct targeting the *MtCEP7* gene was generated by PCR amplification of a 250-nt *MtCEP7* region (indicated by nucleotides in blue in Supplementary Fig. 2) using primers flanked with attB recombination sites (primers listed in Supplementary Table 1), which was inserted into the pDONR221 vector (ThermoFisher, www.thermofisher.com), subsequently recombined into the pFRN binary vector[9], and then validated by sequencing. The pFRN GUS RNAi kanamycin-resistant vector previously described in Gonzalez-Rizzo et al.[9] was used as a control. The efficiency of the MtCEP7 RNAi construct was evaluated on roots collected 2 days post rhizobia inoculation (dpi), immediately frozen in liquid nitrogen for further RNA extraction. For the *CEP7* promoter transcriptional fusion with *GUS*, a 2-kb region upstream of the predicted ATG was selected and amplified from genomic Jemalong A17 DNA, cloned into pENTR/D TOPO (ThermoFisher, http://www.thermofisher.com), sequenced, and subsequently transferred into the pKGWFS7 destination vector (spectinomycin/streptinomycin resistance for bacterial selection; ref. [58]). The *p35S:3xHA-NIN* construct (carbenicillin resistant) was previously generated in Vernié et al.[47], whereas the $pNIN_{5kb}$*:NIN* construct and the corresponding empty vector (spectinomycin resistant) were generated in Liu et al.[25].

Other constructs were generated using a Golden Gate strategy, as described in Engler and Marillonnet[59], with vectors generated by Weber et al.[60] and provided by the Engineering Nitrogen Symbiosis for Africa (ENSA) project (https://www.ensa.ac.uk/). For protoplast transformation, *pCEP7:LUC*, *pCLE13:LUC*, and *pAtUbi:GUS* single gene constructs (promoter–gene–terminator) were cloned into a level 1 Golden Gate vector (EC47811, ampicillin resistant). For *M. truncatula* root transformation, *pAtUbi:amiRCEP7*, *pCLE13:CEP7*, *pCLE13:GUS*, *pCEP7:GUS* and *pAtUbi:NIN:GFP* constructs were first cloned into the level 1 vector (EC47811), which was then combined with a *pNOS:Kanamycin* cassette (EC15029), to allow in planta kanamycin selection of transformed roots into a level 2 destination vector (EC50507). For co-expression experiments, *pCEP7:GUS* and *pAtUbi:NIN:GFP* constructs were combined into a single vector. LUC (EC15217), GUS (EC75111), GFP (EC15095), pAtUbi (EC15062), and 35S terminator (EC41414) cassettes were also provided by the ENSA project. For the *CEP7* promoter, a ~2.4-kb region upstream of the predicted ATG was selected, whereas the ~2-kb region of the *MtCLE13* promoter previously characterized by Mortier et al.[28] was used and amplified by PCR on Jemalong A17 genomic DNA using primers listed in Supplementary Table 1. The same region of the *MtCLE13* promoter was used to express *MtCEP7* using the level 1 vector. The efficiency of this *MtCEP7* ectopic expression construct was evaluated on roots collected 21 dpi. The *pCEP7ΔNBS:GUS* promoter was constructed by combining two PCR products, amplified, respectively, right upstream and downstream of the predicted NBS *cis*-element (primers listed in the Supplementary Table 1). The *pAtUbi:amiRCEP7* amiRNA construct was designed based on the Carbonell et al.[61] strategy (amiRNA sequence provided in Supplementary Table 1). The amiRCEP7 cassette was synthetized by Genewiz (https://www.genewiz.com/) and then assembled with the *pAtUbi* promoter in the level 1 vector. The efficiency of the amiRCEP7 construct was evaluated on roots collected 2 dpi.

Constructs of interest were then introduced into the *A. rhizogenes* ARqua1 strain and recombinant Arqua1 bacteria were used to transform roots according to the protocol described in Boisson-Dernier et al.[62]. The *A. rhizogenes* strains were grown at 28 °C for 2 days on a YEB-agar medium supplemented with appropriate antibiotics (Duchefa, https://www.duchefa-biochemie.com/). Infected seedlings were grown in vitro on a Fåhraeus medium supplemented with 1 mM NH_4NO_3 (Truchet et al.)[54] and kanamycin (25 mg L^{-1}; Duchefa) for 1 week at 20 °C, and 1 more week at 24 °C under a 16-h light photoperiod (150 µE). Plantlets with kanamycin-resistant transformed roots were then transferred either in vitro onto a growth paper (Mega International, http://www.mega-international.com/) on nitrogen-free Fåhraeus medium, grown for 5 days, and then inoculated with rhizobia as previously described or transferred to pots containing a perlite:sand 3:1 mixture for 5 days and then inoculated with rhizobia. Nodule number was scored at 14 dpi for plants grown in vitro or at 21 dpi for plants grown in perlite/sand pots. Images of nodules were obtained in bright field using an AxioZoom V16 macroscope (Zeiss, https://www.zeiss.fr).

Transient activation assays in *M. truncatula* protoplasts. Leaf protoplasts were isolated from 8-week-old *M. truncatula* plants as described by Yoo et al.[63], except that 2% Cellulase Onozuka R10 (Yakult Pharmaceutical Industry CO LTD), 1% Macerozyme R10 (Yakult Pharmaceutical Industry CO LTD), and 4% Viscozyme (Sigma) enzymes were used to digest the cell walls. Protoplasts (2.5×10^5) were transfected with 20 µg of a DNA mixture consisting of 9 µg of either the *pCLE13:LUC* or the *pCEP7:LUC* reporter construct, 10 µg of the *p35S-3xHA-NIN* or of the empty vector construct as a negative control, and 1 µg of the *pAtUbi:GUS* vector used as an internal control to normalize the transfection efficiency. After transfection, the protoplasts were incubated overnight at 20 °C in darkness. Protoplasts were then harvested by centrifugation (100 × *g* for 5 min), lysed in a protoplast lysis buffer[63], and protein extracts were clarified by centrifugation (2000 × *g* for 5 min). For GUS assays, protein extracts were incubated 30 min at 37 °C with the 4-methylumbelliferyl-β-D-glucuronide hydrate (MUG, Duchefa, https://www.duchefa-biochemie.com/) substrate (1 mM 4-MUG in 50 mM sodium phosphate (pH 7.0), 0.1% Triton X-100, 10 mM EDTA, 0.1% sodium lauryl sarcosine, and 10 mM dithiothreitol (DTT)), and fluorescence was measured with an Infinite200 microplate reader (Tecan, http://www.tecan.com). For luciferase (LUC) assays, protein extracts were mixed with a luciferase assay buffer (20 mM Tricine pH 7.8, 5 mM MgCl2, 0.1 mM EDTA, 3.3 mM DTT, 270 µM Coenzyme A, 500 µM Luciferin (Duchefa), and 500 µM ATP), and luminescence was immediately measured for 10 s using the Tecan Infinite200 microplate reader. LUC/GUS ratios were calculated and normalized relative to the empty vector.

qRT-PCR gene expression analysis. Total RNAs were isolated from frozen roots with the RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, http://www.qiagen.com/) according to the manufacturer's instructions. Total RNAs (1.5 µg) were used for cDNA synthesis with the Superscript II Reverse Transcriptase (ThermoFisher, http://www.thermofisher.com). qRT-PCR experiments were performed on a LightCycler 480 apparatus using the LightCycler480 SYBR Green I Master Kit (Roche Diagnostics, http://lifescience.roche.com) according to the manufacturer's instructions. Cycling conditions were as follows: 95 °C for 5 min, and then 40 cycles at 95 °C for 15 s, 60 °C for 15 s, and 72 °C for 15 s. A dissociation curve (55–95 °C) was performed to assess the specificity of the amplification. The expression of genes of interest was normalized against the reference genes *MtACTIN11* and *MtRBP1* (*RNA binding protein 1*) previously selected using the Genorm software (https://genorm.cmgg.be/)[64]. All primers used in qRT-PCR are listed in Supplementary Table 1. Cycle threshold (Ct) values obtained for the two reference genes were averaged prior to calculation of ratios of genes of interest onto reference genes. These ratios were calibrated relative to the experimental control condition (WT genotype and/or untreated mock control).

ChIP-qPCR assays. ChIP experiments were performed on WT or *nin* roots (~3 g of fresh weight) grown in vitro on a nitrogen-free Fåhraeus medium and inoculated 5 days with rhizobia. Briefly, after plant material fixation in 1% (v/v) formaldehyde for 30 min, roots were frozen and ground in liquid nitrogen; then nuclei were isolated and lysed according to Gendrel et al.[65]. Chromatin was then sonicated using a water bath Bioruptor® Plus sonicator (Diagenode; 40 cycles of 30 s on/30 s off pulses). IPs were performed on the sonicated chromatin using an α-NIN antibody (5:1000; Vernié et al.[47]) or IgG (Sigma Aldrich) as a negative control, as described in Gendrel et al.[65], except that washes were performed with a lower stringency using a ChIP dilution buffer (167 mM NaCl, 16.7 mM Tris-Hcl pH 8, 1.2 mM EDTA, 1.1% Triton X-100).

Immunoprecipitated DNA was analyzed by qPCR (Roche Diagnostics, http://lifescience.roche.com) as previously described for RT-PCR, using primers listed in Supplementary Table 1. IP/input ratios were calculated and normalized relative to ratios of IgG IPs.

GUS histochemical staining. GUS activity was detected using histochemical staining as previously described (Pichon et al.[66]; roots were incubated for 3 h at 37 °C). After staining, roots were washed twice in sterile water and observed in bright field using an AxioZoom V16 macroscope (Zeiss, https://www.zeiss.fr) or a Leica DM550 B (Leica Microsystems). Root sections were included in 3% agarose and then sliced into 80-µm sections using a VT 1200S vibratome (Leica Microsystems, http://www.leica-microsystems.com/). Vibratome sections mounted in water were observed in bright field using with an Olympus BX53 microscope (www.olympus-lifescience.com).

Statistical analyses. At least three independent biological replicates were performed in all experiments. Mann–Whitney non-parametric test, available in the Xlstat software (http://www.xlstat.com/), was used to assess significant differences. To compare proportions of roots showing different *GUS* expression patterns, Fisher exact test was used.

Accession numbers. Sequence data from this article were retrieved from the *M. truncatula* genome v4.0 (https://phytozome.jgi.doe.gov/; Tang et al.[67]) and/or the *M. truncatula* genome v5 (https://medicago.toulouse.inra.fr/MtrunA17r5.0-ANR/; Pecrix et al.[68]) under the following accession numbers, respectively: *MtCLE13*, Medtr4g079610.1 or MtrunA17Chr4g0040951; *MtCRA2*, Medtr3g110840.1 or MtrunA17Chr3g0140861; *MtCRE1*, Medtr8g106150.1 or MtrunA17Chr8g0392301, *MtNIN*, Medtr5g099060 or MtrunA17Chr5g0448621; *MtCEP7*, MtrunA17Chr8g0374811. The *MtCEP7* sequence, absent from the v4.0 version, was alternatively retrieved from the *M. truncatula* v3.5 database (AC233112_1013; http://blast.jcvi.org/Medicago-Blast).

Reporting summary. Further information on research design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

Data availability

Data supporting the findings of this work are available within the article and its Supplementary Information file. The source data underlying Figs. 1a–c, 2a–i, 3i, 4c–f, 5c, e, and 6c, e, f, h, i, as well as Supplementary Figs. 1, 4A, B, 5A–D, and 6B are provided as a Source data file. Other supporting data or biological materials are available from the corresponding author upon request.

Received: 31 July 2019; Accepted: 31 May 2020;
Published online: 23 June 2020

References

1. Sprent, J. I. & James, E. K. Legume evolution: where do nodules and mycorrhizas fit in? *Plant Physiol.* **144**, 575–581 (2007).
2. Suzaki, T., Yoro, E. & Kawaguchi, M. Leguminous plants: inventors of root nodules to accommodate symbiotic bacteria. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **316**, 111–158 (2015).
3. Mohd-Radzman, N. A. et al. Different pathways act downstream of the peptide receptor CRA2 to regulate lateral root and nodule development. *Plant Physiol.* **171**, 2536–2548 (2016).
4. Bhuvaneswari, T. V., Bhagwat, A. A. & Bauer, W. D. Transient susceptibility of root cells in four common legumes to nodulation by Rhizobia. *Plant Physiol.* **68**, 1144–1149 (1981).
5. Timmers, A. C. J., Auriac, M. & Truchet, G. Refined analysis of early symbiotic steps of the Rhizobium-Medicago interaction in relationship with microtubular cytoskeleton rearrangements. *Development* **126**, 3617–3628 (1999).
6. Xiao, T. T. et al. Fate map of *Medicago truncatula* root nodules. *Development* **141**, 3517–3528 (2014).
7. Journet, E. et al. *Medicago truncatula* ENOD11: a novel RPRP-encoding early nodulin gene expressed during mycorrhization in arbuscule-containing cells. *Mol. Plant Microbe Interact.* **14**, 737–748 (2001).
8. Andriankaja, A. et al. AP2-ERF transcription factors mediate Nod factor–dependent Mt ENOD11 activation in root hairs via a novel cis-regulatory motif. *Plant Cell* **19**, 2866–2885 (2007).
9. Gonzalez-Rizzo, S., Crespi, M. & Frugier, F. The *Medicago truncatula* CRE1 cytokinin receptor regulates lateral root development and early symbiotic interaction with *Sinorhizobium meliloti*. *Plant Cell* **18**, 2680–2693 (2006).
10. Murray, J. D. et al. A cytokinin perception mutant colonized by Rhizobium in the absence of nodule organogenesis. *Science* **315**, 101–104 (2007).
11. Plet, J. et al. MtCRE1-dependent cytokinin signaling integrates bacterial and plant cues to coordinate symbiotic nodule organogenesis in *Medicago truncatula*. *Plant J.* **65**, 622–633 (2011).
12. Van Zeijl, A. et al. Rhizobium lipo-chitooligosaccharide signaling triggers accumulation of cytokinins in *Medicago truncatula* roots. *Mol. Plant* **8**, 1213–1226 (2015).
13. Gamas, P., Brault, M., Jardinaud, M. & Frugier, F. Cytokinins in symbiotic nodulation: when, where, what for? *Trends Plant Sci.* **22**, 792–802 (2017).
14. Tirichine, L. et al. A gain-of-function mutation in a root nodule organogenesis. *Science* **2680**, 104–107 (2007).
15. Jardinaud, M.-F. et al. 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 (2016).
16. Tsikou, D. et al. Systemic control of legume susceptibility to rhizobial infection by a mobile microRNA. *Science* **362**, 233–236 (2018).
17. Miri, M. et al. Inside out: root cortex-localized LHK1 cytokinin receptor limits epidermal infection of Lotus japonicus roots by *Mesorhizobium loti*. *N. Phytol.* **222**, 1523–1537 (2019).
18. Schauser, L., Roussis, A., Stiller, J. & Stougaard, J. A plant regulator controlling development of symbiotic root nodules. *Nature* **402**, 191–195 (1999).
19. Middleton, P. H. et al. An ERF transcription factor in *Medicago truncatula* that is essential for Nod factor signal transduction. *Plant Cell* **19**, 1221–1234 (2007).
20. Liu, C.-W. et al. NIN acts as a network hub controlling a growth module required for rhizobial infection. *Plant Physiol.* **179**, 1704–1722 (2019).
21. Fournier, J. et al. Remodeling of the infection chamber before infection thread formation reveals a two-step mechanism for rhizobial entry into the host legume root hair. *Plant Physiol.* **167**, 1233–1242 (2015).
22. Soyano, T., Kouchi, H., Hirota, A. & Hayashi, M. NODULE INCEPTION directly targets NF-Y subunit genes to regulate essential processes of root nodule development in *Lotus japonicus*. *PLoS Genet.* **9**, e1003352 (2013).
23. Marsh, J. F. et al. *Medicago truncatula* NIN is essential for rhizobial-independent nodule organogenesis induced by autoactive calcium/calmodulin-dependent protein kinase 1. *Plant Physiol.* **144**, 324–335 (2007).
24. Yoro, E. et al. A positive regulator of nodule organogenesis, NODULE INCEPTION, acts as a negative regulator of rhizobial infection in *Lotus japonicus*. *Plant Physiol.* **165**, 747–758 (2014).
25. Liu, J. et al. A remote cis-regulatory region is required for NIN expression in the pericycle to initiate nodule primordium formation in *Medicago truncatula*. *Plant Cell* **31**, 68–83 (2019).
26. Caetano-Anolles, G. & Gresshoff, P. M. Plant genetic control of nodulation. *Annu. Rev. Microbiol.* **45**, 345–382 (1991).
27. Okamoto, S. et al. Nod factor/nitrate-induced CLE genes that drive HAR1-mediated systemic regulation of nodulation. *Plant Cell Physiol.* **50**, 67–77 (2009).
28. Mortier, V. et al. CLE peptides control *Medicago truncatula* nodulation locally and systemically. *Plant Physiol.* **153**, 222–237 (2010).
29. Reid, D. E., Ferguson, B. J. & Gresshoff, P. M. Inoculation- and nitrate-induced CLE peptides of soybean control NARK-dependent nodule formation. *Mol. Plant Microbe Interact.* **24**, 606–618 (2011).
30. Nishida, H., Handa, Y., Tanaka, S. & Suzaki, T. Expression of the CLE - RS3 gene suppresses root nodulation in Lotus japonicus. *J. Plant Res.* **129**, 909–919 (2016).
31. Wang, L. et al. A GmNINa-miR172c-NNC1 regulatory network coordinates the nodulation and autoregulation of nodulation pathways in soybean. *Mol. Plant* **12**, 1211–1226 (2019).
32. Soyano, T., Hirakawa, H., Sato, S., Hayashi, M. & Kawaguchi, M. NODULE INCEPTION creates a long-distance negative feedback loop involved in homeostatic regulation of nodule organ production. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **111**, 14607–14612 (2014).
33. Krusell, L. et al. Shoot control of root development and nodulation is mediated by a receptor-like kinase. *Nature* **420**, 422–426 (2002).
34. Searle, I. R. et al. Long-distance signaling in nodulation directed by a CLAVATA1-like receptor kinase. *Science* **299**, 109–112 (2003).
35. Schnabel, E., Journet, E. P., De Carvalho-Niebel, F., Duc, G. & Frugoli, J. 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 (2005).
36. Imin, N., Patel, N., Corcilius, L. & Payne, R. J. CLE peptide tri-arabinosylation and peptide domain sequence composition are essential for SUNN-dependent autoregulation of nodulation in *Medicago truncatula*. *N. Phytol.* **218**, 73–80 (2018).
37. Gautrat, P., Laffont, C. & Frugier, F. Compact root architecture 2 promotes root competence for nodulation through the miR2111 systemic effector. *Curr. Biol.* **30**, 1–7 (2020).
38. Imin, N., Mohd-Radzman, N. A., Ogilvie, H. A. & Djordjevic, M. A. The peptide-encoding CEP1 gene modulates lateral root and nodule numbers in *Medicago truncatula*. *J. Exp. Bot.* **64**, 5395–5409 (2013).
39. Huault, E. et al. Local and systemic regulation of plant root system architecture and symbiotic nodulation by a receptor-like kinase. *PLoS Genet.* **10**, e1004891 (2014).
40. Mohd-Radzman, N. A., Binos, S., Truong, T. T. & Djordjevic, M. A. Novel MtCEP1 peptides produced in vivo differentially regulate root development in *Medicago truncatula*. *J. Exp. Bot.* **66**, 5289–5300 (2015).
41. Laffont, C. et al. Independent regulation of symbiotic nodulation by the SUNN negative and CRA2 positive systemic pathways. *Plant Physiol.* **180**, 559–570 (2019).
42. Delay, C., Imin, N. & Djordjevic, M. A. CEP genes regulate root and shoot development in response to environmental cues and are specific to seed plants. *J. Exp. Bot.* **64**, 5383–5394 (2013).
43. Tabata, R. et al. Perception of root-derived peptides by shoot LRR-RKs mediates systemic N-demand signaling. *Science* **346**, 343–346 (2014).

44. Chapman, K., Taleski, M., Ogilvie, H. A., Imin, N. & Djordjevic, M. A. CEP–CEPR1 signalling inhibits the sucrose-dependent enhancement of lateral root growth. *J. Exp. Bot.* **70**, 3955–3967 (2019).
45. Amor, B. Ben et al. The NFP locus of *Medicago truncatula* controls an early step of Nod factor signal transduction upstream of a rapid calcium flux and root hair deformation. *Plant J.* **34**, 495–506 (2003).
46. Mortier, V., De Wever, E., Vuylsteke, M., Holsters, M. & Goormachtig, S. Nodule numbers are governed by interaction between CLE peptides and cytokinin signaling. *Plant J.* **70**, 367–376 (2012).
47. Vernié, T. et al. The NIN transcription factor coordinates diverse nodulation programs in different tissues of the *Medicago truncatula* root. *Plant Cell* **27**, 3410–3424 (2015).
48. Ogilvie, H. A., Imin, N. & Djordjevic, M. A. Diversification of the C-TERMINALLY ENCODED PEPTIDE (CEP) gene family in angiosperms, and evolution of plant-family specific CEP genes. *BMC Genomics* **15**, 6–10 (2014).
49. Whitewoods, C. D. et al. CLAVATA was a genetic novelty for the morphological innovation of 3D growth in land plants. *Curr. Biol.* **28**, 2365–2376 (2018).
50. Chapman, K. et al. CEP receptor signalling controls root system architecture in Arabidopsis and Medicago. *N. Phytol.* https://doi.org/10.1111/nph.16483 (2020).
51. Oh, E., Seo, P. J. & Kim, J. Signaling peptides and receptors coordinating plant root development. *Trends Plant Sci.* **23**, 337–351 (2018).
52. Cammarata, J., Roeder, A. H. & Scanlon, M. J. Cytokinin and CLE signaling are highly intertwined developmental regulators across tissues and species. *Curr. Opin. Plant Biol.* **51**, 96–104 (2019).
53. Yadav, R. K. et al. WUSCHEL protein movement mediates stem cell homeostasis in the Arabidopsis shoot apex. *Genes Dev.* **25**, 2025–2030 (2011).
54. Truchet, G. et al. Alfalfa nodulation in the absence of Rhizobium. *Mol. Gen. Genet.* **219**, 65–68 (1989).
55. Blondon, F. Contribution à l'étude du développement des graminées fourragères ray-grass et dactyle. *Rev. Gen. Bot.* **71**, 293–381 (1964).
56. Ardourel, M. et al. *Rhízobíum meliloti* lipooligosaccharide nodulation factors: different structural requirements for bacterial entry into target root hair cells and lnduction of plant symbiotic developmental responses. *Plant Cell* **6**, 1357–1374 (1994).
57. Vervliet, G., Holsters, M., Teuchy, H., Van Montagu, M. & Schell, J. Characterization of different plaque-forming and defective temperate phages in Agrobacterium. *J. Gen. Virol.* **26**, 33–48 (1975).
58. Karimi, M., Inzé, D. & Depicker, A. GATEWAY^{TM} vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci.* **7**, 1–3 (2002).
59. Engler, C. & Marillonnet, S. Golden Gate cloning. *Methods Mol. Biol.* **1116**, 119–131 (2014).
60. Weber, E., Engler, C., Gruetzner, R., Werner, S. & Marillonnet, S. A modular cloning system for standardized assembly of multigene constructs. *PLoS ONE* **6**, e16765 (2011).
61. Carbonell, A. et al. New generation of artificial microRNA and synthetic trans-acting small interfering RNA vectors for efficient gene silencing in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **165**, 15–29 (2014).
62. Boisson-Dernier, A. et al. *Agrobacterium rhizogenes* -transformed roots of *Medicago truncatula* for the study of nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations. *Mol. Plant Microbe Interact.* **14**, 695–700 (2001).
63. Yoo, S.-D., Cho, Y.-H. & Sheen, J. Arabidopsis mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nat. Protoc.* **2**, 1565–1572 (2007).
64. Vandesompele, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT -PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* **3**, 1–12 (2002).
65. Gendrel, A. V., Lippman, Z., Martienssen, R. & Colot, V. Profiling histone modification patterns in plants using genomic tiling microarrays. *Nat. Methods* **2**, 213–218 (2005).
66. Pichon, M. et al. *Rhizobium meliloti* elicits transient expression of the early nodulin gene ENOD12 in the differentiating root epidermisof transgenic alfalfa. *Plant Cell* **4**, 1199–1211 (1992).
67. Tang, H. et al. An improved genome release (version Mt4. 0) for the model legume *Medicago truncatula*. *BMC Genomics* **15**, 1–14 (2014).
68. Pecrix, Y. et al. Whole-genome landscape of *Medicago truncatula* symbiotic genes. *Nat. Plants* **4**, 1017–1025 (2018).

Acknowledgements

We thank Fabienne Maillet (LIPM, Castanet Tolosan, France) and Sebastien Fort (CERMAV, Grenoble, France) for providing purified *S. meliloti* Nod factors, David Barker (LIPM, Castanet Tolosan, France) for providing seeds of the *pENOD11:GUS* transgenic line, Stéphane Boivin (IPS2) for providing some cDNAs, as well as Ashley Tan and Kelly Chapman (ANU) for help with split-root and grafting experiments, respectively. For the F.F. laboratory, funding from the Saclay Plant Sciences (SPS) Labex, the Plant Phenotyping Pipeline (3P) Lidex, and the Agence Nationale de la Recherche (ANR) is acknowledged. For the M.A.D. laboratory, funding was provided by the Australian Research Council (ARC, DP150104250). A.I. was supported by A.W. Howard fellowship and an Australian post-graduate award.

