



HAL
open science

Rôle de peptides antimicrobiens de la famille des “ non-specific lipid transfer proteins ” dans la symbiose actinorhizienne

Mélanie Gasser

► **To cite this version:**

Mélanie Gasser. Rôle de peptides antimicrobiens de la famille des “ non-specific lipid transfer proteins ” dans la symbiose actinorhizienne. Microbiologie et Parasitologie. Université de Lyon, 2022. Français. NNT : 2022LYSE1085 . tel-04120966

HAL Id: tel-04120966

<https://theses.hal.science/tel-04120966>

Submitted on 7 Jun 2023

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

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



N°d'ordre NNT : 2022LYSE1085

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 341
Evolution Ecosystèmes Microbiologie Modélisation

Spécialité de doctorat : Microbiologie

Soutenue publiquement le 22/06/2022, par :
Mélanie GASSER

**Rôle de peptides antimicrobiens de la
famille des « non-specific lipid transfer
proteins » dans la symbiose
actinorhizienne**

Devant le jury composé de :

LANDON Céline	Chargée de recherche, CNRS Orléans	Rapporteur
FRENDO Pierre	Professeur des Universités, Université Cote d'azur	Rapporteur
RIGALI Sébastien	Maitre de recherche FRS-FNRS, Université de Liège	Rapporteur
CONDEMINÉ Guy	Directeur de Recherche, CNRS Lyon	Examineur
WISNIEWSKI Florence	Professeure des Universités, Université Lyon	Présidente
BOUBAKRI Hasna	Maître de conférences, Université Lyon	Directrice

REMERCIEMENTS

C'est avec émotion que j'écris ces quelques lignes de remerciements à tout ceux et celles qui ont participé de près ou de loin à cette fabuleuse expérience.

Je remercie les membres du jury, Céline Landon, Pierre Frenedo, Sébastien Rigali, Guy Condemine et Florence Wisniewski d'avoir accepté d'évaluer mon travail. Je remercie également les membres de mon comité de suivi de thèse, Alexandre Soulard, Benoit Alunni, Ludovic Vial et Natacha Kremer pour ces deux comités enrichissants et constructifs.

Je tiens à remercier ma directrice de thèse, Hasna Boubakri. J'ai beaucoup appris pendant ces quatre années scientifiquement et personnellement. Merci de toujours avoir été toujours disponible, de m'avoir accordé autant de confiance et d'autonomie aussi bien en master qu'en thèse pour toutes ces réflexions scientifiques, ta bienveillance et ton dynamisme qui m'ont toujours motivé. Je n'aurais pas pu avoir meilleur encadrement, merci.

Je souhaite également remercier les personnes avec qui j'ai collaboré pour ces travaux. Merci à Philippe Bulet, Pedro Da Silva pour votre aide et vos conseils sur la purification des peptides. Je remercie aussi Séverine Balmand de m'avoir formé à la microscopie avec tant de pédagogie. Merci à Jean Keller pour ce que tu as apporté sur ces analyses bioinfo et de m'avoir formé.

Je souhaite également remercier Ons Kharrat pour tout le travail que tu as fourni sur ce sujet, ce fut un plaisir d'échanger et de travailler avec toi.

Je remercie également les membres de l'équipe, Pascale Fournier, Mathilde Vincent, Philippe Normand, Pierre Pujic, Nicole Alloisio, Aude Herrera-Belaroussi, Sandra Kim Tiam, Anne-Emmanuelle Hay de Bettignies, de m'avoir aussi bien accueilli et de leur bienveillance. Merci à Philippe et Pierre d'avoir toujours été à l'écoute pour répondre à mes questions, vos corrections et pour tous vos conseils scientifiques et techniques avisés. Merci à Aude pour tes relectures, tes conseils et ton soutien. Je remercie particulièrement Pascale pour toute l'aide précieuse que tu m'as apporté, tes délicieux clafoutis, de m'avoir appris autant d'expression, j'en reste encore comme deux ronds de flan (ma préférée) et pour toutes nos discussions qui vont fortement me manquer.

Je remercie également les personnes de l'équipe BEER pour cette année de cohabitation de bureau. J'ai apprécié nos discussions, des plus sérieuses au plus farfelues. Merci également à Charline, je te souhaite beaucoup de bonheur avec ta petite Liana.

Je souhaite également remercier toutes les personnes du laboratoire, passées et présentes, qui m'ont aidé et soutenu.

Merci à Tiffany pour toutes ces années depuis le master, j'espère qu'on aura la chance de travailler dans le même labo un jour, il nous reste encore des tests en gélose à faire. Merci à Amandine et Mathilde, pour tous ces moments autour d'une bière et pour tout le reste qui serait bien trop long à lister.

Je souhaite remercier ma famille et plus particulièrement ma mamie. Je remercie également mes amis et toutes les personnes qui me sont chères. Enfin, Gaël, merci d'avoir toujours cru en moi et pour ton soutien sans faille.

RESUME

Les plantes actinorhiziennes regroupent 8 familles de plantes appartenant aux ordres des Fagales, Cucurbitales et Rosales réunissant près de 220 espèces. Parmi ces familles, le genre *Alnus* regroupe 30 espèces dont l'espèce européenne *Alnus glutinosa* (Aulne glutineux) capable de coloniser les biotopes pauvres en azote grâce à sa capacité à établir des symbioses avec des actinobactéries filamenteuses fixatrices d'azote du genre *Frankia*. La reconnaissance entre les deux partenaires initie un programme symbiotique au niveau des racines aboutissant à la formation d'un nouvel organe, la nodosité, dédiée aux échanges trophiques. Au sein de cette nodosité, l'actinobactérie fixe l'azote atmosphérique grâce à des cellules différenciées en diazovésicules et fournit ainsi des composés azotés à la plante qui en échange transfère des composés carbonés dérivés de son activité photosynthétique. La reconnaissance, l'entrée et le maintien de la bactérie dans la nodosité nécessitent une coordination fine de la part des deux partenaires qui est régie grâce à la mise en place d'un dialogue moléculaire. Les mécanismes moléculaires impliqués sont encore peu connus étant donné que les modifications par génie génétique de la bactérie *Frankia* sont encore à développer. Malgré cela, des études physiologiques, et transcriptomiques sur des pré-nodules et des nodosités ont permis d'élucider certains mécanismes comme la présence d'une voie de signalisation commune aux symbioses, appelée voie SYM (Symbiotic signalling pathway). En effet, elle est décrite également chez les légumineuses en association avec les rhizobia et chez les plantes en association avec les champignons mycorhiziens.

Les données transcriptomiques d'*A. glutinosa*, obtenus avec des puces ciblant 13000 gènes transcrits de la plante (EST : Expressed sequence tag), ont permis d'identifier que parmi les gènes surexprimés dans les étapes précoces de la symbiose, 80% codent des peptides sécrétés. Parmi ces peptides, certains sont qualifiés de peptides antimicrobien (AMPs) et sont décrits dans la littérature comme jouant un rôle dans l'immunité innée de la plante face à des microorganismes pathogènes. Cependant, les AMPs ont aussi été décrits comme jouant un rôle crucial durant la symbiose. En effet, il a déjà été montré que des AMPs de la famille des défensines, produites par *A. glutinosa* contrôlent le symbiote dans la nodosité. Parmi celles-ci, AgDef5, cible le symbiote au niveau des diazovésicules fixatrices d'azote

dans les cellules végétales infectées de la nodosité et permettrait d'améliorer les échanges trophiques entre les deux partenaires.

Dans ces données transcriptomiques, des gènes codant une deuxième famille d'AMPs, des « non-specific lipid transfert protein » (nsLTPs), sont également surexprimés. Ces peptides possèdent 4 ponts disulfures qui conduisent à la formation d'une cavité hydrophobe permettant de transférer des lipides. Le rôle biologique des nsLTPs reste très peu connu bien qu'elles interviennent dans de nombreux processus biologiques tels que la résistance au stress, à la reproduction, la formation du tube pollinique, le développement et la germination des graines, la formation de cuticule, les défenses de la plante face à des attaques de pathogènes, ou les symbioses fixatrices d'azote impliquant les légumineuses et les rhizobia. L'un de ces gènes, *agltp24*, est le plus surexprimé dans les étapes précoces suite à la colonisation par la bactérie symbiotique mais aussi dans la nodosité ce qui suggère un rôle important de cet AMP de la mise en place au maintien de la symbiose.

Ces travaux de thèse ont pour but d'étudier le rôle des nsLTPs dans la symbiose entre *A. glutinosa* et la bactérie *Frankia alni* ACN14a. La première partie avait pour but de localiser AgLTP24 dans les tissus végétaux à différents stades de la symbiose et de déterminer ses effets physiologiques sur le symbiote bactérien *Frankia* afin d'identifier de possibles fonctions biologiques. La deuxième partie de ces travaux s'est focalisée sur la réponse moléculaire du symbiote face à AgLTP24. Plus largement, étant donné que le rôle des nsLTPs dans les symbioses fixatrices d'azote reste encore très peu décrit, l'identification de ces peptides chez des plantes nodulantes et non nodulantes a été menée en vue de déterminer leurs distributions et leurs histoires évolutives au sein des symbioses fixatrices d'azote.

ABSTRACT

The actinorhizal plants include 8 families of plants belonging to the orders of Fagales, Cucurbitales and Rosales gathering nearly 220 species. Among these families, the genus *Alnus* includes 30 species including the European species *Alnus glutinosa* (Black Alder) able to colonize nitrogen-poor biotopes thanks to its ability to establish symbioses with filamentous nitrogen-fixing actinobacteria of the genus *Frankia*. The recognition between the two partners initiates a symbiotic program at the root level leading to the formation of a new organ, the nodule, dedicated to trophic exchanges between the two partners. Within this nodule, the actinobacterium fixes atmospheric nitrogen through cells differentiated into vesicles and thus provides nitrogenous compounds to the plant which in exchange transfers carbon compounds derived from its photosynthetic activity. The recognition, entry and maintenance of the bacterium in the nodule require a fine coordination on the part of the two partners which governs through the establishment of a molecular dialogue. The molecular mechanisms involved are still poorly understood, as genetic engineering modifications of the *Frankia* bacterium have yet to be developed. Nevertheless, physiological and transcriptomic studies on pre-nodules and nodules have allowed to elucidate several mechanisms such as a symbiotic signalling pathway. Indeed, it is also described in legumes in association with rhizobia and in plants in association with mycorrhizal fungi.

These transcriptomic data from *A. glutinosa*, obtained with microarrays targeting 13000 transcribed genes of the plant (EST: Expressed sequence tag), allowed to identify that among genes overexpressed at the early stages of symbiosis, 80% encode secreted peptides. Among these peptides, some are qualified as antimicrobial peptides (AMPs) which are described in the literature as playing a role in the innate immunity towards plant to pathogenic microorganisms. However, AMPs have also been described as playing a crucial role during symbiosis. Indeed, it has already been shown that AMPs of the defensin family, produced by *A. glutinosa* control the symbiont in the nodule. Among these secreted defensins, AgDef5, targets the symbiont at the level of the nitrogen-fixing vesicles in the infected plant cells of the nodule and would improve trophic exchanges between the two partners.

In these transcriptomic data, genes encoding a second family of AMPs, the non-specific lipid transfer proteins (nsLTPs), are also overexpressed. These peptides have 4 disulfide bridges that lead to the formation of a hydrophobic cavity allowing lipids transfer. The biological role of nsLTPs is still poorly described although they are involved in several biological processes such as stress resistance, reproduction, pollen tube formation, seed germination, cuticle formation, plant defense against pathogen attacks, or symbiosis between legumes and rhizobia. One of these genes, *agltp24*, is the most overexpressed at the early stage following colonization by the symbiotic bacteria but also in the nodule, which suggests an important role of this AMP in the establishment and the maintenance of the symbiosis.

The aim of this thesis work was to study the role the nsLTP, AgLTP24 in the symbiosis between *A. glutinosa* and the bacterium *Frankia alni ACN14a*. The first part aimed to localize AgLTP24 in plant tissues at different stages of the symbiosis and to determine its physiological effects on the bacterial symbiont *Frankia* to identify possible biological functions. The second part of this work focused on the molecular response of the symbiont to AgLTP24. More broadly, since the role of nsLTPs in nitrogen-fixing symbioses is still poorly described, the identification of these peptides in nodulating and non-nodulating plants was conducted to determine their distribution and their evolutionary history in nitrogen-fixing symbioses.

LABORATOIRE DE RATTACHEMENT

Laboratoire d'Ecologie Microbienne

UMR5557, UCBL, INRAE 1418, VetAgroSup

43 Boulevard du 11 Novembre 1918,

69622 Villeurbanne

SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES	13
LISTE DES TABLEAUX	15
LISTE DES ABBREVIATIONS.....	17
INTRODUCTION	19
I. La fixation d'azote	21
1. Origine des organismes fixateurs d'azote et de la nitrogénase	21
2. Symbioses fixatrices d'azote	23
A. Les symbioses fixatrices d'azote.....	24
B. Histoire évolutive des symbioses fixatrices d'azote	25
II. Symbioses actinorhiziennes	27
1. Plantes actinorhiziennes	27
2. <i>Frankia</i>	29
A. Taxonomie.....	29
B. Sporulation <i>in planta</i>	32
C. Limitations du modèle <i>Frankia</i>	34
3. Processus symbiotique : de la reconnaissance à l'initiation de la symbiose	36
A. Flavonoïdes et facteur symbiotique	36
B. Voie commune de la symbiose.....	39
C. Modèle d'infection	41
4. Structure et fonctionnement de la nodosité	43
A. Mécanismes de protection de la nitrogénase <i>in planta</i>	43
B. Nodosité et métabolisme de l'azote	45
III. Peptides antimicrobiens et symbioses fixatrices d'azote.....	47
1. Les peptides antimicrobiens.....	47
2. Les peptides antimicrobiens de plante	49
A. Les Défensines	49
B. Les « non-specific lipid transfer protein »	50
3. Rôles des peptides antimicrobiens dans les symbioses fixatrices d'azote	52
A. Peptides antimicrobiens et légumineuses.	52
Rôle des « Nodule Cystein Rich peptide »	52
Rôle des nsLTPs.....	55

B. Peptides antimicrobiens et plantes actinorhiziennes	58
Rôle des Défensines	58
IV. Objectifs de thèse	61
TRAVAUX DE RECHERCHE	63
Chapitre 1 - Symbiose entre <i>Alnus glutinosa</i> et <i>Frankia alni ACN14a</i> : une nsLTP impliquée de l'infection à la nodulation	65
Preamble	65
Article : A non-specific Lipid Transfer Protein with potential functions in infection and nodulation	67
Chapitre 2 - NsLTPs et symbioses fixatrices d'azote : Distribution, evolution et effet d'AgLTP24 sur le transcriptome de <i>Frankia alni ACN14a</i>	101
Preamble	101
Article : NsLTP and nitrogen fixing symbiosis: distribution, evolution and sub-inhibitory effects of AgLTP24 on the transcriptome of the actinorhizal symbiont <i>Frankia alni ACN14a</i>	103
DISCUSSION PERSPECTIVES	131
I. Rôle biologique d'AgLTP24 lors de la symbiose entre <i>Alnus glutinosa</i> et <i>Frankia alni ACN14a</i>	133
II. Identification des AMPs impliqués dans les symbioses fixatrices d'azote	141
BIBLIOGRAPHIE	143
ANNEXES	161

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION

Figure 1 : Structure de la nitrogénase.....	22
Figure 2 : Evolution de la Mo-nitrogénase selon deux scénarios.....	23
Figure 3 : Représentation schématique des symbioses fixatrices d'azote.....	24
Figure 4 : Evolution des symbioses fixatrices d'azote selon deux scénarios.....	26
Figure 5 : Arbre phylogénétique des bactéries du genre <i>Frankia</i>	30
Figure 6 : Observations microscopique de <i>Frankia</i>	32
Figure 7 : Sporulation <i>in planta</i> : nodosités d' <i>Alnus glutinosa</i> de phénotype Sp+ et Sp-.....	33
Figure 8 : Schéma des mécanismes moléculaire mis en place lors des premières étapes des symbioses fixatrices d'azote.....	37
Figure 9 : Gènes impliqués dans l'initiation de la nodulation chez différentes plantes actinorhiziennes.....	40
Figure 10 : Modèles d'infection chez les plantes actinorhiziennes.....	41
Figure 11 : Schéma d'organisation des tissus infectés dans des nodosités de Cucurbitales Fagales et Rosales.....	42
Figure 12 : Diazovésicules de <i>Frankia</i> et hopanoïdes.....	44
Figure 13 : Modèle simplifié permettant d'expliquer la gestion de l'azote chez <i>D. glomerata</i> et <i>A. glutinosa</i>	46
Figure 14 : Représentation schématique des cibles des AMPs.....	48
Figure 15 : Motifs conservés caractéristiques des différentes classes d'AMPs de plante.....	49
Figure 16 : Structure 3D de la défensine NaD1 de <i>Nicotiana glauca</i>	50
Figure 17 : Structure 3D de la nsLTP de blé, TaLTP1.1.....	51
Figure 18 : Motifs caractéristiques des NCRs.....	53
Figure 19 : Localisation Ase246 dans les tissus végétaux lors de la nodulation.....	56
Figure 20 : Localisation d'Ase246 dans la nodosité d' <i>A. sinicus</i>	57
Figure 21 : Localisation d'AgDef5 dans la nodosité d' <i>A. glutinosa</i>	59

CHAPITRE 1

Figure 1: Gene Ontology (GO) functional classification analysis.....	72
Figure 2: Expression levels of the genes which were commonly up- and down-regulated in <i>F mDyn</i> and <i>F supC</i> conditions.....	76
Figure 3: AgLTP24 localization.....	78
Figure 4: Alignment of AgLTP24 with nsLTPs and physiological bioassays on <i>Frankia alni</i> ACN14a growth and cellular development.....	80
Figure 5: Effect of AgLTP24 in physiology of <i>Frankia alni</i> ACN14a.....	81

CHAPITRE 2

Figure 1: Phylogenetic tree representing nsLTPs evolution in nitrogen fixing symbiosis....	112
Figure 2: Gene encoding nsLTPs differential expression at nodule stage.....	113

DISCUSSION PERSPECTIVES

Figure 1 : Rôles biologiques possibles d'AgLTP24 lors de la symbiose.....	138
Figure 2 : Transformation d' <i>Alnus glutinosa</i>	139

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION

Tableau 1 : Ordres, familles, genres et nombre d'espèces de plantes actinorhiziennes.....28

Tableau 2 : Souches de *Frankia* séquencées..... 31

CHAPITRE 1

Table 1: The up-regulated genes during early root hair deformation of *Alnus glutinosa* in both bioassays, with *Frankia alni* ACN14a in membrane dynamic contact (F mDyn) or with *F. alni* ACN14a supernatant contact (F supC)..... 75

CHAPITRE 2

Table 1: *Frankia alni* ACN14a overexpressed gene in N-replete condition supplemented with AgLTP24 versus N-replete conditions..... 107

Table 2: *Frankia alni* ACN14a underexpressed gene in N-replete condition supplemented with AgLTP24 versus N-replete conditions..... 109

Table 3: nsLTPs characteristics..... 110

LISTE DES ABBREVIATIONS

8CM	Motif conservé de 8 cystéine 8 cystéin motif	IPTG	Isopropyl β -D-1- thiogalactopyranoside
ABC	ATP Binding Cassette	IRA	Iodonitrotetrazolium/formazan respiratory activity
ADN	Acide Deoxyribonucléique	IRLC	Inverted Repeat Lacking Clade
AMP	Peptide antimicrobien Antimicrobial peptide	IT	Infection thread
ARA	Acetylene Reduction Assay	LCOs	Lipochoitooligossacharides
Arg	Arginine	MET	Microscopie électronique à transmission
ARN	Acide Ribonucléique	MLSA	Multi-Locus Sequence Analysis
ATP	Adenosyl Triphosphate	Mo	Molybdène
CCaMK	Ca ²⁺ /Calmodulin-dependent protein Kinase	Pb	Paire de base
Cit	Citrulline	N₂	Diazote
CO₂	Dioxyde de Carbone	NCR	Nodule Cystein Rich peptide
CSSP	Common symbiotic signaling pathway	NF	Nod Factor
Da	Dalton	NH₄	Ammonium
DAPI	4,6-diamidino-2-phenylindole	NIN	Nodule inception protein
DGDG	Digalactosyldiacylglycerole	nsLTP	Non-specific lipid transfer protein
dpi	Jours post inoculation Day post inoculation	O₂	Dioxygène
ESI	Electrospray ionization source	OD	Densité optique
EST	Expressed sequence tag	PGPR	Plant growth-promoting rhizobacteria
FC	Fold Change	PR	Pathogenesis-related
Gln	Glutamine	RHDF	Root hair deforming factor
Glu	Glutamate	RNF	Root nodule nitrogen fixation
GO	Gene Ontology	ROS	Reactive Oxygen Species
GOGAT	Glutamine Oxoglutarate aminotransferase	RT	Reverse transcription
GS	Glutamine Synthétase	SYM	Symbiotic signalling pathway
		UV	Ultra-Violet

INTRODUCTION

I. La fixation d'azote

1. Origine des organismes fixateurs d'azote et de la nitrogénase

L'azote, nécessaire à la formation des acides aminés, des protéines, de l'ADN et de l'ARN et de nombreux autres métabolites, est un élément chimique primordial pour la vie sur terre. Cet élément composant 78% de l'atmosphère est retrouvé majoritairement sous sa forme la plus stable, le diazote (N_2), qui est une forme inorganique inerte (Zerkle et al. 2017). Malgré son abondance, peu d'organismes sont capables d'utiliser directement le diazote. En effet, pour la majorité des organismes, le diazote doit être fixé puis transformé pour produire par exemple du nitrate (NO_3^-) ou de l'ammonium (NH_4^+), qui sont assimilables (Navarro-González et al. 2001). La capacité de fixer l'azote atmosphérique est retrouvée uniquement chez quelques bactéries et archées (Raymond et al. 2004). Il existe deux types de bactéries diazotrophes, les libres et les symbiotiques en association avec des plantes. Ces bactéries sont capables de fixer l'azote atmosphérique grâce à un complexe enzymatique sensible à l'oxygène, appelé nitrogénase qui catalyse la réduction du diazote en ammonium. Cette réaction est très coûteuse en énergie car elle nécessite l'apport de 16 ATP (Hu et al. 2015). Il existe différentes nitrogénases variant selon leur cofacteur : le molybdène (Mo), le vanadium ou le fer codées respectivement par les gènes *nif*, *vnf* et *anf* (Hu et al. 2015). La forme la plus commune et la plus ancienne est la Mo-nitrogénase (Nif) qui est formée de deux métalloprotéines : la dinitrogénase et la dinitrogénase réductase (Figure 1) (Hu et al. 2015). La protéine fer (Fe) ou dinitrogénase réductase est un homodimère codé par le gène *nifH*. La protéine molybdène fer (MoFe) ou dinitrogénase est un hétérotétramère composé de deux sous unités α et de deux sous unités β codées respectivement par les gènes *nifD* et *nifK*. Cette protéine contient deux types de cluster, le cluster P qui se situe entre les sous unités α et β , et un cluster FeMo-co, permettant la réduction du substrat, qui se situe dans chaque sous unité α .