Author contributions

F.F. designed the project, with contributions from M.A.D. for Fig. 3 and Supplementary Figs. 1, 2, and 4; C.L. performed experiments, except for Fig. 3 and Supplementary Figs. 1, 2, and 4 that were performed by A.I. and Fig. 6a–c and Supplementary Fig. 4 by P.G.; M.B. established the *M. truncatula* protoplast transformation protocol; F.F. and C.L. analyzed and interpreted the results and wrote the manuscript, with help from M.B. and P.G.; M.A.D. and A.I. interpreted results from Fig. 3 and Supplementary Figs. 1, 2, and 4 and participated in drafting the manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information is available for this paper at https://doi.org/10.1038/s41467-020-16968-1.

Correspondence and requests for materials should be addressed to F.F.

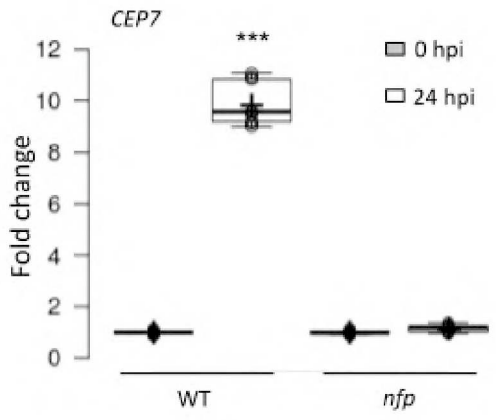
Peer review information *Nature Communications* thanks Krzysztof Szczyglowsk and the other anonymous reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work.

Reprints and permission information is available at http://www.nature.com/reprints

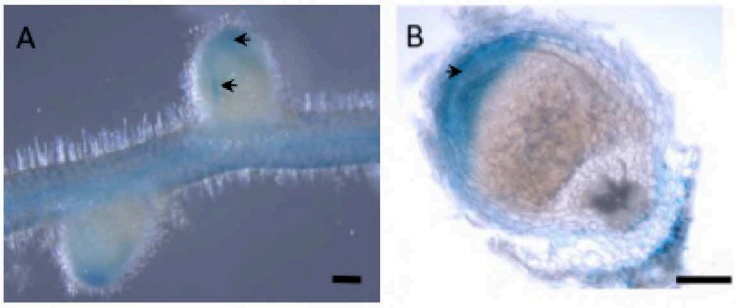
Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

© The Author(s) 2020



Supplementary Figure 1. The induction of *CEP7* expression by rhizobium relies on NFP
Expression analysis of the *MtCEP7* gene in Wild-Type (WT) or *nfp* (*nod factor perception*) mutant roots 24 hours post rhizobium inoculation (hpi). qRT-PCR was used to measure gene expression levels in treated roots, normalized relative to untreated roots. Center lines show the medians; box limits indicate the 25th and 75th percentiles as determined by R software; whiskers extend 1.5 times the interquartile range from the 25th and 75th percentiles, outliers are represented by dots; crosses represent sample means; and data points from three biological replicates are plotted as open circles (n=9).



Supplementary Figure 2. Rhizobia inoculation induces a *pMtCEP7:GUS* transcriptional fusion in vascular bundles and the apex of mature nodules

A-B. The *pCEP7:GUS* activity was analyzed in mature nodules 14 days post rhizobium inoculation (dpi). A is a whole mount image, and B is a sagittal root and nodule section.

A minimum of 8 independent roots were analyzed for each condition from five independent experiments. Images show the GUS staining as a blue signal in bright field microscopy, indicated with arrows. Scale bars=200 µm.

A

MGLFQVTTKYLIVILALSIVYNSFQITQARPIKPLNQQSSLNTQDSGAIHTNSFRPTTPGSSPGVGHRNFVVGDKNTR
TMVVVQSPDVEVFVTNKRSDDGFKPTNPSHSPGVGHGYHTKIRHLN*

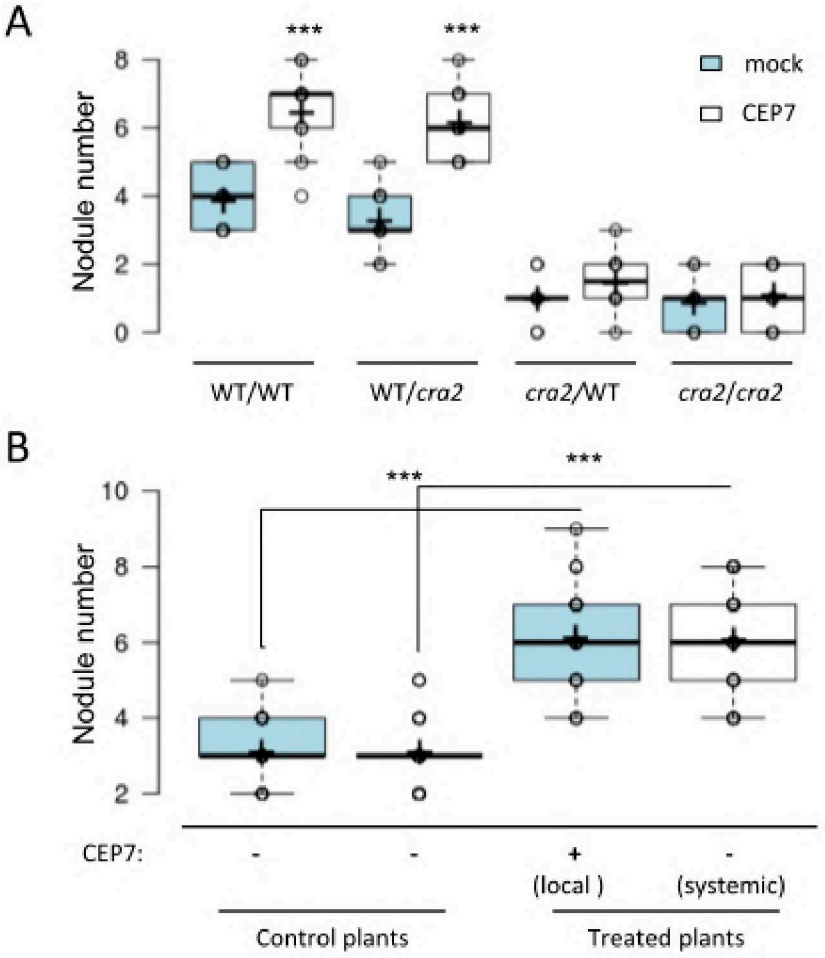
B

GGGCATTGAACTCAATACAAAGATTATAAATAGCATAAGACCCCAGAGCTTGTGTTATAATTTTCTTTTCCATTG
CCAATATATAGCTTAATCGTTCTCTCTAGTTTTAACCTACATATATCCTTTCACTCACTTACCTTTTGTTTGTATAG
*TC*ATGGGTTTGTTTCAAGTCACAACAAAATATTTGATCGTTATTCTAGCACTAAGTATTGTATACAATTCCTTTCA
AATAACTCAAGCCAGGCCAATTAAACCATTGAATCAACAATCTTCATTAAACACACAAGACTCGGGTGCAATCC
ACACTAACTCTTTTCGGCCGACAACACCAGGAAGTAGTCCTGGTGTTGGCCACCGAAATTTTGTTGTAGGAGAT
AAGAACACGAGAACAATGGTGGTTGTTCAGAGCCCGGATGTTGAGGTTTTTGTGACGAATAAGAGATCCGAT
GATGGTTTCAAACCTACAAATCCTAGTCATAGTCCTGGAGTTGGCCATGGTTACCATACCAAAATTAGACATTT
AAATTAG*AACGTGATTGAATTCATTGTAGATTTCAAAACCATCTTAATTAGAAGCTGTGTGTACCTACAATAATG*
*TCCTTAGTTTCATTCTTCAAATTGCATGCCAT*ATCATATGCATGTAGCACATGCACTTGGACTTTTGTTATTTGTTT
AAGAGGCTTGGCTTTTGGTTATTGTTTGGGGGTGTCATAATTCAAAGTATGTAAAGTTTACTCTATTTATTTGTA
ATTGTTTGGTTAATATGATACAAATCATAGCAAAATAAATAAAAGATGTTTTAG

Supplementary Figure 3. *CEP7* protein and genomic sequences

A. MtCEP7 precursor sequence highlighting the CEP domains 1 (CEP7 D1, in blue) and 2 (CEP7 D2, in green).

B. *CEP7* genomic sequence highlighting regions used for RNA interference (in blue) and artificial microRNA (in yellow) strategies. Italics indicate predicted 5' and 3' untranslated regions (UTRs), and initiation and stop codons are underlined.

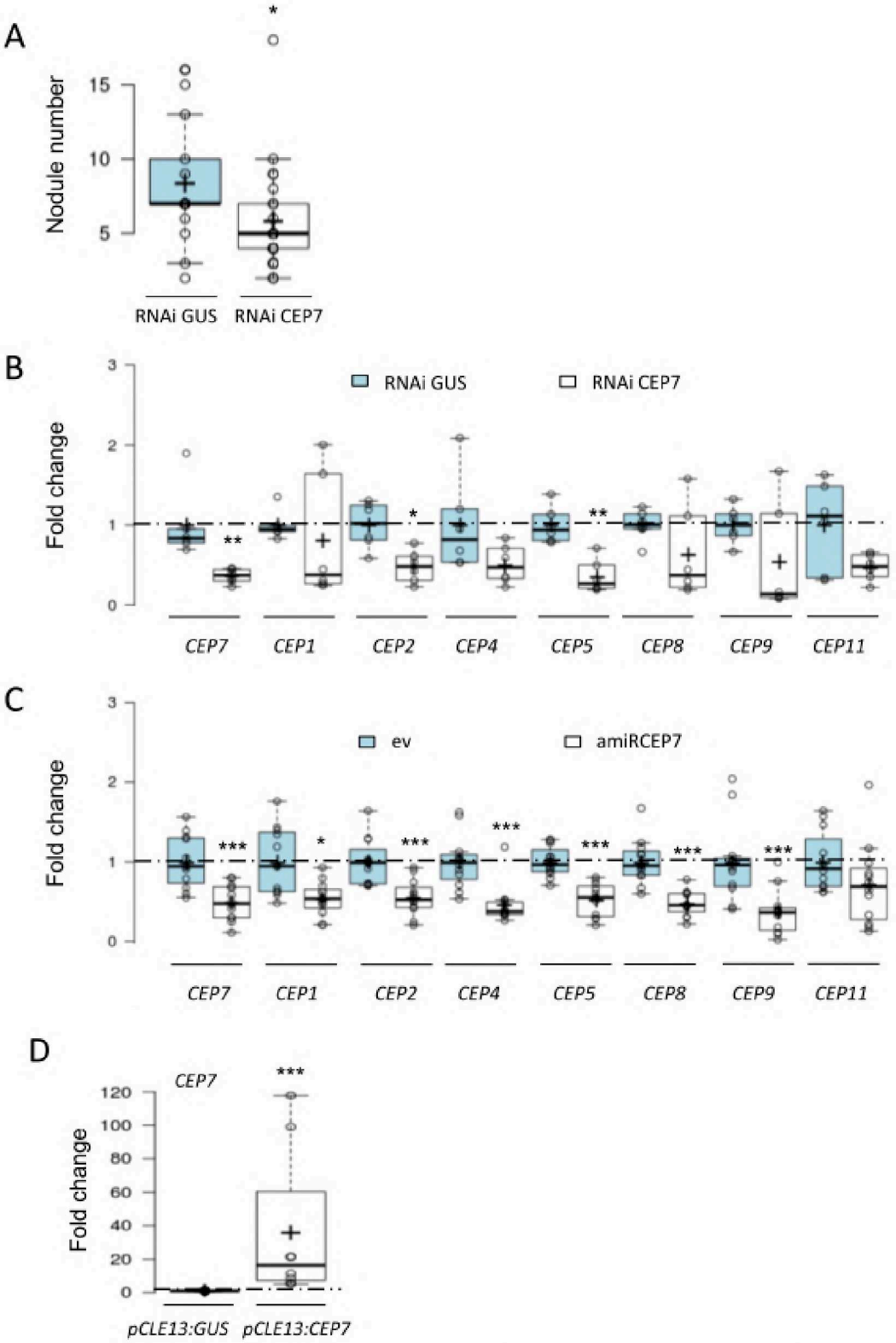


Supplementary Figure 4. CEP7 promotes nodulation systemically

A. Nodulation phenotype of grafts between Wild-Type (WT) and *cra2* mutants treated or not with synthetic MtCEP7 peptides. Quantification of the nodule number in different combinations of WT and *cra2* mutant grafted plants, grown *in vitro* on a nitrogen-free Fahraeus medium supplemented or not with 1 µM CEP7 Domain1 (CEP7 D1) peptides. Nodule number was scored at 14 days post rhizobium inoculation (dpi). Data points from one representative biological experiment out of two are plotted as open circles ($n \geq 9$). A Mann-Whitney test was used for each graft combination to assess significant differences between peptide-treated plants and the control, as indicated by asterisks (*** $\alpha < 0.001$).

B. Nodulation phenotype of local and systemic roots from plants grown in a split-root experimental system. Quantification of the nodule number in split-root WT plants, grown *in vitro* on a nitrogen-free Fahraeus medium, where half of the root system was treated, or not, with 1 µM CEP7 Domain1 (CEP7 D1) peptides. Rhizobium inoculation was performed on the whole root system. Nodule number was scored at 14 days post-rhizobium inoculation (dpi). Data points from one representative biological experiment out of two are plotted as open circles ($n \geq 10$). A Mann-Whitney test was used for each split root combination to assess significant differences between local and systemic roots for peptide-treated plants and the control, as indicated by asterisks (*** $\alpha < 0.001$).

In A-B, center lines show the medians; box limits indicate the 25th and 75th percentiles as determined by R software; whiskers extend 1.5 times the interquartile range from the 25th and 75th percentiles, outliers are represented by dots; and crosses represent sample means.



Supplementary Figure 5. Efficiency and specificity of RNA interference, artificial microRNA and CEP7 ectopic expression

A. Nodulation phenotype of plants where *MtCEP7* expression was silenced by RNA interference (RNAi).

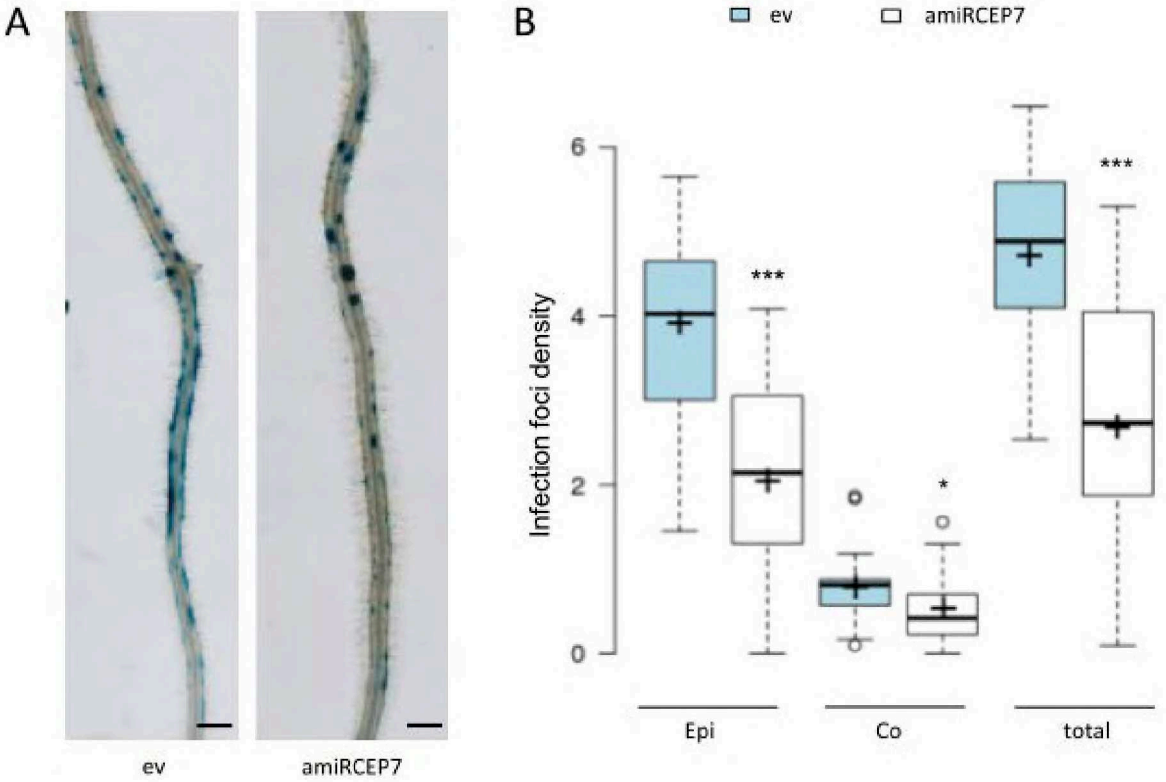
Quantification of the nodule number of Wild-Type (WT) plants expressing a RNAi construct driven by the 35S:CaMV promoter and targeting either *GUS* as a negative control or the *MtCEP7* gene. Plants were grown *in vitro* on a nitrogen-free Fahraeus medium and the nodules were scored at 14 days post rhizobium inoculation (dpi). Data points from one representative biological experiment out of two are plotted as open circles ($n \geq 13$).

B. Expression analysis by qRT-PCR of *CEP* genes in roots expressing a *MtCEP7* RNAi or a *GUS* RNAi construct, as a negative control, grown as described in A. The expression data were normalized relative to the *GUS* control. The dotted line corresponds to a ratio of 1 to highlight fold changes. Data points from three biological replicates are plotted as open circles (n=6).

C. Expression analysis by qRT-PCR of *CEP* genes in roots transformed either with an empty vector (ev) or expressing an amiRCEP7 construct, grown as described in Figure 6D-F. Expression levels in amiRCEP7 roots were normalized relative to control roots. The dotted line corresponds to a ratio of 1 to highlight fold changes. Data points from six biological replicates are plotted as open circles (n=12).

D. Expression analysis by qRT-PCR of *MtCEP7* in roots transformed either with a *pCLE13:GUS* or a *pCLE13:CEP7* construct, grown as described in Figure 6G-I. Expression levels were normalized relative to *pCLE13:GUS* control roots. The dotted line corresponds to a ratio of 1 to highlight fold changes. Data points from four biological replicates are plotted as open circles (n=8).

In A-D, center lines show the medians; box limits indicate the 25th and 75th percentiles as determined by R software; whiskers extend 1.5 times the interquartile range from the 25th and 75th percentiles, outliers are represented by dots; and crosses represent sample means. A Mann-Whitney test was used to assess significant differences, as indicated by asterisks (* $\alpha<0.05$; ** $\alpha<0.01$; *** $\alpha<0.001$).



Supplementary Figure 6. The amiRCEP7 construct decreases rhizobial infections

A. Histochemical GUS staining of *pENOD11:GUS* roots five days post rhizobium inoculation (dpi), expressing either the empty vector (ev) or the amiRCEP7 construct. Bars=500 µm.

B. Quantification using the *pENOD11:GUS* reporter shown in A of the density of rhizobial infection foci localized either in the root epidermis (Epi) or in the cortex (Co). The number of foci is normalized relative to the length (in mm) of the root region containing blue-stained foci. Center lines show the medians; box limits indicate the 25th and 75th percentiles as determined by R software; whiskers extend 1.5 times the interquartile range from the 25th and 75th percentiles, outliers are represented by dots; crosses represent sample means; and data points from two biological replicates are plotted as open circles ($n \geq 22$). A Mann-Whitney test was used for each category to assess significant differences between amiRCEP7 roots and the control, as indicated by asterisks (* $\alpha<0.05$; *** $\alpha<0.001$).

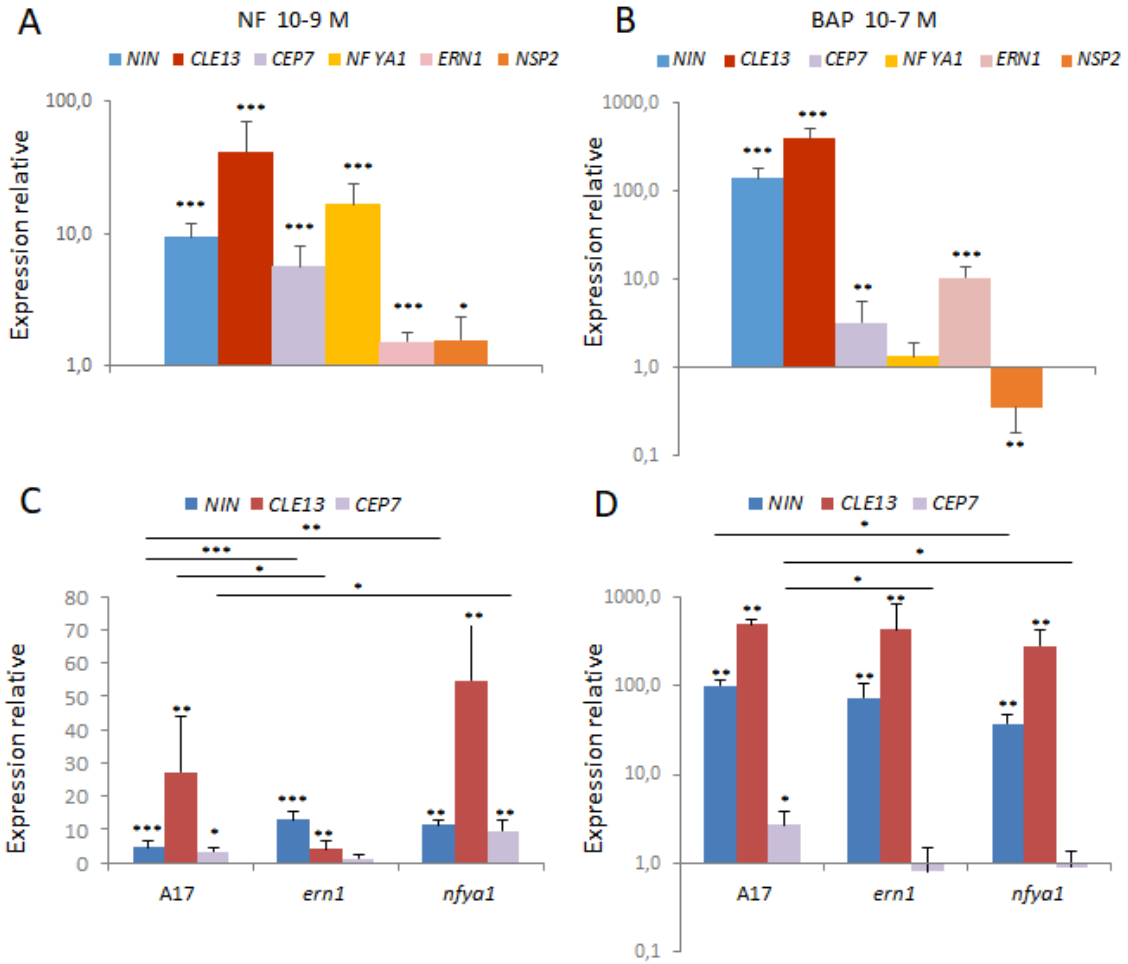


Figure 52 : Régulation d'*ERN1, NF-YA1, NIN, CLE13* et *CEP7* en réponse aux facteurs Nod ou à un traitement par les cytokinines.

(A-B) Expression relative des gènes *ERN1, NF-YA1, NIN, NSP2, CLE13* et *CEP7* dans des racines de plantes cultivées en milieu liquide « i » carencé en azote (Blondon, 1964) en réponse à un traitement par les facteurs Nod (NFs) 10^{-9}M pendant 3h (A) ou par les cytokinines (Benzyl amino Purine, BAP) 10^{-7}M pendant 3h (B). Les valeurs obtenues pour les échantillons traités sont normalisées par rapport aux échantillons non traités.

(C-D) Expression relative de *NIN, CLE13* et *CEP7* dans des racines sauvages (Jemalong A17) ou mutantes *ern1* ou *nf-ya1* cultivées en milieu liquide « i » carencé en azote en réponse à un traitement par les NFs 10^{-9}M (3h ; C) ou par les cytokinines (BAP, 10^{-7}M, 3h ; D). Les valeurs obtenues pour le génotype mutant sont normalisées par rapport au génotype sauvage.

Les moyennes de deux répliques biologiques sont représentées, et les barres d'erreur indiquent l'écart-type (n≥ 8 plantes par réplique). Un test de Mann & Whitney a été réalisé pour comparer les niveaux d'expression de chaque gène d'une part entre la condition traitée et la condition contrôle, et d'autre part pour comparer l'effet du traitement sur les racines du sauvage ou des mutants *ern1* ou *nf-ya1*. (*<0,05; **<0,01; *** p<0,001 ; lorsqu'aucun astérisque n'est indiqué pour l'une de ces comparaisons, cela signifie que la différence est non significative).

II. Résultats complémentaires

A. Rôle des facteurs de transcription ERN1 et NF-YA1 dans la régulation de l'expression de CLE13 et CEP7

Un gène *CEP* unique, *CEP7*, ayant été identifié comme étant rapidement induit à la fois en réponse aux NFs et aux cytokinines, et ce de manière dépendante, respectivement, du récepteur aux NFs NFP, du récepteur aux cytokinines CRE1, et du facteur de transcription NIN (Article 3), nous avons cherché à établir si d'autres gènes codant pour des facteurs de transcription impliqués dans l'initiation de la nodulation étaient corégulés avec *CEP7* et *CLE13* afin de déterminer s'il(s) pourrai(en)t être impliqué(s) dans leur régulation. Les gènes *ERN1, NSP2* et *NF-YA1* codent pour des facteurs de transcription impliqués dans les étapes précoces de la formation des nodosités, et sont régulés par les NFs et/ou les cytokinines (Kaló et al., 2005; Middleton et al., 2007; Plet et al., 2011; Laporte et al., 2014). L'analyse simultanée de l'expression de ces trois facteurs de transcription en parallèle de celle de *NIN*, *CEP7* et *CLE13* en réponse aux NFs (**Figure 52A**) et aux cytokinines (**Figure 52B**) révèle que *NF-YA1* présente une induction forte en réponse aux NFs mais pas en réponse aux cytokinines, alors qu'au contraire *ERN1* présente une induction forte par les cytokinines et plus faible par les NFs. L'expression de *NSP2* est quant à elle faiblement induite par les NFs, et réprimée par les cytokinines, en accord avec les données publiées montrant une induction transitoire de *NSP2* par les cytokinines et rhizobium ((Kaló et al., 2005; Ariel et al., 2012), qui ne correspond donc pas au profil de co-expression de *CEP7* et *CLE13*.

Nous avons donc choisi ensuite de nous focaliser sur les gènes *ERN1* et *NF-YA1* pour analyser l'expression de *NIN*, *CEP7* et *CLE13* dans les mutants correspondants (**Figure 52C et D**). En réponse aux NFs, la corégulation de *NIN, CLE13* et *CEP7* est perdue dans le mutant *ern1* (**Figure 52C**). Ainsi, l'induction de *CLE13* et *CEP7* est fortement diminuée dans les racines du mutant *ern1*, alors que l'induction de *NIN* est au contraire augmentée, en accord avec les données de RNAseq de Liu et al. (2019c). Ces résultats suggèrent d'une part que l'induction de *CLE13* et de *CEP7* dépend non seulement de NIN (Article 3) mais aussi d'ERN1, et d'autre part qu'ERN1 pourrait réguler négativement l'expression de *NIN* (**Figure 52C**).

Dans le mutant *nf-ya1*, la corégulation de *NIN, CLE13* et *CEP7* en réponse aux NFs est maintenue, et ces inductions semblent même plus fortes pour *NIN* et *CEP7*, et potentiellement pour *CLE13*, suggérant un rôle négatif éventuel de NF-YA1 sur l'ensemble de ces régulations (**Figure 52C**).

En réponse aux cytokinines, la corégulation de *NIN, CLE13* et *CEP7* est perdue à la fois dans les mutants *ern1* et *nf-ya1* (**Figure 52D**). En effet, bien que la régulation de *NIN* et de *CLE13* en réponse au BAP ne dépende pas d'ERN1 ni de NF-YA1, l'induction de *CEP7* par les cytokinines dépend elle de ces deux facteurs de transcription. (**Figure 52D**). De manière intéressante, l'induction de *CEP7* par les cytokinines dépendrait de NF-YA1 alors que l'expression de ce dernier n'est pourtant pas induite par les cytokinines chez *M. truncatula*, contrairement à *L. japonicus* (Heckmann et al., 2011).

L'ensemble de ces données indique que la régulation de *CLE13* et *CEP7* ne dépend pas seulement de NIN, et que par ailleurs ERN1 et NF-YA1 semblent différentiellement recrutés pour réguler *CLE13* et *CEP7* en réponse aux NFs et/ou aux cytokinines, faisant émerger un modèle de régulation plus complexe. Ainsi, en réponse aux cytokinines, l'induction de *CLE13* ne dépend pas d'*ERN1* ni de *NF-YA1* mais l'induction de *CEP7* dépend de ces deux gènes ; alors qu'en réponse aux NFs, l'induction de *CLE13* et de *CEP7* dépend d'*ERN1* mais pas de *NF-YA1*; enfin, NF-YA1 pourrait réguler négativement l'expression de *CEP7* et *CLE13* en réponse aux NFs. Au final, ces données mettent en évidence un découplage des voies de régulation transcriptionnelles de *CLE13* et *CEP7* par les cytokinines et les NFs, où les régulations médiées par ERN1 et NF-YA1 en plus du rôle de NIN (Article 3) pourraient expliquer les profils temporels, spatiaux et d'intensité d'expression différents de *CLE13* et *CEP7*.

B. Expression basale de gènes de nodulation précoce dans le mutant cra2

L'analyse de l'expression basale de différents gènes de nodulation précoce (définis dans l'Introduction, section I.B.4) entre des plantes sauvages et le mutant *cra2* met en évidence des dérégulations de l'expression de certains de ces gènes. Ainsi, les gènes codant pour les récepteurs aux facteurs Nod (NFP, LYK4) ont une expression plus faible dans les

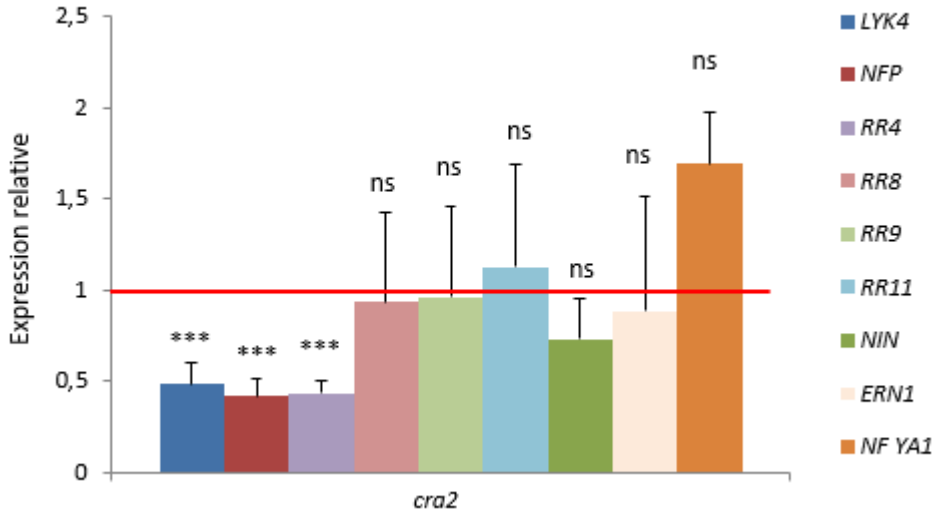


Figure 53 : Expression de gènes liés à l'initiation de la nodulation dans les racines du mutant *cra2*.

Expression relative de transcrits quantifiée par qRT-PCR dans des racines de plantes cultivées en milieu « i » carencé en azote (Blondon, 1964) et prélevées 10 jours après germination. Les valeurs obtenues pour chaque gène dans les racines du mutant *cra2* sont normalisées par rapport à l'expression dans des racines sauvages (comme indiqué par la barre horizontale à 1). Les acronymes des gènes sont définis dans l'Introduction (section I.B.4). Les moyennes de quatre répliques biologiques sont représentées, et les barres d'erreur indiquent l'écart-type (n≥ 2 plantes par réplique). Un test de Mann & Whitney a été réalisé pour comparer les niveaux d'expression de chaque gène dans les racines du sauvage et du mutant *cra2*. (ns : non significatif ; *** p<0,001).

racines du mutant que chez les plantes sauvages. De manière intéressante, les transcrits du gène de réponse primaire aux cytokinines *RRA4* sont aussi plus faiblement accumulés dans les racines du mutant *cra2* que dans des racines sauvages, alors que des gènes codant pour d'autres RRAs qui ont aussi été préalablement reliés à l'initiation de la nodulation, *RRA8*, *RRA9* et *RRA11* (Saur et al., 2011 ; Van Zeijl., et al 2015), ne sont eux pas différentiellement exprimés dans les racines du mutant *cra2* (**Figure 53**). Une analyse de transcriptome (RNAseq) réalisée dans l'équipe (données non publiées) confirme cette plus faible expression des gènes *NFP*, *LYK3*, *LYK4*, et *RRA4* dans le mutant *cra2*. Les autres gènes testés (*NIN*, *ERN1* et *NF-YA1*) ne présentent quant à eux pas de dérégulation dans les racines du mutant *cra2*.

Ces données suggèrent que la voie CEP/CRA2 régulerait spécifiquement et positivement l'expression du gène de réponse aux cytokinines *RRA4* parmi le sous-groupe de gènes *RRA* préalablement liés à la nodulation, et que la voie CRA2 jouerait aussi un rôle positif dans la régulation des récepteurs aux NFs, cette régulation étant opposée à celle exercée par la voie CLE13/SUNN qui inhibe leur expression (Gautrat et al., 2019). Ainsi, la régulation de l'expression des récepteurs aux NFs serait une cible à la fois de la voie systémique CLE/SUNN inhibant la nodulation et de la voie CEP/CRA2 favorisant la nodulation, en accord avec la dérégulation des infections rhizobiennes et de l'expression d'*ENOD11* préalablement observés dans les mutants correspondants (Mortier et al., 2010 ; Tsikou et al., 2018 ; Article 1 ; Article 2).

C. Régulation de l'expression de CEP7 en réponse à rhizobium dans un système de « split-root »

Nous avons montré dans l'Article 3 que l'effet positif du peptide CEP7 sur la nodulation était systémique car des expériences de greffes entre *cra2* et des plantes sauvages associées à un traitement par CEP7 montraient une augmentation de la nodulation seulement lorsque le récepteur CRA2 était fonctionnel dans la partie aérienne (Article 3 ; Suppl Figure 4A). Par ailleurs, des expériences de « split-root » ont aussi permis de montrer que le nombre de nodosités est stimulé non seulement dans les demi-systèmes racinaires traités localement par le peptide CEP7, mais aussi dans les racines distantes, indiquant l'existence d'une action systémique (Article 3 ; Suppl Figure 4B). Nous nous sommes alors interrogés si la production

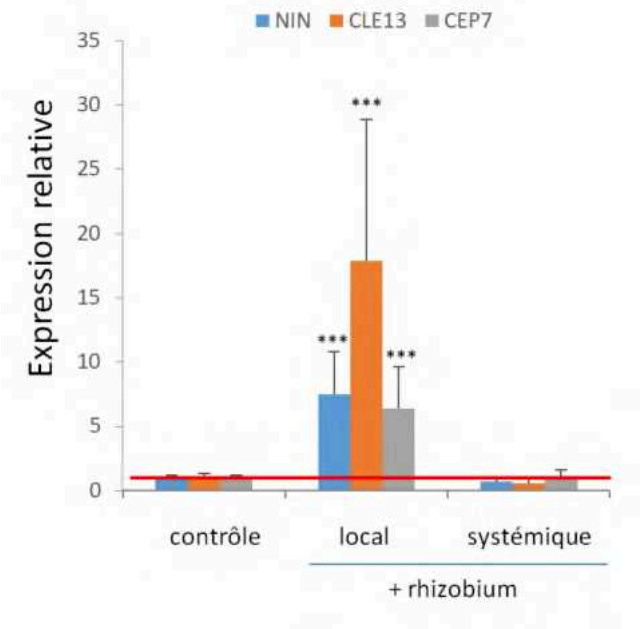


Figure 54 : Expression des gènes *NIN, CLE13* et *CEP7* dans des « split-roots » en réponse à rhizobium.

Expression relative des transcrits *NIN, CLE13* et *CEP7* quantifiée par qRT-PCR dans les racines de plantes sauvages (Jemalong A17) cultivées en « split-root » inoculé ou non par la souche de rhizobium *Sm1021* (compartiment « local » ou « systémique », respectivement); les deux demi-systèmes racinaires ont été prélevés deux jours après l'inoculation. Les valeurs obtenues pour les échantillons « local » et « systémique » du « split-root » traité par rhizobium sont normalisées par rapport à la moyenne des échantillons « local » et « systémique » du « split-root » non-traité (contrôle). Les moyennes de quatre répliques biologiques sont représentées, et les barres d'erreur indiquent l'écart-type (n≥ 8 plantes par réplique).). Un test de Mann & Whitney a été réalisé pour comparer les niveaux d'expression de chaque gène entre la condition contrôle et le compartiment local ou systémique (*** p<0,001).

du peptide CEP7 en réponse à rhizobium était locale. Une expérience de « split-root » a donc été réalisée pour analyser l'expression de *CEP7*, mais aussi de *CLE13* et de *NIN*, dans des racines inoculées par rhizobium (« Rhizobium local ») de manière comparée aux racines distantes non-inoculées (« Rhizobium systémique »), ainsi qu'aux racines « locales » et « systémiques » d'une plante contrôle non-inoculée. Ces analyses révèlent une induction locale de *CEP7* par rhizobium (**Figure 54**), de même que pour NIN et CLE13, en accord avec le modèle de régulation homéostatique de NIN proposé chez le lotier (Soyano et al., 2014).

Au final, ces données indiquent que la corégulation de *NIN, CLE13* et *CEP7* est locale en réponse à rhizobium, alors que l'action de ces peptides sur la nodulation est systémique (Mortier et al., 2010 ; Article 3), en accord avec les modèles proposés (Ferguson et al., 2019 ; Taleski et al., 2018).

DISCUSSION GENERALE

Les travaux réalisés durant cette Thèse et présentés dans ce manuscrit ont permis de caractériser la voie de signalisation médiée par le récepteur CRA2, d'une part en identifiant des signaux peptidiques agissant en amont de ce récepteur, et d'autre part en établissant des connections entre la voie CEP/CRA2 et d'autres voies hormonales peptidiques ou non-peptidiques. Les résultats majeurs, présentés sous forme d'articles, ayant déjà été discutés (chapitres I à III), cette dernière partie propose donc une réflexion plus générale sur la compréhension du rôle de la voie de signalisation peptidique médiée par le récepteur CRA2 en se focalisant sur i) les divergences qui peuvent exister entre les acteurs de la voie CEP/CRA2 chez Medicago et la voie homologue CEP/CEPR chez Arabidopsis ; ii) l'originalité de l'identification d'un facteur de transcription régulant des gènes codant pour des peptides de signalisation appartenant à des familles différentes et dont la fonction est antagoniste ; iii) les connections existant entre les voies de signalisation des cytokinines et d'autres peptides hormonaux dans d'autres contextes que la nodulation ; et iv) l'intégration des résultats obtenus dans cette Thèse avec d'autres résultats obtenus récemment dans l'équipe, consistant en l'identification d'une cible commune des voies systémiques CEP/CRA2 et CLE/SUNN : le module miR2111/TML.

I. Comparaison de la voie CEP/CRA2 chez Medicago avec la voie CEP/CEPR chez Arabidopsis

Le premier objectif majeur de la Thèse était d'identifier quel signal agit via le récepteur CRA2 pour induire la nodulation et réprimer la formation des RLs. En accord d'une part avec l'observation que le plus proche homologue de CRA2 chez Arabidopsis est un récepteur de peptides CEP (Tabata et al., 2014), et d'autre part que chez *M. truncatula,* un de ces peptides de signalisation sécrété, MtCEP1, génère des phénotypes racinaires et de nodulation opposés à ceux du mutant *cra2* (Imin et al., 2013), nous avons montré que le peptide MtCEP1 nécessitait le récepteur CRA2 pour agir (Mohd-Radzman et al., 2016). Toutefois l'existence d'une interaction physique directe entre la protéine CRA2 et le peptide CEP1, comme cela a été démontré chez Arabidopsis, resterait à établir. L'accumulation des transcrits des gènes codant pour la plupart des peptides CEP dans les racines du mutant *cra2* par rapport aux racines sauvages (**Figure 47**) suggère qu'un lien, direct ou indirect, existe

entre le récepteur CRA2 et ces peptides de signalisation CEP, au-delà de MtCEP1 (Article 1) et de MtCEP7 (Article 3). De manière similaire, une accumulation des transcrits des gènes *CEP5, CEP6, CEP7* et *CEP8* a été mise en évidence chez le mutant *cepr1* d'Arabidopsis (Chapman et al., 2019). Ces dérégulations de l'expression « basale » des peptides rappelle aussi celle des transcrits *CLE2, CLE3, CLE4* et *CLE7* qui s'accumulent dans le mutant *clv1* (Brand et al., 2000; Schoof et al., 2000; Araya et al., 2014). L'ensemble de ces données suggère l'existence de boucles de rétrocontrôle négatif entre ces voies de signalisation et la synthèse des signaux peptidiques qui sont à l'origine de leur activation, comme c'est classiquement le cas aussi pour les hormones non-peptidiques (Müller et Sheen, 2007; Farcot et al., 2015).

Chez la plante de référence Arabidopsis, deux récepteurs CEPR1 et CEPR2 ont été identifiés alors que chez *M. truncatula*, un seul a été caractérisé à ce jour, CRA2 (Tabata et al., 2014 ; Huault et al., 2014 ; Article 2). Le récepteur CEPR2 est proposé pour jouer un rôle mineur dans la signalisation des peptides CEP, car par exemple l'inhibition de la croissance de la racine primaire en réponse à un traitement par le peptide CEP3 n'est pas perdue dans le mutant nul *cepr2* contrairement au mutant *cepr1* (Chapman et al., 2019). La comparaison des phénotypes d'architecture racinaire de mutants nuls *cepr1* obtenus dans deux fonds génétiques différents d'Arabidopsis révèle par ailleurs une influence de facteurs à la fois génétiques et liés aux conditions de culture. Ainsi, dans un milieu sans saccharose, le mutant *cepr1.1* généré dans l'écotype No-0 présente à la fois une racine primaire plus longue et une réduction du nombre et de la longueur totale des RLs par rapport à celles de plantes sauvages, tandis que ces paramètres ne sont pas différents du sauvage chez le mutant *cepr1.3* obtenu dans le génotype Col-O (Chapman et al., 2019). Dans un milieu supplémenté en saccharose 1%, la longueur totale des RLs est cependant supérieure à celle du sauvage dans les deux allèles, ce qui est en accord avec le phénotype du mutant *cepr1.1* montré par Tabata et al. (2014) lorsque ce mutant est cultivé sur milieu supplémenté en saccharose 0,5%. Un rôle inhibiteur de AtCEPR sur l'élongation des RLs en réponse à l'addition de saccharose 1% dans le milieu, ou à une exposition à une lumière plus intense (150 µmol m^{-2} s^{-1} au lieu de 110), a aussi été mis en évidence par Chapman et al. (2019).

Ces différents phénotypes racinaires des mutants *cepr1* d'Arabidopsis sont différents du phénotype des mutants *cra2* de *M. truncatula*, qui ont à la fois un plus grand nombre de

RLs et une diminution de la longueur des racines primaire et latérales, et ce de manière totalement homogène entre les deux génotypes de *M. truncatula* analysés, R108 et Jemalong A17 (Huault et al., 2014; Article 2). Cependant, le paramètre « longueur totale des RLs » utilisé chez Arabidopsis (Chapman et al., 2019), prenant en compte à la fois la longueur des RLs et leur nombre, pourrait masquer un effet sur l'un ou l'autre de ces paramètres. Ainsi, si ce paramètre « longueur totale des RLs » avait été calculé dans le mutant *cra2*, il pourrait aussi être supérieur à celui du sauvage, i.e. comme observé chez Arabidopsis, en raison du nombre élevé de ramifications du mutant *cra2*. Enfin, on peut se demander si la réduction de la croissance des racines du mutant *cra2* est une conséquence indirecte du nombre plus important de ces organes, ou si elle est liée à un rôle direct de la voie CRA2, et que la plante compense indirectement le fait que ses racines ne s'allongent pas correctement en augmentant leur nombre. D'un côté, la réduction de la longueur de la racine primaire du mutant *cra2* a en effet été associée à une réduction de la taille du méristème racinaire, et *CRA2* s'exprime dans la zone de prolifération du RAM (Huault et al., 2014) ; d'un autre coté cependant, des expériences d'excision du RAM à des temps précoces après la germination ont montré que le défaut de régulation du nombre de RLs était indépendant du défaut de croissance de la racine primaire. Il est aussi à noter que la longueur de la racine primaire n'est pas affectée en réponse à un traitement CEP1 chez Medicago (Imin et al., 2013), et que c'est principalement l'émergence des RLs qui est inhibée par un traitement exogène ou la surexpression de ces peptides (Imin et al., 2013).

Au final, les différences de phénotypes racinaires observées entre les mutants *cepr1* et *cra2* suggèrent que la plasticité racinaire pourrait être régulée différentiellement par la voie CEPR/CRA2 entre Arabidopsis et Medicago. Le recrutement de la voie CEP/CRA2 chez les légumineuses pour réguler aussi la nodulation au niveau du système racinaire pourrait être associé à ces divergences de régulation du développement racinaire entre ces différentes plantes.

Des divergences existent aussi entre Arabidopsis et Medicago quant à la fonction, locale ou systémique, des récepteurs CEPR/CRA2. En effet, les greffes réalisées chez Medicago montrent que dans les deux génotypes analysés (R108 et Jemalong A17), la longueur de la racine primaire et le nombre de RLs sont contrôlés par la fonction de CRA2

dans la racine, tandis que les greffes réalisées chez Arabidopsis suggèrent une fonction de CEPR1 à la fois dans les racines et la partie aérienne pour contrôler la longueur des RLs (Huault et al., 2014 ; Chapman et al., 2019 ; Article 2). En revanche, les récepteurs AtCEPR1 et MtCRA2 contrôlent dans les deux espèces de manière systémique depuis les parties aériennes l'angle de croissance des RLs, aboutissant à des architectures racinaires plus étroites chez les mutants *cra2* et *cepr1* que chez les plantes sauvages (Chapman et al., 2020). Par ailleurs, CRA2 contrôle aussi le nombre de nodosités formées, mais pas leur croissance, systémiquement et négativement dans les deux génotypes analysés (Huault et al 2014 ; Article 2).

Ainsi, l'ensemble de ces données met en évidence que la perte de fonction de CEPR1 chez Arabidopsis n'est pas associée à un défaut d'architecture racinaire aussi robuste en fonction des écotypes et des milieux que chez Medicago, où la perte de fonction de CRA2 est associée à un défaut de développement racinaire affectant *a priori* principalement l'inhibition de l'émergence des RLs et positivement l'initiation de la nodulation. Ces différences phénotypiques de mutants de gènes orthologues rappellent celles existant entre les mutants *har1* chez *L. japonicus*, *sunn* chez *M. truncatula*, et *clv1* chez Arabidopsis, qui présentent, respectivement, un défaut d'architecture racinaire très marqué consistant en une racine primaire courte et plus de RLs, un phénotype faible de réduction de la racine primaire, ou un phénotype de RLs plus longues (Wopereis et al., 2000 ; Schnabel et al., 2005 ; Araya et al., 2014). La caractérisation d'un homologue de CRA2 dans d'autres espèces, et notamment chez d'autres légumineuses, permettrait de comprendre si le rôle négatif drastique de CRA2 dans le développement des RLs est conservé avec Medicago, ou si c'est une exception, comme c'est -à ce jour- le cas pour HAR1 chez *L. japonicus*. Et si de telles différences existent, en rechercher les causes éventuelles, telle que l'existence d'un homologue qui serait fonctionnellement redondant et masquerait par conséquent certains phénotypes.

II. Coordination par le facteur de transcription NIN de la régulation de différents peptides de signalisation régulant la nodulation : dimension tissulaire, intégration avec d'autres facteurs de transcription, et autres contextes qui permettraient de généraliser cet exemple fondateur ?

Nous avons vu dans l'Article 3 que le facteur de transcription NIN lie les promoteurs des gènes *CLE13* et *CEP7* et active leur expression dans un système hétérologue et dans la racine de Medicago en absence de rhizobium, ces deux gènes codant pour des peptides de signalisation appartenant à des familles différentes et jouant des rôles antagonistes sur la nodulation. Ce résultat soulève tout d'abord la question de savoir si ces régulations aboutissant à des réponses macroscopiques contraires prennent place dans les mêmes tissus de la racine, et/ou au même moment lors de la mise en place des nodosités. A cette fin, il faudrait préciser les profils spatio-temporels de *CEP7* et de *CLE13*, en les analysant en parallèle dans les mêmes conditions à l'aide de fusion transcriptionnelles. Par ailleurs, il serait intéressant d'utiliser le mutant *nin*$^{daphne\text{-}like}$ de *M. truncatula* (Liu et al., 2019c), où le gène *NIN* s'exprime seulement dans l'épiderme et permet uniquement la formation de cordons d'infection, mais ne s'exprime plus dans le péricycle et ne permet donc plus l'organogénèse de nodosités, afin de voir si en réponse à rhizobium, à un traitement par les NFs, et/ou par les cytokinines, la régulation de *CEP7* et de *CLE13* par l'une ou l'autre de ces conditions est affectée. Ainsi, ces analyses pourraient révéler des spécificités tissulaires différentes quant à leur activation par NIN. Chez *L. japonicus*, l'induction de *CLE-RS1/2* par rhizobium est réduite chez le mutant *nin*^{daphne} par rapport au sauvage (Yoro et al., 2020), et l'induction de *NIN* par les cytokinines est perdue dans le mutant *nin*$^{daphne\text{-}like}$ chez *M. truncatula* (Liu et al., 2019c). Basé sur ces données, on peut en conséquence anticiper que l'induction de *CLE13* soit réduite dans *nin*$^{daphne\text{-}like}$ en réponse à rhizobium et perdue en réponse aux cytokinines, mais on peut imaginer que l'induction de *CEP7* en réponse à rhizobium et/ou aux cytokinines soit potentiellement maintenue, indiquant ainsi la possibilité d'un découplage des régulations de *CEP7* et *CLE13* en lien avec les multiples rôles de NIN, positifs à la fois sur la formation de la chambre d'infection, des cordons d'infections et sur l'organogénèse des nodosités, et négatifs à un stade plus tardif sur les infections au travers de l'induction de la voie d'autorégulation systémique de la nodulation (Fournier et al., 2015 ; Marsh et al., 2007 ; Soyano et al., 2014 ; Vernié et al., 2015).