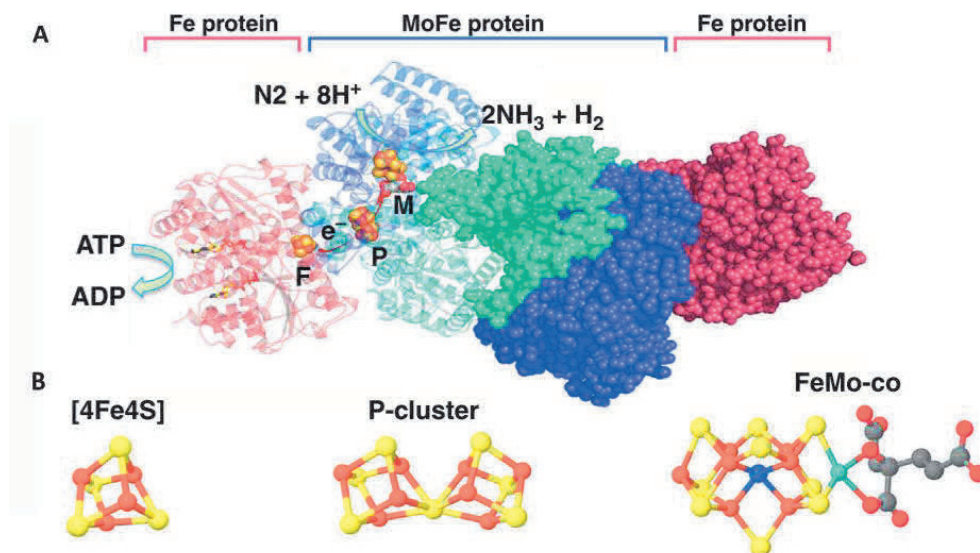


Figure 1 : Structure de la nitrogénase

(A) Structure du complexe enzymatique de la nitrogénase avec les compartiments protéique Fe et MoFe. Métalloprotéines : F, [4Fe4S] ; P, P cluster ; M, FeMo-co. (B) Structure des trois métallopoteines de la nitrogénase. Source : (Oldroyd et al. 2014).

Dans les premières périodes géologiques, à l'Archéen (4 à 2,5 milliards d'années), le diazote aurait été fixé en azote organique, par des processus abiotiques tels que la foudre, qui fournirait assez d'énergie pour rompre la triple liaison entre les deux atomes d'azote présents dans le diazote (Navarro-González et al. 2001). Cependant, l'azote organique serait devenu une ressource rare limitant leur expansion (Navarro-González et al. 2001, Stüeken et al. 2015). Cet appauvrissement aurait exercé une pression de sélection qui aurait conduit à l'émergence d'organismes capables de fixer l'azote atmosphérique en ammonium grâce à la nitrogénase (Raymond et al. 2004). Lors de leur émergence, l'atmosphère aurait été majoritairement composée de CO_2 , ce qui suppose que ces premiers organismes étaient des anaérobies stricts (Navarro-González et al. 2001, Stüeken et al. 2015). Cette hypothèse est soutenue par le fait que la nitrogénase actuelle est fonctionnelle uniquement dans des conditions anaérobies. La date d'apparition de la nitrogénase est un sujet à controverse dans la communauté scientifique. En effet, certaines études datent son apparition au début du Paléoprotérozoïque, il y a 2,2 milliards d'années (Navarro-González et al. 2001), période marquée par la baisse du taux de CO_2 dans l'atmosphère et par la hausse du taux d' O_2 suite à l'émergence de la photosynthèse chez les microorganismes (Zerkle et al. 2017) (Figure 2). L'augmentation de l'oxygène atmosphérique aurait donc permis l'augmentation de la disponibilité du molybdène (Mo), insoluble dans des conditions anoxiques, d'être disponible dans les océans (Boyd et al.

2011b) et aurait ainsi menée à l'émergence de la nitrogénase dépendante du molybdène chez des organismes méthanogènes anoxiques. La capacité à fixer l'azote aurait ensuite été transmise aux bactéries par transfert horizontal de gènes (Boyd et al. 2011a). D'autres études datent son apparition au milieu de la période Archéenne, il y a 3,2 milliards d'années et soutiennent que l'azote fixé de façon abiotique, à cette période, n'était pas suffisant pour répondre aux besoins des premiers organismes (Figure 2). De ce fait, pour répondre à la demande croissante en azote, les organismes fixateurs d'azote auraient évolué à partir d'un ancêtre commun il y a 3,2 milliards d'années (Schoepp-Cothenet et al. 2012, Stüeken et al. 2015).

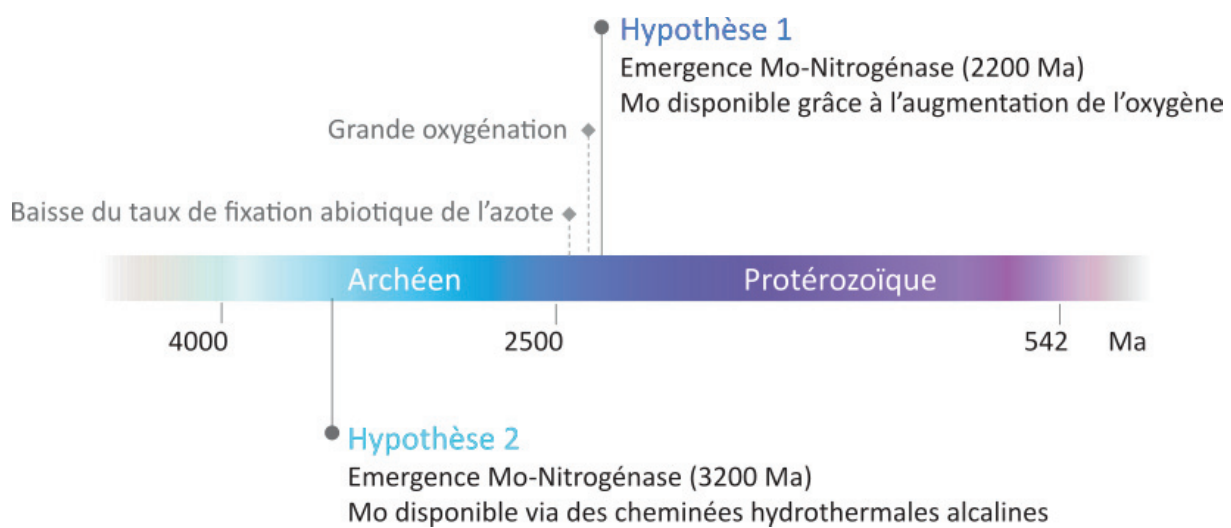


Figure 2 : Evolution de la Mo-nitrogénase selon deux scénarios

2. Symbioses fixatrices d'azote

Depuis 460 à 470 millions d'années (Martin et al. 2017) les plantes ont commencé à coloniser les continents et ont co-évolué avec divers microorganismes permettant le développement de nombreuses interactions plantes-bactéries. Une grande diversité de bactéries fixatrices d'azote sont présentes dans les sols et sont capables d'interagir avec les plantes au niveau de la rhizosphère qui est le sol immédiatement au contact des racines sous influence de la plante (concept décrit pour la première fois par Hiltner en 1901). Parmi ces bactéries, certaines sont caractérisées de PGPR pour « plant growth-promoting rhizobacteria », jouant un rôle important en permettant la stimulation de la croissance de la plante et en la protection contre certaines maladies (Franche et al. 2009). Deux types d'association ont été décrites entre les bactéries fixatrices d'azote et les plantes ; les diazotrophes libres ou endophytes et les

symbiotiques fixatrices d'azote qui forment une nodosité au sein des racines de la plante lors de l'interaction. Dans cette synthèse bibliographique nous allons nous concentrer sur les symbioses fixatrices d'azote.

A. Les symbioses fixatrices d'azote

"La symbiose est la cohabitation d'organismes différents" selon Bary (De Bary 1879), ce qui englobe les interactions étroites et souvent à long terme entre espèces différentes. Certaines de ces relations peuvent être mutualistes c'est-à-dire avantageuses pour les deux partenaires ou elles peuvent être de nature parasitique lorsque que l'un des partenaires exploite un ou plusieurs partenaire(s). De plus, certaines associations symbiotiques peuvent être des associations mutualistes et nuisibles de différents partenaires en même temps.

Les plantes sont capables d'établir différentes symbioses avec des microorganismes différents. Parmi les espèces végétales, 90% sont capables de s'associer avec des champignons mycorhiziens formant ainsi les symbioses mycorhiziennes, considérées comme les plus anciennes, qui seraient apparues il y a 443-470 millions d'années (Martin et al. 2017). Les symbioses fixatrices d'azotes quant à elles impliquent les bactéries diazotrophes du genre *Frankia* et les rhizobia. L'association entre les plantes et ces deux genres de diazotrophes conduit à la formation d'un organe spécialisé au sein des racines, appelé nodosité (Figure 3).

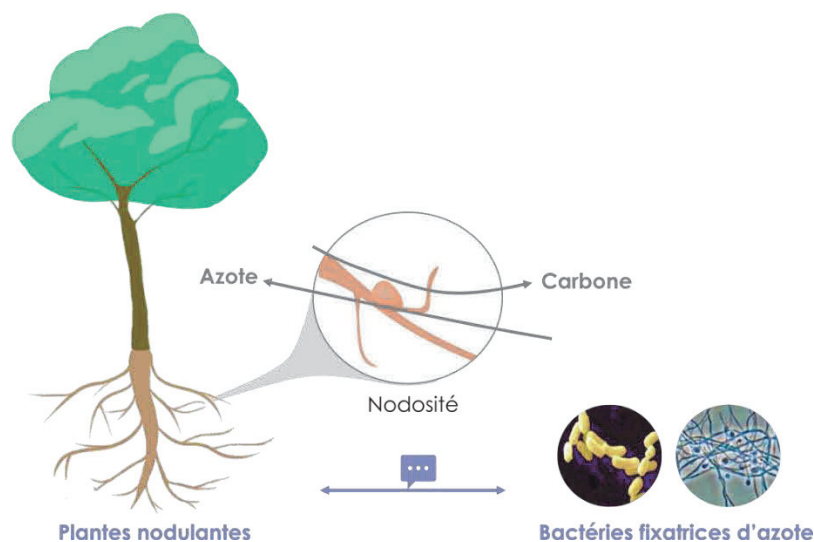


Figure 3 : Représentation schématique des symbioses fixatrices d'azote

Cette nodosité héberge la bactérie de manière endophyte et offre un environnement propice aux échanges trophiques. En effet, le symbiote capable de fixer l'azote atmosphérique dans la nodosité transfère à la plante des composés azotés qui en échange lui fournit des photosynthétats (Berry et al. 2011). Les rhizobia s'associent avec des plantes légumineuses appartenant à l'ordre des Fabales et au genre *Parasponia* appartenant à l'ordre des Rosales. Les *Frankia* ont un spectre d'hôte plus large et s'associent avec des plantes appartenant aux ordres des Fagales, Cucurbitales et Rosales. Seules les espèces appartenant à ces 4 ordres de plantes, appelées plantes nodulantes, ont la capacité d'établir une symbiose via la formation d'une nodosité avec des symbiotes diazotrophes et font parties du « root nodule nitrogen fixing » clade (RNF clade).

B. Histoire évolutive des symbioses fixatrices d'azote

Parmi les plantes appartenant au clade RNF certaines sont dites nodulantes comme vu précédemment et d'autres sont dites non nodulantes car elles ne sont pas capables d'établir des symbioses fixatrices d'azote. L'histoire évolutive de ce clade RNF est depuis longtemps étudiée. Au sein de la communauté scientifique deux hypothèses ont été émises concernant l'histoire évolutive des symbioses fixatrices d'azote qui aurait mené à un clade contenant des plantes nodulantes et non nodulantes (Figure 4). La première, qui a longtemps été la plus soutenue, basée sur des études phylogénétiques, propose que la capacité des plantes à établir une symbiose aurait été acquise indépendamment par ces espèces de plantes et serait ainsi dû à une convergence de fonctions. L'ancêtre commun du clade RNF aurait acquis une prédisposition à établir une symbiose puis cette capacité aurait été acquise jusqu'à 16 fois de manière indépendante dans ces espèces végétales aboutissant à la distribution actuelle des plantes nodulantes (Werner et al. 2014). L'acquisition d'une prédisposition à la nodulation aurait eu lieu grâce au recrutement de la voie de signalisation présente dans les symbioses mycorhiziennes (Martin et al. 2017).

La deuxième hypothèse proposée concernant l'histoire évolutive des symbioses fixatrices d'azote semble actuellement être la plus soutenue. Dans ce scénario, l'acquisition de la capacité à établir une symbiose fixatrice d'azote aurait été acquise par un ancêtre commun au clade RNF. Cet évènement aurait été suivi d'une perte multiple et/ou des

pseudogénisations de gènes conduisant à une perte de cette capacité chez certaines espèces de clade RNF qui sont actuellement décrites comme non nodulantes. En effet, une étude récente a ravivé cette hypothèse en menant une étude phylogénétique avec des génomes d'espèces nodulantes et non nodulantes du RNF clade (Griesmann et al. 2018, Van Velzen et al. 2018). Grâce à cette étude, des signatures multiples d'évènements indépendants de perte de fonction de gène codant un régulateur clé de la symbiose, « Nodule Inception » (NIN), ont été identifiées dans des génomes d'espèces non nodulantes. Le scénario proposé par cette étude suggère qu'il y aurait eu au moins 8 pertes indépendantes de la symbiose dans le clade RNF. Ainsi, des pertes multiples se sont produites dans les différentes lignées de plantes. Cependant, il n'est pas exclu que certains mécanismes impliqués dans les symbioses fixatrices d'azote, chez les plantes nodulantes, aient été acquis de manière indépendante.

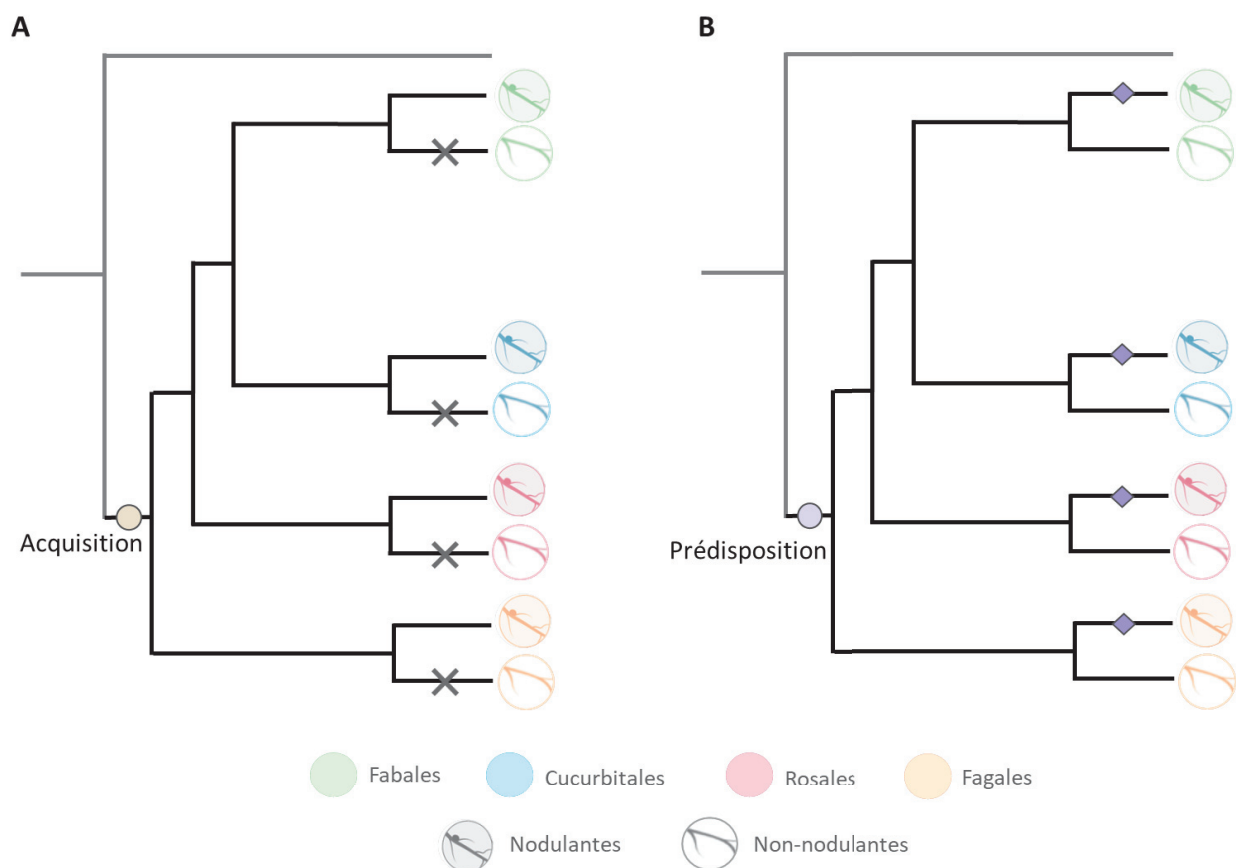


Figure 4 : Evolution des symbioses fixatrices d'azote selon deux scénarios

(A) Scénario basé sur une acquisition de la capacité à établir des symbioses par ancêtre commun suivi de pertes multiples au sein du clade. Les croix représentent les pertes de la capacité à établir des symbioses fixatrices d'azote. (B) Scénario basé sur l'acquisition d'une prédisposition à établir des symbioses par un ancêtre commun suivi de gains multiples, représentés par les losanges, à établir cette interaction au sein du clade.

II. Symbioses actinorhiziennes

1. Plantes actinorhiziennes

Parmi ces symbioses fixatrices d'azote, nous allons nous intéresser aux symbioses actinorhiziennes impliquant les plantes actinorhiziennes et les *Frankia*. Les plantes actinorhiziennes regroupent 25 genres distribués dans 8 familles de plantes (Tableau 1). Elles sont retrouvées sur tous les continents à l'exception de l'Antarctique (Schwintzer 2012), généralement dans les zones tempérées à l'exception des *Casuarinaceae* et des *Myricaceae* qui peuvent être retrouvés dans des zones tropicales (Schwintzer 2012). Certaines espèces d'*Alnus* et d'*Elaeagnus* ont également été retrouvées dans des zones tropicales mais sont localisées en altitude sous un climat tempéré (Schwencke et al. 2001). Les plantes actinorhiziennes sont considérées comme des plantes pionnières. En effet, grâce à leur association avec *Frankia* elles sont capables de coloniser des sols pauvres en azote. Ainsi, les sols s'enrichissent en azote et en matière organique permettant aux autres plantes de coloniser ces environnements (Schwencke et al. 2001). Certaines plantes actinorhiziennes sont capables de supporter des conditions environnementales extrêmes comme la salinité, la sécheresse ou encore les sols pollués par des métaux lourds (Ribeiro et al. 2011). Les espèces du genre *Casuarina* et *Alnus* sont les plus utilisées par l'homme pour la restauration de sols dédiés à l'agroforesterie, la stabilisation des dunes ou encore comme brise-vent (Dommergues 1997).

Tableau 1 : Ordre, familles, genres et nombre d'espèces de plantes actinorhiziennes

Source : Adapté de (Normand et al. 2019)

Ordre	Famille	Genre	Espèces	
Fagales	<i>Betulaceae</i>	<i>Alnus</i>	35	
	<i>Casuarinaceae</i>	<i>Allocasuarina</i>	58	
		<i>Gymnostoma</i>	12	
	<i>Myricaceae</i>	<i>Casuarina</i>	16	
		<i>Comptonia</i>	1	
		<i>Myrica</i>	4	
Cucurbitales	<i>Morella</i>	29		
	<i>Coriariaceae</i>	<i>Coriaria</i>	11	
	<i>Datisceae</i>	<i>Datisca</i>	2	
Rosales	<i>Eleagnaceae</i>	<i>Elaeagnus</i>	19	
		<i>Hippophaë</i>	7	
		<i>Shepherdia</i>	2	
	<i>Rhamnaceae</i>	<i>Ceanothus</i>	57	
		<i>Colletia</i>	5	
		<i>Discaria</i>	6	
		<i>Kentrothamnus</i>	1	
		<i>Trevoa</i>	1	
		<i>Rosaceae</i>	<i>Cercocarpus</i>	3
			<i>Chamaebatia</i>	1
<i>Dryas</i>	1			
	<i>Purshia</i>	2		

En plus de leur intérêt environnemental, les plantes actinorhiziennes peuvent avoir d'autres applications. En effet, les plantes du genre *Alnus* sont utilisées en médecine traditionnelle pour traiter diverses maladies, telles que le cancer, l'hépatite, les inflammations utérines, les rhumatismes, les maux de ventre (Sati et al. 2011). Parmi le genre *Alnus*, nous allons nous concentrer sur *Alnus glutinosa* qui est le modèle d'étude dans ce projet de thèse. Il s'avère que les extraits d'écorce d'*A. glutinosa* ont des effets antimicrobiens et antiparasitaires. En effet, ces extraits ont une activité antimicrobienne sur divers microorganismes testés comprenant des bactéries et des levures pathogènes de l'homme (Abedini et al. 2016). De plus, les triterpènes issus d'extraits d'écorce d'*A. glutinosa* ont des effets antiparasitaires en inhibant la croissance du protozoaire *Toxoplasma gondii*, un parasite responsable de la toxoplasmose (Darne et al. 2021, Darne et al. 2022). Les espèces d'aulne synthétisent de l'oregonine qui est un composé ayant des propriétés anti-oxydatives et anti-inflammatoires et inhibe l'adipogénèse. L'oregonine permet une réduction de l'accumulation des lipides, et

une réduction de l'inflammation et de la production de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) chez les macrophages humain (Lundqvist et al. 2015).

2. *Frankia*

A. Taxonomie

Les bactéries du genre *Frankia* sont des actinobactéries à Gram positif, filamenteuses avec un génome riche en GC (>70%). Grâce à des approches génomiques et phylogénétiques, les *Frankia* ont été regroupés en quatre groupes ou clusters (Figure 5). Le cluster 1 regroupe les souches symbiotiques de l'aulne, des myricas et du filao. Le cluster 2 regroupe des souches symbiotiques associées aux *Rosaceae*, *Cucurbitales* et aux *Ceanothus* (Pozzi et al. 2018). Les souches du cluster 2 sont décrites comme endophytes non cultivables car aucune condition de culture n'a été fructueuse pour les isoler à l'exception de la souche BMG5.1 qui a été cultivée dans des conditions alcaline (Gtari et al. 2015). Etant donné que ces souches sont non cultivables, il a été suggéré qu'il s'agirait de symbiotes obligatoires (Ghodhbane-Gtari et al. 2010, Persson et al. 2015). Dans le cluster 3 sont retrouvées des souches symbiotiques de *Elaeagnaceae*, *Rhamnaceae* et de *Gymnostoma* (Normand et al. 2009). Le cluster 4 comprend des souches non symbiotiques qui ont été isolées à partir de nodosités de différentes plantes actinorhiziennes telles que *Coriaria nepalensis*, *A. glutinosa* ou encore *Eleagnus umbellata* (Carlos-Shanley et al. 2021). Toutes les souches appartenant à ce cluster ne sont pas capables de fixer l'azote atmosphériques et sont saprophytiques. Certaines de ces souches ne sont pas capables de réinfecter la plante hôte ou d'autres plantes actinorhiziennes (Fix-/Nod-). D'autres sont capables d'infecter l'hôte comme la souche de *Frankia* Eul1c mais induisent de petites nodosités non fonctionnelles (Fix-/Nod+).