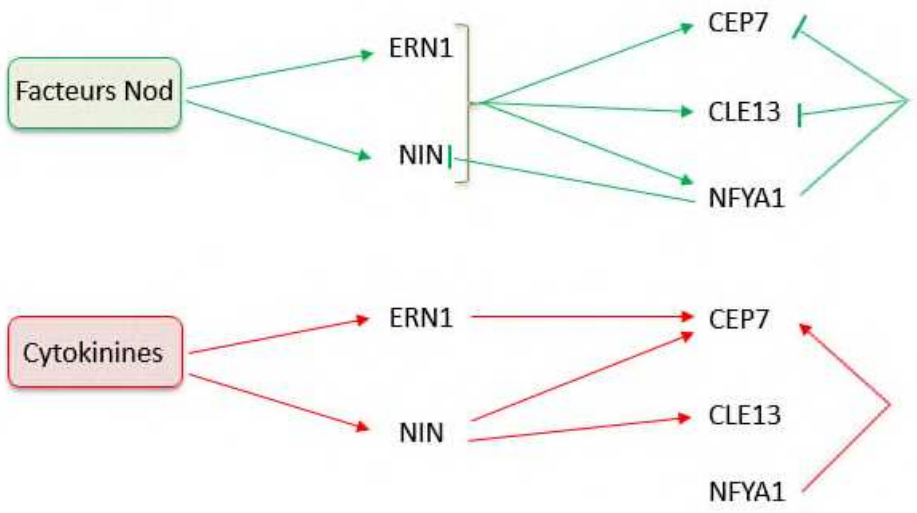


Figure 55 : Rôle des régulateurs transcriptionnels NIN, ERN1 et NF-YA dans la réponse aux facteurs Nod et aux cytokinines.

En réponse aux facteurs Nod, l'expression des facteurs de transcription ERN1 et NIN est induite. Ces deux protéines, sont à l'origine de l'induction de l'expression du facteur de transcription *NF-YA1* et des gènes codant pour les peptides *CEP7* et *CLE13.* NF-YA1, au contraire, régulerait potentiellement négativement l'expression de *NIN, CEP7* et *CLE13,* mais pas celle d'*ERN1*.

En réponse aux cytokinines, l'expression des facteurs de transcription ERN1 et NIN est induite. Alors que NIN est requis pour l'induction de *CEP7* et de *CLE13* (Article 3), *ERN* est nécessaire pour l'induction de l'expression de *CEP7* seulement. Par ailleurs, NF-YA1 semble aussi jouer un rôle positif dans l'induction de l'expression de *CEP7.*

L'analyse du promoteur de *NIN* a révélé que la région promotrice de 2,2 kb en amont de l'ATG était nécessaire à l'expression de *NIN* au niveau de l'épiderme et était associée au rôle positif de NIN sur la formation de la chambre d'infection symbiotique au niveau des poils absorbants (Fournier et al., 2015; Liu et al., 2019c). Cependant, le rôle de NIN dans l'établissement des cordons d'infection requiert un site de liaison à CYCLOPS/IPD3 localisé entre 5 et 2,2 kb en amont de l'ATG. Bien que le promoteur de 5 kb de NIN s'exprimant dans les cellules épidermiques restaure le défaut d'infection du mutant *nin*, il ne permet de restaurer le défaut d'organogénèse des nodosités qu'en association avec une région régulatrice localisée 17 kb en amont de l'ATG et contenant des sites de liaison putatifs pour des facteurs de transcription de la voie de signalisation des cytokinines (RRBs). Basé sur ces connaissances, il serait intéressant de tester si ces différentes régions promotrices de *NIN* ayant des domaines d'expression spatiaux différents ont une capacité différentielle à induire l'expression de *CEP7* et/ou de *CLE13* en réponse à rhizobium, à un traitement par les NFs, et/ou par les cytokinines, et de déterminer ainsi notamment si l'induction de *CEP7* est liée à la fonction positive et précoce de NIN sur la formation des cordons d'infections au niveau de l'épiderme.

Nous avons vu dans le chapitre III que *NIN* n'était pas le seul facteur de transcription impliqué dans la régulation de *CEP7* et *CLE13* en conditions symbiotiques et en réponse aux cytokinines, mais que les régulateurs transcriptionnels *ERN1* et *NF-YA1* semblent également recrutés, différentiellement, pour réguler *CEP7* et *CLE13* en réponse à ces différents signaux (**Figure 55**). La protéine ERN1 étant nécessaire à l'induction de *CEP7* et *CLE13* en réponse aux NFs, elle pourrait agir en association avec NIN pour induire leur expression dans ces conditions. Par ailleurs, un éventuel complexe impliquant NIN et ERN1 serait également requis pour l'induction de *CEP7* en réponse aux cytokinines, alors que seul NIN semble responsable de l'activation de *CLE13* par les cytokinines. L'existence de tels complexes transcriptionnels, qui pourraient être tissu spécifique, NIN et ERN1 étant exprimés dans les cellules épidermiques (Cerri et al., 2012; Vernié et al., 2015), pourrait être à l'origine du découplage observé entre la régulation de *CLE13* et *CEP7*. Enfin, le facteur de transcription NF-YA1, impliqué dans le contrôle de l'initiation et la progression des infections rhizobiennes, ne semble pas intervenir dans la régulation de *CLE13* mais pourrait être recruté

pour la régulation de *CEP7* par les cytokinines en association avec NIN. En perspective, l'analyse de profils d'expression spatiaux de *CEP7* et *CLE13* en réponse aux signaux NFs ou cytokinines dans les mutants *ern1* et *nf-ya1* pourraient permettre de préciser les spécificités tissulaires associées à ces régulations différentielles.

Même si l'hypothèse d'un découplage spatio-temporel de la production des peptides CEP7 et CLE13 médiée par NIN est validée, cela n'enlève en rien l'originalité de cette régulation, sachant que dans la littérature il n'existe pas d'autre donnée -à notre connaissance- montrant qu'un même TF soit à l'origine de la régulation de peptides de signalisation appartenant à des familles différentes et ayant des rôles antagonistes sur un processus. Ce type de mécanisme permettrait à la plante d'assurer une coordination dynamique, tout au long de son cycle de vie, de sa nutrition azotée en fonction des variations de disponibilité en azote minéral et de la possibilité, ou non, de mettre en place une symbiose fixatrice d'azote selon la présence, ou non, de rhizobia compatibles. L'obtention de nos résultats a été possible de par le contexte spécifique de cette étude, un des rares cas où deux voies impliquant des peptides de signalisation antagonistes régulant un même processus a été décrit. Un autre exemple chez Arabidopsis est la régulation de la différenciation des stomates par des peptides antagonistes, positive via le peptide STOMAGEN / « EPIDERMAL PATTERNING FACTOR-LIKE 9 » (EPFL9), et négative via les peptides EPF1 et EPF2 (Hara et al., 2007; Hunt et Gray, 2009; Sugano et al., 2010). Le mécanisme identifié dans ce contexte implique que le peptide STOMAGEN entre en compétition pour la liaison au récepteur ERECTA avec le peptide EPF2 ayant un rôle antagoniste, supprimant ainsi l'activation de la voie inhibant le développement des stomates (Lee et al., 2015). Dans ce contexte, il serait intéressant de voir quels TFs régulent l'expression de ces peptides antagonistes afin de coordonner leur action, et si un seul TF pourrait dans ce cas aussi réguler ces peptides à action antagoniste, et notamment le régulateur de réponse à l'auxine MONOPTEROS/AUXIN RESPONSE FACTOR (ARF5) qui a déjà été montré comme régulant négativement l'expression de STOMAGEN (Zhang et al., 2014). Il est à noter que dans ce cas, les peptides à action antagoniste appartiennent à la même famille EPF, contrairement à notre exemple.

Chez Arabidopsis, les publications ont été plutôt focalisées sur l'identification du (ou des) récepteur(s) impliqué(s) dans différentes signalisations peptidiques, ou bien sur les voies activées en aval du couple peptide/récepteur, plutôt que sur les voies de régulation en amont de la production du (des) peptide(s) (Oh et al., 2018; Jourquin et al., 2020). Certains articles mettent en parallèle l'implication de deux familles de peptides dans un même processus de développement, mais n'établissent pas de lien entre les deux voies de signalisation, comme dans le cas par exemple des peptides CLE40 et ROOT GROWTH FACTOR (RGF) régulant tous deux négativement le RAM d'Arabidopsis (Leasure et He, 2012). Enfin, en réponse à un déficit en azote, des peptides de la famille CEP (CEP1, 3, 5) et de la famille CLE (CLE1, 3, 4,7) sont induits, et ont tous des rôles inhibiteurs sur le développement des RLs (Tabata et al., 2014; Araya et al., 2014; Roberts et al., 2016). Les peptides CEP inhibant chez Arabidopsis l'étape d'initiation des RLs et les peptides CLE inhibant leur émergence (Araya et al., 2014 ; Roberts et al., 2016), l'hypothèse d'une régulation commune de ces peptides par une même voie hormonale, potentiellement l'auxine, ou par un même facteur de transcription, appartenant potentiellement à la famille des ARFs ou des LATERAL ORGAN BOUNDARIES-DOMAIN (LBD) (Okushima et al., 2007; Schiessl et al., 2019) pour assurer une coordination de la régulation de l'initiation et de l'émergence des RLs pourrait être explorée.

III. Connections entre les voies de signalisation des cytokinines et des peptides hormonaux

Comme mentionné dans l'introduction, la voie de signalisation des cytokinines induit de manière conservée entre *L. japonicus* et *M. truncatula* la production des peptides LjCLE-RS1/2 ou MtCLE13, respectivement (Mortier et al., 2012 ; Soyano et al., 2014 ; Article 3). Dans l'Article 3, nous avons aussi montré que les cytokinines activaient l'expression d'un gène unique dans la famille *CEP*, *MtCEP7*. Il est à noter que *MtCLE13* et *MtCEP7* sont tous deux également induits en conditions symbiotiques, à la fois par les rhizobia et les NFs. MtCEP7 ayant, comme MtCEP1, un effet promoteur sur la nodulation, il semble étonnant que les mêmes signaux NFs et cytokinines, comme NIN précédemment, induisent la production de deux signaux peptidiques ayant des rôles antagonistes sur la nodulation.

Comme discuté pour NIN dans la section précédente, les cytokinines jouent aussi un rôle double dans l'initiation de la nodulation, à la fois positif sur l'organogénèse des nodosités et négatif sur les infections rhizobiennes et/ou la signalisation NF (Gamas et al., 2017). Comme la voie systémique de la nodulation médiée par CLE13/SUNN inhibe les infections (Gautrat et al., 2019), nous pourrions émettre l'hypothèse que le rôle négatif des cytokinines sur les infections passe par cette voie systémique et pourrait être interprété comme un rétrocontrôle négatif sur les infections. En accord avec cette hypothèse, le prétraitement de racines par les cytokinines inhibe l'induction de l'expression d'*ENOD11*, marqueur des infections rhizobiennes, par les NFs (4h ; Jardinaud et al., 2016) potentiellement suite à l'activation de l'expression du peptide CLE13 par les cytokinines. Pour tester l'hypothèse d'un rôle négatif des cytokinines sur les infections en aval de la voie CLE13/SUNN, il faudrait analyser dans une expérience de « split-root » en réponse aux cytokinines ou aux NFs l'expression de gènes de la voie de réponse primaire aux cytokinines, tels que les *RRAs* et notamment *RRA8* qui a déjà été lié aux régulations systémiques (Saur et al., 2011). De manière complémentaire, comme la production du peptide MtCEP7 est associée à l'épiderme racinaire (Article 3), il serait intéressant de tester son expression ainsi que celle de *NIN* dans des racines transformées par la construction tissu spécifique *pEpi :CKX3*, qui en diminuant la quantité de cytokinines spécifiquement dans l'épiderme, induit l'expression d'*ENOD11* et la capacité de nodulation (Jardinaud et al., 2016). Cette approche permettrait d'établir si l'induction du peptide MtCEP7 en réponse aux NFs ou à rhizobium est affectée lorsque la capacité de production des cytokinines est inhibée dans l'épiderme racinaire.

Chez Arabidopsis, un rôle agoniste ou antagoniste des cytokinines et de différents peptides de signalisation sur le maintien d'un équilibre entre identité des cellules souches et différenciation cellulaire a été décrit en fonction des organes, souterrains ou aériens (Cammarata et al., 2019). Ainsi, les cytokinines et certains peptides CLE jouent un rôle agoniste répresseur au niveau de la racine pour réguler plusieurs processus tels que l'inhibition de l'identité des cellules souches dans le RAM, des divisions cellulaires, de la formation des RLs, et de la différenciation du xylème (Cammarata et al., 2019). Par exemple, les cytokinines et le peptide CLE40 ont tous deux un effet inhibiteur sur la différenciation des

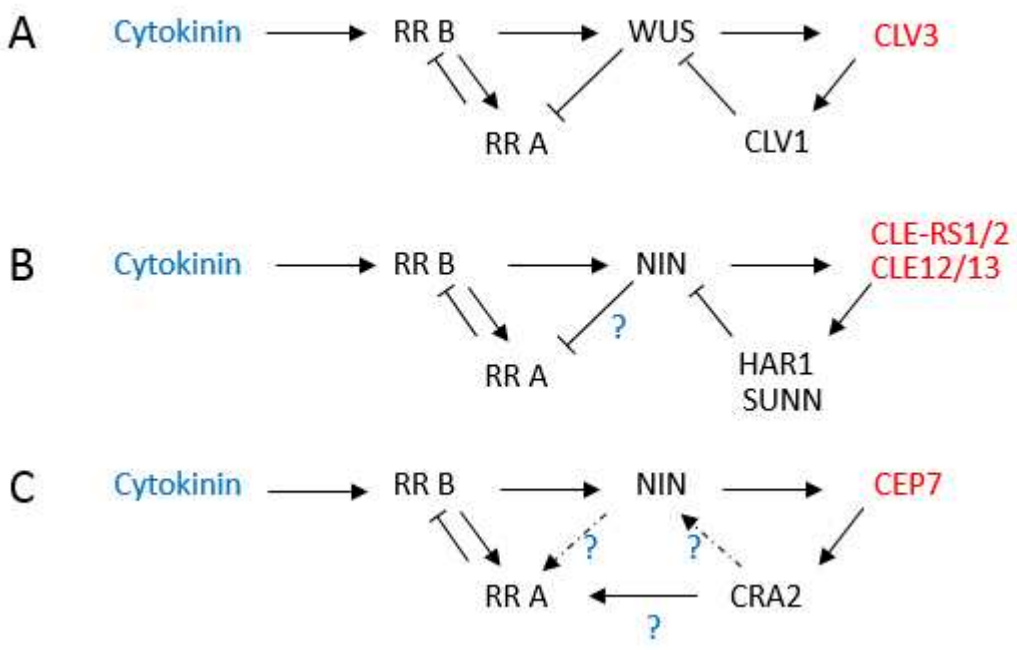


Figure 56 : Parallèles entre les interactions de la voie de régulation des cytokinines avec celle de signaux peptidiques dans le SAM d'Arabidopsis ou dans la régulation systémique de la nodulation chez les légumineuses.

(A) Dans le contexte du développement du SAM d'Arabidopsis, les cytokinines activent via les Régulateurs de Réponse de type B (RRB), l'expression de *WUSCHEL* (*WUS*), qui lui-même induit l'expression de *CLV3.* Après perception par CLV1, CLV3 inhibe à son tour de manière non-cellule autonome l'expression de *WUS*. En réprimant l'expression des *RRA*, WUS maintient ainsi active la voie de signalisation des cytokinines (Cammarata et al., 2019)

(B) Dans le contexte de la régulation du nombre de nodosités chez *M. truncatula* et *L. japonicus,* les cytokinines activent potentiellement via des RRBs l'expression de *NIN*, qui lui-même induit l'expression de *CLE12/13* ou *CLE-RS1/2* qui après perception par SUNN ou HAR1, inhibe à son tour de manière systémique l'expression de *NIN*. La surexpression de CLE12 étant associée à une induction de *RRA8*, l'hypothèse d'une répression de *RRAs* par NIN, de manière similaire au rôle de WUS dans le SAM, reste à explorer. (Mortier et al., 2010 ; Plet et al., 2011 ; Saur et al., 2011 ; Soyano et al., 2014)

(C) Dans le contexte de la nodulation chez *M. truncatula,* les cytokinines activent NIN qui induit aussi l'expression de *CEP7* qui est perçu par CRA2 pour réguler positivement la formation des nodosités et notamment les infections symbiotiques. Avec l'objectif d'établir un parallèle entre les liens de régulation mis en évidence dans les deux modèles précédents, plusieurs hypothèses seraient à explorer. D'une part, CEP7 réamplifierait l'expression de *NIN* qui induirait à son tour celle de *RRA4*, associé à la formation des nodosités. D'autre part, CEP7 induirait via le récepteur CRA2 l'expression de *RRA4* pour réprimer la voie des cytokinines indépendamment de NIN. Il est à noter que ces deux voies de régulations ne sont pas forcément exclusives.

cellules du RAM, mais à ce jour, il n'a pas été établi si ces deux signaux agissent via des voies indépendantes ou s'il existe un lien entre ces deux signaux régulateurs (Stahl et al., 2009; Zhang et al., 2013). A l'inverse, les cytokinines et d'autres peptides CLE ont un rôle antagoniste dans le développement du SAM, les cytokinines induisant les divisions cellulaires, l'identité des cellules souches et la stomatogénèse, et les peptides CLE les inhibant (Cammarata et al., 2019).

Un lien de régulation entre les peptides CLE et la voie des cytokinines a notamment été mis en évidence lors de la différenciation des cellules du xylème dans la racine (Kondo et al., 2011). En effet, les cellules voisines des pôles de xylème ne peuvent pas acquérir l'identité de cellules de xylème du fait d'une inhibition médiée à la fois par les cytokinines et par le peptide AtCLE10. Des double mutants *arr10;arr12* affectés dans deux RR de type B permettant la signalisation des cytokinines sont insensibles à l'inhibition du protoxylème médiée par les cytokinines, comme attendu, mais également à l'inhibition du protoxylème induite par AtCLE10. Ces données indiquent que l'activation d'AtCLE10 requiert donc la voie des cytokinines (Kondo et al., 2011). AtCLE10 réprime via le co-récepteur CLV2 l'expression des RR de type A *ARR5* et *ARR6*, permettant ainsi de maintenir active la voie des cytokinines au niveau des faisceaux de protoxylème, et d'inhiber en conséquence la différenciation du xylème.

De manière similaire dans le contexte du développement du SAM d'Arabidopsis, les cytokinines activent via les RR de type B ARR1, ARR10 et ARR12 le facteur de transcription *WUS* dans le centre organisationnel à l'origine de l'induction de l'expression du peptide CLE AtCLV3 dans la zone centrale du SAM (Meng et al., 2017). L'activation du récepteur CLV1 par le peptide CLV3 conduit dans les cellules entourant le centre organisationnel à la répression du facteur de transcription WUS qui à son tour inhibe les RR de type A, eux-mêmes répresseurs de la voie des cytokinines (**Figure 56**). Cette boucle de rétrocontrôle entre cytokinines et peptide CLE est à l'origine d'une homéostasie de l'activité du facteur de transcription WUS, qui permet ainsi de réguler finement la taille du SAM (Cammarata et al., 2019).

Dans ce modèle du développement du SAM, les cytokinines agissent donc en amont de la voie impliquant les peptides CLE, comme cela a aussi été démontré dans le contexte de

la racine pour réguler le nombre de nodosités formées (Mortier et al., 2012 ; Soyano et al., 2014 ; Article 3). On pourrait alors faire un parallèle entre cette homéostasie du facteur de transcription WUS dans le SAM et l'homéostasie du facteur de transcription NIN dans la régulation du nombre de nodosités formées, car dans les deux cas les cytokinines induisent l'expression du facteur de transcription impliqué, WUS ou NIN, ainsi que celle des peptides CLE associés (AtCLV3 ou MtCLE13/LjCLE-RS1/2) (**Figure 56**). Ces peptides CLE agissent via le récepteur AtCLV1, ou les homologues MtSUNN/LjHAR1, pour réprimer la transcription de *WUS* ou *NIN*, respectivement, permettant ainsi une régulation fine et dynamique de ces TF, et donc déterminer la taille optimale du SAM, ou le nombre optimal de nodosités (Saur et al., 2011; Soyano et al., 2014) De manière intéressante, dans ces deux contextes, l'homéostasie de ces deux facteurs de transcription est régulée par un mécanisme non-cellule autonome, impliquant une voie de signalisation locale dans le cas du développement du SAM ou systémique dans le cas de la formation des nodosités.

La surexpression de CLE12 chez Medicago induit l'expression d'un RR de type A, *RRA8*, de manière dépendante de SUNN, indiquant que la voie de l'AON médiée par SUNN induit au moins certains régulateurs de réponse RRA, qui sont à la fois des gènes de réponse primaire aux cytokinines et des répresseurs de la voie de signalisation des cytokinines (Saur et al., 2011). Ces données suggèrent donc que la surexpression de *CLE12* ou *CLE13*, en inhibant NIN, supprimerait la répression de *RRA8,* de manière similaire au mécanisme de rétrocontrôle régulant la taille du SAM. En accord avec cette hypothèse, les données de RNAseq de Schiessl et al. (2019) indiquent aussi une induction de l'expression de *RRA8* en réponse à rhizobium, maximale 16 à 24 heures après l'inoculation, puis une répression 5 jours après inoculation. Ce lien de régulation entre NIN et l'expression de *RRAs* pourrait être approfondi d'une part, en réalisant une analyse spatio-temporelle de l'expression de *RRA8* en réponse à rhizobium dans des racines sauvages ou mutantes *nin*, pour tester si l'induction de *RRA8* à un temps précoce est indépendante de NIN, contrairement à la répression plus tardive ; d'autre part, en analysant l'expression de *RRA8* dans des plantes cultivées en « split-root » dont un demi système racinaire serait mis en présence de peptides CLE12 ou CLE13, afin de tester si l'inhibition de l'expression de *RRA8* est bien systémique.

A ce jour, il n'existe pas d'autres données dans la littérature montrant un lien entre peptides CEP et cytokinines, au-delà de celui que nous avons identifié (Article 3). De manière

intéressante, nous avons montré que les niveaux d'expression des transcrits de *RRA4*, associé à la mise en place des nodosités, sont plus faibles dans les racines du mutant *cra2* que dans des racines sauvages (Chapitre III, **Figure 53**). Cette dérégulation « basale » de *RRA4* suggère que la perte de fonction de CRA2 pourrait être associée à la perte d'un rétrocontrôle exercé par la voie des cytokinines. Au final, on pourrait chercher à établir si le lien de régulation identifié entre CRA2 et RRA4 est direct ou non, et pour faire le parallèle entre la voie de signalisation médiée par CLE/SUNN et la voie CEP7/CRA2, si cette voie CEP/CRA2 agit via NIN pour réguler *RRA4*.

VI. Intégration des résultats issus de cette Thèse avec l'identification du module miR2111/TML comme cible commune des voies systémiques CEP/CRA2 et CLE/SUNN

Des résultats obtenus récemment dans l'équipe d'accueil ont montré que l'induction dans les racines de la production de peptides CEP lors d'un déficit azoté, et notamment de MtCEP1, induisait la production du microARN *miR2111* dans les parties aériennes (Gautrat et al., 2020). Ce microARN régule post-transcriptionnellement les gènes *TML1* et *TML2* codant pour des protéines de type « F-box », responsables de la dégradation par la voie de l'ubiquitination et du protéasome de protéines nucléaires permettant la mise en place des nodosités (Takahara et al., 2013), qui restent à être identifiées. La perte de fonction de TML conduit en conséquence à une super/hypernodulation, que ce soit chez *L. japonicus* ou *M. truncatula* (Magori et al., 2009; Gautrat et al., 2019). Ainsi, en conditions de déficit azoté, le niveau faible de transcrits *TMLs* dans les racines, provoqué au moins en partie par l'accumulation de la production de *miR2111* dans les parties aériennes, contribue à rendre la racine compétente pour la nodulation (Gautrat et al., 2020). De manière intéressante, l'expression du *miR2111* dans le mutant *cra2* est faible de manière constitutive, c'est-à-dire que ce soit en présence ou absence de rhizobia ou d'azote, ce qui mime en permanence le niveau de *miR2111* retrouvé dans des plantes sauvages nodulées ou cultivées dans un milieu riche en azote. De manière complémentaire, le niveau des transcrits *TMLs* est constitutivement plus élevé dans le mutant *cra2* indépendamment de la présence de rhizobium ou de nitrate, et l'accumulation de cet inhibiteur de la nodulation corrèle avec l'incapacité du

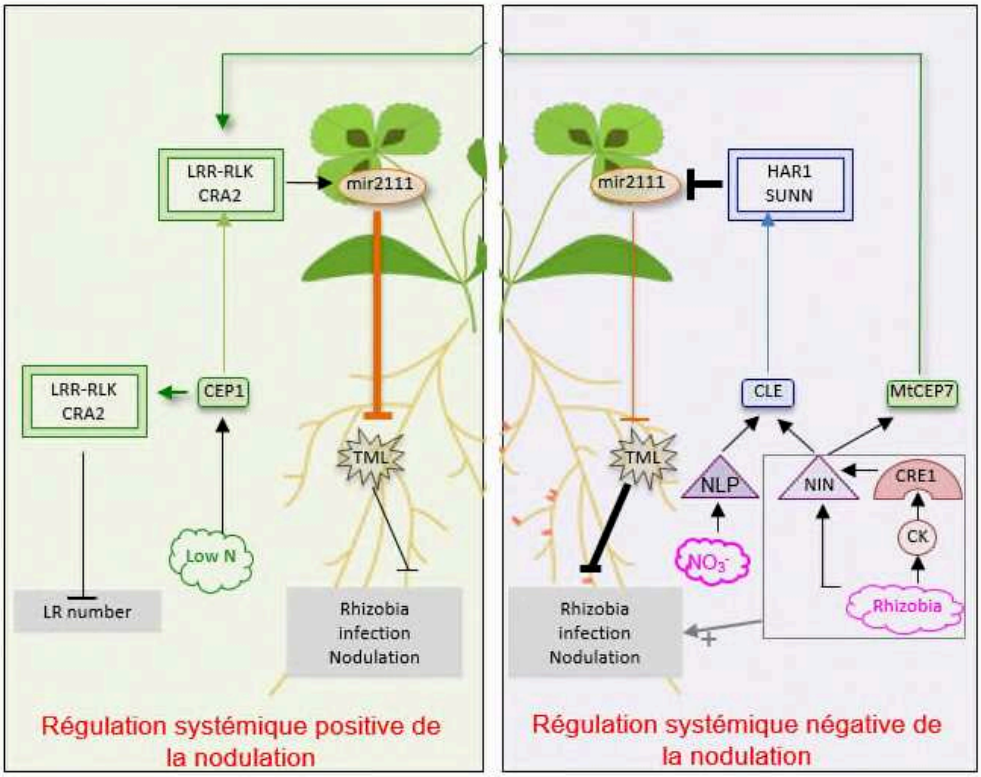


Figure 57 : Deux voies systémiques régulent la nodulation via le module miR2111/TML chez les légumineuses.

A gauche, la voie de signalisation régulant positivement la nodulation. Un déficit azoté induit la production de peptides CEP dans les racines, dont MtCEP1, qui d'une part, réprime la formation des racines latérales via l'activité du récepteur CRA2 dans les racines, et d'autre part, promeut les infections rhizobiennes et la nodulation via l'activité de CRA2 dans les parties aériennes de la plante. En aval, cette voie MtCEP1/CRA2 induit l'expression et l'accumulation systémique du miR2111, réprimant en conséquence l'accumulation des transcrits des gènes *TML* dans les racines qui codent pour des inhibiteur de la nodulation, empêchant ainsi leur rôle négatif sur les infections rhizobiennes et la nodulation. La voie MtCEP1/CRA2 permet donc aux racines d'être compétentes pour la nodulation lors d'un déficit azoté.

A droite, la voie de signalisation régulant négativement la nodulation. La perception des rhizobia induit en partie via l'activation de la voie des cytokinines et du récepteur CRE1, le facteur de transcription NIN qui d'une part, est central pour l'établissement des nodosités, et d'autre part, induit à la fois l'expression de peptides de signalisation CLE et le peptide MtCEP7. D'autres peptides CLE ont une expression induite par l'azote via des facteurs de transcription NLP. Ces différents peptides CLE sont perçus au niveau de la partie aérienne par le récepteur LRR-RLK SUNN/HAR1, ce qui provoque une répression de l'expression et de l'accumulation systémique du miR2111, augmentant en conséquence le l'accumulation des transcrits des gènes *TML* dans les racines.

Le peptide MtCEP7 agissant de manière systémique via le récepteur CRA2 promeut les infections rhizobiennes, et une implication éventuelle du module miR2111/TML resterait à établir. (d'après Magori et al., 2009 ; Mortier et al., 2010 ; Plet et al., 2011; Imin et al., 2013; Tsikou et al., 2018; Gautrat et al., 2019; 2020; Laffont et al., 2020)

mutant *cra2* à noduler. L'expression du module miR2111/TML est par ailleurs réprimée en présence d'azote ou en présence de rhizobia, le niveau d'accumulation des transcrits *TMLs* étant anti-corrélé à celui du miR2111 dans ces conditions (Tsikou et al., 2018; Gautrat et al., 2020). Cette régulation du module miR2111/TML par rhizobium dépend du récepteur MtSUNN/LjHAR1, et s'insère donc dans la voie de régulation AON (Tsikou et al., 2018 ; Gautrat et al., 2020) où le miR2111 n'agirait pas comme SDI, pour « Shoot Derived Inhibitor », comme initialement suggéré, mais en tant que SDP pour « Shoot Derived Promotor ». Par conséquent, ces données démontrent que le miR2111 est un signal systémique effecteur commun aux deux voies systémiques CEP/CRA2 et CLE/SUNN, qui le régulent respectivement positivement lors d'un déficit azoté et négativement en réponse à rhizobium (**Figure 57**).

On peut dès lors se demander comment ces nouvelles données s'intègrent avec l'indépendance des deux voies démontrée par l'approche génétique dans l'Article 2. En effet, les analyses génétiques réalisées grâce à l'obtention de doubles mutants *cra2;sunn* dans les fonds génétiques Jemalong A17 et R108 ont révélé une indépendance des voies CEP1/CRA2 et CLE13/SUNN, validée par ailleurs en démontrant que l'action inhibitrice de CLE13 sur la nodulation est indépendante de CRA2 (Article 2), et que l'action promotrice de CEP1 sur la nodulation est indépendante de SUNN (Article 1). Dans le double mutant *cra2;sunn*, l'absence des deux voies systémiques régulant de manière antagoniste le module miR2111/TML suggère que ce module ne serait plus régulé par la présence de rhizobia et/ou d'azote, ce qui pourrait être testé en perspective. En conséquence, la régulation du nombre de nodosités par le nitrate devrait être perdue chez le double mutant. En accord avec cette hypothèse, la nodulation du double mutant *cra2;sunn* n'est en effet plus réprimée par la présence de nitrate (10mM) dans le milieu. Cependant, ce double mutant perçoit la quantité d'azote dans son environnement car cette concentration en nitrate élevée (10mM) inhibe le nombre de RLs du double mutant de manière similaire à l'inhibition observée pour le simple mutant *cra2*, et contrairement au mutant *sunn* dont le nombre de RLs n'est pas affecté par le nitrate en conditions symbiotiques.

Au final, l'indépendance des deux voies de régulation systémique et antagoniste de la nodulation n'est pas incompatible avec l'identification d'une cible commune agissant en aval de ces voies, en l'occurrence le module miR2111/TML.

On peut aussi s'interroger comment le module miR2111/TML s'intègre par rapport au rôle du peptide MtCEP7 identifié au cours de cette Thèse (Article 3). L'application de peptide MtCEP1 favorise la production du miR2111 dans les parties aériennes, l'accumulation dumiR2111 de manière systémique, et la diminution de l'accumulation des transcrits *TML* dans les racines (Gautrat et al., 2020). En dépit de son profil d'expression unique par rapport aux autres gènes *CEP*, et sachant que MtCEP7 régule positivement la nodulation, agit-il aussi via le module miR2111/TML pour maintenir l'activation du miR2111 de manière transitoire en réponse à rhizobium et donc une fenêtre pendant laquelle les infections rhizobiennes restent possibles ? Cette hypothèse pourrait être testée en utilisant différentes approches permettant de moduler le niveau de peptide CEP7, correspondant soit à des applications exogènes de CEP7, soit à l'utilisation des constructions *pCLE13:CEP7* ou amiRCEP7 (Article 3) afin de mesurer les conséquences sur la régulation du module miR2111/TML en réponse à rhizobium. Par ailleurs, les voies CEP1/CRA2 ou CEP7/CRA2 et CLE13/SUNN pourraient–elles être en compétition pour la régulation du module miR2111/TML ? En se basant sur le mécanisme proposé par Lin et al. (2018) où, dans les racines de *M. truncatula*, la protéine NLP1 en se liant en présence d'azote à des cibles de NIN, dont MtCRE1, empêche l'activation de leur expression par NIN, on pourrait imaginer que dans les parties aériennes, un régulateur transcriptionnel activé en aval de la voie CLE13/SUNN entrerait en compétition avec un facteur de transcription induit par la voie CEP/CRA2 pour contrer l'activation du *miR2111*.

Au final, les travaux réalisés durant cette Thèse ont permis d'établir d'une part que la voie de régulation systémique et positive de la nodulation médiée par les peptides CEP et agissant via le récepteur CRA2, caractérisée à ce jour uniquement chez *M. truncatula*, était indépendante de la voie de régulation systémique négative médiée par CLE13/SUNN ; et d'autre part, qu'une coordination de ces deux voies systémiques régulant la nodulation de manière antagoniste était assurée en amont de la production des signaux peptidiques appartenant à des familles différentes via un même facteur de transcription, NIN.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Andriankaja, A., Boisson-Dernier, A., Frances, L., Sauviac, L., Jauneau, A., Barker, D.G., and de Carvalho-Niebel, F. (2007). AP2-ERF Transcription Factors Mediate Nod Factor–Dependent Mt ENOD11 Activation in Root Hairs via a Novel cis -Regulatory Motif . Plant Cell **19**: 2866–2885.

Ané, J.M. Kiss, G.B., Riely, B. K., Penmetsa, R. V., Oldroyd, G. E.D., Ayax, C., Lévy, J., Debellé, F., Baek, J. M., Kalo, P., Rosenberg, C., Roe, B. A., Long, S. R., Dénarié, J. and Cook, D.R. (2004). *Medicago truncatula* DMI1 Required for Bacterial and Fungal Symbioses in Legumes. Science **303**: 1364–1367.

Araya, T., Miyamoto, M., Wibowo, J., Suzuki, A., Kojima, S., Tsuchiya, Y.N., Sawa, S., Fukuda, H., von Wirén, N., and Takahashi, H. (2014). CLE-CLAVATA1 peptide-receptor signaling module regulates the expansion of plant root systems in a nitrogen-dependent manner. Proc. Natl. Acad. Sci. **111**: 2029–34.

Ardourel, M., Demont, N., Debellé, F., Maillet, F., de Billy, F., Promb, J., Denarié, J., and Truchet, G. (1994). *Rhízobíum meliloti* Lipooligosaccharide Nodulation Factors : Different Structural Requirements for Bacterial Entry into Target Root Hair Cells and lnduction of Plant Symbiotic Developmental Responses. Plant Cell **6**: 1357–1374.

Ariel, F., Brault-Hernandez, M., Laffont, C., Huault, E., Brault, M., Plet, J., Moison, M., Blanchet, S., Ichanté, J.-L., Chabaud, M., Carrere, S., Crespi, M., Chan, R. L. and Frugier, F. (2012). Two direct targets of cytokinin signaling regulate symbiotic nodulation in *Medicago truncatula*. Plant Cell **24**: 3838-3852.

Arrighi, J.F., Barre, A.Ben Amor, B., Bersoult, A., Soriano, L. C., Mirabella, R., De Carvalho-Niebel, F., Journet, E. P., Ghérardi, M., Huguet, T., Geurts, R., Dénarié, J. , Rougé, P. and Gough, C. (2006). The *Medicago truncatula* lysine motif-receptor-like kinase gene family includes NFP and new nodule-expressed genes. Plant Physiol. **142**: 265–279.

Banda, J., Bellande, K., Wangenheim, D. Von, Goh, T., Guyomarc, S., Laplaze, L., and Bennett, M.J. (2019). Lateral Root Formation in Arabidopsis : A Well-Ordered LRexit. Trends Plant Sci. **24**: 826–839.

de Bang, T.C. Lundquist, P. K., Dai, X., Boschiero, C., Zhuang, Z., Pant, P., Torres-Jerez, I., Roy, S., Nogales, J., Veerappan, V., Dickstein, R., Udvardi, M. K., Zhao, P. X. and Scheible, W.-R. (2017). Genome-Wide identification of Medicago Peptides Involved in Macronutrient Responses and Nodulation. Plant Physiol. **175**: 1669–1689.

Banks, J.A. (2009). Selaginella and 400 Million Years of Separation. Annu. Rev. Plant Biol. **60**: 223–238.

Baudin, M., Laloum, T., Lepage, A., Rípodas, C., Ariel, F., Frances, L., Crespi, M., Gamas, P., Blanco, F.A., Zanetti, M.E., de Carvalho-Niebel, F., and Niebel, A. (2015). A phylogenetically conserved group of nuclear factor-Y transcription factors interact to control nodulation in legumes. Plant Physiol. **169**: 2761–2773.

Bauer, P., Ratet, P., Crespi, M.D., Schultze, M., and Kondorosi, A. (1996). Nod factors and cytokinins induce similar cortical cell division, amyloplast deposition and MsEnoD12A expression patterns in alfalfa roots. Plant J. **10**: 91–105.

Beeckman, T., Burssens, S., and Inze, D. (2001). The peri-cell-cycle in Arabidopsis. J. Exp. Bot. **52**: 403–411.

Bell, J. and McCully, M. (1970). A histological study of lateral root initiation and development in *Zea mays*. Protoplasma **70**: 179–205.

Ben Amor, B., Shaw, S.L., Oldroyd, G.E.D., Maillet, F., Penmetsa, R.V., Cook, D., Long, S.R., Denarié, J., and Gough, C. (2003). The NFP locus of *Medicago truncatula* controls an early step of Nod factor signal transduction upstream of a rapid calcium flux and root hair deformation. Plant J. **34**: 495–506.

Bhuvaneswari, T. V., Bhagwat, A.A., and Bauer, W.D. (1981). Transient Susceptibility of Root Cells in Four Common Legumes to Nodulation by Rhizobia. Plant Physiol. **68**: 1144–1149.

Boisson-Dernier, A., Chabaud, M., Garcia, F., Bécard, G., Rosenberg, C., and Barker, D.G. (2001). *Agrobacterium rhizogenes* -Transformed Roots of *Medicago truncatula* for the Study of Nitrogen-Fixing and Endomycorrhizal Symbiotic Associations. Mol. Plant-Microbe Interact. **14**: 695–700.

Boivin, S., Kazmierczak, T., Brault, M., Wen, J., Gamas, P., Mysore, K.S., and Frugier, F. (2016). Different cytokinin histidine kinase receptors regulate nodule initiation as well as later nodule developmental stages in *Medicago truncatula*. Plant Cell Environ. **39**: 2198–2209.

Bonaldi, K., Gargani, D., Prin, Y., Fardoux, J., Gully, D., Nouwen, N., Goormachtig, S., and Giraud, E. (2011). Nodulation of *Aeschynomene afraspera* and *A. indica* by Photosynthetic Bradyrhizobium Sp . Strain ORS285 : The Nod-Dependent Versus the Nod-Independent Symbiotic Interaction. Mol. Plant-Microbe Interact. **24**: 1359–1371.

Brand, U., Fletcher, J.C., Hobe, M., Meyerowitz, E.M., and Simon, R. (2000). Dependence of stem cell fate in Arabidopsis on a feedback loop regulated by CLV3 activity. Science **289**: 617–619.

Breakspear, A., Liu, C., Roy, S., Stacey, N., Rogers, C., Trick, M., Morieri, G., Mysore, K.S., Wen, J., Oldroyd, G.E.D., Downie, J.A., and Murray, J.D. (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.

Brewin, N.J. (1991). Development of the legume root nodule. Annu. Rev. Cell Biol. **7**: 191–226.

Broghammer, A. et al. (2012). Legume receptors perceive the rhizobial lipochitin oligosaccharide signal molecules by direct binding. Proc. Natl. Acad. Sci. **109**: 13859–13864.

Bryan, A., Obaidi, A., Wierzba, M., and Tax, F. (2012). XYLEM INTERMIXED WITH PHLOEM1, a leucine-rich repeat receptor-like kinase required for stem growth and vascular development in *Arabidopsis thaliana*. Planta **235**: 111–22.

Bustos-Sanmamed, P., Laffont, C., Frugier, F., Lelandais-Briere, C., and Crespi, M. (2013). Analyzing small and long RNAs in plant development using non-radioactive *in situ hybridization.*

Caetano-Anolles, G. and Gresshoff, P.M. (1991). Plant Genetic Control of Nodulation. Annu. Rev. microbiol **45**: 345–382.

Cammarata, J., Roeder, A.H., and Scanlon, M.J. (2019). Cytokinin and CLE signaling are highly intertwined developmental regulators across tissues and species. Curr. Opin. Plant Biol. **51**: 96–104.

Capoen, W., Goormachtig, S., De Rycke, R., Schroeyers, K., and Holsters, M. (2005). *SrSymRK*, a plant receptor essential for symbiosome formation. Proc. Natl. Acad. Sci. **102**: 10369–10374.

Capoen, W., Sun, J., Wysham, D., Otegui, M.S., Venkateshwaran, M., Hirsch, S., Miwa, H., Downie, J.A., Morris, R.J., Ané, J.M., and Oldroyd, G.E.D. (2011). Nuclear membranes control symbiotic calcium signaling of legumes. Proc. Natl. Acad. Sci. **108**: 14348–14353.

Cárdenas, L., Vidali, L., Domínguez, J., Pérez, H., Sánchez, F., Hepler, P.K., and Quinto, C. (1998). Rearrangement of Actin Microfilaments in Plant Root Hairs Responding to *Rhizobium etli* Nodulation Signals. Plant Physiol. **116**: 871–877.

Carroll, B.J., McNeil, D.L., and Gresshoff, P.M. (1985). A Supernodulation and Nitrate-Tolerant Symbiotic (nts) Soybean. Plant Physiol. **78**: 34–40.

Casero, P.J., Casimiro, I., and Lloret, P. (1995). Lateral root initiation by asymmetrical transverse divisions of pericycle cells in four plant species:*Raphanus sativus*, *Helianthus annuus*, *Zea mays* and *Daucus carota*. Protoplasma **188**: 49–58.

Casimiro, I., Beeckman, T., Graham, N., Bhalerao, R., Zhang, H., Casero, P., Sandberg, G., and Bennett, M.J. (2003). Dissecting Arabidopsis lateral root development. Trends Plant Sci. **8**: 165–171.

Casimiro, I., Marchant, A., Bhalerao, R.P., Beeckman, T., Dhooge, S., Swarup, R., Graham, N., Inzé, D., Sandberg, G., Casero, P.J., and Bennett, M. (2001). Auxin Transport Promotes Arabidopsis Lateral Root Initiation. Plant Cell **13**: 843–852.

Catoira, R., Galera, C., de Billy, F., Penmetsa, R.V., Journet, E.-P., Maillet, F., Rosenberg, C., Cook, D., Gough, C., and Denarie, J. (2000). Four Genes of *Medicago truncatula* Controlling Components of a Nod Factor Transduction Pathway. Plant Cell **12**: 1647–1665.

Cerri, M.R. Wang, Q., Stolz, P., Folgmann, J., Frances, L., Katzer, K., Li, X., Heckmann, A. B., Wang, T. L., Downie, J. A., Klingl, A., de Carvalho-Niebel, F., Xie, F. and Parniske, M. (2017). The *ERN1* transcription factor gene is a target of the CCaMK/CYCLOPS complex and controls rhizobial infection in *Lotus japonicus*. New Phytol. **215**: 323–337.

Cerri, M.R., Frances, L., Kelner, A., Fournier, J., Middleton, P.H., Auriac, M.-C., Mysore, K.S., Wen, J., Erard, M., Barker, D.G., Oldroyd, G.E., and de Carvalho-Niebel, F. (2016). The Symbiosis-Related ERN Transcription Factors Act in Concert to Coordinate Rhizobial Host Root Infection. Plant Physiol. **171**: pp.00230.2016.

Cerri, M.R., Frances, L., Laloum, T., Auriac, M.-C., Niebel, A., Oldroyd, G.E.D., Barker, D.G., Fournier, J., and de Carvalho-Niebel, F. (2012). *Medicago truncatula* ERN Transcription Factors: Regulatory Interplay with NSP1/NSP2 GRAS Factors and Expression Dynamics throughout Rhizobial Infection . Plant Physiol. **160**: 2155–2172.

Chabaud, M., Larsonneau, C., Marmouget, C., and Huguet, T. (1996). Transformation of barrel medic (*Medicago truncatula* Gaertn.) by *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration via somatic embryogenesis of transgenic plants with the *MtENOD12* nodulin promoter fused to the *gus* reporter gene. Plant Cell Rep. **15**: 305–310.

Chandler, M.R. (1978). Some Observations on Infection of *Arachis hypogaea* L. by Rhizobium. J. Exp. Bot. **29**: 740–755.

Chapman, K., Ivanovici, A., Taleski, M., Sturrock, C.J., Ng, J.L.P., Mohd-Radzman, N.A., Frugier, F., Bennett, M.J., Mathesius, U., and Djordjevic, M.A. (2020). CEP receptor signalling controls root system architecture in Arabidopsis and Medicago. New Phytol.: 10.1111/nph.16483.

Chapman, K., Taleski, M., Ogilvie, H.A., Imin, N., and Djordjevic, M.A. (2019). CEP–CEPR1 signalling inhibits the sucrose-dependent enhancement of lateral root growth. J. Exp. Bot. **70**: 3955–3967.

Charpentier, M. (2018). Calcium signals in the plant nucleus: Origin and function. J. Exp. Bot. **69**: 4165–4173.

Charpentier, M., Bredemeier, R., Wanner, G., Takeda, N., Schleiff, E., and Parniske, M. (2008). *Lotus japonicus* CASTOR and POLLUX Are Ion Channels Essential for Perinuclear Calcium Spiking in Legume Root Endosymbiosis . Plant Cell **20**: 3467–3479.

Charpentier, M., Sun, J., Martins, T.V., Radhakrishnan, G. V, Findlay, K., Soumpourou, E., Thouin, J., Véry, A., Sanders, D., Morris, R.J., and Oldroyd, G.E.D. (2016). Symbiotic Calcium Oscillations. Science **352**: 1102–5.

Charron, D., Pingret, J.-L., Chabaud, M., Journet, E.-P., and Barker, D.G. (2004). Pharmacological Evidence That Multiple Phospholipid Signaling Pathways Link Rhizobium Nodulation Factor Perception in *Medicago truncatula* Root Hairs to Intracellular Responses, Including Ca2+ Spiking and Specific *ENOD* Gene Expression. Plant Physiol **136**: 3582–3593.

Clark, S.E., Running, M.P., and Meyerowitz, E.M. (1995). CLAVATA3 is a specific regulator of shoot and floral meristem development affecting the same processes as CLAVATA. Development **121**: 2057–2067.

Clark, S.E., Running, M.P., and Meyerowitz, E.M. (1993). CLAVATA1, a regulator of meristem and flower development in Arabidopsis. Development **119**: 397–418.

Clark, S.E., Williams, R.W., and Meyerowitz, E.M. (1997). The CLAVATA1 Gene Encodes a Putative Receptor Kinase That Controls Shoot and Floral Meristem Size in Arabidopsis. Cell **89**: 575–585.

Cock, J.M. and McCormick, S. (2001). A large family of genes that share homology with Clavata3. Plant Physiol. **126**: 939–942.

Combier, J., Frugier, F., de Billy, F., Boualem, A., El-yahyaoui, F., Moreau, S., Vernie, T., Ott, T., Gamas, P., Crespi, M., and Niebel, A. (2006). *MtHAP2-1* is a key transcriptional regulator of symbiotic nodule development regulated by microRNA169 in *Medicago truncatula*. Genes Dev. **20**: 3084–3088.

Combier, J.P., Küster, H., Journet, E.P., Hohnjec, N., Gamas, P., and Niebel, A. (2008). Evidence for the involvement in nodulation of the two small putative regulatory peptide-encoding genes *MtRALFL1* and *MtDVL1*. Mol. Plant-Microbe Interact. **21**: 1118–1127.

Crook, A.D., Schnabel, E.L., and Frugoli, J.A. (2016). The systemic nodule number regulation kinase SUNN in *Medicago truncatula* interacts with MtCLV2 and MtCRN. Plant J. **88**: 108–119.

D'Haeze, W. and Holsters, M. (2002). Nod factor structures, responses, and perception during initiation of nodule development. Glycobiology **12**: 79–105.

Delay, C., Chapman, K., Taleski, M., Wang, Y., Tyagi, S., Xiong, Y., Imin, N., and Djordjevic, M.A. (2019). CEP3 levels affect starvation-related growth responses of the primary root. J. Exp. Bot. **70**: 4763–4773.

Delay, C., Imin, N., and Djordjevic, M.A. (2013). *CEP* genes regulate root and shoot development in response to environmental cues and are specific to seed plants. J. Exp. Bot. **64**: 5383–5394.

Delves, A.C., Mathews, A., Day, D.A., Carter, A.S., Carroll, B.J., and Gresshoff, P.M. (1986). Regulation of the Soybean- Rhizobium Nodule Symbiosis by Shoot and Root Factors . Plant Physiol. **82**: 588–590.