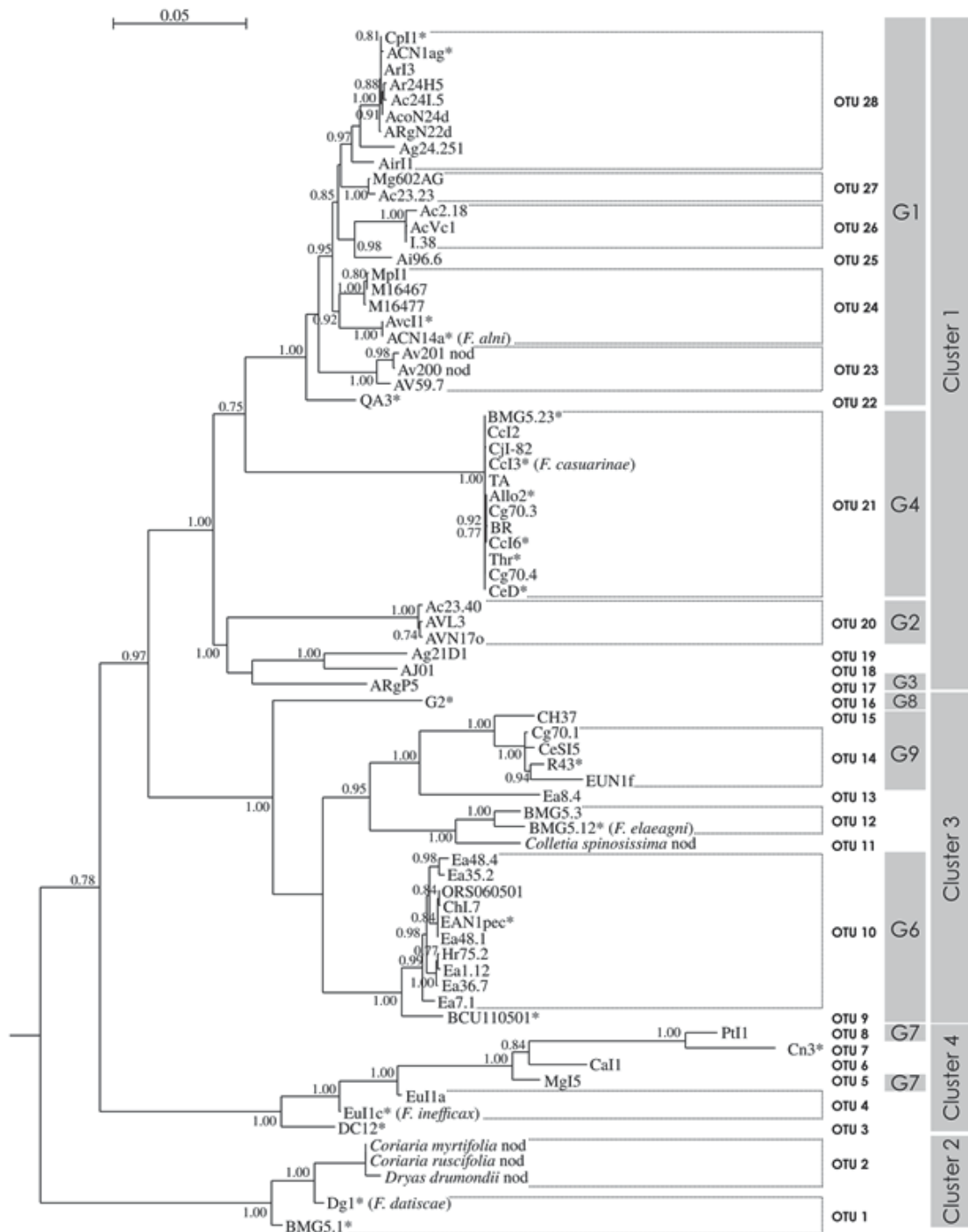


Figure 5 : Arbre phylogénétique des bactéries du genre *Frankia*

Arbre phylogénétique des bactéries du genre *Frankia* réalisé avec une approche MLSA (Multi-Locus Sequence Analysis) déduit de la concaténation de cinq gènes de ménage (*atpD*, *dnaA*, *ftsZ*, *pgk* et *rpoB*). Les indications G1 à G9 correspondent aux espèces génomiques délimitées par la méthode AFLP, précédemment nommées par Bautista et al. (2011) (Bautista et al. 2011). Les clusters et les groupes d'infection de l'hôte sont indiqués comme précédemment (Normand et al. 1996). (*) Souches séquencées extraites de GenBank de NCBI. Source : (Pozzi et al. 2018)

Ces souches de *Frankia* varient selon la taille de leurs génomes (Tableau 2). En effet, les souches appartenant au cluster 1 ont un génome de 4,9 (AgTrS) à 7,7 Mpb (Avcl1), les souches du cluster 2, de 5,3 (Dg1) à 7,6 Mpb (Cpl1T), les souches du cluster 3 de 6,6 (EI5c) à 10,45 Mpb (R43) et celles du cluster 4 de 6,8 (DC12) à 11,2 Mpb (BMG5.36).

Tableau 2 : Souches de *Frankia* séquencées

Source : Adapté et complété à partir de (Bogusz et al. 2020)

Cluster	Souche	Plante hôte	Génome (Mpb)	Reference
1	<i>Frankia torreyi</i> ACN1ag	<i>Alnus glutinosa</i>	7.5	Swanson et al., 2015a
1	Candidatus <i>Frankia nodulisporulans</i> AgTrS	<i>Alnus glutinosa</i>	4,9	Bethencourt et al, 2019
1	Candidatus <i>Frankia nodulisporulans</i> AgUmAS1	<i>Alnus glutinosa</i>	4,3	Herrera-Belaroussi et al, 2020
1	Candidatus <i>Frankia nodulisporulans</i> AgUmASH1	<i>Alnus glutinosa</i>	4,3	Herrera-Belaroussi et al, 2020
1	Candidatus <i>Frankia alpina</i> AiOr	<i>Alnus incana</i>	5,6	Bethencourt et al, 2019
1	Candidatus <i>Frankia alpina</i> AvVan	<i>Alnus viridis</i>	5	Bethencourt et al, 2019
1	<i>Frankia alni</i> ACN14a	<i>Alnus viridis subsp. crispa</i>	7.5	Normand et al., 2007b
1	<i>Frankia casuarinae</i> Allo2	<i>Allocasuarina verticillata</i>	5.3	Oshone et al., 2016
1	<i>Frankia alni</i> Avcl1	<i>Alnus viridis subsp. crispa</i>	7.7	Swanson et al., 2015b
1	<i>Frankia</i> sp. BMG5.23	<i>Casuarina glauca</i>	5.3	Ghodhbane-Gtari et al., 2014
1	<i>Frankia casuarinae</i> BR	<i>Casuarina equisetifolia</i>	5.2	D'Angelo et al., 2016b
1	<i>Frankia casuarinae</i> Ccl3	<i>Casuarina</i> sp.	5.4	Normand et al., 2007b
1	<i>Frankia casuarinae</i> Ccl6	<i>Casuarina cunninghamiana</i>	5.6	Mansour et al., 2014
1	<i>Frankia casuarinae</i> CeD	<i>Casuarina equisetifolia</i>	5.0	Ngom et al., 2016
1	<i>Frankia casuarinae</i> KB5	<i>Casuarina equisetifolia</i>	5.5	Pesce et al., 2017
1	<i>Frankia casuarinae</i> Thr	<i>Casuarina cunninghamiana</i>	5.3	Hurst et al., 2014
1	<i>Frankia</i> sp. QA3	<i>Alnus nitida</i>	7.6	Sen et al., 2013
2	<i>Frankia</i> sp. BMG5.30	<i>Coriaria myrtifolia</i>	5.8	Gueddou et al., 2018
2	<i>Frankia torreyi</i> Cpl1T	<i>Coriaria peregrina</i>	7.6	Callaham et al., 1978
2	Candidatus <i>Frankia datiscae</i> Dg1	<i>Coriaria nepalensis</i>	5.3	Persson et al., 2011
2	Candidatus <i>Frankia californiensis</i> Dg2	<i>Datisca glomerata</i>	5.92	Van Nguyen et al., 2016
3	<i>Frankia discariae</i> BCU110501	<i>Discaria trinervis</i>	7.9	Wall et al., 2013
3	<i>Frankia elaeagni</i> BMG5.12	Soil	7.6	Nouioui et al., 2013
3	<i>Frankia</i> sp. Cc1.17	<i>Colletia cruciata</i>	8.4	Swanson et al., 2017
3	<i>Frankia</i> sp. Cci49	<i>Casuarina cunninghamiana</i>	9.76	Mansour et al., 2017
3	<i>Frankia</i> sp. EAN1pec	<i>Eleagnus angustifolia</i>	9.0	Normand et al., 2007b
3	<i>Frankia</i> sp. EI5c	<i>Eleagnus angustifolia</i>	6.6	D'Angelo et al., 2016a
3	<i>Frankia irregularis</i> G2	<i>Casuarina equisetifolia</i>	9.5	Nouioui et al., 2016
3	<i>Frankia</i> sp. R43	<i>Casuarina cunninghamiana</i>	10.45	Pujic et al., 2015
4	<i>Frankia</i> sp. BMG5.36	<i>Coriaria myrifolia</i>	11.2	Gueddou et al., 2017
4	<i>Frankia saprophytica</i> CN3	<i>Coriaria nepalensis</i>	10.0	Ghodhbane-Gtari et al., 2013
4	<i>Frankia</i> sp. DC12	<i>Datisca cannabina</i>	6.8	Tisa et al., 2015
4	<i>Frankia inefficax</i> Eu1c	<i>Elaeagnus umbellata</i>	6.6	Nouioui et al. 2017a
4	<i>Frankia asymbiotica</i> M16386	<i>Morella californica</i>	8.8	Nouioui et al 2017b
4	<i>Frankia</i> sp. EUN1h	<i>Elaeagnus umbellata</i>	9.9	Gueddou et al., 2017
4	<i>Frankia</i> sp. NRRL	<i>Morella californai</i>	9.4	Gueddou et al., 2017

Un des facteurs qui pourrait expliquer cette différence de taille de génome peut être les différences de mode de vie de ces souches. En effet, au sein du cluster 1, la souche *Frankia alni* ACN14a possède un grand génome et est retrouvée dans les sols nus en tant que saprophyte alors que *Frankia casuarinae* Cci3 qui a un génome plus petit n'est retrouvé que dans les sols à proximité de la plante hôte ce qui suggérerait que la propagation de la souche soit dépendante de la présence de l'hôte (Normand et al. 2007b).

B. Sporulation *in planta*

Les *Frankia* sont capables de différencier trois types de cellules : les hyphes, les diazovésicules (décrites partie II.4.1) et les sporanges multiloculaires produisant des spores non mobiles (Figure 6).

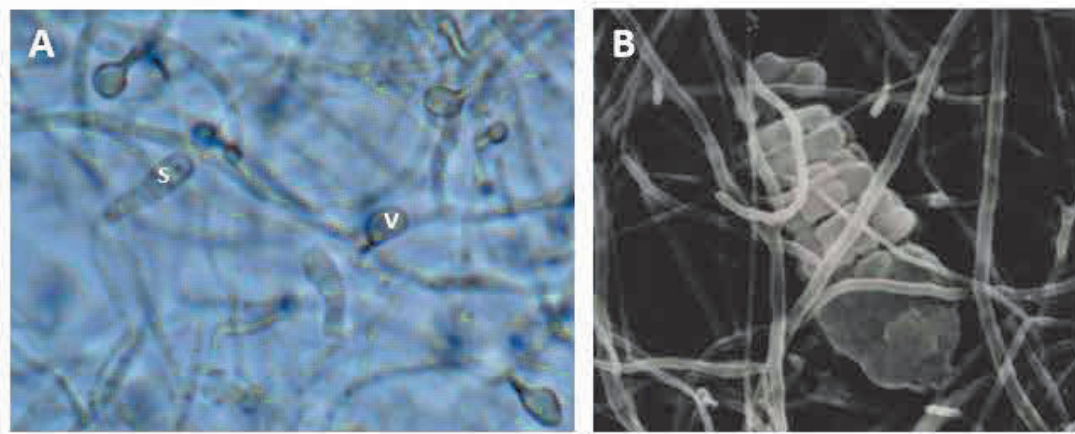


Figure 6 : Observations microscopique de *Frankia*

(A) Culture de *Frankia alni* ACN14a en condition de carence d'azote, v : diazovésicule, s : sporange. Source : P. Pujic. (B) Sporange de *Frankia*, microscopie électronique à balayage. Source : Y. Prin

La sporulation est une stratégie microbienne adaptative de résistance dans des conditions de stress qui permet par ailleurs la colonisation de milieux plus favorables à la croissance bactérienne. Des sporanges produits par *Frankia* en grande quantité (10^8 spores par gramme de nodosité) ont été retrouvés dans les cellules végétales de nodosités racinaires (Cotin-Galvan et al. 2016). Ces nodosités décrites pour la première fois en 1976 ont un phénotype spore-positif (Sp+) (Vandijk et al. 1976) (Figure 7). Les nodosités ne contenant pas de symbiotes sporulants *in planta* ont un phénotype spore-négatif (Sp-) (Figure 7). Sur 25 genres de plantes actinorhiziennes, le phénotype Sp+ a déjà été décrit chez 9 genres : *Myrica*,

Ceanothus, *Eleagnus*, *Hippophae*, *Casuarina*, *Purshia*, *Comptonia*, *Dryas* et *Alnus* (Schweitzer et al. 1990). Le phénotype Sp+ des nodosités est le plus fréquemment observé chez le genre *Alnus*, en particulier chez l'espèce *Alnus incana* spp. *incana* dont les nodosités sont principalement Sp+ (cependant ce genre reste aussi le plus étudié pour la recherche des nodosités Sp+) (Schweitzer et al. 1990).

Une étude récente a montré que les souches de *Frankia* hébergées dans les nodosités Sp+ sont génétiquement divergentes des souches présentes dans les nodosités Sp- (Pozzi et al 2015). Ce résultat n'exclut cependant pas l'implication de l'hôte dans le processus de sporulation *in planta* de *Frankia*. Cette étude a également révélé l'existence de deux lignées distinctes de souches Sp+, regroupant les souches selon leur plante hôte d'origine et représentant de nouvelles espèces potentielles au sein du genre *Frankia*. A ce jour, les souches Sp+ (sporulantes *in planta*) restent encore non cultivables malgré les nombreux essais d'isolement (Quispel et al. 1978, Normand et al. 1982). Toutes les souches de *Frankia* disponibles en culture ont été isolées de nodosités Sp-. Ces souches ne sont pas capables de sporuler *in planta* mais ne sont pas moins capables de différencier des sporanges *in vitro* en milieu liquide.

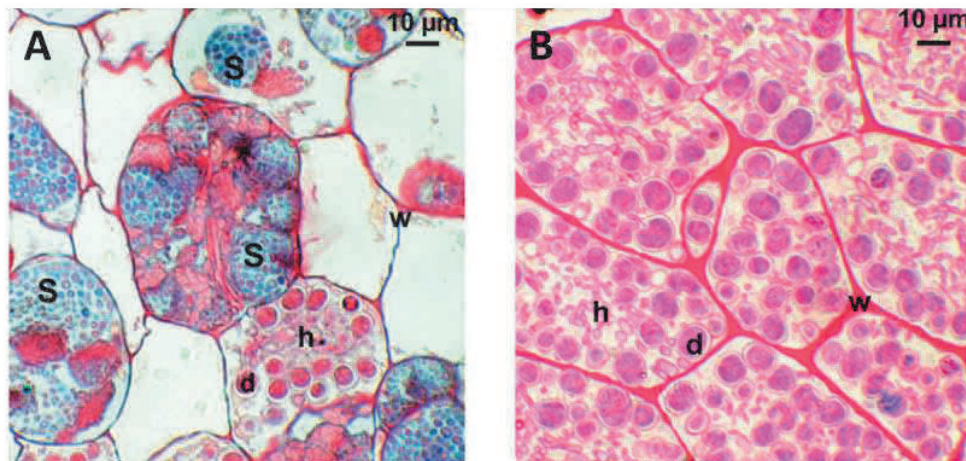


Figure 7 : Sporulation *in planta* : nodosités d'*Alnus glutinosa* de phénotype Sp+ et Sp-

(A) Photo de coupe transversale de nodosité Sp+. (B) Photo de coupe transversale de nodosité Sp-. Les coupes transversales de nodosités ont été colorées au Schiff-Vert-de-Malachite, les hyphes (h) et des diazovésicules (d) de *Frankia* sont colorés en rouge, les sporanges (s) contenant des spores en bleu. W : paroi des cellules végétales. Source : (Pozzi et al. 2015)

Les souches Sp+ présenteraient une plus grande capacité à infecter la plante hôte que les souches Sp- et seraient plus compétitives en conditions de co-inoculation avec d'autres souches de *Frankia* (Houwens et al. 1981, Kurdali et al. 1990, Cotin-Galvan et al. 2016). Ceci s'expliquerait par la production massive de spores, décrites comme étant des propagules plus infectives que les hyphes de *Frankia* (Burleigh et al. 1990). Dans le sol, à la sénescence de la nodosité Sp+, ces spores seraient libérées au voisinage de la racine et seraient capables de réinfecter les poils racinaires (Cotin-Galvan et al. 2016). Les souches Sp+ auraient également un spectre d'hôte plus restreint que les souches Sp- (Cotin-Galvan et al. 2016, Schwob et al. 2018). A notre connaissance, les souches Sp+ de *Frankia* sont un modèle unique de bactérie endophyte capable de dormance à l'intérieur des cellules de son hôte. L'ensemble des avancées réalisées sur ces souches (*i.e.* souches Sp+ phylogénétiquement divergentes des souches Sp-, plus infectives, plus compétitives, et très forte dépendance à la plante hôte traduite par un spectre d'hôte limité), ajoutées à la difficulté d'isoler et cultiver les souches Sp+, a conduit à émettre l'hypothèse selon laquelle les souches Sp+ auraient évolué vers un statut de symbiote obligatoire (Pozzi et al. 2015).

C. Limitations du modèle *Frankia*

Le modèle *Frankia*, bactérie filamenteuse à croissance lente (avec un temps de génération de 14 à 16 heures (Schwencke 1991)), présente de nombreuses limitations. En effet, malgré de nombreuses tentatives de conservation avec diverses méthodes (congélation, lyophilisation), cette souche se conserve uniquement en croissance en culture liquide rendant son maintien difficile car instable au cours du temps.

De plus, les modifications par génie génétique de *Frankia* étaient jusqu'à présent non maîtrisées. De nombreux obstacles ont été rencontrés pour la modification de cette souche freinant l'avancée des connaissances sur les mécanismes moléculaires impliqués dans la symbiose actinorhizienne. L'utilisation de spores ou de protoplastes (issus d'hyphes) pour la transformation de *Frankia* n'ont jamais abouti dû à un faible taux de régénération des protoplastes ou un faible taux de germination des spores (Kucho et al. 2013). De plus, l'insertion de vecteur par électroporation a jusqu'à présent conduit à des transformations non stables. En effet, une réduction au cours du temps des cellules portant le gène de sélection apporté par le plasmide a été constatée (Kucho et al. 2009). Pour pallier ces difficultés,

différentes approches ont été utilisées pour caractériser certains gènes de *Frankia*. En effet, des mutations par des agents mutagènes ont été réalisées avec des composés chimiques (N-méthyl-N-nitrosoguanidine et méthanesulfonate) et par UV (Myers et al. 2004, Kucho et al. 2017) D'autres approches ont été mises au point pour la caractérisation fonctionnelle de gène de *Frankia*. En effet, des approches d'expression hétérologue de gène de *Frankia* chez la bactérie modèle, *Escherichia coli* ou chez une actinobactérie proche, *Streptomyces albus* ont été réalisées (Lurthy et al. 2018, Myronovskyi et al. 2018). La première étude a caractérisé fonctionnellement un gène annoté comme codant une nitrite réductase chez *F. alni* ACN14a par expression hétérologue chez *E. coli* (Lurthy et al. 2018). La nitrite réductase réduit le nitrite en composé assimilable par la bactérie. Cette protéine est essentielle à la survie de la bactérie face à de fortes concentrations de nitrite étant donné que ce composé est hautement réactif et toxique pour les microorganismes. Grâce à ce gain de gènes, une résistance d'*E. coli* face à ce composé toxique a été observée comparé à la souche sauvage. La deuxième étude s'est intéressée à des clusters de gènes de *F. alni* ACN14a et *F. casuarinae* Cci3 annotés comme codant des métabolites secondaires (Myronovskyi et al. 2018). Afin de caractériser ces métabolites secondaires, les clusters de gènes ont été exprimés par expression hétérologue chez *S. albus*. Le cluster de gène de *F. alni* ACN14a permet la production d'acide salicylique et de Fralnimycine et celui de *F. casuarinae* Cci3 permet la synthèse de Bhimamycine A et d'Aloesaponarine II. Récemment deux études ont réalisé des transformations stables de *Frankia* via l'insertion de vecteurs en utilisant des méthodes de conjugaison et électroporation (Gifford et al. 2019, Pesce et al. 2019). Bien que ces techniques de transformation de *Frankia* ouvrent de grandes perspectives il faudrait continuer le développement de ces approches avec la mise au point de perte et de gain de gène au niveau du génome de *Frankia* afin d'appréhender des études fonctionnelles. Ces deux études bien qu'étant prometteuses ont été publiées en 2019 et pour l'instant aucune autre étude n'a encore été publiée. De plus, ces méthodes semblent être difficilement reproductibles dans d'autres laboratoires (Kucho et al. 2022).

3. Processus symbiotique : de la reconnaissance à l'initiation de la symbiose

Le processus symbiotique nécessite une coordination fine de la part des deux partenaires qui est mise en place lors des premières étapes de reconnaissances, d'entrée du symbiote, de formation de la nodosité et son maintien. Dans cette partie, les différentes étapes nécessaires pour la mise en place de la symbiose seront décrites, de la reconnaissance des partenaires à l'entrée du symbiote dans les tissus végétaux.

A. Flavonoïdes et facteur symbiotique

Flavonoïdes

Dans les premières étapes de la symbiose, l'hôte végétal et le symbiote établissent un dialogue moléculaire (Figure 8). En effet, la plante sécrète des métabolites secondaires appelés flavonoïdes ou isoflavonoïdes. Les flavonoïdes sont un groupe de métabolites secondaires dérivés de la voie des phénylpropanoïdes (Abdel-Lateif et al. 2012). Dans le cas des symbioses entre les rhizobia et les légumineuses, la plante sécrète des flavonoïdes dans la rhizosphère qui les attirent jusqu'à la racine. Les flavonoïdes vont également induire la synthèse de lipochitooligosaccharides (LCOs) bactérien également appelés NOD facteur (Oldroyd 2013). Ces LCOs sont codés par des gènes *nodABC* situés sur des îlots de gènes symbiotiques ou sur des plasmides mobiles dans le génome des rhizobia. Les flavonoïdes produits par l'hôte vont interagir avec la protéine NodD qui va induire la transcription de ces gènes *nod* permettant la synthèse du facteur symbiotique (Hassan et al. 2012).

Pour les symbioses actinorhiziennes, l'implication des flavonoïdes dans la symbiose n'est pas encore bien décrite. Il a été mis en évidence, pour quelques plantes actinorhiziennes, que les flavonoïdes produits lors des premières étapes de la symbiose favoriseraient la chemoattraction et la prolifération de *Frankia* (Vessey et al. 2005). Les flavonoïdes issus du fruit de *Myrica gale* induiraient des changements phénotypiques au niveau de la croissance et de l'activité de fixation d'azote de *Frankia* selon la compatibilité des souches. En effet, les souches compatibles ont une croissance et une fixation d'azote favorisées alors que pour les souches incompatibles, ces activités sont réprimées (Popovici et al. 2010). De plus, une autre étude a montré que les exsudats racinaires de *Casuarina cunninghamiana* contiennent des flavonoïdes qui modifient la physiologie et l'infectivité de *F. casuarinae* Cci3 (Beauchemin et

al. 2012). De plus, le pré-traitement de *F. casuarinae* Cci3 avec des exsudats racinaire de *C. cunninghamiana* permettrait d'induire plus tôt la nodulation comparé à la souche non traitée, ce qui suggère que ce traitement est bénéfique à l'infection et au processus de nodulation (Beauchemin et al. 2012). Chez *Casuarina glauca* un gène codant une chalcone synthase impliquée dans les premières étapes de la synthèse des flavonoïdes a été inactivé par une approche d'ARN interférence (Abdel-Lateif et al. 2013). L'inhibition de l'expression de ce gène induit une réduction du taux de flavonoïdes produit par *C. glauca* et altère le taux de nodulation sans impacter la structure des nodosités suggérant ainsi un rôle des flavonoïdes dans les premières étapes de la symbiose.

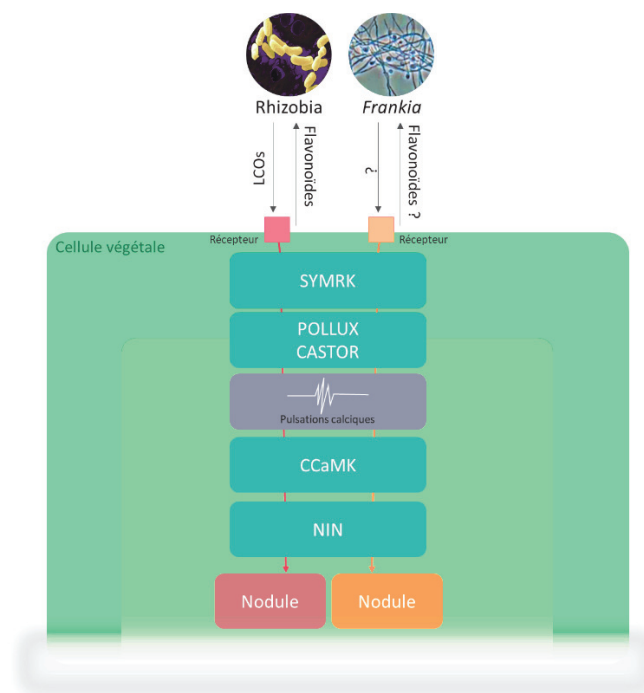


Figure 8 : Schéma des mécanismes moléculaires mis en place lors des premières étapes des symbioses fixatrices d'azote

Facteur symbiotique

Comme vu précédemment, les rhizobia produisent un facteur symbiotique. Dans le cas de *Frankia*, bien qu'il ait été montré que plusieurs souches produisent un facteur dans leur surnageant capable d'induire la déformation des poils racinaires de leur plante hôte, ce signal est encore inconnu (Cérémonie et al. 1999, Cissoko et al. 2018). Ce facteur symbiotique aurait un poids moléculaire inférieur à 3kDa et serait, de manière similaire au facteur NOD, résistant à la chaleur mais aussi hydrophile et résistant à certaines chitinases testées contrairement au

facteur NOD. De plus, au niveau génétique, la majorité des souches de *Frankia* séquencées ne contiennent pas les gènes *nodABC* canoniques. Cependant, ces gènes ont été trouvés dans deux opérons dans les génomes des souches *Candidatus Frankia daticae* Dg1 et *Candidatus Frankia daticae* Dg2 appartenant au cluster 2 et dans le génome d'une souche appartenant au cluster 3 NRRL B-16219 (Persson et al. 2015, Nguyen et al. 2016, Ktari et al. 2017b).

Effets des exsudats racinaires sur le protéome de *Frankia*

Bien que l'implication des flavonoïdes dans les symbioses actinorhiziennes soit de plus en plus décrite, les potentielles cibles moléculaires chez *Frankia* ne sont pas encore connues. Une seule étude a testé l'effet de flavonoïdes extraits de fruits de *M. gale* sur le transcriptome de *F. alni* ACN14a et a noté un faible nombre de gènes différentiellement exprimés (22 gènes différentiellement exprimés dont 5 surexprimés, codant pour des protéines associées à la gestion de stress) (Popovici et al. 2010). Pour aller plus loin sur les mécanismes impliqués lors de la reconnaissance de l'hôte dans les premières étapes de la symbiose, la réponse de *Frankia* a été explorée par d'autres approches utilisant des exsudats racinaires. En effet, les réponses de souches de *Frankia* appartenant au cluster 2 (BMG5.1) (Ktari et al. 2017a) et au cluster 3 (NRRL B-16219) (Gueddou et al. 2021) face à des exsudats racinaires de plantes compatibles et incompatibles ont été testées. Il s'avère que la dynamique du protéome de *Frankia* est plus fortement modulée lors d'un contact avec des exsudats de plantes compatibles. Concernant l'effet de ces exsudats de plantes compatibles, une troisième étude vient compléter les deux autres avec l'étude de la réponse moléculaire d'une souche appartenant au cluster 1, *F. alni* ACN14a (Pujic et al. 2019). Dans cette étude, le symbiote a été placé dans un boudin de dialyse au contact de sa plante hôte, *A. glutinosa*, afin de se rapprocher des conditions *in natura* où un dialogue moléculaire entre les deux partenaires est mis en place. En effet, la membrane de dialyse permet de piéger les *Frankia* tout en permettant l'échange de molécules entre les deux partenaires. En vue d'accéder à la réponse de *F. alni* ACN14a des analyses protéomique et transcriptomique ont été réalisées. Globalement, ces trois études montrent que *Frankia* au contact des exsudats racinaires change son métabolisme et produit des protéines impliquées dans le stress oxydatif. De plus, *Frankia* produit des enzymes permettant la dégradation de la paroi végétale pour son entrée dans les tissus végétaux. En effet, il a été montré que *F. alni* ACN14a dégradait à l'aide d'une cellulase les tissus de la plante et rigidifierait les extrémités

de ces hyphes grâce à une cellulose synthase afin d'entrer dans les cellules végétales. Dans ces trois études, un possible réarrangement des structures de surface a été proposé. Ce qui est en accord avec une étude précédente (Beauchemin et al. 2012) qui a montré que *F. casuarinae* Cci3 en contact avec des exsudats racinaires de son hôte avait des propriétés de surface bactérienne altérées conduisant à un recourbement des hyphes.

B. Voie commune de la symbiose

La reconnaissance des facteurs microbiens par les récepteurs membranaires végétaux vont induire chez la plante une voie commune aux symbioses, appelée voie SYM (Figure 8). La voie SYM implique un récepteur-like kinase SYMRK, des canaux ioniques localisés dans la membrane nucléaire, CASTOR et POLLUX, qui permettent l'induction d'une oscillation calcique au niveau du noyau de la cellule végétale (Hochoer et al. 2011b, Oldroyd 2013). Cette signature calcique va être reconnue par une protéine kinase dépendante de la calmoduline et du calcium, appelée CCaMK, qui a pour rôle d'activer des facteurs de transcription pour la mise en place de la nodulation (Svistoonoff et al. 2013). La protéine CCaMK semble avoir un rôle primordial dans l'établissement de la symbiose puisque quand elle est mutée, la plante est incapable d'établir la symbiose avec le partenaire microbien (Svistoonoff et al. 2013). La voie SYM a été étudiée chez les légumineuses en association avec les rhizobia et chez les plantes en association avec les champignons mycorhiziens (Oldroyd 2013). Grâce à l'essor du séquençage la présence de ces gènes dans le génome des plantes actinorhiziennes a été étudiée chez *Casuarina glauca* (Hochoer et al. 2011a), *A. glutinosa* (Hochoer et al. 2011a), *Datisca glomerata* (Demina et al. 2013, Battenberg et al. 2018, Salgado et al. 2018), et *Ceanothus thrysiflorus* (Battenberg et al. 2018, Salgado et al. 2018). Ces données ont permis d'identifier les gènes impliqués dans cette cascade de signalisation chez ces 4 plantes actinorhiziennes (Figure 9).

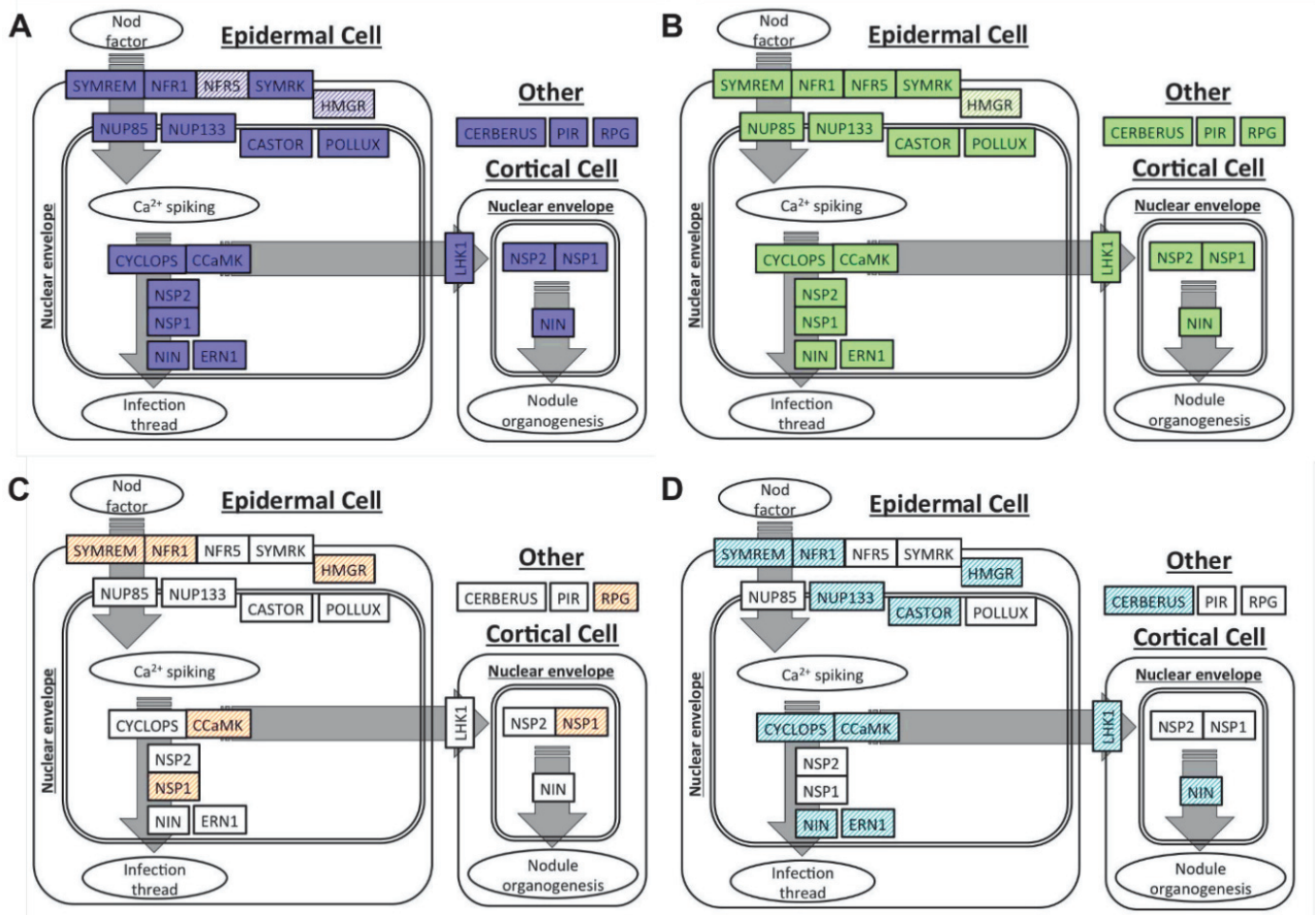


Figure 9 : Gènes impliqués dans l'initiation de la nodulation chez différentes plantes actinorhiziennes

Les orthologues sont représentés par des couleurs unies, les homologues ont des hachures colorées. Gènes détectés chez (A) *C. thyrsoiflorus*, (B) *D. glomerata*, (C) *A. glutinosa* selon (Hochoer et al. 2011a); (D) *C. glauca* selon (Hochoer et al. 2011a). Source : (Battenberg et al. 2018)

Les rhizobia, via la voie SYM, induisent des oscillations calciques au niveau du noyau des cellules végétales des plantes, *Medicago truncatula*, *Pisum stivum*, *Phaseolus vulgaris* et *Lotus japonicus* conduisant à l'établissement de la symbiose (Granqvist et al. 2015). Cette oscillation calcique est également retrouvée au niveau des différentes plantes appartenant au genre *Alnus* (Granqvist et al. 2015), *Casuarina* et à l'espèce *Discaria trivervis* (Svistoonoff et al. 2013) lorsque les racines de ces plantes sont en contact avec les exsudats de *Frankia*. De plus, l'activation de la protéine CCaMK chez *Casuarina* et *Discaria*, en absence de la bactérie, déclenche la formation d'une nodosité (Svistoonoff et al. 2013). Cette oscillation calcique est donc indispensable pour la formation d'une nodosité lors des symbioses fixatrices d'azote. Cependant, les champignons mycorhiziens activent également la voie SYM, sans induire la

formation d'un organe spécialisé (Oldroyd 2013). Ceci peut être expliqué par le fait que les rhizobia et les *Frankia* auraient détourné le système de communication de la symbiose mycorhizienne qui est plus ancienne. Ainsi, chaque organisme induirait une signature calcique spécifique ce qui induirait une réponse physiologique différente chez la plante. En effet, pour les symbioses fixatrices d'azote, la protéine CCaMK, une fois le signal calcique reconnu, active les gènes codant des facteurs de transcription NIN (nodule inception protein) qui régulent les gènes responsables de l'infection des racines par la bactérie puis de la formation de la nodosité (Hoher et al. 2011a, Chabaud et al. 2016, Barker et al. 2017). L'oscillation calcique induite par les champignons mycorhiziens, active des gènes différents des gènes *nin*, afin d'établir la symbiose mycorhizienne (Oldroyd 2013).

C. Modèle d'infection

Une fois la reconnaissance des deux partenaires établie, des mécanismes d'infection se mettent en place. Dans les symbioses actinorhiziennes, deux modes d'infection ont été décrits, l'infection intracellulaire ou intercellulaire (Berry et al. 1990, Froussart et al. 2016) (Figure 10 Figure 10).

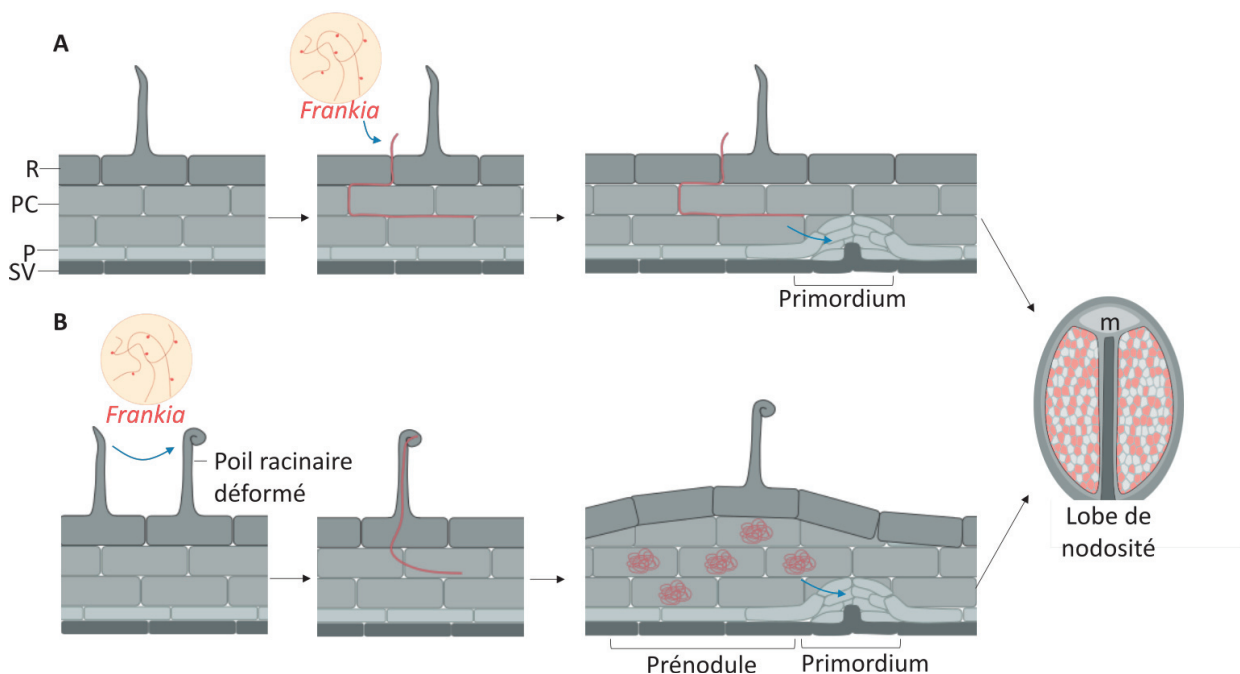


Figure 10 : Modèles d'infection chez les plantes actinorhiziennes

(A) Modèle d'infection intercellulaire, (B) Modèle d'infection intracellulaire. m : méristème (zone de division cellulaire), R : Rhizoderme, PC : Parenchyme Cortical, P : Péricycle, SV : Système vasculaire.

L'infection intracellulaire (Figure 10-A) va être établie via la déformation de poils racinaires (Berry et al. 1990). La détection de la bactérie à proximité des racines déclenche un programme cellulaire conduisant à la déformation des poils racinaires et la mise en place d'un cordon d'infection chez la plante hôte. Le symbiote va alors se fixer au niveau des poils racinaires déformés puis le cordon d'infection va guider la bactérie jusqu'à des cellules cibles situées dans le parenchyme cortical de la plante. Lors de son entrée dans les cellules végétales, le symbiote est entouré d'une membrane végétale appelée le symbiosome. La bactérie, une fois dans les cellules du parenchyme corticale de la plante, colonise les cellules végétales et conduit à la formation d'un prénodule. Parallèlement à la formation du prénodule, des cellules du péricycle vont former un primordium qui va être infecté par *Frankia*. Le développement du primordium aboutit à une nodosité fonctionnelle. Dans le modèle d'infection intercellulaire (Figure 10-B), les poils racinaires au contact du symbiote ne sont pas modifiés puisque le symbiote pénètre dans la racine via l'interface apoplasmique entre les cellules de l'épiderme. Le symbiote progresse ensuite entre les cellules végétales. Durant la colonisation du compartiment intercellulaire, la plante semblerait jouer un rôle actif. En effet, chez *D. trinervis* l'espace intercellulaire est élargi et semble subir des modifications au niveau de sa composition et sa structure (Fournier et al. 2018b). Cette modification serait médiée par la sécrétion de composés venant de réticulum endoplasmique qui s'accumule au niveau des jonctions cellulaires modifiées. Dans ce modèle d'infection intercellulaire, étant donné que les *Frankia* sont localisées au niveau intercellulaire, il n'y a pas de prénodule formé. Les cellules du péricycle vont former un primordium qui va être par la suite colonisé de manière intracellulaire par le symbiote. Les mécanismes d'infection intracellulaire sont retrouvés pour les plantes appartenant à l'ordre des Fagales et les mécanismes d'entrée intercellulaire sont retrouvés chez les plantes appartenant aux ordres des Cucurbitales et Rosales (Froussart et al. 2016). Certaines souches de *Frankia* sont capables d'infecter à la fois l'aulne au niveau intercellulaire et *Eleagnus* au niveau intracellulaire ce qui suggère que le mode d'infection est dépendant de l'hôte et non du symbiote (Baker 1987).

4. Structure et fonctionnement de la nodosité

L'association entre les plantes actinorhiziennes et les *Frankia* conduit à la formation d'une nodosité au niveau des racines. Ces nodosités, correspondant à des racines latérales modifiées, sont de forme coralloïdes et sont composées de lobes multiples avec un système vasculaire centrale (Pawlowski et al. 2012). Les nodosités formées chez les plantes appartenant aux ordres des Fagales et Rosales comportent des cellules végétales infectées et non infectées au niveau du cortex. Concernant les plantes appartenant à l'ordre des Cucurbitales, les nodosités formées ont une organisation différente. En effet, les cellules infectées sont regroupées et forment un ensemble continu (Figure 11).

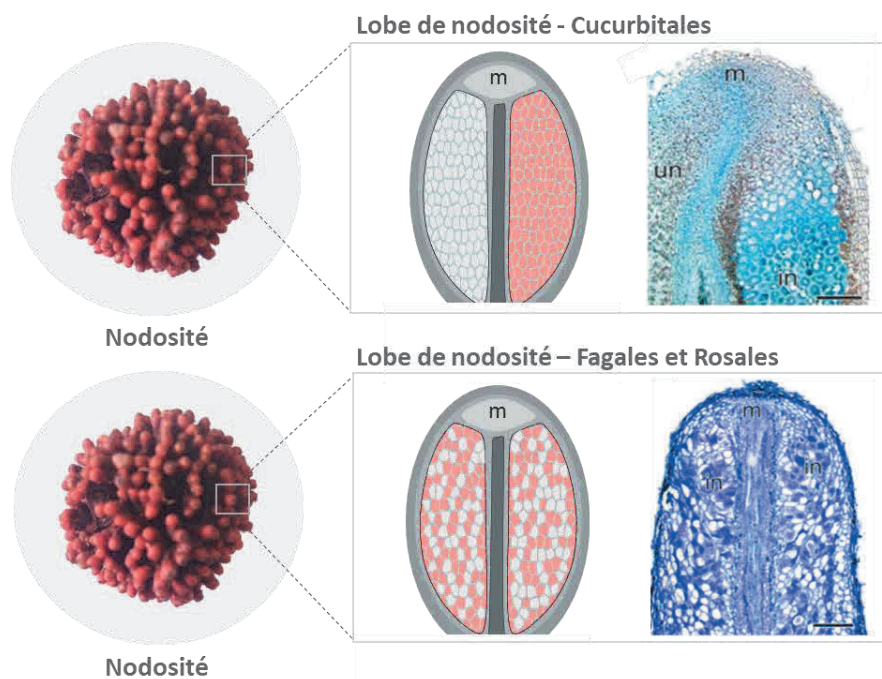


Figure 11 : Schéma d'organisation des tissus infectés dans des nodosités de Cucurbitales, Fagales et Rosales

Photo de nodosité : M. Gasser. Coupes de lobe de nodosités de *D. glomerata* (Cucurbitales) et d'*A. glutinosa* (Fagales) colorées avec du bleu de toluidine. Source : (Pawlowski et al. 2012).