Dénarié, J. (1996). Rhizobium Lipo-Chitooligosaccharide Nodulation Factors: Signaling Molecules Mediating Recognition and Morphogenesis. Annu. Rev. Biochem. **65**: 503–535.

Denarié, J., Debellé, F., and Promé, J. (1996). Rhizobium lipo-chitooligosaccharide nodulation factors : Signaling Molecules Mediating Recognition and Morphogenesis. Annu. Rev. Biochem. **65**: 503–35.

Dong, W., Wang, Y., and Takahashi, H. (2019). CLE-CLAVATA1 Signaling Pathway Modulates Lateral Root Development under Sulfur Deficiency. Plants **8**: doi:10.3390/plants8040103.

Downie, J.A. (2005). Legume Haemoglobins: Symbiotic Nitrogen Fixation Needs Bloody Nodules. Curr. Biol. **15**: 196–198.

Downie, J.A. and Walker, S.A. (1999). Plant responses to nodulation factors. Curr. Opin. Plant Biol. **2**: 483–489.

Drew, M. (1975). Comparison of the effects of a localized supply of phosphate, nitrate, ammonium and potassium on the growth of the seminal root system, and the shoot, in barley. New Phytol **75**: 479–490.

Drew, M., Saker, L.R., and Ashley, T.W. (1973). Nutrient supply and the growth of the seminal root system in barley. I. The effect of nitrate concentrations on the growth of axes and laterals. J. Exp. Bot. **24**: 1189–1202.

Dubrovsky, J.G., Napsucialy-Mendivil, S., Duclercq, J., Heng, Y., Shishkova, S., Ivanchenko, M.G., Murphy, A.S., and Benkova, E. (2011). Auxin minimum defines a developmental window for lateral root initiation. New Phytol. **191**: 970–983.

Ehrhardt, D.W., Wais, R., and Long, S.R. (1996). Calcium spiking in plant root hairs responding to rhizobium modulation signals. Cell **85**: 673–681.

van Eijsden, R.R., Díaz, C.L., de Pater, B.S., and Kijne, J.W. (1995). Sugar-binding activity of pea (*Pisum sativum*) lectin is essential for heterologous infection of transgenic white clover hairy roots by *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae. Plant Mol. Biol. **29**: 431–439.

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.

Etchells, J.P., Mishra, L.S., Kumar, M., Campbell, L., and Turner, S.R. (2015). Wood formation in trees is increased by manipulating PXY-regulated cell division. Curr. Biol. **25**: 1050–1055.

Etchells, J.P. and Turner, S.R. (2010). The PXY-CLE41 receptor ligand pair defines a multifunctional pathway that controls the rate and orientation of vascular cell division. Development **137**: 767–774.

Farcot, E., Lavedrine, C., and Vernoux, T. (2015). A modular analysis of the auxin signalling network. PLoS One **10**: DOI:10.1371/journal.pone.0122231.

Ferguson, B.J., Indrasumunar, A., Hayashi, S., Lin, M.H., Lin, Y.H., Reid, D.E., and Gresshoff, P.M. (2010). Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. J. Integr. Plant Biol. **52**: 61–76.

Ferguson, B.J., Mens, C., Hastwell, A.H., Zhang, M., Su, H., Jones, C.H., Chu, X., and Gresshoff, P.M. (2019). Legume nodulation: The host controls the party. Plant Cell Environ. **42**: 41–51.

Fiers, M., Golemiec, E., Xu, J., van der Geest, L., Heidstra, R., Stiekema, W., and Liua, C.-M. (2005). The 14–Amino Acid CLV3, CLE19, and CLE40 Peptides Trigger Consumption of the Root Meristem in Arabidopsis through a CLAVATA2-Dependent Pathway. Plant Cell **17**: 2542–2553.

Fisher, K. and Turner, S. (2007). PXY, a Receptor-like Kinase Essential for Maintaining Polarity during Plant Vascular-Tissue Development. Curr. Biol. **17**: 1061–1066.

Fisher, R.F. and Long, S.R. (1992). Rhizobium-plant signal exchange. Nature **357**: 655–660.

Fletcher, J.C., Brand, U., Running, M.P., Simon, R., and Meyerowitz, E.M. (1999). Signaling of Cell Fate Decisions by CLAVATA3 in Arabidopsis Shoot Meristems. Science **283**: 1911–1914.

Fonouni-Farde, C., Kisiala, A., Brault, M., Emery, R.J.N., Diet, A., and Frugier, F. (2017). DELLA1-mediated gibberellin signaling regulates cytokinin-dependent symbiotic nodulation. Plant Physiol. **175**: 1795–1806.

Fonouni-Farde, C., Tan, S., Baudin, M., Brault, M., Wen, J., Mysore, K.S., Niebel, A., Frugier, F., and Diet, A. (2016). DELLA-mediated gibberellin signalling regulates Nod factor signalling and rhizobial infection. Nat. Commun. **7**. DOI: 10.1038/ncomms12636

Forde, B.G. (2002). Local and long range signaling pathways regulating plant responses to nitrate. Annu. Rev. Plant Biol.: 203–224.

Fournier, J., Timmers, A.C.J., Sieberer, B.J., Jauneau, A., Chabaud, M., and Barker, D.G. (2008). Mechanism of Infection Thread Elongation in Root Hairs of *Medicago truncatula* and Dynamic Interplay with Associated Rhizobial Colonization. Plant Physiol. **148**: 1985–1995.

Fournier, J., Teillet, A., Chabaud, M., Ivanov, S., Genre, A., Limpens, E., de Carvalho-Niebel, F., and Barker, D.G. (2015). Remodeling of the Infection Chamber before Infection Thread Formation Reveals a Two-Step Mechanism for Rhizobial Entry into the Host Legume Root Hair. Plant Physiol. **167**: 1233–1242.

Fransen, B., De Kroon, H., and Berendse, F. (1998). Root morphological plasticity and nutrient acquisition of perennia grass species from habitats of different nutrient availability. Oecologia **115**: 351–358.

Frugier, F., Kosuta, S., Murray, J.D., Crespi, M., and Szczyglowski, K. (2008). Cytokinin: secret agent of symbiosis. Trends Plant Sci. **13**: 115–120.

Fukai, E., Soyano, T., Umehara, Y., Nakayama, S., Hirakawa, H., Tabata, S., Sato, S., and Hayashi, M. (2012). Establishment of a *Lotus japonicus* gene tagging population using the exon-targeting endogenous retrotransposon LORE1. Plant J. **69**: 720–730.

Gage, D.J. (2004). 2004 Infection and Invasion of Roots by Symbiotic, Nitrogen-Fixing Rhizobia during Nodulation of Temperate Legumes. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **68**: 280-300.

Gamas, P., Brault, M., Jardinaud, M.F., and Frugier, F. (2017). Cytokinins in Symbiotic Nodulation: When, Where, What For? Trends Plant Sci. **22**: 792–802.

Gauthier-Coles, C., White, R.G., and Mathesius, U. (2019). Nodulating legumes are distinguished by a sensitivity to cytokinin in the root cortex leading to pseudonodule development. Front. Plant Sci. **9**: 1–14.

Gautrat, P., Laffont, C., and Frugier, F. (2020). Compact Root Architecture 2 Promotes Root Competence for Nodulation through the miR2111 Systemic Effector. Curr. Biol. **30**: doi.org/10.1016/j.cub.2020.01.084

Gautrat, P., Mortier, V., Laffont, C., Keyser, A. De, Fromentin, J., and Goormachtig, S. (2019). Unraveling new molecular players involved in the autoregulation of nodulation in *Medicago truncatula*. J. Exp. Bot. **70**: 1407–1417.

Giehl, R.F.H., Gruber, B.D., and Von Wirén, N. (2014). It's time to make changes: Modulation of root system architecture by nutrient signals. J. Exp. Bot. **65**: 769–778.

Giraud, E. et al. (2007). Legumes symbioses: Absence of *Nod* genes in photosynthetic bradyrhizobia. Science **316**: 1307–1312.

Gleason, C., Chaudhuri, S., Yang, T., Muñoz, A., Poovaiah, B.W., and Oldroyd, G.E.D. (2006). Nodulation independent of rhizobia induced by a calcium-activated kinase lacking autoinhibition. Nature **441**: 1149–1152.

Gonzalez-Rizzo, S., Crespi, M., and Frugier, F. (2006). The *Medicago truncatula* CRE1 Cytokinin Receptor Regulates Lateral Root Development and Early Symbiotic Interaction with *Sinorhizobium meliloti.* Plant Cell **18**: 2680–2693.

González-Sama, A., Lucas, M.M., De Felipe, M.R., and Pueyo, J.J. (2004). An unusual infection mechanism and nodule morphogenesis in white lupin (*Lupinus albus*). New Phytol. **163**: 371–380.

Goormachtig, S., Capoen, W., James, E.K., and Holsters, M. (2004). Switch from intracellular to intercellular invasion during water stress-tolerant legume nodulation. Proc. Natl. Acad. Sci. **101**: 6303–6308.

Goyal, R.K. and Mattoo, A.K. (2014). Multitasking antimicrobial peptides in plant development and host defense against biotic/abiotic stress. Plant Sci. **228**: 135–149.

Groß-Hardt, R. and Laux, T. (2003). Stem cell regulation in the Arabidopsis shoot apical meristem. J. Cell Sci. **9**: 1659–1666.

Groth, M., Takeda, N., Perry, J., Uchid, H., Dräxl, S., Brachmann, A., Sato, S., Tabata, S., Kawaguchi, M., Wang, T.L., and Parniske, M. (2010). NENA, a *Lotus japonicus* homolog of Sec13, is required for rhizodermal infection by arbuscular mycorrhiza fungi and rhizobia but dispensable for cortical endosymbiotic development. Plant Cell **22**: 2509–2526.

Gutiérrez-Alanís, D., Yong-Villalobos, L., Jiménez-Sandoval, P., Alatorre-Cobos, F., Oropeza-Aburto, A., Mora-Macías, J., Sánchez-Rodríguez, F., Cruz-Ramírez, A., and Herrera-Estrella, L. (2017). Phosphate Starvation-Dependent Iron Mobilization Induces CLE14 Expression to Trigger Root Meristem Differentiation through CLV2/PEPR2 Signaling. Dev. Cell **41**: 555-570.e3.

Hara, K., Kajita, R., Torii, K.U., Bergmann, D.C., and Kakimoto, T. (2007). The secretory peptide gene EPF1. Genes Dev. **21**: 1720–1725.

Haruta, M., Sabat, G., Stecker, K., Minkoff, B.B., and Sussman, M.R. (2014). A peptide hormone and its receptor protein kinase regulate plant cell expansion. Science **343**: 408–411.

Hayashi, T., Banba, M., Shimoda, Y., Kouchi, H., Hayashi, M., and Imaizumi-Anraku, H. (2010). A dominant function of CCaMK in intracellular accommodation of bacterial and fungal endosymbionts. Plant J. **63**: 141–154.

Heckmann, A.B., Lombardo, F., Miwa, H., Perry, J.A., Bunnewell, S., Parniske, M., Wang, T.L., and Downie, J.A. (2006). *Lotus japonicus* Nodulation Requires Two GRAS Domain Regulators, One of Which Is Functionally Conserved in a Non-Legume . Plant Physiol. **142**: 1739–1750.

Heckmann, A.B., Sandal, N., Bek, A.S., Madsen, L.H., Jurkiewicz, A., Nielsen, M.W., Tirichine, L., and Stougaard, J. (2011). Cytokinin Induction of Root Nodule Primordia in *Lotus japonicus* Is Regulated by a Mechanism Operating in the Root Cortex. Mol. Plant-Microbe Interact. **24**: 1385–1395.

Held, M., Hou, H., Mandana, M., Huynh, C., Ross, L., Hossain, S., Sato, S., Tabata, S., Perry, J., Wang, T.L., and Szczyglowski, K. (2014). *Lotus japonicus* Cytokinin Receptors Work Partially Redundantly to Mediate Nodule Formation. Plant Cell **26**: 678–694.

den Herder, G., Yoshida, S., Antolín-Llovera, M., Ried, M.K., and Parniske, M. (2012). *Lotus japonicus* E3 ligase SEVEN IN ABSENTIA4 destabilizes the symbiosis receptor-like Kinase SYMRK and negatively regulates rhizobial infection. Plant Cell **24**: 1691–1707.

Herrbach, V., Remblière, C., Gough, C., and Bensmihen, S. (2014). Lateral root formation and patterning in *Medicago truncatula.* J. Plant Physiol. **171**: 301–310.

Hirakawa, Y., Kondo, Y., and Fukuda, H. (2010). TDIF peptide signaling regulates vascular stem cell proliferation via the WOX4 homeobox gene in Arabidopsis. Plant Cell **22**: 2618–2629.

Hirakawa, Y., Shinohara, H., Kondo, Y., Inoue, A., Nakanomyo, I., Ogawa, M., Sawa, S., Ohashi-Ito, K., Matsubayashi, Y., and Fukuda, H. (2008). Non-cell-autonomous control of vascular stem cell fate by a CLE peptide/receptor system. Proc. Natl. Acad. Sci. **105**: 15208–13.

Hirsch, S., Kim, J., Muñoz, A., Heckmann, A.B., Downie, J.A., and Oldroyd, G.E.D. (2009). GRAS Proteins Form a DNA Binding Complex to Induce Gene Expression during Nodulation Signaling in *Medicago truncatula* . Plant Cell **21**: 545–557.

Hobe, M., Müller, R., Grünewald, M., Brand, U., and Simon, R. (2003). Loss of CLE40, a protein functionally equivalent to the stem cell restricting signal CLV3, enhances root waving in Arabidopsis. Dev. Genes Evol. **213**: 371–381.

Hodge, A., Robinson, D., and Fitter, A. (2000). Are microorganisms more effective than plants at competing for nitrogen? Trends Plant Sci. **5**: 304–308.

de Hoff, P.L., Brill, L.M., and Hirsch, A.M. (2009). Plant lectins: The ties that bind in root symbiosis and plant defense. Mol. Genet. Genomics **282**: 1–15.

Horvath, B. Domonkos, A., Kereszt, A., Szucs, A., Abraham, E., Ayaydin, F., Boka, K., Chen, Y., Chen, R., Murray, J. D., Udvardi, M. K., Kondorosi, E. and Kalo, P. (2015). Loss of the nodule-specific cysteine rich peptide, NCR169, abolishes symbiotic nitrogen fixation in the *Medicago truncatula dnf7* mutant. Proc. Natl. Acad. Sci. **112**: 15232–15237.

Hossain, M.S. , Shrestha, A., Zhong, S., Miri, M., Austin, R. S., Sato, S., Ross, L., Huebert, T., Tromas, A., Torres-Jerez, I., Tang, Y., Udvardi, M., Murray, J. D. and Szczyglowski, K. (2016). *Lotus japonicus* NF-YA1 plays an essential role during nodule differentiation and targets members of the SHI/STY gene family. Mol. Plant-Microbe Interact. **29**: 950–964.

Huault, E., Laffont, C., Wen, J., Mysore, K.S., Ratet, P., Duc, G., and Frugier, F. (2014). Local and Systemic Regulation of Plant Root System Architecture and Symbiotic Nodulation by a Receptor-Like Kinase. PLoS Genet. **10**: e1004891.

Hunt, L. and Gray, J.E. (2009). The Signaling Peptide EPF2 Controls Asymmetric Cell Divisions during Stomatal Development. Curr. Biol. **19**: 864–869.

Hutchings, M.J. and de Kroon, H. (1994). Foraging in plants: the role of morphological plasticity in resource acquisition. Adv. Ecol. Res. **25**: 159–238.

Ikeuchi, M., Yamaguchi, T., Kazama, T., Ito, T., Horiguchi, G., and Tsukaya, H. (2011). ROTUNDIFOLIA4 regulates cell proliferation along the body axis in Arabidopsis shoot. Plant Cell Physiol. **52**: 59–69.

Imin, N., Mohd-Radzman, N.A., Ogilvie, H.A., and Djordjevic, M.A. (2013). The peptide-encoding CEP1 gene modulates lateral root and nodule numbers in *Medicago truncatula*. J. Exp. Bot. **64**: 5395–5409.

Imin, N., Patel, N., Corcilius, L., Payne, R.J. and Djordjevic, M.A. (2018). CLE peptide tri-arabinosylation and peptide domain sequence composition are essential for SUNN-dependent autoregulation of nodulation in *Medicago truncatula*. New Phytol. **218**: 73–80.

Ito, Y. and Fukuda, H. (2006). Dodeca-CLE Peptides as Suppressors of Plant Stem Cell Differentiation. Science **313**: 842–845.

Ivanov, S., Fedorova, E.E., Limpens, E., De Mita, S., Genre, A., Bonfante, P., and Bisseling, T. (2012). Rhizobium-legume symbiosis shares an exocytotic pathway required for arbuscule formation. Proc. Natl. Acad. Sci. **109**: 8316–8321.

Jardinaud, M.-F. Boivin, S., Rodde, N., Catrice, O., Kisiala, A., Lepage, A., Moreau, S., Roux, B., Cottret, L., Sallet, E., Brault, M., Emery, R.J. N., Gouzy, J., Frugier, F. and Gamas, P. (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.

Jeong, S., Trotochaud, A.E., and Clark, S.E. (1999). The Arabidopsis CLAVATA2 Gene Encodes a Receptor-like Protein Required for the Stability of the CLAVATA1 Receptor-like Kinase. Plant Cell **11**: 1925–1933.

Jeudy, C., Ruffel, S., Freixes, S., Tillard, P., Santoni, A.L., Morel, S., Gojon, A., Lepetit, M., Salon, C., and Journet, E. (2010). Adaptation of *Medicago truncatula* to nitrogen limitation is modulated via local and systemic nodule developmental responses. New Phytol. **185**: 817–828.

Jin, Y., Liu, H., Luo, D., Yu, N., Dong, W., Wang, C., Zhang, X., Dai, H., Yang, J., and Wang, E. (2016). DELLA proteins are common components of symbiotic rhizobial and mycorrhizal signalling pathways. Nat. Commun. **7**: doi: 10.1038/ncomms12433.

Journet, E., El-gachtouli, N., Vernoud, V., Billy, F. De, Pichon, M., Dedieu, A., Arnould, C., Morandi, D., Barker, D.G. and Gianinazzi-pearson, V. (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.

Journet, E.P., Pichon, M., Dedieu, A., de Billy, F., Truchet, G., and Barker, D.G. (1994). Nod factors elicit cell-specific transcription of the ENOD12 gene in transgenic alfalfa. Plant J. **6**: 241–249.

Jourquin, J., Fukaki, H., and Beeckman, T. (2020). Peptide-receptor signaling controls lateral root development. Plant Physiol. **182**: 1645–1656.

Jun, J., Fiume, E., Roeder, A.H.K., Meng, L., Sharma, V.K., Osmont, K.S., Baker, C., Ha, C.M., Meyerowitz, E.M., Feldman, L.J., and Fletcher, J.C. (2010). Comprehensive Analysis of CLE Polypeptide Signaling Gene Expression and Overexpression Activity in Arabidopsis. Plant Physiol. **154**: 1721–1736.

Jun, J.H., Fiume, E., and Fletcher, J.C. (2008). The CLE family of plant polypeptide signaling molecules. Cell. Mol. Life Sci. **65**: 743–755.

Kalo, P. Gleason, C. A., Edwards, A., Marsh, J. F., Mitra, R. M., Hirsch, S., Jakab, J., Sims, S., Long, S.R., Rogers, J., Kiss, G. B., Downie, J. A. and Oldroyd, G. E D. (2005). Nodulation signaling in legumes requires NSP2, a member of the GRAS family of transcriptional regulators. Science **308**: 1786–1789.

Kamal, N., Mun, T., Reid, D., Lin, J., Akyol, T.Y., Sandal, N., Asp, T., Stougaard, J., Mayer, K.F.X., Sato, S., and Andersen, S.U. (2020). Insights into the evolution of symbiosis gene copy number and distribution from a chromosome-scale *Lotus japonicus* Gifu genome sequence. BioRxiv: https://doi.org/10.1101/2020.04.17.042473.

Kanamori, N., Madsen, L.H., Radutoiu, S., Frantescu, M., Quistgaard, E.M.H.,Miwa, H., Downie, J.A., James, E.K., Felle, H.H., Haaning, L.L., Jensen, T.H., Sato, S., Nakamura, Y., Tabata, S., Sandal, N. and Stougaard, J. (2006). A nucleoporin is required for induction of Ca2+ spiking in legume nodule development and essential for rhizobial and fungal symbiosis. Proc. Natl. Acad. Sci. **103**: 359–364.

Kassaw, T., Nowak, S., Schnabel, E., and Frugoli, J. (2017). *Root determined nodulation1* is required for *M. truncatula* CLE12, but not CLE13, peptide signaling through the SUNN receptor kinase. Plant Physiol. **174**: 2445–2456.

Kawaharada, Y., James, E.K., Kelly, S., Sandal, N., and Stougaard, J. (2017). The ethylene responsive factor required for nodulation 1 (ERN1) transcription factor is required for infection-thread formation in *Lotus japonicus*. Mol. Plant-Microbe Interact. **30**: 194–204.

Kayes, J.M. and Clark, S.E. (1998). CLAVATA2, a regulator of meristem and organ development in Arabidopsis. Development **125**: 3843–51.

Kereszt, A., Mergaert, P., Montiel, J., Endre, G., and Kondorosi, É. (2018). Impact of Plant Peptides on Symbiotic Nodule Development and Functioning. Front. Plant Sci. **9**: doi: 10.3389/fpls.2018.01026

Kevei, Z.l., Lougnon, G., Mergaert, P., Horváth, G.V., Kereszt, A., Jayaraman, D., Zaman, N., Marcel, F., Regulski, K., Kiss, G.B., Kondorosi, A., Endre, G., Kondorosi, E. and Ané, J.M. (2007). 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase1 interacts with NORK and is crucial for nodulation in *Medicago truncatula*. Plant Cell **19**: 3974–3989.

Kim, M., Chen, Y., Xi, J., Waters, C., Chen, R., and Wang, D. (2015). An antimicrobial peptide essential for bacterial survival in the nitrogen-fixing symbiosis. Proc. Natl. Acad. Sci. **112**: 15238–15243.

Kim, S., Zeng, W., Bernard, S., Liao, J., Venkateshwaran, M., Ane, J.M., and Jiang, Y. (2019). Ca2+-regulated Ca2+ channels with an RCK gating ring control plant symbiotic associations. Nat. Commun. **10**: doi.org/10.1038/s41467-019-11698-5.

Kinoshita, A., Betsuyaku, S., Osakabe, Y., Mizuno, S., Nagawa, S., Stahl, Y., Simon, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Fukuda, H., and Sawa, S. (2010). RPK2 is an essential receptor-like kinase that transmits the CLV3 signal in Arabidopsis. Development **137**: 3911–3920.

Kondo, Y., Hirakawa, Y., Kieber, J.J., and Fukuda, H. (2011). CLE Peptides can Negatively Regulate Protoxylem Vessel Formation via Cytokinin Signaling. Plant Cell Physiol. **52**: 37–48.

Kondorosi, E., Mergaert, P., and Kereszt, A. (2013). A Paradigm for Endosymbiotic Life: Cell Differentiation of Rhizobium Bacteria Provoked by Host Plant Factors . Annu. Rev. Microbiol. **67**: 611–628.

Kondorosi, E., Redondo-nieto, M., and Kondorosi, A. (2005). Ubiquitin-Mediated Proteolysis . To Be in the Right Place at the Right Moment during Nodule Development. Development **137**: 1197–1204.

Kosslak, R.M. and Bohlool, B.B. (1984). Suppression of Nodule Development of One Side of a Split-Root System of Soybeans Caused by Prior Inoculation of the Other Side. Plant Physiol. **75**: 125–130.

de Kroon, H., Huber, H., Stuefer, J.F., and Van Groenendael, J.M. (2005). A modular concept of phenotypic plasticity in plants. New Phytol. **166**: 73–82.

de Kroon, H., Visser, E.J.W., Huber, H., Mommer, L., and Hutchings, M.J. (2009). A modular concept of plant foraging behaviour : the interplay between local responses and systemic control. Plant, Cell Environ. **32**: 704–712.

Krusell, L., Madsen, L.H, Sato, S., Aubert, G., Genua, A., Szczyglowski, K., Duc, G., Kaneko, T., Tabata, S., de Bruijn, F., Pajuelo, E., Sandal, N. and Stougaard, J. (2002). Shoot control of root development and nodulation is mediated by a receptor-like kinase. Nature **420**: 422–426.

Krusell, L., Sato, N., Fukuhara, I., Koch, B.E V, Grossmann, C., Okamoto, S., Oka-Kira, E., Otsubo, Y., Aubert, G., Nakagawa, T., Sato, S., Tabata, S., Duc, G., Parniske, M., Wang, T.L., Kawaguchi, M. and Stougaard, J. (2011). The *Clavata2* genes of pea and *Lotus japonicu*s affect autoregulation of nodulation. Plant J. **65**: 861–871.

Kutschmar, A., Rzewuski, G., Stührwohldt, N., Beemster, G.T.S., Inzé, D., and Sauter, M. (2009). PSK-α promotes root growth in Arabidopsis. New Phytol. **181**: 820–831.

Laffont, C., Huault, E., Gautrat, P., Endre, G., Kalo, P., Bourion, V., Duc, G. and Frugier, F. (2019) Independent Regulation of Symbiotic Nodulation by the SUNN Negative and CRA2 Positive Systemic Pathways. Plant Physiol. **180**: 559-570.