A. Mécanismes de protection de la nitrogénase *in planta*

Une fois la nodosité formée, des échanges trophiques sont mis en place par les deux partenaires ; le symbiote fournit de l'azote à l'hôte qui en retour lui fournit des photosynthétats. Les bactéries du genre *Frankia*, à l'exception des souches appartenant au cluster 4, sont capables de fixer l'azote dans des conditions libres et dans des conditions

symbiotiques grâce à la nitrogénase. Bien que la nitrogénase soit irréversiblement inactivée par l' O_2 , les *Frankia* sont capables de fixer l'azote atmosphérique dans des conditions aérobies grâce à des cellules différenciées en diazovésicules. Ces diazovésicules ont une paroi composée d'une multicouche de lipides riche en bacteriohopanetetrol et en phenylacetate monoester de bacterio-hopanetetrol. Ces lipides sont similaires aux stérols et sont appelés lipides hopanoïdes (Berry 1991, Berry et al. 1993) (Figure 12). Cette paroi permettrait de faire barrière à l'oxygène afin de protéger la nitrogénase présente dans les diazovésicules de *Frankia* (Berry et al. 1993). Cette hypothèse est soutenue par le fait que l'épaisseur de la paroi des diazovésicules varie selon la teneur en oxygène (Parsons et al. 1987). En effet, à un faible taux d' O_2 , (4kPa) les parois des diazovésicules de *F. casuarinae* Cci3 sont constituées de 17 couches de lipides alors qu'à un taux plus élevé d' O_2 (40kPa), cette paroi est constituée de 40 multicouches. De plus, il a été montré que les diazovésicules de *F. alni* ACN14a dans les cellules végétales d'*A. glutinosa* auraient un diamètre plus grand *in planta* (5 μ m) en comparaison aux mêmes cellules observées en culture *in vitro* (3 μ m) (Carro et al. 2016a). L'épaississement des parois des diazovésicules est induite par les conditions *in planta*, cependant il est aussi possible que l'hôte y participe activement afin d'augmenter l'efficacité de fixation d'azote de son symbiote.

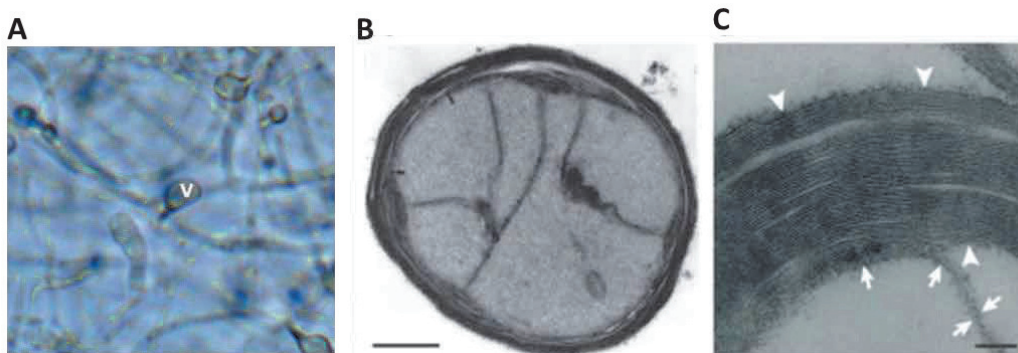


Figure 12 : Diazovésicules de *Frankia* et hopanoïdes

(A) Culture de *Frankia alni* ACN14a en carence d'azote, v : diazovésicule. Source : P. Pujic. (B) Photo de diazovésicule de *Frankia* Cpl1 par microscopie électronique à transmission (MET), échelle : 0.5 μ m. Source : (Harriott et al. 1991). (C) Photo de MET d'une paroi de diazovésicule de *Frankia* Cpl1 composée d'une multicouche (48 couches) riche en lipides hopanoïdes, échelle : 50 nm. Source (Berry et al. 1993).

Dans la symbiose impliquant *C. glauca* et *F. casuarinae* Cci3, la gestion de l' O_2 est majoritairement prise en charge par l'hôte contrairement aux autres modèles de symbiose

actinorhizienne. Le symbiote bactérien *F. casuarinae* Cci3 capable de différencier des diazovésicules *in vitro* n'en différencie pas dans la nodosité (Berg et al. 1987). Cela suggère que le taux d'O₂ est très faible dans les cellules végétales. En effet, la plante rigidifie les parois des cellules végétales infectées de lignine qui permet de créer des conditions de microaérophile optimales pour la respiration et la fixation d'azote du symbiote (Berg et al. 1988, Zeng et al. 1989). De plus, des hémoglobines permettant de piéger et transporter l'O₂ sont produites par les deux partenaires afin de gérer les flux (Jacobsen-Lyon et al. 1995, Niemann et al. 2008).

B. Nodosité et métabolisme de l'azote

Dans la nodosité, la bactérie transforme le diazote (N₂) en ammonium qui va être transféré à la plante sous forme d'acides aminés ou d'amides via le xylème. L'ammonium (NH₄) est un composé toxique qui peut interférer avec l'homéostasie du pH. Ce composé dans la nodosité est donc pris en charge par la voie GS/GOGAT (Glutamine Synthétase, Glutamine Oxoglutarate aminotransferase) qui permet la conversion de l'ammonium en glutamine (Gln) et glutamate (Glu) qui vont par la suite être convertis en d'autres composés azotés assimilables (Lurthy et al. 2018). La gestion de l'azote semble être différente selon les espèces de plantes actinorhiziennes (Berry et al. 2011, Hay et al. 2020) (Figure 13).

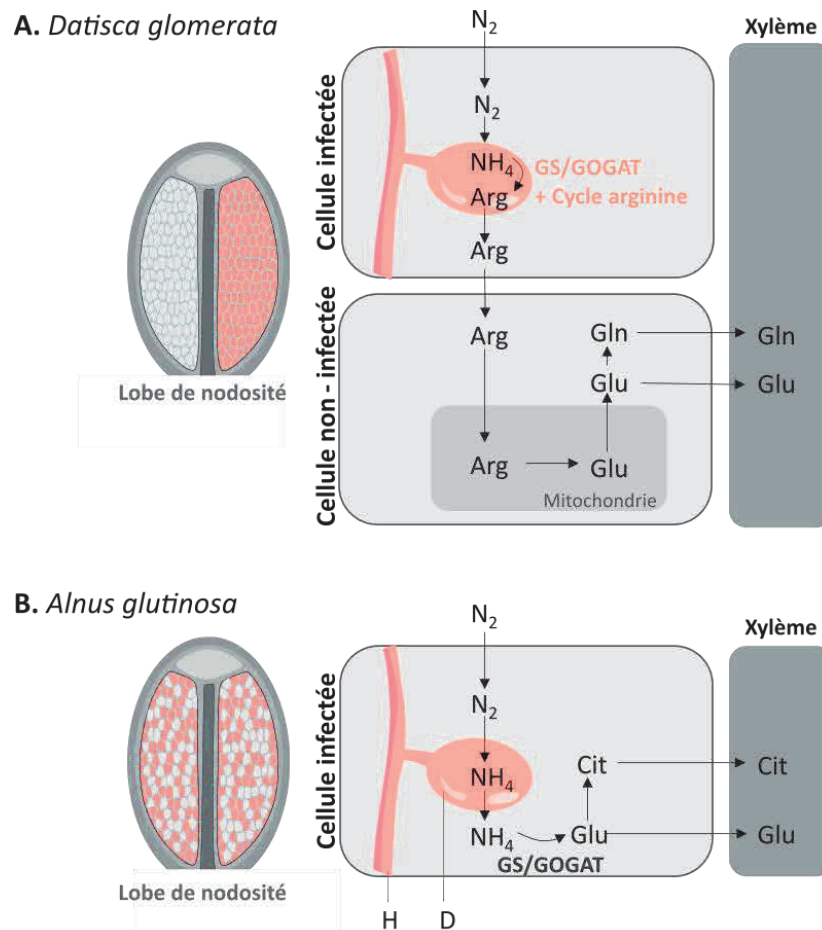


Figure 13 : Modèle simplifié permettant d'expliquer la gestion de l'azote chez *D. glomerata* et *A. glutinosa*

Gestion de l'azote de la fixation d'azote dans les diazovésicules de *Frankia* au transport vers le système vasculaire de la plante. (A) gestion de l'azote dans les nodosités de *D. glomerata*, selon (Berry et al. 2011). (B) Gestion de l'azote dans les nodosités d'*A. glutinosa* selon (Hay et al. 2020). H : Hyphes de *Frankia*, D : Diazovésicules de *Frankia*

En effet, dans la nodosité d'*A. glutinosa* (Figure 13-B), l'assimilation de l'ammonium serait prise en charge par la plante via le cycle GS/GOGAT et probablement dans le cytoplasme de la cellule végétale infectée (Hay et al. 2020). Ce cycle est réprimé partiellement chez le symbiote *in planta* puisque seule la glutamine synthétase (GS) est activée chez *Frankia* suggérant que la glutamine pourrait également être transportée vers les cellules végétales mais de manière moindre que l'ammonium (non indiqué sur le modèle ci-dessus). La citrulline, formée via la voie de l'urée est transportée dans le xylème en plus du glutamate (Hay et al. 2020). Dans le cas de *D. glomerata* (Figure 13-A), la gestion de l'ammonium est différente puisqu'elle est en partie prise en charge par l'endosymbiote. En effet, dans cette symbiose la voie GS/GOGAT est activée chez *Frankia* alors que chez l'hôte, ce cycle n'est pas exprimé dans les cellules

infectées de la nodosité mais est exprimé dans les cellules non infectées. De plus, la voie de l'arginine (Arg) est exprimée chez le symbiote ce qui suggère que l'export des composés azotés vers la plante serait réalisé via un transfert d'arginine (Berry et al. 2011). La GS de l'hôte est induite dans les cellules végétales non infectées de la nodosité ce qui suggère que les acides aminés fournis par le symbiote sont réassimilés dans ces cellules végétales. Cette ré-assimilation serait prise en charge par le cycle arginine-ornithine-urée puis par la voie GS/GOGAT de la plante afin de produire de la glutamine et du glutamate qui vont ensuite être transportés vers les parties aériennes via le xylème.

III. Peptides antimicrobiens et symbioses fixatrices d'azote

Lors des symbioses fixatrices d'azote, l'hôte produit des peptides antimicrobiens (AMPs) ayant des rôles clés dans les étapes précoces de la symbiose et lors de la nodulation. Cependant, ces peptides sont principalement décrits dans la réponse immunitaire innée de organismes pour lutter contre des attaques de pathogènes. Leur production par la plante hôte dans un contexte d'interactions bénéfiques interroge sur leurs rôles biologiques dans ces interactions. Dans la suite de cette section, nous allons commencer par décrire les peptides antimicrobiens, en particulier ceux présents chez les plantes, avant de discuter de leur rôle potentiel dans les interactions symbiotiques.

1. Les peptides antimicrobiens

Les organismes sont en constante interaction avec divers microorganismes qui peuvent être pour certains délétères. Pour faire face à ces attaques et survivre, les organismes ont développés au cours de l'évolution de nombreux mécanismes de défense. Parmi ces mécanismes on retrouve de petites protéines de moins de 100 acides aminés, appelés peptides antimicrobiens (AMPs), présents chez tous les êtres vivants, ce qui reflète leur origine ancienne (Zaslhoff 2002). Ces AMPs, impliqués dans l'immunité innée, ont un large spectre de propriétés antimicrobiennes contre divers organismes tels que les bactéries, les champignons, les virus, les protozoaires et des activités anticancéreuses (Huan et al. 2020). Ces peptides peuvent être anioniques ou cationiques bien que la majorité soit chargée positivement avec

une charge nette moyenne de +2 à +9 (Pushpanathan et al. 2013). Côté hydrophobicité, les AMPs sont généralement amphipathiques avec à la fois des domaines hydrophiles et hydrophobes.

Grâce à ces propriétés, les AMPs interagissent avec les membranes, notamment les peptides cationiques qui s'accumulent sur les membranes bactériennes chargées négativement conduisant à une perméabilisation de la membrane et la lyse de la bactérie (Figure 14). Les AMPs peuvent également avoir des cibles intracellulaires permettant d'interagir ou d'inhiber les machineries cellulaires essentielles de l'organisme (Figure 14). Au contact de la bactérie, les peptides sont transportés à l'intérieur des cellules via des transporteurs spécifiques ou par auto-transport. Dans la cellule, les AMPs peuvent agir sur la synthèse protéique, cibler l'ADN pour inhiber la transcription ou la réplication, inhiber la biosynthèse de membranes ou encore perturber des activités enzymatiques vitales (Scocchi et al. 2016). Certains peptides vont inhiber la traduction des protéines en inhibant l'incorporation d'acides aminés et en se liant aux sous unités ribosomiques. Certains AMPs provoquent la dégradation d'acide nucléique ou encore l'inhibition de leur synthèse. D'autres encore vont perturber le processus de cytokinèse et induire la formation de cellules incapables de se diviser en interagissant directement avec la machinerie de division ou de régulation du cycle.

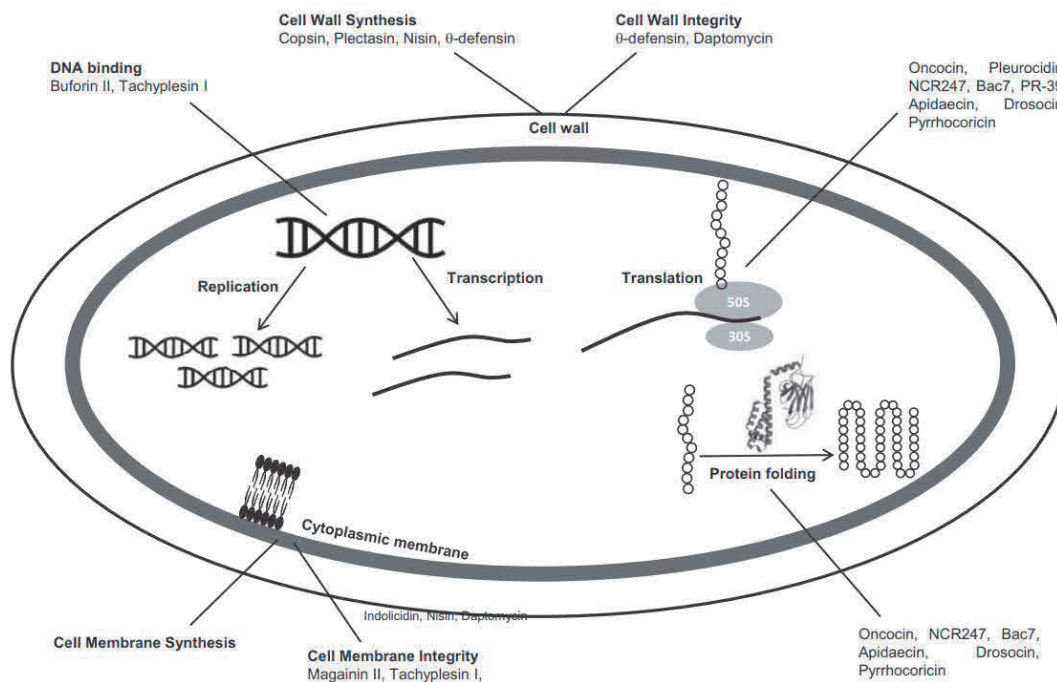


Figure 14 : Représentation schématique des cibles des AMPs

Sources : (Scocchi et al. 2016)

2. Les peptides antimicrobiens de plante

Les AMPs de plante ont une grande variabilité au niveau de leurs séquences nucléotidiques conférant une grande diversité structurale qui amène à avoir de nombreuses cibles cellulaires (Santos-Silva et al. 2020). Ils font partie de la réponse immunitaire innée et ont été retrouvés dans tous les tissus végétaux. Dans le but d'optimiser ses défenses, la plante synthétise des AMPs de manière constitutive ou de manière spécifique en réponse à différents stimuli (Campos et al. 2018). Les AMPs de plantes sont majoritairement sécrétés. En effet, ils comportent une séquence signal qui permet de les transférer dans le réticulum endoplasmique où ils vont pouvoir prendre leur conformation tertiaire puis être adressés à des compartiments cellulaires cibles. Ces AMPs sont généralement classés selon leurs similarités de séquence mais aussi selon un motif en cystéines caractéristique de chaque famille (Figure 15). Les cystéines du motif forment des ponts disulfures permettant le repliement tertiaire du peptide. Les principales familles d'AMPs de plante sont : les thionines, les défensines, les heveines, les « non-specific lipid transfer protein » (nsLTPs), les snakines et les cyclotides. Pour la suite de cette introduction, nous allons nous concentrer sur deux de ces familles d'AMPs à savoir les défensines et les nsLTPs.

Cyclotide	C-Xn-C-Xn-C-Xn-CXC-Xn-C
Défensine	C-Xn-C-Xn-C-Xn-C-Xn-C-Xn-CXC-Xn-C
Heveine	C-Xn-C-Xn-CC-Xn-C-Xn-C
nsLTPs	C-Xn-C-Xn-CC-Xn-CXC-Xn-C-Xn-C
Snakine	C-Xn-C-Xn-C-Xn-C-Xn-C-Xn-CC-Xn-CXC-Xn-CXC-Xn-C
Thionine	CC-Xn-C-Xn-C-Xn-C-Xn-C

Figure 15 : Motifs conservés caractéristiques des différentes classes d'AMPs de plante

X : acides aminés. n : nombre variable d'acides aminés, C : cystéine

A. Les Défensines

Les défensines sont sécrétées dans tous les tissus végétaux et majoritairement dans les graines. Leurs séquences protéiques comportent un motif conservé de 8 cystéines (Figure 156) permettant la formation de 4 ponts disulfures.

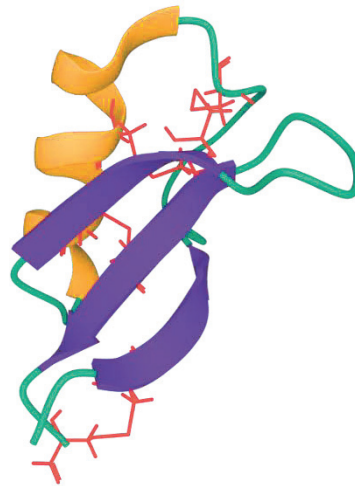


Figure 16 : Structure 3D de la défensine NaD1 de *Nicotiana glauca*

Les hélices alpha sont représentées en jaune, les feuillets beta en violet et les ponts disulfures en rouge PDB ID : 1MR4, (Lay et al. 2003).

Cette conformation tertiaire confère aux défensines une stabilité face aux protéases, aux pH extrêmes et à la température (Parisi et al. 2019). La plupart des défensines sont décrites comme impliquées dans la réponse immunitaire innée de l'hôte mais sont aussi nécessaires pour assurer d'autres fonctions biologiques telles que l'inhibition de la synthèse protéique, la résistance à des métaux lourds, le développement ou encore la reproduction de la plante ainsi que l'inhibition de canaux ioniques (Na^+ , Ca^{2+} , K^+) des plantes (Parisi et al. 2019).

B. Les « non-specific lipid transfer proteins »

Les nsLTPs sont les peptides les plus grands au sein des AMPs avec plus de 100 acides aminés. Le peptide mature a une conformation tertiaire composé de 4 ponts disulfures formés grâce à un motif conservé de 8 cystéines (8CM) (Figure 15). Ces ponts disulfures stabilisent 4 hélices alpha et permettent la formation d'une cavité hydrophobe en forme de tunnel permettant la liaison et le transport de molécules hydrophobes comme les lipides (Kader 1996) (Figure 17).

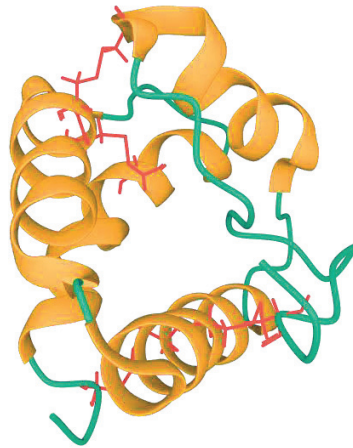


Figure 17 : Structure 3D de la nsLTP de blé, TaLTP1.1

Les hélices alpha sont représentées en jaune et les ponts disulfures en rouge. PDB ID : 1GH1, (Gincel et al. 1994).

La conformation des nsLTPs confère une résistance à la chaleur, aux agents dénaturants et aux protéases (Lindorff-Larsen et al. 2001). Ces peptides ont été initialement classés en deux groupes : LTP1 et LTP2, en fonction de leur poids moléculaire (respectivement 9 kDa et 7 kDa) et du motif des liaisons disulfures (Kader 1996). Depuis, la classification de cette famille de protéine a évolué grâce au développement des méthodes de classifications. En effet, Boutrot regroupe les nsLTPs en 9 types (I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII et IX) en se basant sur une analyse phylogénétique et sur l'espacement en nombre d'acides aminés entre les cystéines du motif caractéristique (Boutrot et al. 2008), espacement qui va influencer la dimension de la cavité. Une autre classification proposée par Edstam regroupe les nsLTPs en 10 types (1, 2, C, D, E, F, G, H, J et K) selon l'espacement des cystéines, la présence et la position d'introns dans la séquence codante ou encore la présence de glycosylphosphatidylinositol (GPI) qui est une modifications post-traductionnelle permettant l'ancrage du peptide dans les membranes (Edstam et al. 2011). Les nsLTPs sont largement distribuées dans les tissus végétaux tels que les graines, les feuilles, les tiges, les racines, les fleurs et les fruits et sont retrouvées chez toutes les plantes terrestres à l'exception des algues. Ainsi, les nsLTPs auraient évolué avec l'apparition des plantes terrestres (Edstam et al. 2011). Cependant, une nsLTP a été identifiée récemment chez une algues verte, *Chlamydomonas reinhardtii*, ce qui suggère que cette famille a une origine encore plus ancienne (Fonseca-García et al. 2021). Les nsLTPs impliquées dans l'immunité innée de la plante sont classées en tant que « pathogenesis-related protein »

(PR-14). Les nsLTPs participent à la résistance aux stress biotiques et abiotiques. En effet, il a été montré que l'expression de ces nsLTPs étaient induites lors de stress environnementaux tels que la sécheresse, des stress salins, le contact avec des microorganismes pathogènes (Edqvist et al. 2018). Ces peptides décrits comme capables de lier et de transférer des lipides *in vitro* sont impliqués dans divers processus biologiques de la plante comme la formation de cutine, le développement et la germination des graines, le développement des membranes, la signalisation et la nodulation (Edqvist et al. 2018). Les AMPs de plantes sont impliqués dans d'autres fonctions biologiques telles que les symbioses fixatrices d'azote. Leurs rôles seront décrits dans les paragraphes suivants.

3. Rôles des peptides antimicrobiens dans les symbioses fixatrices d'azote

A. Peptides antimicrobiens et légumineuses

Rôle des « Nodule Cystein Rich peptide »

Dans les symbioses fixatrices d'azote impliquant les légumineuses, certaines espèces de plantes sont capables d'induire une différenciation terminale des rhizobia dans la nodosité afin d'augmenter l'efficacité symbiotique. Cette différenciation terminale conduit à la formation de bactéroïdes polyploïdes aux membranes perméabilisées incapables de se diviser mais avec une réplication de l'ADN active. Les rhizobia différenciés en bactéroïdes dans les nodosités sont retrouvés chez des plantes appartenant au clade des IRLC (Inverted Repeat Lacking Clade) et chez certaines plantes du clade des Dalbergioides comprenant des plantes du genre *Aeschynomene* (Czernic et al. 2015). Cette différenciation est coordonnée par des petites protéines sécrétées par l'hôte et riches en cystéines appelées NCRs (Nodule Cysteine Rich peptides) ou NCR-like chez les Dalbergioides. Les NCRs et NCRs-like sont des peptides ayant des caractéristiques proches des AMPs. En effet, ce sont des peptides sécrétés avec une séquence mature de 30 à 50 acides aminés qui contient un motif en cystéine caractéristique proche du motif spécifique des défensines et de celui des neurotoxines (Figure 18). Ce motif peut être composé de 4 à 6 cystéines pour les NCR et de 6 à 9 cystéines pour les NCRs-like. Cette différence d'appellation vient du fait que les NCRs ont initialement été décrits chez les plantes appartenant au clade des IRLC mais il s'avère que les peptides NCR-like identifiés chez les plantes appartenant aux Dalbergioides diffèrent au niveau de leur structure comparée aux

NCRs (Alunni et al. 2016) (Figure 18). En plus d'induire la formation de bactéroïdes, les NCRs sont impliqués dans la sélection de symbiotes compatibles. En effet, *M. truncatula* sécrète deux NCRs (NFS1 et NFS2) qui permettent l'élimination de rhizobia incompatibles avec l'hôte lors de la nodulation (Wang et al. 2017, Yang et al. 2017).

NCR-IRLC	SP-X _n -C-X ₅ -C-X _n -C-X ₄ -C-X _n
NCR-IRLC	SP-X _n -C-X ₅ -C-X _n -C-X _n -C-X ₄ -C-X ₁ -C-X _n
NCR-Dalbergioides	SP-X _n -C-X ₆ -C-X ₃ -C-X ₁₁ -C-X ₄ -C-X ₁ -C-X _n
NCR-Dalbergioides	SP-X _n -C-X ₈ -C-X _n -C-X ₃ -C-X _n -C-X ₄ -C-X ₁ -C-X ₁ -C-X ₃ -C-X _n
Défensines	SP-X _n -C-X _n -C-X _n -C-X _n -C-X _n -C-X _n -C-X ₁ -C-X _n -C-X _n
Neurotoxine	SP-X _n -C-X _n -C-X ₃ -C-X _n -C-X ₄ -C-X ₁ -C-X _n

Figure 18 : Motifs caractéristiques des NCRs

Comparaison du motif en cystéines (C) des NCRs de légumineuses avec les motifs des défensines et des neurotoxines. SP : Peptide signal. X_n : nombre d'acides aminés, SP : peptide signal. Figure réalisée à partir de (Mergaert et al. 2003) et (Haag et al. 2020)

Ces peptides ont été identifiés pour la première fois chez *M. truncatula* qui compte maintenant plus de 600 gènes codants des NCRs (Mergaert et al. 2003, Montiel et al. 2017). Ces gènes sont uniquement exprimés dans des conditions symbiotiques dans le nodosité (Guefrachi et al. 2014). Ainsi, les NCRs, bien qu'étant classés en tant qu'AMPs ne font pas partie de la réponse immunitaire innée de la plante mais sont spécifiques à la symbiose (Guefrachi et al. 2014). Selon les espèces de plantes appartenant au clade des IRCL, le nombre de gènes codant des NCRs varie de 7 à 700 (Montiel et al. 2017).

Au niveau de leurs caractéristiques, même si la plupart sont cationiques, les peptides peuvent être également, anioniques ou neutres. Le repliement tertiaire de ces peptides semble être important pour la structure et la fonctionnalité du peptide puisque le remplacement d'une seule cystéine du peptide NCR169 conduit à son inactivation (Horváth et al. 2015). Cependant, la conformation des NCRs au sein de la nodosité reste encore à déterminer étant donné que des thioredoxines sont également adressées vers le cytosol des bactéroïdes. Ces protéines catalysent la réduction des ponts disulfures. Ainsi les thioredoxines pourraient permettre de contrôler l'activité des NCRs en influant sur leur état d'oxydoréduction (Mergaert 2018).

Au niveau de leurs modes d'action, les NCRs sont des peptides très diversifiés dont les fonctions sont encore peu connues. Les NCRs généralement cationiques compromettent

l'intégrité des membranes et peuvent de surcroît avoir des cibles intracellulaires telles que les ribosomes, la protéine FtsZ impliquée dans la division cellulaire ou encore la chaperonne GroEL impliquée dans la gestion du stress (Farkas et al. 2014). En plus d'être proches des défensines, certains de ces NCRs possèdent *in vitro* des activités antimicrobiennes contre des rhizobia symbiotiques mais aussi contre d'autres bactéries et champignons (Lima et al. 2020). D'un point de vue évolutif, les gènes codant ces NCRs auraient évolué à partir de gènes codant des défensines par duplication de gène avec une évolution et une diversification très rapides (Czernic et al. 2015). En effet, les gènes codants les NCRs sont organisés chez *M. truncatula* en plusieurs clusters de gènes répartis dans tout le génome au voisinage de gènes codant des éléments transposables. Cette répartition serait due à une évolution très rapide de ces gènes et à de nombreux évènements de duplication dans le génome. Bien que ces NCRs présentent une activité antimicrobienne contre le symbiote et que les gènes qui les codent soient présents en grand nombre dans le génome de certaines légumineuses ce qui ferait penser à une redondance de fonctions, la perte d'un gène codant un NCR provoque une sénescence rapide des bactéroïdes (Horvath et al., 2015 ; Kim et al., 2015). Chez les légumineuses, la capacité d'induire une différenciation du symbiote en bactéroïdes aurait été acquise au cours de l'évolution au moins 5 fois de manière indépendante (Oono et al. 2010). De plus, les NCRs participant à ces différenciations cellulaires présentent une grande diversité au niveau de leur composition et de leur complexité selon les espèces de plantes. Cette diversité est corrélée au morphotype de l'endosymbiote (Montiel et al. 2017). En effet, la forme des bactéroïdes varie en fonction de la plante hôte ; ils peuvent être gonflés, allongés ou encore sphériques. Par ailleurs, les NCRs-like retrouvés chez les plantes appartenant au clade Dalbergioides des légumineuses auraient évolué indépendamment des NCRs retrouvés chez les plantes appartenant au clade IRLC (Czernic et al., 2015). Ainsi, les NCRs chez les légumineuses auraient évolué de manière indépendante ce qui est en accord avec une évolution convergente de la capacité à induire une différenciation du symbiote chez les légumineuses.

Réponse du symbiote face aux NCRs

Les rhizobia confrontés à ces peptides durant la nodulation ont développé des mécanismes de résistances en co-évoluant avec leurs plantes hôtes. En effet, *Sinorhizobium meliloti* est un symbiote capable de résister à l'activité antimicrobienne des NCRs grâce au transporteur BacA

qui est un transporteur ABC (ATP Binding Cassette) orthologue du transporteur BclA retrouvé chez *Bradyrhizobium spp.* (Haag et al. 2011, Barrière et al. 2017) et qui est essentiel à la survie du symbiote dans la nodosité (Haag et al. 2013). Le transporteur BacA permet d'importer le peptide afin de le détourner de sa cible principale qui est la membrane bactérienne. Les symbiotes ne possédant pas ce transporteur sont sensibles aux NCRs et subissent une lyse dans la nodosité. Un autre mécanisme de résistance implique les exopolysaccharides (EPS) chez *S. meliloti* en piégeant les NCRs réduisant ainsi leur concentration donc leur toxicité (Montiel et al. 2017, Arnold et al. 2018). Les mécanismes de résistance aux NCRs chez les rhizobia endosymbiotiques ont été développés pour assurer leur survie dans la nodosité mais sont également décrits chez des souches de rhizobia capable de coloniser les tissus végétaux sans apporter d'azote à la plante. En effet, certains rhizobia dites « bactéries tricheuses » produisent des métallopeptidases Hrrp qui dégradent les NCRs (Price et al. 2015). En les dégradant, elles échappent à la différenciation en bactéroïdes dans les nodosités et peuvent proliférer dans les cellules végétales sans fixer l'azote.

Rôle des nsLTPs

Une autre famille d'AMP est sécrétée par les plantes nodulantes lors de l'interaction symbiotique. En effet, lorsque *M. truncatula* est en symbiose avec *S. meliloti*, un gène codant une nsLTP appelée MtN5 est surexprimé dans les étapes précoces de la nodulation ainsi que dans la nodosité (Pii et al. 2009, Pii et al. 2012). À la suite de la mutagenèse de ce gène chez *M. truncatula*, les premières étapes d'infection sont affectées. En effet, la mutation du gène codant MtN5 induit une augmentation du nombre de poils racinaires déformés et une réduction du nombre de pré-nodule. Par ailleurs, la surexpression de ce gène augmente le nombre de nodosités (Pii et al. 2009, Pii et al. 2012). Ainsi, MtN5 pourrait être impliqué dans le contrôle du symbiote dans les premières étapes d'infection en limitant l'invasion de la racine et en favorisant l'infection dans le cortex (Pii et al. 2013). Ainsi, MtN5 n'est pas indispensable pour l'initiation de la nodosité mais semble jouer un rôle dans l'invasion de la plante par le symbiote.

Chez *M. truncatula*, deux autres gènes codants des nsLTPs sont exprimés dans la nodosité, *mtltp3* et *mtltp7*. L'expression de ces deux gènes a été étudiée au niveau de la racine à différentes étapes de la symbiose. Il s'avère que ces gènes ont une même dynamique

d'expression en s'exprimant dans les premières étapes de contact avec le symbiote, et dans la nodosité (Santi et al. 2020). La réduction de l'expression de *mtltp7* (par la méthode d'ARN interférant) chez cette plante induit une diminution de production de nodosités de 60% par rapport aux plantes contrôles (Santi et al. 2020). Ainsi MtLTP7 semble être nécessaire à la nodulation avec un possible rôle dans la régulation de l'invasion des tissus végétaux par le symbiote.

Les nsLTPs ont été étudiées chez une autre légumineuse, *Astragalus sinicus* (Chinese milk vetch) (Lei et al. 2014). En effet, un gène codant une nsLTP, *ase246* est exprimé spécifiquement dans les premières étapes de la symbiose ainsi que dans la nodosité. Cette nsLTP a été localisée dans les tissus végétaux grâce à une approche d'immunohistochimie et par microscopie électronique. Ces analyses ont permis de localiser AsE246 dans les premières étapes de la symbiose au niveau du cordon d'infection formé dans les poils racinaires déformés (Figure 19).

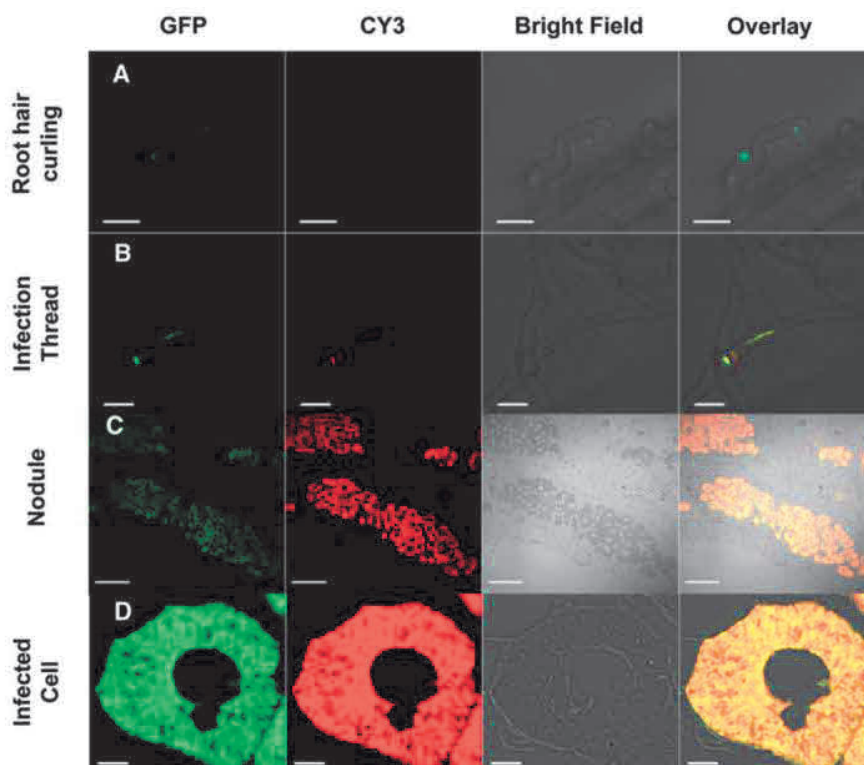


Figure 19 : Localisation AsE246 dans les tissus végétaux lors de la nodulation

Immunolocalisation d'AsE246 dans les racines infectées de *A. sinicus* par *Mesorhizobium huakuii* 7653R. Les rhizobies sont marqués en vert avec de la GFP, AsE246 en rouge (Cy3), la co-localisation en jaune sur la superposition des images (overlay). Des images ont également été prises en lumière visible (Bright Field) (A) Localisation dans les poils racinaires déformés. (B) Localisation dans le cordon

d'infection. (C) Localisation dans la nodosité. (D) Localisation dans une cellule végétale infectée de la nodosité. Echelles = 20 μm (A and B), 200 μm (C), 10 μm (D). Source : (Lei et al. 2014)

Une extinction de l'expression de ce gène a été réalisée par ARN interférence chez *A. sinicus*. Ce mutant présente une réduction du nombre de nodosités qui sont de plus petites tailles et plus claires avec une activité de fixation d'azote plus faible que les nodosités provenant de plantes témoins. De plus, la mutation d'AsE246 induit un développement anormal du symbiosome (Figure 20). Cet élargissement suggère une augmentation de la perméabilité de la membrane entraînant une sensibilité à la pression osmotique dans les nodosités ce qui diminuerait l'activité de fixation d'azote. Dans la nodosité, ce peptide ciblerait la membrane du symbiosome entourant l'endosymbiote. En effet, il a été montré que AsE246 est capable *in vitro* de se lier aux lipides d'origine végétal membranaires dont le digalactosyldiacylglycerole (DGDG). La mutation de ce gène impacte le contenu lipidique de la nodosité, cette nsLTP pourrait participer au trafic de lipides végétaux à la membrane du symbiosome. De plus, divers processus cellulaires sont dépendants de ce contenu lipidique tels que la transduction du signal, les trafics membranaires ou encore le métabolisme des lipides et pourraient donc être impactés par l'absence de ce peptide.

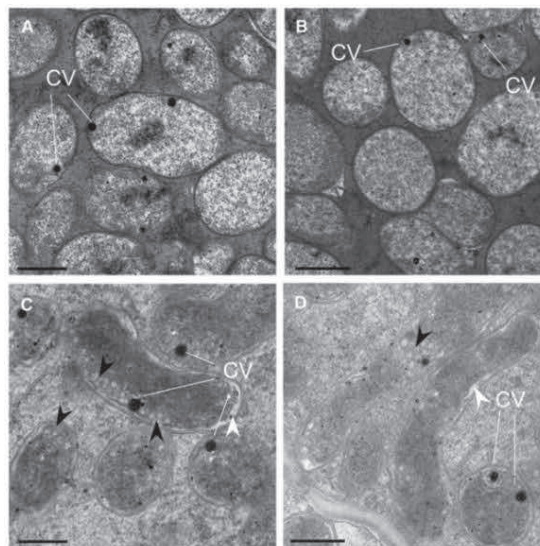


Figure 20 : Localisation d'AsE246 dans la nodosité d'*A. sinicus*

(A et B) Photo de microscopie électronique à transmission (MET) du symbiosome de nodosité de plante témoin. (C et D) Photo de MET du symbiosome de nodosité de plante mutée du gène *ase246* par RNAi. Les flèches blanches indiquent les zones d'élargissement de l'espace péri-bactéroïdes. Les flèches noires indiquent des accumulations de poly- β -hydroxybutyrate qui sont des systèmes de réserve de nutriments. Echelle = 500 nm. Source : (Lei et al. 2014)

Ainsi, AsE246 pourrait être impliquée dans la réorganisation et/ou dans la formation des membranes. De plus, il a été montré que AsE246, en interaction avec la protéine chaperonne HtpG du symbiote bactérien, participerait aux transports lipidiques au niveau du symbiosome et serait importante pour la symbiose notamment dans l'infection et la maintenance des bactéroïdes (Lei et al. 2014, Zhou et al. 2019).

B. Peptides antimicrobiens et plantes actinorhiziennes

L'implication des AMPs dans les symbioses actinorhiziennes est beaucoup moins décrite dû au manque d'outils génétiques, aussi bien du côté de la bactérie que des plantes actinorhiziennes. Pour pallier ces difficultés, des analyses transcriptomiques menées à différentes étapes de la symbiose sur l'hôte ont permis d'identifier des gènes codants des AMPs surexprimés dans des conditions symbiotiques chez différentes plantes actinorhiziennes et vont être décrites ci-dessous.

Rôle des Défensines

Des gènes codants des défensines surexprimés dans les nodosités comparées aux racines non infectées ont été identifiés dans trois transcriptomes de plantes actinorhiziennes appartenant aux ordres des Fagales, Rosales et Cucurbitales. En effet, deux gènes codants des défensines sont surexprimés dans la nodosité *C. thyrsoiflorus* (Salgado et al. 2018), deux autres sont surexprimés dans la nodosité de *D. glomerata* (DgDEF1 (Dgc156), Fold Change (FC)=2223 et DgDEF2 (Dgc845) FC=89.5) (Demina et al. 2013) et 15 dans la nodosité d'*A. glutinosa* (Carro et al. 2015). Les effets des défensines dont les gènes sont les plus surexprimés dans les nodosités ont été étudiées (AgDef1, AgDef5, AgDef6, AgDef9 et AgDef11). Parmi celles-ci, AgDef5 qui a été la plus étudiée cible les diazovésicules fixatrices d'azote de *Frankia* dans la nodosité (Carro et al. 2015) (Figure 21).

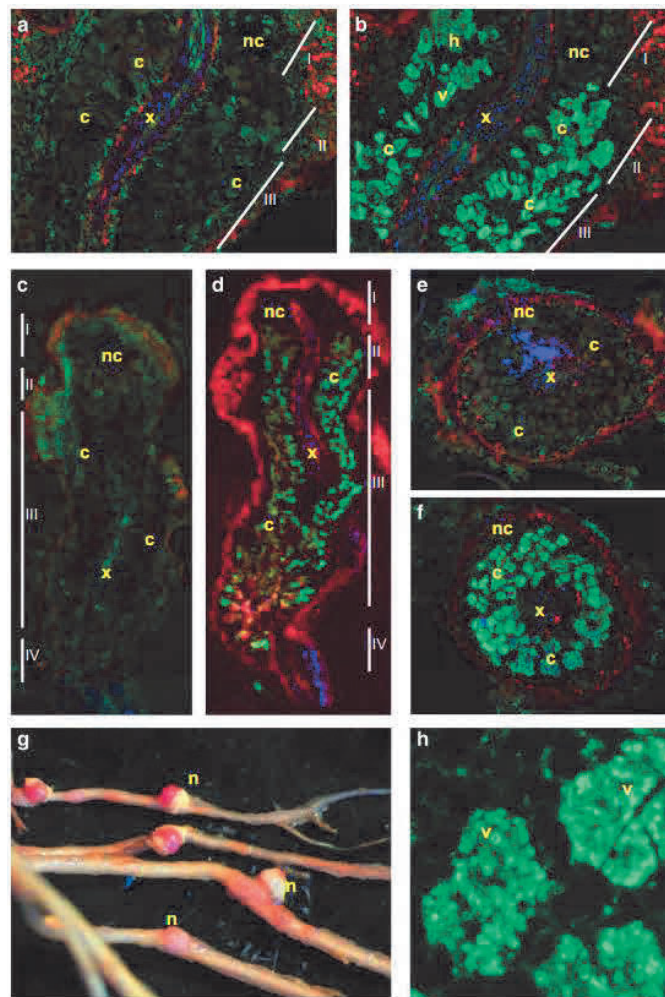


Figure 21 : Localisation d'AgDef5 dans la nodosité d'*A. glutinosa*

Les contrôles négatifs ont été réalisés avec du sérum de lapin avant l'injection d'Ag5 (a, c, e). Immunolocalisation d'AgDef5 avec l'anticorps anti-Ag5 (b, d, f, h). L'observation des nodosités a été réalisée avec des coupes longitudinales (a, b, c, d) et transversales (e, f). (g) Photographie de racines d'*A. glutinosa* avec des nodosités. Bleu : DAPI ; rouge : autofluorescence ; vert : Anticorps anti-lapin couplé à un fluorochrome Alexa Fluor 488 (Life Technologies, Saint Aubin, France). c, cellules infectées ; h, hyphes ; nc, cellules non infectées ; v, diazovésicules ; x, xylème. I, Méristème ; II, Zone d'infection ; III, Zone de fixation d'azote et IV, Zone de sénescence. Source : (Carro et al. 2015)

Cette étude a en effet montré qu' AgDef5 permettrait, *in vitro*, de perméabiliser les diazovésicules de *Frankia* et de moduler la respiration et la fixation d'azote de *F. alni ACN14a*. Cette perméabilisation des diazovésicules permet le relargage d'acides aminés, *in vitro*, dans le milieu et principalement la glutamine. Comme abordé précédemment, la glutamine synthétase est induite dans les diazovésicules de *Frankia* dans la nodosité et joue un rôle central dans l'assimilation de l'azote (Hay et al. 2020). Ainsi, AgDef5 participerait aux échanges azotés en transférant la glutamine produite par le symbiote à la plante hôte. Cependant, il

n'est pas exclu que l'ammonium seul puisse également être transféré dans ce modèle. Ainsi, AgDef5 produite par l'hôte lors de la nodulation ciblerait les diazovésicules fixatrices d'azote afin d'améliorer les échanges trophiques entre les partenaires symbiotiques.

Dans cette section d'introduction, nous avons vu que les AMPs de plantes, décrits principalement dans la défense, jouent également des rôles dans divers processus dont les symbioses fixatrices d'azote chez les plantes nodulantes. De fait, différentes familles de peptide aux fonctions variées sont impliquées dans la symbiose chez les légumineuses et les plantes actinorhiziennes. En effet, des NCRs produits spécifiquement par certaines espèces de légumineuses dans la nodosité permettent la différenciation terminale du symbiote en bactéroïde afin d'améliorer son efficacité et peuvent également intervenir dans la sélection des symbiotes compatibles. D'autre part, une seconde famille d'AMPs, les nsLTPs, sont sécrétés par les légumineuses dans les étapes précoces de la symbiose et dans la nodosité afin de contrôler l'infection et jouent aussi un rôle dans le transfert lipidique. Concernant les symbioses actinorhiziennes beaucoup moins d'informations sont disponibles. Cependant, des études *in silico* ont permis d'identifier des gènes codant des défensines surexprimées dans la nodosité. Parmi celles-ci, AgDef5 sécrétée par *A. glutinosa* dans la nodosité perméabilise *in vitro* les diazovésicules fixatrice d'azote de *Frankia* entraînant une fuite de métabolites ce qui améliorerait les échanges trophiques entre les partenaires.