Laffont, C., Ivanovici, A., Gautrat, P., Brault, M., Djordjevic, M.A., and Frugier, F. (2020). The NIN transcription factor coordinates CEP and CLE signaling peptides that regulate nodulation antagonistically. Nat. Commun. **11**: 3167.

Lagunas, B., Achom, M., Bonyadi-Pour, R., Pardal, A.J., Richmond, B.L., Sergaki, C., Vázquez, S., Schäfer, P., Ott, S., Hammond, J., and Gifford, M.L. (2019). Regulation of Resource Partitioning Coordinates Nitrogen and Rhizobia Responses and Autoregulation of Nodulation in *Medicago truncatula*. Mol. Plant **12**: 833–846.

Laloum, T., Baudin, M., Frances, L., Lepage, A., Billault-Penneteau, B., Cerri, M.R., Ariel, F., Jardinaud, M.F., Gamas, P., De Carvalho-Niebel, F., and Niebel, A. (2014). Two CCAAT-box-binding transcription factors redundantly regulate early steps of the legume-rhizobia endosymbiosis. Plant J. **79**: 757–768.

Laloum, T., De Mita, S., Gamas, P., Baudin, M., and Niebel, A. (2013). CCAAT-box binding transcription factors in plants: Y so many? Trends Plant Sci. **18**: 157–166.

Laporte, P., Lepage, A., Fournier, J., Catrice, O., Moreau, S., Jardinaud, M.F., Mun, J.H., Larrainzar, E., Cook, D.R., Gamas, P., and Niebel, A. (2014). The CCAAT box-binding transcription factor NF-YA1 controls rhizobial infection. J. Exp. Bot. **65**: 481–494.

Leasure, C.D. and He, Z.H. (2012). CLE and RGF family peptide hormone signaling in plant development. Mol. Plant **5**: 1173–1175.

Lee, J.S., Hnilova, M., Maes, M., Lin, Y.C.L., Putarjunan, A., Han, S.K., Avila, J., and Torii, K.U. (2015). Competitive binding of antagonistic peptides fine-tunes stomatal patterning. Nature **522**: 439–443.

Lefebvre, B. Timmers, T., Mbengue, M., Moreau, S., Herve, C., Toth, K., Bittencourt-Silvestre, J., Klaus, D., Deslandes, L., Godiard, L., Murray, J. D., Udvardi, M. K., Raffaele, S., Mongrand, S., Cullimore, J., Gamas, P., Niebel, A. and Ott, T. (2010). A remorin protein interacts with symbiotic receptors and regulates bacterial infection. Proc. Natl. Acad. Sci. **107**: 2343–2348.

Lenhard, M. and Laux, T. (2003). Stem cell homeostasis in the Arabidopsis shoot meristem is regulated by intercellular movement of CLAVATA3 and its sequestration by CLAVATA1. Development **130**: 3163–3173.

Lévy, J. Bres, C., Geurts, R., Chalhoub, B., Kulikova, O., Duc, G., Journet, E.-P., Ané, J.-M., Lauber, E., Bisseling, T., Dénarié, J., Rosenberg, C. and Debellé, F. (2004). A Putative Ca 2 and Calmodulin-Dependent Protein Kinase Required. Science **303**: 1361–4.

Li, H., Jiang, F., Wu, P., Wang, K., and Cao, Y. (2020). A High-Quality Genome Sequence of Model Legume *Lotus japonicus* (MG-20) Provides Insights into the Evolution of Root Nodule Symbiosis. Genes (Basel). **11**: doi:10.3390/genes11050483.

Lim, C.W., Lee, Y.W., Lee, S.C., and Hwang, C.H. (2014). Nitrate inhibits soybean nodulation by regulating expression of CLE genes. Plant Sci. **229**: 1–9.

Limpens, E., Franken, C., Smit, P., Willemse, J., Bisseling, T., and Geurts, R. (2003). LysM Domain Receptor Kinases Regulating Rhizobial Nod Factor-Induced Infection. Science **302**: 630–633.

Limpens, E., Mirabella, R., Fedorova, E., Franken, C., Franssen, H., Bisseling, T., and Geurts, R. (2005). Formation of organelle-like N2-fixing symbiosomes in legume root nodules is controlled by DMI2. Proc. Natl. Acad. Sci. **102**: 10375–10380.

Lin, J., Li, X., Luo, Z.L., Mysore, K.S., Wen, J., and Xie, F. (2018). NIN interacts with NLPs to mediate nitrate inhibition of nodulation in *Medicago truncatula*. Nat. Plants: https://doi.org/10.1038/s41477-018-0261-3.

Linkohr, B.I., Williamson, L.C., Fitter, A.H., and Leyser, H.M.O. (2002). Nitrate and phosphate availability and distribution have different effects on root system architecture of Arabidopsis. Plant J. **29**: 751–760.

Liu, C.-W., Breakspear, A., Guan, D., Cerri, M.R., Jackson, K., Jiang, S., Robson, F., Radhakrishnan, G.V., Roy, S., Bone, C., Stacey, N., Rogers, C., Trick, M., Niebel, A., Oldroyd, G.E.D., de Carvalho-Niebel, F. and Murray, J.D. (2019a). NIN Acts as a Network Hub Controlling a Growth Module Required for Rhizobial Infection. Plant Physiol. **179**: 1704–1722.

Liu, C.J., Zhao, Y., and Zhang, K. (2019b). Cytokinin transporters: Multisite players in cytokinin homeostasis and signal distribution. Front. Plant Sci. **10**: doi: 10.3389/fpls.2019.00693.

Liu, J., Rutten, L., Limpens, E., Van Der Molen, T., Van Velzen, R., Chen, R., Chen, Y., Geurtz, R., Kohlen, W., Kulikova, O., and Bisseling, T. (2019c). A Remote cis -Regulatory Region Is Required for NIN Expression in the Pericycle to Initiate Nodule Primordium Formation in *Medicago truncatula.* Plant Cell **31**: 68–83.

Livingston, D., Tuong, T., Nogueira, M., and Sinclair, T. (2019). Three-dimensional reconstruction of soybean nodules provides an update on vascular structure. Am. J. Bot. **106**: 507–513.

López-Bucio, J., Cruz-Ramírez, A., and Herrera-Estrella, L. (2003). The role of nutrient availability in regulating root architecture. Curr. Opin. Plant Biol. **6**: 280–287.

Lynch, J. (1995). Root architecture and plant productivity. Plant Physiol. **109**: 7–13.

Madsen, E.B., Antolín-Llovera, M., Grossmann, C., Ye, J., Vieweg, S., Broghammer, A., Krusell, L., Radutoiu, S., Jensen, O.N., Stougaard, J., and Parniske, M. (2010a). Autophosphorylation is essential for the in vivo function of the *Lotus japonicus* Nod factor receptor 1 and receptor-mediated signalling in cooperation with Nod factor receptor 5. Plant J. **65**: 404–417.

Madsen, L.H., Tirichine, L., Jurkiewicz, A., Sullivan, J.T., Heckmann, A.B., Bek, A.S., Ronson, C.W., James, E.K., and Stougaard, J. (2010b). The molecular network governing nodule organogenesis and infection in the model legume *Lotus japonicus*. Nat. Commun. **1**: doi: 10.1038/ncomms1009.

Magori, S., Oka-Kira, E., Shibata, S., Umehara, Y., Kouchi, H., Hase, Y., Tanaka, A., Sato, S., Tabata, S., and Kawaguchi, M. (2009). Too Much Love, a root regulator associated with the long-distance control of nodulation in *Lotus japonicus*. Mol. Plant-Microbe Interact. **22**: 259–268.

Malamy, J.E. (2005). Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture. Plant, Cell Environ. **28**: 67–77.

Malamy, J.E. and Benfey, P.N. (1997). Down and out in Arabidopsis: the formation of lateral roots. Trends Plant Sci. **2**: 390–396.

Marsh, J.F., Rakocevic, A., Mitra, R.M., Brocard, L., Sun, J., Eschstruth, A., Long, S.R., Schultze, M., Ratet, P., and Oldroyd, G.E.D. (2007). *Medicago truncatula* NIN Is Essential for Rhizobial-Independent Nodule Organogenesis Induced by Autoactive Calcium / Calmodulin-Dependent Protein Kinase 1. Plant Physiol. **144**: 324–335.

Marshall, E., Costa, L.M., and Gutierrez-Marcos, J. (2011). Cysteine-Rich Peptides (CRPs) mediate diverse aspects of cell-cell communication in plant reproduction and development. J. Exp. Bot. **62**: 1677–1686.

Matsubayashi, Y. (2014). Posttranslationally Modified Small-Peptide Signals in Plants. Annu. Rev. Plant Biol. **65**: 385–413.

Matsubayashi, Y. (2018). Review Exploring peptide hormones in plants : identification of four peptide hormone-receptor pairs and two post-translational modification enzymes. Proc. Jpn. Acad.,Ser. B **94**: 59–74.

Matsubayashi, Y., Ogawa, M., Kihara, H., Niwa, M., and Sakagami, Y. (2006). Disruption and overexpression of Arabidopsis phytosulfokine receptor gene affects cellular longevity and potential for growth. Plant Physiol. **142**: 45–53.

Matsubayashi, Y., Takagi, L., and Sakagami, Y. (1997). Phytosulfokine-α, a sulfated pentapeptide, stimulates the proliferation of rice cells by means of specific high- and low-affinity binding sites. Proc. Natl. Acad. Sci. **94**: 13357–13362.

Mayer, K.F.X., Schoof, H., Haecker, A., Lenhard, M., Jurgens, G., and Laux, T. (1998). Role of WUSCHEL in Regulating Stem Cell Fate in the Arabidopsis Shoot Meristem. Cell **95**: 805–815.

Mbengue, M., Camut, S., de Carvalho-Niebel, F., Deslandes, L., Froidure, S., Klaus-Heisen, D., Moreau, S., Rivas, S., Timmers, T., Hervé, C., Cullimore, J., and Lefebvre, B. (2010). The *Medicago truncatula* E3 ubiquitin ligase PUB1 interacts with the LYK3 symbiotic receptor and negatively regulates infection and nodulation. Plant Cell **22**: 3474–3488.

Meng, L., Ruth, K.C., Fletcher, J.C., and Feldman, L. (2010). The roles of different CLE domains in arabidopsis CLE polypeptide activity and functional specificity. Mol. Plant **3**: 760–772.

Meng, W.J., Cheng, Z.J., Sang, Y.L., Zhang, M.M., Rong, X.F., Wang, Z.W., Tang, Y.Y., and Zhang, X.S. (2017). Type-B ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATORs specify the shoot stem cell niche by dual regulation of WUSCHEL. Plant Cell **29**: 1357–1372.

Mergaert, P. (2018). Role of antimicrobial peptides in controlling symbiotic bacterial populations. Nat. Prod. Rep. **35**: 336–356.

Mergaert, P., Nikovics, K., Kelemen, Z., Maunoury, N., Vaubert, D., Kondorosi, A., and Kondorosi, E. (2003). A Novel Family in *Medicago truncatula* Consisting of More Than 300 Nodule-Specific Genes Coding for Small, Secreted Polypeptides with Conserved Cysteine Motifs. Plant Physiol. **132**: 161–173.

Mergaert, P., Uchiumi, T., Alunni, B., Evanno, G., Cheron, A., Catrice, O., Mausset, A.E., Barloy-Hubler, F., Galibert, F., Kondorosi, A., and Kondorosi, E. (2006). Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the Rhizobium-legume symbiosis. Proc. Natl. Acad. Sci. **103**: 5230–5235.

Messinese, E., Mun, J.-H., Yeun, L.H., Jayaraman, D., Rougé, P., Barre, A., Lougnon, G., Schornack, S., Bono, J.-J., Cook, D.R., and Ané, J.-M. (2007). A Novel Nuclear Protein Interacts With the Symbiotic DMI3 Calcium- and Calmodulin-Dependent Protein Kinase of *Medicago truncatula* . Mol. Plant-Microbe Interact. **20**: 912–921.

Middleton, P.H., Jakab, J., Penmetsa, R.V., Starker, C.G., Doll, J., Kaló, P., Prabhu, R., Marsh, J.F., Mitra, R.M., Kereszt, A., Dudas, B., VandenBosch, K., Long, S.R., Cook, D.R., Kiss, G.B. and Oldroyd, G.E.D. (2007). An ERF Transcription Factor in *Medicago truncatula* That Is Essential for Nod Factor Signal Transduction . Plant Cell **19**: 1221–1234.

Miller, J.B., Pratap, A., Miyahara, A., Zhou, L., Bornemann, S., Morris, R.J., and Oldroyd, G.E.D. (2013). Calcium/calmodulin-dependent protein kinase is negatively and positively regulated by calcium, providing a mechanism for decoding calcium responses during symbiosis signaling. Plant Cell **25**: 5053–5066.

Mitra, R.M., Shaw, S.L., and Long, S.R. (2004). Six nonnodulating plant mutants defective for Nod factor-induced transcriptional changes associated with the legume-rhizobia symbiosis. Proc. Natl. Acad. Sci. **101**: 10217–10222.

Miwa, H., Sun, J., Oldroyd, G.E.D., and Allan Downie, J. (2006). Analysis of calcium spiking using a cameleon calcium sensor reveals that nodulation gene expression is regulated by calcium spike number and the developmental status of the cell. Plant J. **48**: 883–894.

Miyahara, A., Hirani, T.A., Oakes, M., Kereszt, A., Kobe, B., Djordjevic, M.A., and Gresshoff, P.M. (2008). Soybean nodule autoregulation receptor kinase phosphorylates two kinase-associated protein phosphatases in vitro. J. Biol. Chem. **283**: 25381–25391.

Miyazawa, H. et al. (2010). The receptor-like kinase KLAVIER mediates systemic regulation of nodulation and non-symbiotic shoot development in *Lotus japonicus*. Development **137**: 4317–4325.

Mohd-Radzman, N.A., Binos, S., Truong, T.T., and Djordjevic, M.A. (2015). Novel MtCEP1 peptides produced in vivo differentially regulate root development in *Medicago truncatula*. J. Exp. Bot. **66**: 5289–5300.

Mohd-Radzman, N.A., Laffont, C., Ivanovici, A., Patel, N., Reid, D.E., Stougaard, J., Frugier, F., Imin, N., and Djordjevic, M.A. (2016). Different pathways act downstream of the peptide receptor CRA2 to regulate lateral root and nodule development. Plant Physiol. **171**: 2536–2548.

Mortier, V., Den Herder, G., Whitford, R., Van de Velde, W., Rombauts, S., D'Haeseleer, K., Holsters, M., and Goormachtig, S. (2010). CLE peptides control *Medicago truncatula* nodulation locally and systemically. Plant Physiol. **153**: 222–237.

Mortier, V., De Wever, E., Vuylsteke, M., Holsters, M., and Goormachtig, S. (2012). Nodule numbers are governed by interaction between CLE peptides and cytokinin signaling. Plant J. **70**: 367–376.

Müller, B. and Sheen, J. (2007). Advances in cytokinin signaling. Science **318**: 68–69.

Müller, R., Bleckmann, A., and Simon, R. (2008). The receptor kinase CORYNE of Arabidopsis transmits the stem cell-limiting signal CLAVATA3 independently of CLAVATA1. Plant Cell **20**: 934–946.

Murray, J.D., Karas, B., Sato, S., Tabata, S., Amyot, L., and Szczyglowski, K. (2007). A Cytokinin Perception Mutant Colonized by Rhizobium in the Absence of Nodule Organogenesis. Science **315**: 101–105.

Nagymihály, M., Veluchamy, A., Györgypál, Z., Ariel, F., Jégu, T., Benhamed, M., Szücs, A., Kereszt, A., Mergaert, P., and Kondorosi, É. (2017). Ploidy-dependent changes in the epigenome of symbiotic cells correlate with specific patterns of gene expression. Proc. Natl. Acad. Sci. **114**: 4543–4548.

Ni, J., Guo, Y., Jin, H., Hartsell, J., and Clark, S.E. (2011). Characterization of a CLE processing activity. Plant Mol. Biol. **75**: 67–75.

Nishida, H., Handa, Y., Tanaka, S., and Suzaki, T. (2016). Expression of the CLE-RS3 gene suppresses root nodulation in *Lotus japonicus*. J. Plant Res. **129**: 909–919.

Nishida, H., Tanaka, S., Handa, Y., Ito, M., Sakamoto, Y., Matsunaga, S., Betsuyaku, S., Miura, K., Soyano, T., Kawaguchi, M., and Suzaki, T. (2018). A NIN-LIKE PROTEIN mediates nitrate-induced control of root nodule symbiosis in *Lotus japonicus*. Nat. Commun. **9**. doi: 10.1038/s41467-018-02831-x

Nishimura, R., Hayashi, M.M., Wu, G.-J.J., Kouchi, H., Imaizumi-Anraku, H., Murakami, Y., Kawasaki, S., Akao, S., Ohmori, M., Nagasawa, M., Harada, K., and Kawaguchi, M. (2002). HAR1 mediates systemic regulation of symbiotic organ development. Nature **420**: 426–429.

Nowak, S., Schnabel, E., and Frugoli, J. (2019). The *Medicago truncatula* CLAVATA3-LIKE CLE12/13 signaling peptides regulate nodule number depending on the CORYNE but not the COMPACT ROOT ARCHITECTURE2 receptor. Plant Signal. Behav. **14**: e1598730.

O' Brien, A., Vega, A., Krouk, G., Gojon, A., Coruzzi, G., and Gutie, R.A. (2016). Nitrate Transport , Sensing , and Responses in Plants. Mol. Plant **9**: 837–856.

Ogawa, M., Shinohara, H., Sakagami, Y., and Matsubayash, Y. (2008). Arabidopsis CLV3 peptide directly binds CLV1 ectodomain. Science **319**: 294.

Oh, E., Seo, P.J., and Kim, J. (2018). Signaling Peptides and Receptors Coordinating Plant Root Development. Trends Plant Sci. **23**: 337–351.

Ohkubo, Y., Tanaka, M., Tabata, R., Ogawa-ohnishi, M., and Matsubayashi, Y. (2017). Shoot-to-root mobile polypeptides involved in systemic regulation of nitrogen acquisition. Nat. Plants **17029**: 1–6.

Ohyama, K., Ogawa, M., and Matsubayashi, Y. (2008). Identification of a biologically active , small , secreted peptide in Arabidopsis by *in silico* gene screening , followed by LC-MS-based structure analysis. Plant J. **55**: 152–160.

Okamoto, S. and Kawaguchi, M. (2015). Shoot HAR1 mediates nitrate inhibition of nodulation in *Lotus japonicus*. Plant Signal. Behav. **10**: e1000138.

Okamoto, S., Ohnishi, E., Sato, S., Takahashi, H., Nakazono, M., Tabata, S., and Kawaguchi, M. (2009). Nod factor/nitrate-induced CLE genes that drive HAR1-mediated systemic regulation of nodulation. Plant Cell Physiol. **50**: 67–77.

Okamoto, S., Shinohara, H., Mori, T., Matsubayashi, Y., and Kawaguchi, M. (2013). Root-derived CLE glycopeptides control nodulation by direct binding to HAR1 receptor kinase. Nat. Commun. **4**: doi10.1038/ncomms3191.

Okushima, Y., Fukaki, H., Onoda, M., Theologis, A., and Tasaka, M. (2007). ARF7 and ARF19 regulate lateral root formation via direct activation of LBD/ASL genes in Arabidopsis. Plant Cell **19**: 118–130.

Oldroyd, G.E.D. (2013). Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. Nat. Rev. Microbiol. **11**: 252–63.

Oldroyd, G.E.D., Murray, J.D., Poole, P.S., and Downie, J.A. (2011). The Rules of Engagement in the Legume-Rhizobial Symbiosis. Annu. Rev. Genet. **45**: 119–144.

Patriarca, E.J., Tatè, R., Ferraioli, S., and Iaccarino, M. (2004). Organogenesis of Legume Root Nodules. Int. Rev. Cytol. **234**: 201–261.

Pearce, G., Strydom, D., Johnson, S., and Ryan, C.A. (1991). A Polypeptide from Tomato Leaves Induces Wound-Inducible Proteinase Inhibitor Proteins. Science **253**: 895–897.

Pearce, G., Yamaguchi, Y., Barona, G., and Ryan, C.A. (2010). A subtilisin-like protein from soybean contains an embedded, cryptic signal that activates defense-related genes. Proc. Natl. Acad. Sci. **107**: 14921–14925.

Pecrix, Y. et al. (2018). Whole-genome landscape of *Medicago truncatula* symbiotic genes. Nat. Plants **4**: 1017–1025.

Peiter, E., Sun, J., Heckmann, A.B., Venkateshwaran, M., Riely, B.K., Otegui, M.S., Edwards, A., Freshour, G., Hahn, M.G., Cook, D.R., Sanders, D., Oldroyd, G.E.D., Downie, J.A., Ané, J.M. (2007). The *Medicago truncatula* DMI1 protein modulates cytosolic calcium signaling. Plant Physiol. **145**: 192–203.

Penmetsa, R. V, Frugoli, J.A., Smith, L.S., Long, S.R., and Cook, D.R. (2003). Dual genetic pathways controlling nodule number in *Medicago truncatula*. Plant Physiol **131**: 998–1008.

Péret, B., De Rybel, B., Casimiro, I., Benková, E., Swarup, R., Laplaze, L., Beeckman, T., and Bennett, M.J. (2009). Arabidopsis lateral root development: an emerging story. Trends Plant Sci. **14**: 399–408.

Perry, J.A., Wang, T.L., Welham, T.J., Gardner, S., Pike, J.M., Yoshida, S., Parniske, M., Innes, J., Tre, C., Tra, W., and Lane, C. (2003). A TILLING Reverse Genetics Tool and a Web-Accessible Collection of Mutants of the Legume *Lotus japonicus*. Plant Physiol. **131**: 866–871.

Pislariu, C.I. et al. (2012). A *Medicago truncatula* tobacco retrotransposon insertion mutant collection with defects in nodule development and symbiotic nitrogen fixation. Plant Physiol. **159**: 1686–1699.

Plet, J., Wasson, A., Ariel, F., Le Signor, C., Baker, D., Mathesius, U., Crespi, M., and Frugier, F. (2011). MtCRE1-dependent cytokinin signaling integrates bacterial and plant cues to coordinate symbiotic nodule organogenesis in *Medicago truncatula.* Plant J. **65**: 622–633.

Prell, J. and Poole, P. (2006). Metabolic changes of rhizobia in legume nodules. Trends Microbiol. **14**: 161–168.

Radutoiu, S., Madsen, L.H., Madsen, E.B., Felle, H.H., Umehara, Y., Grønlund, M., Sato, S., Nakamura, Y., Tabata, S., Sandal, N., and Stougaard, J. (2003). Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. Nature **425**: 585–592.

Reid, D.E., Ferguson, B.J., and Gresshoff, P.M. (2011). Inoculation- and Nitrate-Induced CLE Peptides of Soybean Control NARK-Dependent Nodule Formation. Mol. Plant-Microbe Interact. **24**: 606–618.

Ridge, R.W. and Rolfe, B.G. (1985). *Rhizobium sp.* degradation of legume root hair cell wall at the site of infection thread origin. Appl. Environ. Microbiol. **50**: 717–720.

Ried, M.K., Antolín-llovera, M., and Parniske, M. (2014). Spontaneous symbiotic reprogramming of plant roots triggered by receptor-like kinases. Elife: doi: 10.7554/eLife.03891.

Roberts, I., Smith, S., Stes, E., De Rybel, B., Staes, A., Van De Cotte, B., Njo, M.F., Dedeyne, L., Demol, H., Lavenus, J., Audenaert, D., Gevaert, K., Beeckman, T., and De Smet, I. (2016). CEP5 and XIP1/CEPR1 regulate lateral root initiation in Arabidopsis. J. Exp. Bot. **67**: 4889–4899.

Roberts, I., Smith, S., Rybel, B. De, Van Den Broeke, J., Smet, W., De Cokere, S., Mispelaere, M., De Smet, I., and Beeckman, T. (2013). The CEP family in land plants: Evolutionary analyses, expression studies, and role in Arabidopsis shoot development. J. Exp. Bot. **64**: 5371–5381.

Robinson, D. (1994). The responses of plants to non-uniform supplies of nutrients. New Phytol. **127**: 635–674.

Roche, P., Lerouge, P., Ponthus, C., and Promé, J.C. (1991). Structural determination of bacterial nodulation factors involved in the *Rhizobium meliloti*-alfalfa symbiosis. J. Biol. Chem. **266**: 10933–10940.

Roth, L. and Stacey, G. (1989). Bacterium Release Into Host Cells of Nitrogen-Fixing Soybean Nodules: The Symbiosome Membrane Comes From Three Sources. Eur. J. Cell Biol. **49**: 13–23.

Roy, S., Liu, W., Nandety, R.S., Crook, A., Mysore, K.S., Pislariu, C.I., Frugoli, J., Dickstein, R., and Udvardi, M.K. (2020). Celebrating 20 Years of Genetic Discoveries in Legume Nodulation and Symbiotic Nitrogen Fixation. Plant Cell **32**: 15–41.