IV. Objectifs de thèse

Dans les symbioses actinorhiziennes, les rôles biologiques des AMPs lors de la symbiose sont très peu décrits. En effet, seule la famille des défensines a été étudiée par des approches *in silico* chez *C. thyriflorus*, *D. glomerata* et *A. glutinosa* (Demina et al. 2013, Carro et al. 2015, Salgado et al. 2018). Grâce aux données transcriptomiques au stade de la nodosité fonctionnelle d'*A. glutinosa* (21 jours post-inoculation (dpi)), 15 gènes surexprimés codant des défensines ont été identifiés. Parmi ces défensines, AgDef5 a été localisée au niveau des cellules végétales infectées par *Frankia* et plus précisément autour des diazovésicules fixatrices d'azote. De plus, *in vitro* ce peptide perméabilise les diazovésicules du symbiote, *F. alni* ACN14a conduisant à une fuite de métabolites riches en azote. Ceci pourrait permettre d'améliorer les échanges trophiques entre les deux partenaires (Carro et al. 2015).

De nouvelles données ont permis d'identifier une seconde famille d'AMPs potentiellement impliquée dans le processus symbiotique. En effet, les données transcriptomiques de l'aulne aux stades prénodule et nodosité (7 et 21 dpi) ont été complétées avec l'étude du transcriptome de cette plante lors des premiers échanges avec le symbiote *F. alni* ACN14a (2,5 dpi). Ces données transcriptomiques, au stade précoce de la symbiose ont révélé que 80% des gènes surexprimés codent des peptides sécrétés. Parmi ceux-ci, une seconde famille d'AMP, celle des nsLTPs a été identifiée. En effet, un gène codant la nsLTP, appelé AgLTP24, s'avère être le plus surexprimé à cette étape (Fold Change=140) mais aussi dans les nodosités fonctionnelles (Fold Change=2145). Cette dynamique d'expression suggère ainsi un rôle important d'AgLTP24 de la mise en place jusqu'au maintien de la symbiose. L'objectif de mes travaux a donc été d'étudier le rôle du peptide antimicrobien AgLTP24 de la famille des nsLTPs dans la symbiose actinorhizienne entre *A. glutinosa* et *F. alni* ACN14a.

La première partie de mes travaux avait pour but de localiser AgLTP24 dans les tissus végétaux à différents stades de la symbiose et de déterminer ses effets physiologiques sur le symbiote bactérien *Frankia* afin d'identifier de possibles fonctions biologiques. La deuxième partie de ces travaux s'est concentrée sur la réponse moléculaire du symbiote face à AgLTP24 et sur une étude plus large des nsLTPs en identifiant leur distribution au sein de plantes nodulantes, leur expression dans la nodosité et leur histoire évolutive dans les symbioses fixatrices d'azote.

TRAVAUX DE RECHERCHE

Chapitre 1

Symbiose entre *Alnus glutinosa* et *Frankia alni* ACN14a : une nsLTP impliquée de l'infection à la nodulation

PREAMBULE

Afin de mieux comprendre les mécanismes mis en place par *Alnus glutinosa* lors de la symbiose, des études transcriptomiques au stade de prénodule et dans la nodosité ont été réalisées (Hoher et al. 2011a). Ces données ont été complétées par mon équipe d'accueil avant mon arrivée en thèse avec l'étude de la réponse de la plante lors des premières étapes de la symbiose à 2.5 jours post-inoculation (dpi) par *Frankia alni* ACN14a. Ces étapes précoces ont lieu au moment où les poils racinaires sont déformés (Berry & Torrey, 1983) avant la formation du prénodule qui se forme à 7 dpi (Lalonde, 1979). Ces étapes comprennent la reconnaissance du symbiote et les premières réponses de la plante. Pour étudier cette réponse, la plante a été placée en contact acellulaire avec son symbiote, *F. alni* ACN14a dans deux conditions : i) contact indirect et dynamique avec *Frankia* piégée dans un tube de dialyse, ii) contact direct avec le surnageant de *Frankia*. Ces données transcriptomiques ont révélé que 80% des gènes surexprimés dans ces conditions codent des peptides sécrétés dont certains sont annotés en tant qu'AMPs. Parmi ceux-ci, le gène le plus surexprimé dans ces étapes précoces code une nsLTP, AgLTP24. Ce gène fait également partie des gènes les plus surexprimés dans les étapes prénodule et nodosité (7 et 21 dpi), ce qui suggère que ce peptide pourrait jouer un rôle primordial dans la mise en place et le maintien de la symbiose. Dans un premier temps, nous avons étudié sa localisation au sein de la nodosité (21 dpi) et des racines en contact avec *F. alni* ACN14a (2.5 dpi) grâce à de l'imagerie puis nous sommes intéressés à ses effets sur le symbiote bactérien.

Le peptide AgLTP24 a été localisé dans les racines de l'aune à 2.5 dpi et dans la nodosité (21 dpi) par immunolocalisation en utilisant des anticorps spécifiques à ce peptide. Une fluorescence a été observée au niveau des poils racinaires déformés de l'aune à 2.5 dpi évoquant une implication du peptide dans les étapes précoces de la symbiose. Dans la nodosité, le signal se localise dans les cellules végétales infectées par la bactérie, et semblerait

être localisé plus précisément autour des hyphes et des diazovésicules du symbiote bactérien *Frankia*, impliquées dans la fixation d'azote. Ainsi, *A. glutinosa* secrète spécifiquement AgLTP24 lors des premiers contacts entre la plante et la bactérie et l'adresse à son symbiote dans la nodosité. Pour comprendre le rôle biologique d'AgLTP24 lors de la nodulation, son effet sur le symbiote a été testé. Afin de réaliser ces tests, le peptide a été dans un premier temps produit biologiquement par expression hétérologue dans la souche *Escherichia coli* ShuffleT7 *lysY* permettant la production de peptides avec des ponts disulfures puis le peptide a été purifié. L'activité antimicrobienne du peptide a ensuite été testé et il s'avère qu'à partir de 5µM, AgLTP24 induit une baisse de 16% de la croissance du symbiote. Etant donné que le symbiote dans la nodosité doit être viable et efficace pour assurer la fixation d'azote et les échanges trophiques, des tests physiologiques ont été réalisés à des concentrations sub-inhibitrices de ce peptide. Ces tests ont été réalisés en mesurant l'effet d'AgLTP24 sur l'activité de fixation l'azote, la respiration et sur la croissance cellulaire. Ces tests ont montré qu'AgLTP24, après 7 jours de contact, inhibait la fixation de *Frankia* à partir de 100nM.

Pour cet article, j'ai réalisé la construction du vecteur pour l'expression hétérologue d'AgLTP24 sans peptide signal avec un tag histidine. J'ai mis au point les protocoles de production et de purification et j'ai produit et purifié AgLTP24. J'ai traité les données des tests physiologiques, réalisé les tests statistiques et les représentations graphiques. Avec Ons Kharrat en stage de Master 2 biochimie sur ce projet, nous avons mis au point et réalisé les tests d'activité métabolique de *F. alni* ACN14a en microplaque (test résazurine) et réalisé les tests. Les observations microscopiques ont été réalisées par Ons Kharrat, Hasna Boubakri et moi. J'ai ensuite traité les données puis mené des analyses statistiques et les représentations graphiques. J'ai réalisé l'immunolocalisation d'AgLTP24 sur les racines d'*A. glutinosa* en contact avec *F. alni* ACN14a. J'ai mis en forme le données sous le format heatmap (Figure2) et fait la correspondance entre les ESTs des données transcriptomique d'*A. glutinosa* et les gènes annotés suite au séquençage du génome de la plante (publié en 2018) en utilisant l'outil BLASTN. Les travaux réalisés sur AgLTP24 pendant ma thèse, qui décrivent l'implication d'une nsLTP lors de la symbiose actinorhizienne, ont été valorisés à travers un article comprenant les données transcriptomiques d'*A. glutinosa* aux stades précoces de la symbiose. Cet article a été accepté dans le journal « Molecular Plant-Microbe Interactions », <https://doi.org/10.1094/mpmi-06-22-0131-r>.

A non-specific Lipid Transfer Protein with potential functions in infection and nodulation

Mélanie GASSER¹, Nicole ALLOISIO¹, Pascale FOURNIER¹, Severine BALMAND², Ons KHARRAT¹, Joris TULUMELLO^{1,3}, Lorena CARRO^{1,4}, Abdelaziz HEDDI², Pedro Da SILVA², Philippe NORMAND¹, Petar PUJIC^{1,5}, Hasna BOUBAKRI^{1,5#}

1-Université de Lyon, F-69361, Lyon, France ; Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR 5557, INRAE UMR1418, Ecologie Microbienne, F-69622, Villeurbanne, France. 2-INSA-Lyon, INRAE, UMR203 BF2i, Biologie Fonctionnelle Insectes et Interactions, Villeurbanne, France. 3-present address: Aix Marseille Univ, CEA, CNRS, BIAM, Lab Microbial Ecology of the Rhizosphere (LEMIRE), F-13108, Saint-Paul-Lez-Durance, France; BioIntrant 139, Rue Philippe de Girard, Pertuis F-84120, France. 4-present address: Departamento de Microbiología y Genética, Facultad de CC Agrarias y Ambientales, Universidad de Salamanca <https://ror.org/02f40zc51>, Plaza Doctores de la Reina, 37007, Salamanca, Spain. 5-co-seniors

#corresponding author: hasna.boubakri@univ-lyon1.fr, tel: 33-472 44 82 00

ABSTRACT

The response of *Alnus glutinosa* to *Frankia alni* ACN14a is driven by several sequential physiological events from calcium spiking and root hair deformation to the development of the nodule. Early stages of actinorhizal symbiosis were monitored at the transcriptional level to observe plant host responses to *Frankia*. Forty-two genes were significantly upregulated in inoculated compared to non-inoculated roots. Most of these genes encode proteins involved in biological processes induced during microbial infection such as oxidative stress or response to stimuli but a large part of them are not differentially modulated or downregulated later in the process of nodulation. In contrast, several of them remained upregulated in mature nodules, and this included the gene most upregulated, which encodes a non-specific lipid transfer protein (nsLTP). Classified as an antimicrobial peptide, this nsLTP, was immunolocalized on the deformed root hair surfaces that are points of contact for *Frankia* during infection. Later in nodules, it binds to the surface of *Frankia*'s vesicles, which are the specialized cells for nitrogen fixation. This nsLTP, named AgLTP24, was biologically produced in a heterologous host and purified for assay on *F. alni* ACN14a to identify physiological effects. Thus, the activation of the plant immunity response occurs upon first contact, while the recognition of *Frankia* switches off part of the defense system during nodulation. AgLTP24 constitutes a part of the defense system that is maintained all along the symbiosis with

potential functions such as the formation of infection threads or nodule primordia to the control of *Frankia* proliferation.

Keywords: antimicrobial peptide, infection threads, immunity, nitrogen fixation, nodule, oxidative stress, root hairs.

INTRODUCTION

Mutualistic symbioses are fascinating paragons of coevolution, promoting plant growth by facilitating access to scarce nutrients and keeping pathogens at bay. To cope with the shortage of essential nitrogenous compounds, some plants developed highly sophisticated systems to interact with nitrogen-fixing bacteria (diazobacteria). Only plant species belonging to a phylogenetic clade composed of four orders (Fabales, Fagales, Cucurbitales and Rosales) have the capacity to form nitrogen-fixing root nodules symbioses (RNS). This concerns the legume family (Fabales) and the non-legume, *Parasponia* (Rosales), associated with the well-studied Gram-negative rhizobia. This RNS also concerns actinorhizal plants, which represent over 200 species spread among 8 families and 25 genera of the Fagales, Rosales, and Cucurbitales orders, and which are associated with the Gram-positive *Frankia*. Actinorhizal symbiosis is considered the most ancient (about 70–90 Mya) (Coba de la Peña et al., 2018) mainly constituted by perennial woody shrubs or trees distributed all around the world and able to fix a large amount (over 15%) of the biologically available nitrogen into ecosystems, making this symbiosis a key player in the nitrogen cycle. *Frankia* is responsible of this nitrogen fixation in actinorhizal plants, and contrary to rhizobia, *Frankia* is also a free-living diazotrophic bacterium in the rhizosphere through its unique capacity to differentiate its hyphae cells into diazovesicles, which are the specialized cells for nitrogen fixation.

Among actinorhizal plants, *Alnus glutinosa* is the model species of the genus (Navarro et al., 2003) which grows in pioneer biotopes such as glacial moraines, volcanic ashes and mine spoils (Normand and Fernandez, 2019) and its genome has been sequenced recently (Griesmann et al., 2018). The molecular components of the interaction between *A. glutinosa* and their symbiotic *Frankia* are poorly known, due among other reasons to the lack of a transformation system.

The presence of a symbiotic bacterium like *Frankia* or merely its exudates, triggers in the host plant tissues a series of events leading to root hair deformation and calcium spiking (Granqvist et al., 2015). Root hair deformation is followed by penetration of roots by *Frankia*, primordium formation, nodule organogenesis, and ultimately exchange of nutrients. Omic analyses have permitted to gain a global view of the physiological changes taking place in this symbiosis upon specific conditions. In particular, transcriptomics of mature 21 day post-inoculation (dpi) nodules permitted to see on the plant side the presence of homologs of the whole common symbiotic signaling pathway or CSSP (Hocher et al., 2011b; Hocher et al., 2011a), of which *NIN* and *RPG* have been lost in non-symbiotic neighbors (Griesmann et al., 2018).

The important conservation on the plant side of the CSSP (Hocher et al., 2011b) contrasts with the absence of the canonical *nod* genes in most *Frankia* genomes (Normand et al., 2007) which are involved in the biosynthesis of Nod Factor (NF) in most rhizobia (D’Haeze and Holsters, 2002). In mature *A. glutinosa* nodules, the bacterial genes *nif*, *hup*, *shc* and *suf* are upregulated but no trace of a symbiosis island (clustering symbiotic signaling and nitrogen fixation encoding genes in integrative and conjugative genetic elements (Sullivan et al., 2002) was found (Alloisio et al., 2010). A study of the *F. alni* ACN14a early response (2.5 dpi) showed that several bacterial determinants were upregulated in contact with the plant (compared to N-free culture condition) among which a K-transporter, lipid modifying enzymes and a cellulose synthase cluster conserved among the *Frankia* and other actinobacteria such as *Streptomyces* (Pujic et al., 2019). Globally, metabolomics done on *A. glutinosa* nodules showed the presence of various compounds that are less abundant or absent in roots such as citrulline, glutamate and pyruvate or the tricarboxylic acid cycle intermediates composed by citrate, fumarate, malate suggesting a metabolic partitioning between *Frankia* and its host plant cells in the nodule tissue (Carro et al., 2015a; Brooks and Benson, 2016; Hay et al., 2020).

Signaling between *A. glutinosa* and *F. alni* ACN14a involves on the bacterium side the synthesis of an uncharacterized root hair deforming factor (Ghelue et al., 1997; Cérémonie et al., 1999) and a specific auxin, phenylacetic acid (Hammad et al., 2003). On the plant side, less is known besides the upregulation of defensins that modify the porosity of *Frankia* membranes (Carro et al., 2015b; Carro et al., 2016).

We undertook the present study to better understand the initial steps of the actinorhizal symbiosis on the plant side where the symbiont must be recognized to pave the way for its

internalization. To analyze this early plant responses to *Frankia* symbiont we have conducted a cell-free contact using two conditions: membrane dynamic contact with *F. alni* ACN14a trapped in a dialysis tube or its supernatant and by targeting 2.5 dpi response, by which time extensive root hair deformation has occurred (Berry and Torrey, 1983), but the primordium is not formed yet (Lalonde, 1979). We further focused on the most upregulated gene coding for an antimicrobial peptide classified as non-specific Lipid Transfer Protein (nsLTP), which is also an overexpressed gene in the nodule (Hoher et al., 2011b). The nsLTPs, found only in land plants, are small in size (6.5–10.5 kDa), characterized by an eight-cysteine motif backbone and termed this way because of their ability to bind a variety of hydrophobic molecules such as phospholipids or fatty acids (Salminen et al., 2016; D'Agostino et al., 2019). This study showed that this nsLTP, named here as AgLTP24 was localized on the surface of deformed root hairs and around *Frankia's* vesicles inside nodules. Purified *in vitro*, this nsLTP impacted *Frankia* nitrogen fixation and growth suggesting that AgLTP24 could be a part of the defense system that is maintained all along the symbiosis.

RESULTS

Transcriptomic response of *Alnus glutinosa* at 2.5 dpi

In *A. glutinosa* roots after 2.5 days post inoculation (dpi) by *F. alni* ACN14a in dynamic contact through dialysis membranes (cut off 100 kDa - *F* mDyn condition) and compared to non-inoculated roots (control), 300 and 225 genes were found to be significantly up- and down-regulated, respectively (see supplemental Table S1). For the *Frankia* supernatant contact condition at 2.5 dpi (*F* supC) compared to the control, 176 and 76 genes were up- and down-regulated, respectively (see supplemental Table S2). Between *F* supC and *F* mDyn conditions, 42 and 42 genes were up and down regulated in both conditions (see supplemental Table S3).

Biological processes implicated in early steps of symbiosis

A GO enrichment analysis was carried out following BLASTX search. This analysis showed that 12 to 23 % have no hits, 8 to 14% had a hit to unknown functions, and the remaining 63 to 80 % were associated with a total of 19 GO terms under biological processes (see supplemental Fig. S1). The annotated sequences retrieved were distributed into 19 different processes (Fig.

1A). The presence of *Frankia* at an early stage highly activated genes encoding proteins involved in response to stimuli and catabolic processes. Among them, several genes encoding enzymes implicated in oxidative stress (oxidase, peroxidase) or defense (chitinase, defensin, thaumatin...) were upregulated either with cell supernatant or *Frankia* cells.

A statistical analysis (Fisher's test) was used to identify if the enrichment of certain enzyme families in one pool of genes was present by comparing it to a second one. Between up and down-regulated genes found in *F* supC, Fisher's test identified no GO enrichment where difference were statistically found in the *F* mDyn condition (Fig. 1B). Between up and down-regulated genes found in the *F* mDyn assay, an overrepresentation of genes coding for enzymes involved in oxidation-reduction processes, oxidative stress or defense responses was seen (see supplemental Table S1 and S4). Also, genes encoding enzymes involved in amino acids metabolism, organo-nitrogen compound or carboxylic acid biosynthetic processes such as selenocysteine methyltransferase, phenylalanine ammonia lyase or caffeic acid O-methyltransferase were over-detected among the *F* mDyn up-regulated genes. Nucleotide binding proteins such as a receptor kinase (AG-N01f_037_C05), a uridine kinase (AG-N01f_030_B06) or a calcium membrane transporter (AGCL1701Contig1) were also more abundant in the set of up-regulated genes in *F* mDyn assay. Conversely, we observed an enrichment of down-regulated genes encoding enzymes having isomerase activity such as inositol-3-phosphate synthase, ribose-5-phosphate isomerase or beta-amyrin synthase.

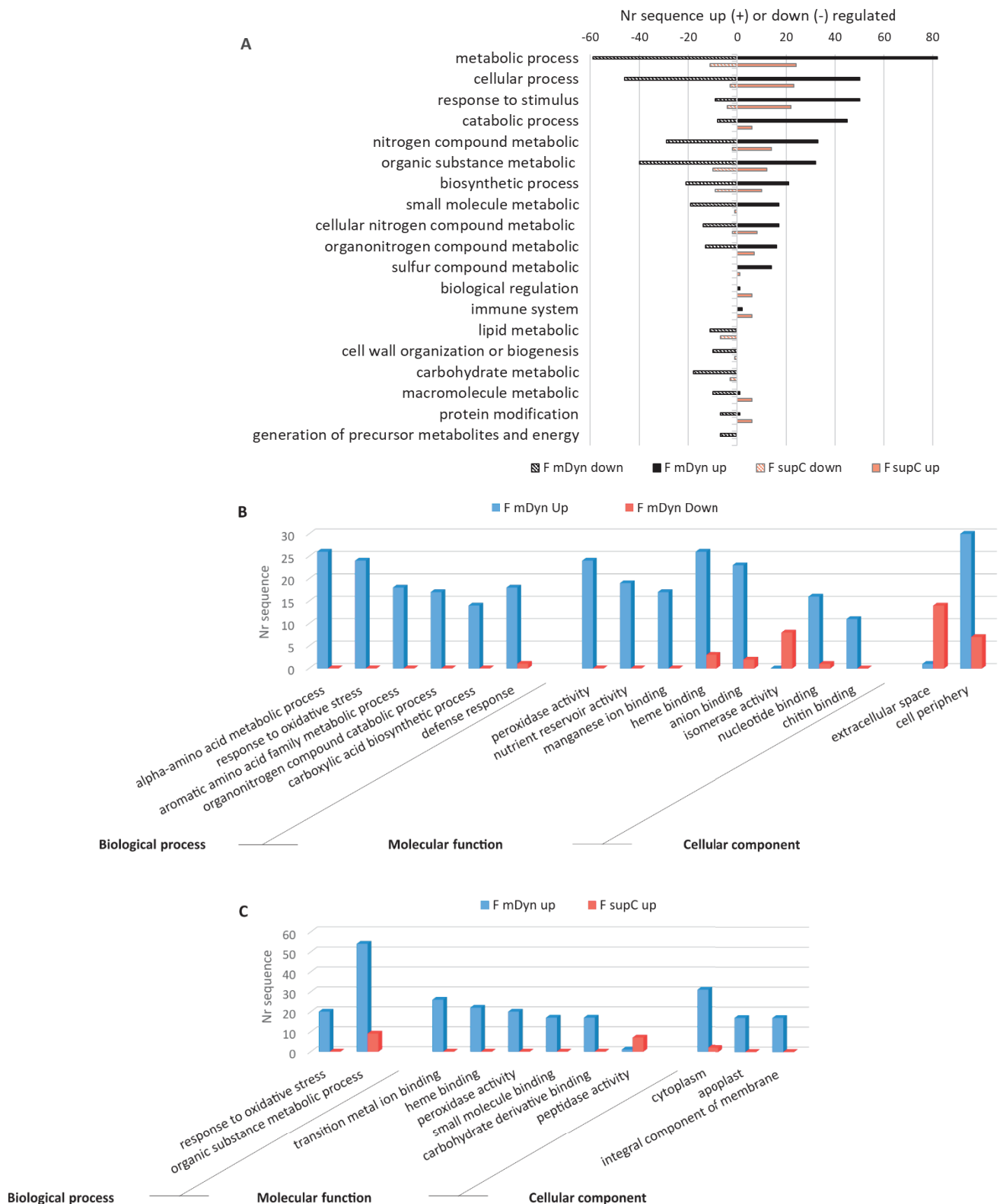


Figure 1: Gene Ontology (GO) functional classification analysis. (A) Distribution of annotated genes into functional categories according to the Blast2GO application (Conesa et al., 2005) using *F mDyn* (in black) or *F supC* data (in orange). GO functional classification analysis was made by comparing (B) up and down-regulated genes found in *F mDyn* (see supplemental Table S1) and (C) up-regulated genes found in *F mDyn* versus *F supC* conditions (see supplemental Table S1 and Table S2) according to biological process, molecular function and cellular component through Fisher's exact test. Number of

sequences (Nr) were indicated for each category. Blast2GO pipeline was used to get this GO annotation.