Ruffel, S. Freixes, S., Balzergue, S., Tillard, P., Jeudy, C., Martin-Magniette, M.L., Van Der Merwe, M.J., Kakar, K., Gouzy, J., Fernie, A.R., Udvardi, M., Salon, C., Gojon, A. and Lepetit, M. (2008). Systemic signaling of the plant nitrogen status triggers specific transcriptome responses depending on the nitrogen source in *Medicago truncatula*. Plant Physiol. **146**: 2020–2035.

Ruffel, S., Krouk, G., Ristova, D., Shasha, D., Birnbaum, K.D., and Coruzzi, G.M. (2011). Nitrogen economics of root foraging: Transitive closure of the nitrate-cytokinin relay and distinct systemic signaling for N supply vs. demand. Proc. Natl. Acad. Sci. **108**: 18524–18529.

Saha, S., Dutta, A., Bhattacharya, A., and Dasgupta, M. (2014). Intracellular Catalytic Domain of Symbiosis Receptor Kinase Hyperactivates Spontaneous Nodulation in Absence of Rhizobia. Plant Physiol. **166**: 1699–1708.

Saito, K., Yoshikawa, M., Yano, K., Miwa, H., Uchida, Hi., Asamizu, E., Sato, S., Tabata, S., Imaizumi-Anraku, H., Umehara, Y., Kouchi, H., Murooka, Y., Szczyglowski, K., Downie, J. A., Parniske, M., Hayashi, M., Kawaguchi, M. (2007). Nucleoporin85 is required for calcium spiking, fungal and bacterial symbioses, and seed production in *Lotus japonicus.* Plant Cell **19**: 610–624.

Sasaki, T., Suzaki, T., Soyano, T., Kojima, M., Sakakibara, H., and Kawaguchi, M. (2014). Shoot-derived cytokinins systemically regulate root nodulation. Nat. Commun. **5:** doi: 10.1038/ncomms5983.

Saur, I.M.L., Oakes, M., Djordjevic, M.A., and Imin, N. (2011). Crosstalk between the nodulation signaling pathway and the autoregulation of nodulation in *Medicago truncatula*. New Phytol. **190**: 865–874.

Schauser, L., Roussis, A., Stiller, J., and Stougaard, J. (1999). A plant regulator controlling development of symbiotic root nodules. Nature **402**: 191–195.

Scheres, B., Wolkenfelt, H., Willemsen, V., Terlouw, M., Lawson, E., Dean, C., and Weisbeek, P. (1994). Embryonic origin of the Arabidopsis primary root and root meristem initials. Development **120**: 2475–2487.

Schiessl, K. Lilley, J., Lee, T., Tamvakis, I., Kohlen, W., Bailey, P. C., Thomas, A., Luptak, J., Ramakrishnan, K., Carpenter, M.D., Mysore, K. S., Wen, J., Ahnert, S., Grieneisen, V. A., and Oldroyd, G. E. (2019). NODULE INCEPTION Recruits the Lateral Root Developmental Program for Symbiotic Nodule Organogenesis in *Medicago truncatula*. Curr. Biol. **29**: 1–12.

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.

Schnabel, E., Karve, A., Kassaw, T., Mukherjee, A., Zhou, X., Hall, T., and 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**: 1–3.

Schoof, H., Lenhard, M., Haecker, A., Mayer, K.F.X., Jürgens, G., and Laux, T. (2000). The stem cell population of Arabidopsis shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the CLAVATA and WUSCHEL genes. Cell **100**: 635–644.

Searle, I.R., Men, A.E., Laniya, T.S., Buzas, D.M., Iturbe-Ormaetxe, I., Carroll, B.J., and Gresshoff, P.M. (2003). Long-Distance Signaling in Nodulation Directed by a CLAVATA1-Like Receptor Kinase. Science **299**: 109–112.

Shaw, S.L. and Long, S.R. (2003). Nod Factor Elicits Two Separable Calcium Responses in *Medicago truncatula* Root Hair Cells. Plant Physiol. **131**: 976–984.

Shekhar, V., Stöckle, D., Thellmann, M., and Vermeer, J.E.M. (2019). The role of plant root systems in evolutionary adaptation. Curr. Top. Dev. Biol. **131**: 55–80.

Shinohara, H., Moriyama, Y., Ohyama, K., and Matsubayashi, Y. (2012). Biochemical mapping of a ligand-binding domain within Arabidopsis BAM1 reveals diversified ligand recognition mechanisms of plant LRR-RKs. Plant J. **70**: 845–854.

Sieberer, B.J., Timmers, A.C.J., and Emons, A.M.C. (2005). Nod Factors Alter the Microtubule Cytoskeleton in *Medicago truncatula* Root Hairs to Allow Root Hair Reorientation. Mol. Plant-Microbe Interact. **18**: 1195–1204.

Le Signor, C., Savois, V., Aubert, G., Verdier, J., Nicolas, M., Pagny, G., Moussy, F., Sanchez, M., Baker, D., Clarke, J., and Thompson, R. (2009). Optimizing TILLING populations for reverse genetics in *Medicago truncatula*. Plant Biotechnol. J. **7**: 430–441.

Singh, S., Katzer, K., Lambert, J., Cerri, M., and Parniske, M. (2014). CYCLOPS, A DNA-binding transcriptional activator, orchestrates symbiotic root nodule development. Cell Host Microbe **15**: 139–152.

Singh, S. and Parniske, M. (2012). Activation of calcium- and calmodulin-dependent protein kinase (CCaMK), the central regulator of plant root endosymbiosis. Curr. Opin. Plant Biol. **15**: 444–453.

Singleton, P.W. and van Kessel, C. (1987). Effect of Localized Nitrogen Availability to Soybean Half-Root Systems on Photosynthate Partitioning to Roots and Nodules. Plant Physiol. **83**: 552–556.

De Smet, I. and Beeckman, T. (2011). Asymmetric cell division in land plants and algae: The driving force for differentiation. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. **12**: 177–188.

Smit, P. (2005). NSP1 of the GRAS Protein Family Is Essential for Rhizobial Nod Factor-Induced Transcription. Science **308**: 1789–1791.

Smit, P., Limpens, E., Geurts, R., Fedorova, E., Dolgikh, E., Gough, C., and Bisseling, T. (2007). Medicago LYK3, an entry receptor in rhizobial nodulation factor signaling. Plant Physiol. **145**: 183–191.

Soupene, E., Foussard, M., Boistard, P., Truchet, G., and Batut, J. (1995). Oxygen as a key developmental regulator of *Rhizobium meliloti* N2-fixation gene expression within the alfalfa root nodule. Proc. Natl. Acad. Sci. **92**: 3759–3763.

Soyano, T., Hirakawa, H., Sato, S., Hayashi, M., and Kawaguchi, M. (2014). NODULE INCEPTION creates a long-distance negative feedback loop involved in homeostatic regulation of nodule organ production. Proc. Natl. Acad. Sci. **111**: 14607–14612.

Soyano, T., Kouchi, H., Hirota, A., and Hayashi, M. (2013). NODULE INCEPTION Directly Targets NF-Y Subunit Genes to Regulate Essential Processes of Root Nodule Development in *Lotus japonicus*. PLoS Genet. **9**: e1003352.

Sprent, J.I. and James, E.K. (2007). Legume Evolution: Where Do Nodules and Mycorrhizas Fit In? Plant Physiol. **144**: 575–581.

Stahl, Y. Grabowski, S., Bleckmann, A., Kühnemuth, R., Weidtkamp-Peters, S., Pinto, K.G., Kirschner, G.K., Schmid, J.B., Wink, R.H., Hülsewede, A., Felekyan, S., Seidel, C.A.M. and Simon, R. (2013). Moderation of arabidopsis root stemness by CLAVATA1 and ARABIDOPSIS CRINKLY4 receptor kinase complexes. Curr. Biol. **23**: 362–371.

Stahl, Y., Wink, R.H., Ingram, G.C., and Simon, R. (2009). A Signaling Module Controlling the Stem Cell Niche in Arabidopsis Root Meristems. Curr. Biol. **19**: 909–914.

Stougaard, J. (1995). *Agrobacterium rhizogenes* as a Vector for Transforming Higher Plants. Methods Mol. Biol. **49**: 49–61.

Stracke, S., Kistner, C., Yoshida, S., Mulder, L., Sato, S., Kaneko, T., Tabata, S., Sandal, N., Stougaard, J., Szczyglowski, K., and Parniske, M. (2002). A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. Nature **417**: 959–962.

Streeter, J. (1988). Inhibition of legume nodule formation and N2 fixation by nitrate. Crit. Rev. plant Sci. **7**: 1–23.

Sugano, S.S., Shimada, T., Imai, Y., Okawa, K., Tamai, A., Mori, M., and Hara-Nishimura, I. (2010). Stomagen positively regulates stomatal density in Arabidopsis. Nature **463**: 241–244.

Tabata, R. and Sawa, S. (2014). Maturation processes and structures of small secreted peptides in plants. Front. Plant Sci. **5**: doi: 10.3389/fpls.2014.00311.

Tabata, R., Sumida, K., Yoshii, T., Ohyama, K., Shinohara, H., and Matsubayashi, Y. (2014). Perception of root-derived peptides by shoot LRR-RKs mediates systemic N-demand signaling. Science **346**: 343–346.

Tadege, M., Wen, J., He, J., Tu, H., Kwak, Y., Eschstruth, A., Cayrel, A., Endre, G., Zhao, P.X., Chabaud, M., Ratet, P., and Mysore, K.S. (2008). Large-scale insertional mutagenesis using the *Tnt1* retrotransposon in the model legume *Medicago truncatula.* Plant J. **54**: 335–347.

Takahara, M. Magori, S., Soyano, T., Okamoto, S., Yoshida, C., Yano, K., Sato, S., Tabata, S., Yamaguchi, K., Shigenobu, S., Takeda, N., Suzaki, T. and Kawaguchi, M. (2013). TOO MUCH LOVE, a novel kelch repeat-containing F-box protein, functions in the long-distance regulation of the LEGUME-rhizobium symbiosis. Plant Cell Physiol. **54**: 433–447.

Takahashi, F., Suzuki, T., Osakabe, Y., Betsuyaku, S., Kondo, Y., Dohmae, N., Yamaguchi-shinozaki, K., and Shinozaki, K. (2018). A small peptide modulates stomatal control via abscisic acid in long-distance signalling. Nature **556**: 235–238.

Taleski, M., Imin, N., and Djordjevic, M.A. (2018). CEP peptide hormones : key players in orchestrating nitrogen-demand signalling , root nodulation , and lateral root development. J. Exp. Bot. **69**: 1829–1836.

Tamaki, T., Betsuyaku, S., Fujiwara, M., Fukao, Y., Fukuda, H., Sawa, S., Agency, T., Global, P., and Project, E. (2013). SUPPRESSOR OF LLP1 1-mediated C – terminal processing is critical for CLE19 peptide activity. Plant J. **76**: 970–981.

Tavormina, P., Coninck, B. De, Nikonorova, N., Smet, I. De, and Cammue, B.P.A. (2015). The Plant Peptidome : An Expanding Repertoire of Structural Features and Biological Functions. Plant Cell **27**: 2095–2118.

Terpolilli, J.J., Hara, G.W.O., Tiwari, R.P., Michael, J., and Howieson, J.G. (2008). A17 is poorly matched for N 2 fixation with the sequenced microsymbiont *Sinorhizobium meliloti* 1021. New Phytol. **1021**: 62–66.

Teulet, A., Busset, N., Fardoux, J., Gully, D., Chaintreuil, C., and Cartieaux, F. (2019). The rhizobial type III effector ErnA confers the ability to form nodules in legumes. Proc. Natl. Acad. Sci. **116**: 21758–21768.

Tian, H., De Smet, I., and Ding, Z. (2014). Shaping a root system: Regulating lateral versus primary root growth. Trends Plant Sci. **19**: 426–431.

Timmers, A.C., Auriac, M.C., de Billy, F., and Truchet, G. (1998). Nod factor internalization and microtubular cytoskeleton changes occur concomitantly during nodule differentiation in alfalfa. Development **125**: 339–49.

Timmers, A.C.J., Auriac, M., and Truchet, G. (1999). Refined analysis of early symbiotic steps of the Rhizobium-Medicago interaction in relationship with microtubular cytoskeleton rearrangements. Development **126**: 3617–3628.

Timmers, A.C.J., Soupène, E., Auriac, M.-C., de Billy, F., Vasse, J., Boistard, P., and Truchet, G. (2000). Saprophytic Intracellular Rhizobia in Alfalfa Nodules. Mol. Plant-Microbe Interact. **13**: 1204–1213.

Tirichine, L. Imaizumi-Anraku, H., Yoshida, S., Murakami, Y., Madsen, L.H., Miwa, H., Nakagawa, T., Sandal, N., Albrektsen, A.S., Kawaguchi, M., Downie, A., Sato, S., Tabata, S., Kouchi, H., Parniske, M., Kawasaki, S. and Stougaard, J. (2006). Deregulation of a Ca 2+ /calmodulin-dependent kinase leads to spontaneous nodule development. Nature **441**: 1153–1156.

Tirichine, L., Sandal, N., Madsen, L.H., Radutoiu, S., Albrektsen, A.S., Sato, S., Asamizu, E., Tabata, S., and Stougaard, J. (2007). A Gain-of-Function Mutation in a Root Nodule Organogenesis. Science **2680**: 104–107.

Truchet, G., Roche, P., Lerouge, P., Vasse, J., Camut, S., de Billy, F., Promé, J.-C., and Dénarié, J. (1991). Sulphated lipo-oligosaccharide signals of *Rhizobium meliloti* elicit root nodule organogenesis in alfalfa. Nature **351**: 670–673.

Tsikou, D., Yan, Z., Holt, D.B., Abel, N.B., Reid, D.E., Madsen, L.H., Bhasin, H., Sexauer, M., Stougaard, J., and Markmann, K. (2018). Systemic control of legume susceptibility to rhizobial infection by a mobile microRNA. Science **362**: 233–236.

Urbański, D.F., Małolepszy, A., Stougaard, J., and Andersen, S.U. (2012). Genome-wide LORE1 retrotransposon mutagenesis and high-throughput insertion detection in *Lotus japonicus*. Plant J. **69**: 731–741.

Vasse, J., De Billy, F., Camut, S., and Truchet, G. (1990). Correlation between ultrastructural differentiation of bacteriods and nitrogen fixation in alfalfa nodules. J. Bacteriol. **172**: 4295–4306.

Van de Velde, W., Zehiro, G., Szatmari, A., Debreczeny, M., Ishihar, H., Kevei, Z., Farkas, A., Mikulass, K., Nagy, A., Tiricz, H., Satiat-Jeunemaître, B., Alunni, B., Bourge, M., Kucho, K., Abe, M., Kereszt, A., Marot, G., Uchiumi, T., Kondorosi, E. and Mergaert, Peter. (2010). Plant Peptides Govern Terminal Differentiation of Bacteria in Symbiosis. Science **327**: 1122–1126.

Venkateshwaran, M., Jayaraman, D., Chabaud, M., Genre, A., Balloon, A.J., Maeda, J., Forshey, K., Den Os, D., Kwiecien, N.W., Coon, J.J., Barker, D.G., and Ané, J.M. (2015). A role for the mevalonate pathway in early plant symbiotic signaling. Proc. Natl. Acad. Sci. **112**: 9781–9786.

Vernié, T. Camut, S., Camps, C., Rembliere, C., de Carvalho-Niebel, F., Mbengue, M., Timmers, T., Gasciolli, V., Thompson, R., le Signor, C., Lefebvre, B., Cullimore, J. and Hervé, C. (2016). PUB1 Interacts with the Receptor Kinase DMI2 and Negatively Regulates Rhizobial and Arbuscular Mycorrhizal Symbioses through Its Ubiquitination Activity in *Medicago truncatula* . Plant Physiol. **170**: 2312–2324.

Vernié, T., Kim, J., Frances, L., Ding, Y., Sun, J., Guan, D., Niebel, A., Gifford, M.L., de Carvalho-Niebel, F., and Oldroyd, G.E.D. (2015). The NIN Transcription Factor Coordinates Diverse Nodulation Programs in Different Tissues of the *Medicago truncatula* Root. Plant Cell **27**: 3410–3424.

Wais, R.J., Galera, C., Oldroyd, G., Catoira, R., Penmetsa, R.V., Cook, D., Gough, C., Dénarié, J., and Long, S.R. (2000). Genetic analysis of calcium spiking responses in nodulation mutants of *Medicago truncatula*. Proc. Natl. Acad. Sci. **97**: 13407–13412.

Wais, R.J., Keating, D.H., and Long, S.R. (2002). Structure-function analysis of nod factor-induced root hair calcium spiking in Rhizobium-legume symbiosis. Plant Physiol. **129**: 211–224.

Wang, C., Yu, H., Zhang, Z., Yu, L., Xu, X., Hong, Z., and Luo, L. (2015). Phytosulfokine is involved in positive regulation of *Lotus japonicus* nodulation. Mol. Plant-Microbe Interact. **28**: 847–855.

Wang, L., Einig, E., Almeida-trapp, M., Albert, M., Fliegmann, J., Mithöfer, A., Kalbacher, H., and Felix, G. (2018). The systemin receptor SYR1 enhances resistance of tomato against herbivorous insects. Nat. Plants **4**: 152-156.

Weston, L.A. and Mathesius, U. (2013). Flavonoids: their structure, biosynthesis and role in the rhizosphere, including allelopathy. J. Chem. Ecol. **39**: 283–97.

White, J., Prell, J., James, E.K., and Poole, P. (2007). Nutrient sharing between symbionts. Plant Physiol. **144**: 604–614.

Wopereis, J., Pajuelo, E., Dazzo, F.B., Jiang, Q., Gresshoff, P.M., De Bruijn, F.J., Stougaard, J., and Szczyglowski, K. (2000). Short root mutant of *Lotus japonicus* with a dramatically altered symbiotic phenotype. Plant J. **23**: 97–114.

Xiao, T.T., Schilderink, S., Moling, S., Deinum, E.E., Kondorosi, E., and Franssen, H. (2014). Fate map of *Medicago truncatula* root nodules. Development **141**: 3517–3528.

Xiao, T.T., van Velzen, R., Kulikova, O., Franken, C., and Bisseling, T. (2019). Lateral root formation involving cell division in both pericycle, cortex and endodermis is a common and ancestral trait in seed plants. Development **146**: doi:10.1242/dev.182592.

Yamada, M. and Sawa, S. (2013). The roles of peptide hormones during plant root development. Curr. Opin. Plant Biol. **16**: 56–61.

Yamaguchi, Y.L., Ishida, T., and Sawa, S. (2016). CLE peptides and their signaling pathways in plant development. J. Exp. Bot. **67**: 4813–4826.

Yano, K., Yoshida, S., Muller, J., Singh, S., Banba, M., Vickers, K., Markmann, K., White, C., Schuller, B., Sato, S., Asamizu, E., Tabata, S., Murooka, Y., Perry, J., Wang, T.L., Kawaguchi, M., Imaizumi-Anraku, H., Hayashi, M. and Parniske, M. (2008). CYCLOPS, a mediator of symbiotic intracellular accommodation. Proc. Natl. Acad. Sci. **105**: 20540–20545.

Yoro, E., Nishida, H., Ogawa-ohnishi, M., Yoshida, C., and Suzaki, T. (2019). PLENTY , a hydroxyproline O -arabinosyltransferase , negatively regulates root nodule symbiosis in *Lotus japonicus*. J. Exp. Bot. **70**: 507–517.

Yoro, E., Suzaki, T., and Kawaguchi, M. (2020). CLE-HAR1 systemic signaling and NIN-mediated local signaling suppress the increased rhizobial infection in the *daphne* mutant of *Lotus japonicus*. Mol. Plant-Microbe Interact. **33**: 320–327.

Yoro, E., Suzaki, T., Toyokura, K., Miyazawa, H., Fukaki, H., and Kawaguchi, M. (2014). A Positive Regulator of Nodule Organogenesis , NODULE INCEPTION , Acts as a Negative Regulator of Rhizobial Infection in *Lotus japonicus*. Plant Physiol. **165**: 747–758.

de Young, B.J., Bickle, K.L., Schrage, K.J., Muskett, P., Patel, K., and Clark, S.E. (2006). The CLAVATA1-related BAM1, BAM2 and BAM3 receptor kinase-like proteins are required for meristem function in Arabidopsis. Plant J. **45**: 1–16.

Yuan, S., Zhu, H., Gou, H., Fu, W., Liu, L., Chen, T., Ke, D., Kang, H., Xie, Q., Hong, Z., and Zhang, Z. (2012). A ubiquitin ligase of symbiosis receptor kinase involved in nodule organogenesis. Plant Physiol. **160**: 106–117.

Yue, M., Li, Q., Zhang, Y., Zhao, Y., Zhang, Z., and Bao, S. (2013). Histone H4R3 methylation catalyzed by SKB1/PRMT5 is required for maintaining shoot apical meristem. PLoS One **8**: e83258.

Van Zeijl, A., Op Den Camp, R.H.M., Deinum, E.E., Charnikhova, T., Franssen, H., Camp, H.J.M.O. Den, Bouwmeester, H., Kohlen, W., Bisseling, T., and Geurts, R. (2015). Rhizobium Lipo-chitooligosaccharide Signaling Triggers Accumulation of Cytokinins in *Medicago truncatula* Roots. Mol. Plant **8**: 1213–1226.

Zhang, H. and Forde, B.G. (1998). An Arabidopsis MADS Box Gene That Controls Nutrient-Induced Changes in Root Architecture. Science **279**: 407–410.

Zhang, J.Y., He, S.B., Li, L., and Yang, H.Q. (2014). Auxin inhibits stomatal development through MONOPTEROS repression of a mobile peptide gene STOMAGEN in mesophyll. Proc. Natl. Acad. Sci. **111**: E3015–E3023.

Zhang, W., Swarup, R., Bennett, M., Schaller, G.E., and Kieber, J.J. (2013). Cytokinin induces cell division in the quiescent center of the arabidopsis root apical meristem. Curr. Biol. **23**: 1979–1989.

Zhu, Y., Wang, Y., Li, R., Song, X., Wang, Q., Huang, S., Jin, J.B., Liu, C.M., and Lin, J. (2010). Analysis of interactions among the CLAVATA3 receptors reveals a direct interaction between CLAVATA2 and CORYNE in Arabidopsis. Plant J. **61**: 223–233.

ÉCOLE DOCTORALE
Sciences du végétal : du gène à l'écosystème (SdV)

Titre : Intégration de signaux peptidiques et hormonaux régulant l'architecture du système racinaire des légumineuses

Mots clés : nodosité, racine, symbiose, développement, peptide, signalisation

Résumé : Les légumineuses adaptent l'architecture de leur système racinaire aux conditions environnementales en modifiant la croissance et le nombre de leurs racines latérales mais aussi en développant des nodosités fixatrices d'azote en condition de carence azotée et en présence de bactéries symbiotiques (rhizobia). Des voies de régulation systémique impliquant des peptides de signalisation perçus par des récepteurs kinases permettent la coordination du développement de ces organes racinaires en fonction de la disponibilité en azote dans le sol et des besoins de la plante. Les objectifs de cette thèse était d'une part d'identifier quel signal peptidique agit via l'un de ces récepteurs, appelé CRA2, pour induire la nodulation et réprimer la formation des racines latérales ; et d'autre part de déterminer comment cette voie s'intègre avec d'autres voies de signalisation régulant l'architecture racinaire, ie (i) la voie systémique impliquant des peptides de signalisation CLE et le récepteur SUNN régulant négativement la nodulation et (ii) la voie des phytohormones cytokinines régulant l'architecture racinaire de manière similaire à CRA2 .Nous avons montré que le récepteur CRA2 est requis pour l'action du peptide de signalisation MtCEP1, et que les deux voies systémiques régulant de manière antagoniste la nodulation agissaient de manière indépendante Enfin, nous avons montré que le gène *MtCEP7*, induit par rhizobium et les cytokinines, favorise les infections rhizobiennes, et sa production est coordonnée avec celle d'un peptide CLE régulant négativement la nodulation, via les cytokinines et le facteur de transcription NIN.

Title : Integration of peptidic and hormonal signals regulating Legume root architecture.

Keywords : nodule, root, symbiosis, development, peptide, signaling

Abstract : Legumes adapt their root architecture to environmental conditions by modifying the growth and number of their lateral roots, but also by developing nitrogen-fixing nodules in nitrogen-deficient conditions and in the presence of symbiotic bacteria (rhizobia). Systemic regulatory pathways involving signaling peptides perceived by receptors kinase allow the coordination of the development of these root organs according to the availability of nitrogen in the soil and the needs of the plant. The objectives of this thesis were, on the one hand, to identify which peptide signal acts via one of these receptors, namely CRA2, to induce nodulation and suppress the formation of lateral roots; and secondly to determine how this pathway integrates with other signaling pathways regulating the root architecture, ie (i) the systemic pathway involving CLE signaling peptides and the SUNN receptor negatively regulating nodulation and (ii) the pathway of cytokinin phytohormones regulating root architecture similarly to CRA2. We have shown that the CRA2 receptor is required for the action of the signaling peptide MtCEP1, and that the two systemic pathways antagonistically regulating nodulation act independently. Finally, we have shown that the MtCEP7 gene, induced by rhizobium and cytokinins, promotes rhizobial infections, and its production is coordinated with that of a CLE peptide that negatively regulates nodulation, via cytokinins and the NIN transcription factor.

Université Paris-Saclay
Espace Technologique / Immeuble Discovery
Route de l'Orme aux Merisiers RD 128 / 91190 Saint-Aubin, France