The most up-regulated genes in both assays during the early steps of symbiosis

Amongst the 42 most upregulated genes found in both assays (Table 1), a gene encoding a non-specific lipid transfer protein or nsLTP was the most upregulated (inoculated versus non-inoculated roots Fold Change (FC): 140.7 in *F mDyn* and 74.8 in *F supC* bioassays), followed by a beta-tubulin and a pectin methylesterase inhibitor. Remarkably, 20 out of these 42 up-regulated genes encoded proteins with a signal peptide (Table 1). Thus, numerous upregulated genes encode secreted peptides (47%), some of which are classified as antimicrobials such as 3 defensins (Ag5, Ag3 and Ag11), the nsLTP and a thaumatin like-protein.

To confirm the level of expression at this early symbiotic step, we did qRT-PCR on two genes, one encoding the nsLTP and the second encoding the basic blue copper protein with two primer pairs per gene (see supplemental Table S5). Up-regulation was confirmed using the same biological replicates previously analyzed (see supplemental Table S6).

In order to follow the time course of expression during nodulation, we compared our results with the FC obtained with the same microarray at 21 dpi comparing the nodule data with non-infected roots (Table 1, Fig. 2) from our previous work (Hochoer et al., 2011b). Down-regulated genes found in infected roots after 2.5 dpi followed two profiles: always down-regulated or no difference in nodules (21 dpi). Conversely, genes upregulated at 2.5 dpi were classified into three profiles. Sixteen were up-regulated, 17 were not modulated and 8 repressed in nodules. For instance, genes encoding proteins involved in stress response were found in the three profiles (Fig. 2) but we found mainly AMPs (defensin, thaumatin) in the first while chitinase and peroxidase were enriched in the two other profiles (Table 1). The nsLTP found as the most upregulated gene at an early step presented also a very high expression at 21 dpi (FC=2145 in nodule, Table 1) suggesting a requirement all along the symbiotic interaction. Globally, the nsLTPs are classified as antimicrobial peptides (AMPs) and annotated as systematic acquired resistance suggesting their potential role in defense response. For all these reasons, we decided to focus our functional analysis on this nsLTP.

Table 1: The up-regulated genes during early root hair deformation of *Alnus glutinosa* in both bioassays, with *Frankia alni* ACN14a in membrane dynamic contact (F mDyn) or with *F. alni* ACN14a supernatant contact (F supC). For contigs, EMBL-Accession numbers of all the contigated EST sequences are indicated. Singleton or contig nucleotide sequences are indicated when they were not of high-enough quality for EMBL submission acceptance. Fold Change (FC) is the ratio between F mDyn roots and control roots and between F SupC roots and control roots, respectively. The significant difference of gene expression between F mDyn roots and control roots and between F SupC roots and control roots ($FC \geq 2$ or ≤ 0.05) was assessed by a T- test at $p < 0.05$

*: Results of the previously reported microarray study with *Alnus glutinosa* nodules are indicated: FC* is the ratio between nodules and non-inoculated root and p^* is the p value of a t-student test comparing these two conditions (Hoher et al., 2011a). ns indicated non-significant difference between nodules and non-inoculated root ($p < 0.05$)

For EMBL-accession number, see Table S3.

NA: not assigned

§: correspondence with the N° of accession of gene annotated after *A. glutinosa* genome sequencing (Griesmann et al., 2018) by using a BLASTN program ($>90\%$ identity, $>60\%$ cover, E-value <0.0001).

#AGCL3038Contig1 sequence is the 3' noncoding region of basic blue copper gene (AG-N01f_023_I15).

Clone Name	N° accession#	F mDyn FC	F supC FC	Nodule* FC*	Sequence homology	GO annotation	Peptide signal
AGCL115Contig1	Alng424615503856	140.65	1.8E-06	2145.65	lipid transfer protein AgLTP24	systemic acquired resistance	Yes
AG-N01f_017_D15	Alng243444S21531	24.72	1.7E-06	173.71	beta tubulin 14	cytoskeleton organization	No
AG-R01f_023_D12	NA	10.02	3.3E-04	0.55	pectin methylesterase inhibitor	F:enzyme regulator activity	Yes
AGCL581Contig1	NA	8.78	5.7E-04	2941.04	NA	NA	Yes
AGCL3639Contig1	NA	8.57	1.4E-05	55.49	NA	NA	-
AG-R01f_043_B03	NA	7.89	4.7E-04	0.90	Major pollen allergen Aln g 1	response to stress	No
AG-R01f_030_G24	Alng19157506383	7.07	4.3E-08	288.39	plant basic secretory protein (BSP), peptidase M	NA	Yes
AG-N01f_038_P13	Alng13936526216	7.06	3.3E-04	9.13	thaumatin like protein precursor	response to stress	Yes
AGCL3713Contig1	NA	6.77	5.8E-03	155.02	defensin cysteine rich antimicrobial protein, Ag5 peptide	response to stress	Yes
AGCL1289Contig1	NA	6.04	4.1E-08	1.56	proline-rich extensin-related protein-like	NA	Yes
AG-R01f_030_E08	Alng424613527758	6.04	4.7E-04	46.10	defensin cysteine rich antimicrobial protein, Ag11 peptide	defense response	Yes
AGCL3038Contig1#	NA	5.67	5.0E-06	31.43	3' non coding region of basic blue copper gene	NA	Yes
AGCL649Contig1	Alng131095523736	5.21	1.8E-05	0.43	class III peroxidase	response to stress	Yes
AGCL1440Contig1	NA	5.20	9.3E-06	1.01	chitinase / Hevein / PR-4 / Wheatwin2	response to stress	Yes
AGCL1113Contig1	NA	4.71	1.9E-03	0.14	NA	NA	-
AG-N01f_023_I15#	NA	4.71	5.3E-07	28.29	basic blue copper protein	NA	Yes
AG-R01f_032_F18	Alng19245512537	4.56	3.8E-06	0.42	cytochrome P450	F:oxidoreductase activity	Yes
AG-R01f_020_G10	NA	4.41	3.5E-07	0.11	germin like protein 5	NA	Yes
AG-N01f_006_G15	Alng48575530830	4.37	6.7E-07	0.91	cationic peroxidase	response to stress	Yes
AG-N01f_002_C06	NA	4.34	6.7E-03	125.38	defensin cysteine rich antimicrobial protein, Ag3 peptide	response to stress	Yes
AGCL1514Contig1	Alng195332512620	4.19	1.8E-04	0.36	class IV chitinase	response to stress	-
AG-J02f_002_N06	Alng12978523342	3.88	9.2E-06	0.06	class V chitinase	carbohydrate metabolic process	-
AG-R01f_019_G06	NA	3.64	2.5E-05	16.08	NA	NA	-
AG-R01f_001_A18	NA	3.59	3.1E-07	1.03	PRp27-like protein	NA	Yes
AGCL1169Contig1	Alng1269508994	3.29	4.3E-03	12.42	auxin-binding protein ABP20	signal transduction	Yes
AG-R01f_024_N21	NA	3.14	4.2E-06	1.11	PRp27 like protein	NA	-
AG-N01f_036_L04	NA	3.03	2.0E-05	1.10	PRp27 like protein	NA	-
AGCL194Contig1	Alng7233535093	2.99	5.2E-05	0.92	germin like protein 5	F:ion binding	Yes
AGCL1654Contig1	Alng139757526278	2.81	2.4E-05	2.70	glutathione S-transferase	cellular nitrogen compound metabolic process	No
AG-N01f_024_P14	Alng16853534646	2.56	1.9E-04	0.45	cationic peroxidase	response to stress	-
AGCL91Contig1	Alng1286502659	2.50	4.2E-05	0.83	PRp27 like protein	NA	Yes
AGCL1559Contig1	NA	2.45	8.8E-05	7.18	mannitol dehydrogenase	F:oxidoreductase activity	-
AG-J02f_002_F23	NA	2.37	8.3E-06	1.77	NA	NA	-
AG-N01f_037_C05	Alng15680532515	2.26	9.1E-05	1.97	receptor protein kinase perk1 like protein	signal transduction	No
AG-R01f_012_L02	NA	2.12	1.2E-02	0.22	phenylalanine ammonia-lyase	secondary metabolic process	-
gl_38453640_emb_AJ420771.1	Alng48971510918	2.18	9.8E-03	ND	phenylalanine ammonia-lyase	secondary metabolic process	No
AGCL1190Contig1	NA	5.88	7.3E-09	1.38	proline rich cell wall protein	NA	Yes
AG-N01f_041_N13	NA	2.23	5.3E-04	10.57	10 hydroxygeraniol oxidoreductase	F:oxidoreductase activity	No
AG-N01f_010_F03	NA	6.09	8.5E-08	1.17	NA	NA	-
AG-N01f_020_O15	NA	6.26	3.9E-08	1.53	proline rich protein	NA	-
AG-R01f_016_N10	Alng428056529375	3.71	5.4E-05	1.03	pr4 (pathogenesis related 4)	response to stress	-
AG-R01f_021_E14	NA	4.75	3.1E-04	1.01	pr	NA	No

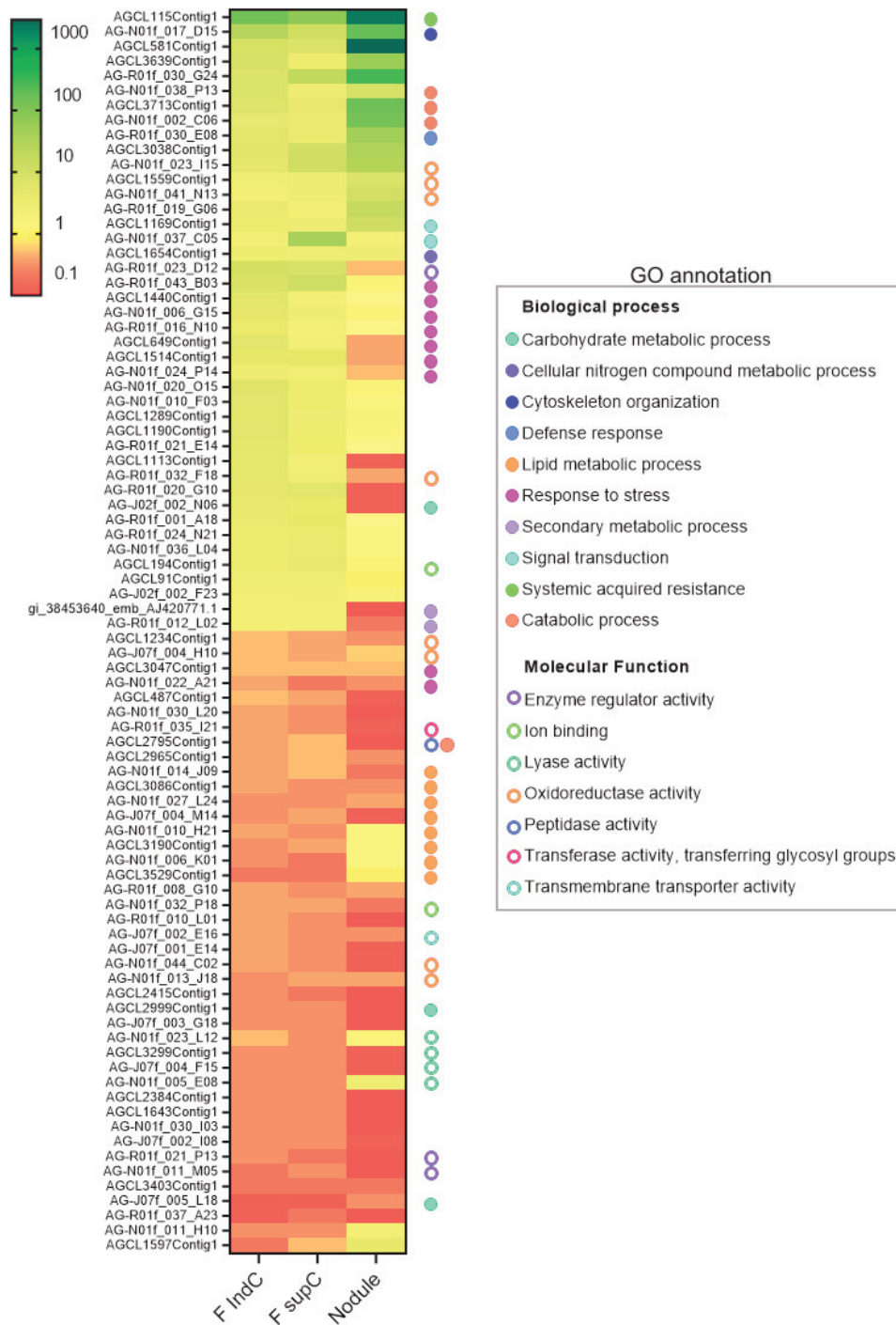


Figure 2: Expression levels of the genes which were commonly up- and down-regulated in *F mDyn* and *F supC* conditions. The expression level values in nodule were extracted from our previous work (Hoher et al., 2011a; see supplemental Table S3). The expression values were expressed as Fold change (FC) with a color gradient from red (down-regulated; ≤ 0.5) and orange-yellow (no-regulated) to green (up-regulated; ≥ 2) in infected roots or nodules compared to control roots without *Frankia*. The GO annotations were assigned by noting preferentially biological process and if not present, the molecular function. Certain genes have no GO assignment after Blast2Go analysis. The heatmap was generated by GraphPad Prism 9.2.0.

Structure and classification of AgLTP24

Several genes encoding nsLTPs from *A. glutinosa* were induced in *F* mDyn or *F* supC conditions (AGCL80Contig1, AGCL115Contig1, AGCL1667Contig1, see supplemental Table S1 and S2) with several others lower down the list. The nsLTP named *agLTP24* (AGCL115Contig1) was the most upregulated (Table 1) at 2.5 dpi but also in mature nodule when the two other genes encoding nsLTP are not differentially regulated in this later step of symbiosis (Hocher et al., 2011b). The gene *agLTP24* presents a total nucleotide sequence of 552 base pairs. This sequence encodes a protein of 114 amino acids including a signal peptide of 22 amino acids that allows its secretion and is localized in the scaffold424615_cov87 (n° accession: AIngl424615S0385) in the *A. glutinosa* genome (Griesmann et al., 2018). The mature peptide has a molecular weight of 9700.28 Dalton and a cationic isoelectric point of 8.46. This nsLTP is classified as Type D according to Edstam and collaborators (Edstam et al., 2011) since it contains one intron and a characteristic motif of 8 cysteines: C-X13-C-X14CC-X9-C-X1-C-X24-C-X10-C in its mature protein (Fig. 4A). Those cysteines stabilize nsLTPs to fold the α -helices domains with disulfide bridges. NCBI BLASTP analysis using non redundant database revealed that the most similar sequence to AgLTP24 mature sequence was an unknown protein found in *Prosopis alba* (XP_028772949.1) that had 57 % of identity over 94 % of the sequence (see supplemental Table S7). In *Arabidopsis thaliana* and *Medicago truncatula*, the most similar proteins were a bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein and a putative lipid-transfer protein DIR1, respectively.

Immunolocalization of AgLTP24 in planta

In order to determine where this nsLTP is secreted during symbiosis establishment, we performed an immunohistolocalization on various plant tissues. Antibodies anti-AgLTP24 were applied to different *A. glutinosa* tissues inoculated or not with *Frankia*. First, we induced root hairs deformation through the membrane dynamic contact with *Frankia* (*F* mDyn) in two independent bioassays. We observed signals in several extracellular nooks (Fig. 3, B, C and, F). These nooks are associated to *Frankia* binding (Berry et al., 1986). A few spots of reduced fluorescence were detected with the control rabbit serum against the same samples mainly in the proximal region of the rhizoderm (Fig. 3A). No signal was observed with anti-AgLTP24 against non-infected roots (see supplemental Fig. S2). The vascular system in the center of the

infected roots was also labeled by this anti-LTP24 leading to a faint green fluorescence (Fig. 3, B and C). Because microarrays showed overexpression of this protein in mature 21 dpi nodules, we performed a specific immunolocalization in plant cells infected by *Frankia* situated in the fixation zone of the nodule (Fig. 3E). In a pattern similar to that of Ag5, called here AgDef5 (Carro et al., 2015b), AgLTP24 co-localized onto the periphery of *Frankia*'s vesicles in nodule (Fig. 3G). In other infected plant cells, we also observed a diffuse signal that suggests a faint labeling onto *Frankia*'s hyphae.

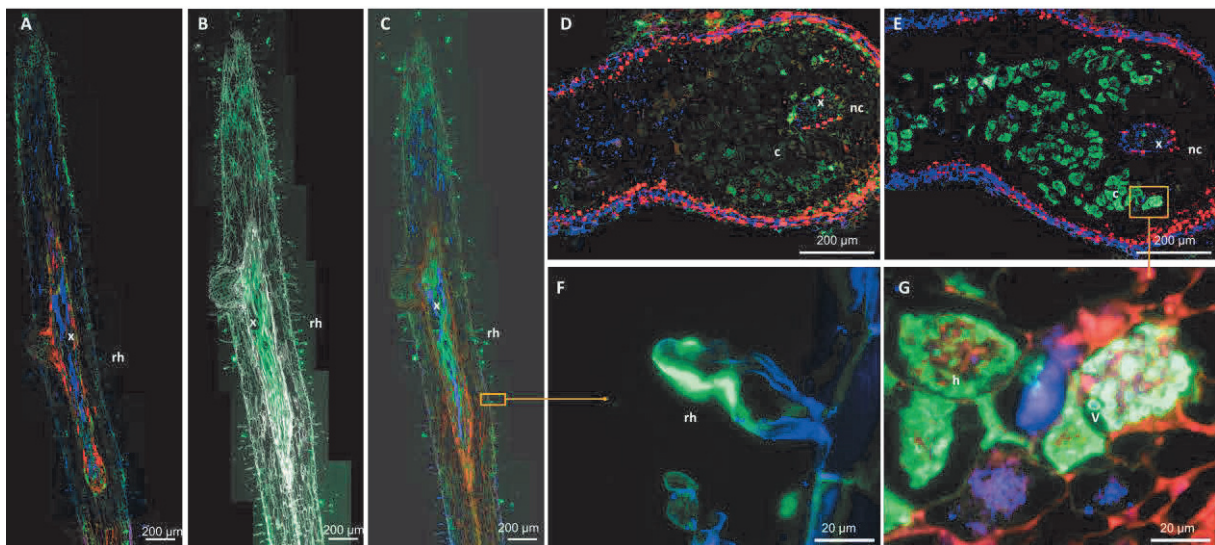


Figure 3: AgLTP24 localization in roots after 2.5 dpi (A, B, C, F) or nodule of 21 dpi (D, E, G). Hair magnification of a specific zone of F, the infected root or G, in nodule. B, C and F: Immunofluorescence localization of AgLTP24 in root hairs (B, C, F) and around *Frankia alni* ACN14a vesicles in infected cells (E, G). The same image of AgLTP24 localization in root hairs were converted in grey and green colors (C) to get a better contrasted to distinguish root hairs. Negative control with rabbit serum before intramuscular injection of AgLTP24 epitope showed no green fluorescence A, in root hairs or D, in infected cells in mature nodule. Blue: DAPI; red: autofluorescence; green: Alexa Fluor 488 dye anti-rabbit antibody (Life Technologies, Saint Aubin, France). c, infected cells; nc, noninfected cells; v, *Frankia* vesicles; h, *Frankia* Hyphae; x, xylem; rh, root hairs

Biological production of AgLTP24

The nsLTPs are low molecular weight peptides rich in cysteines. They have a signal sequence that allows the plant to address them to target cellular compartments. Those nsLTPs are characterized by a conserved motif of 8 cysteines in their mature sequence forming 4 disulfide bonds important for the formation of the hydrophobic cavity, which makes their production in heterologous hosts difficult. Synthetic production is limited to short peptides with no or few disulfide bonds, so we opted for a biological production of mature AgLTP24, i.e. without its

signal peptide, in *E. coli* shuffle T7 *lysY* (see supplemental Fig. S3) which is capable of forming disulfide bonds (Lobstein et al., 2012). We obtained a yield of 0.1 mg of pure protein per liter of culture. After peptide purification, UPLC-ESI-HRMS analysis of the purified AgLTP24 protein revealed a monoisotopic $[M+H]^+$ m/z 9686.8008 (theoretical monoisotopic m/z calculated for $C_{415}H_{676}N_{123}O_{126}S_9$: 9686.7760) consistent with the formation of four disulfide bridges (see supplemental Fig. S4). This analysis was made after each run of purification and before bioassays to check the purity and the good conformation of the protein with disulfide bridges.

Physiology of *Frankia alni* ACN14a in contact with AgLTP24

A miniaturized, rapid fluorescent bioassay using resazurin dye was successfully developed to determine whether AgLTP24 had antimicrobial activity against *F. alni* ACN14a after 7 days of contact. For this, we applied a range of concentrations of AgLTP24 from 1 to 5 μ M (Fig. 4) and used kanamycin as control of inhibition of *Frankia*. The cell growth of *Frankia* was reduced at concentrations higher than 5 μ M AgLTP24 ($54 \pm 16\%$ of cell growth). AgLTP24 can thus be considered as an antibacterial peptide against the symbiotic partner at concentrations of 5 μ M and higher. In addition, microscopic observation permitted to see a negative effect of AgLTP24 on vesicles' production (Fig. 4C). Vesicles production, abundant in the control, is absent at 5 μ M of AgLTP24. Since *Frankia* must be viable and efficient in the nodule to ensure nitrogen fixation for trophic exchanges with its plant partner, we performed a second physiological assay at sub-inhibitory concentrations of AgLTP24. We conducted a second physiological assay using a range of AgLTP24 from 1 nM to 1 μ M (Fig. 5). In this test, nitrogen fixation, respiratory activity ($OD_{490\text{ nm}}$) and growth effects ($OD_{600\text{ nm}}$) were monitored over a 10 days' time course (see supplemental Fig. S5).

That range of AgLTP24 had little effect on *Frankia* growth. A negative effect was noted at 10 nM of AgLTP24 on respiratory activity shortly after addition to cells (see supplemental Fig. S5B) but it was transient. The most striking effect was observed on nitrogen fixation after 7 days of culture (Fig. 5) with a concentration above 100 nM leading to an inhibition whereas no effect was observed on growth or respiratory activity. This inhibition was not seen at 1 and 10 nM. No effect on vesicle morphology was seen (data not shown). In conclusion, *Frankia* growth was altered upon addition of a high dose of 5 μ M of AgLTP24. Below or at the 100 nM threshold, a negative effect was observed on *Frankia* nitrogen fixation activity without effect

on cells growth. At lower concentrations of between 1 and 10 nM of AgLTP24, no effect was observed on *Frankia* physiology.

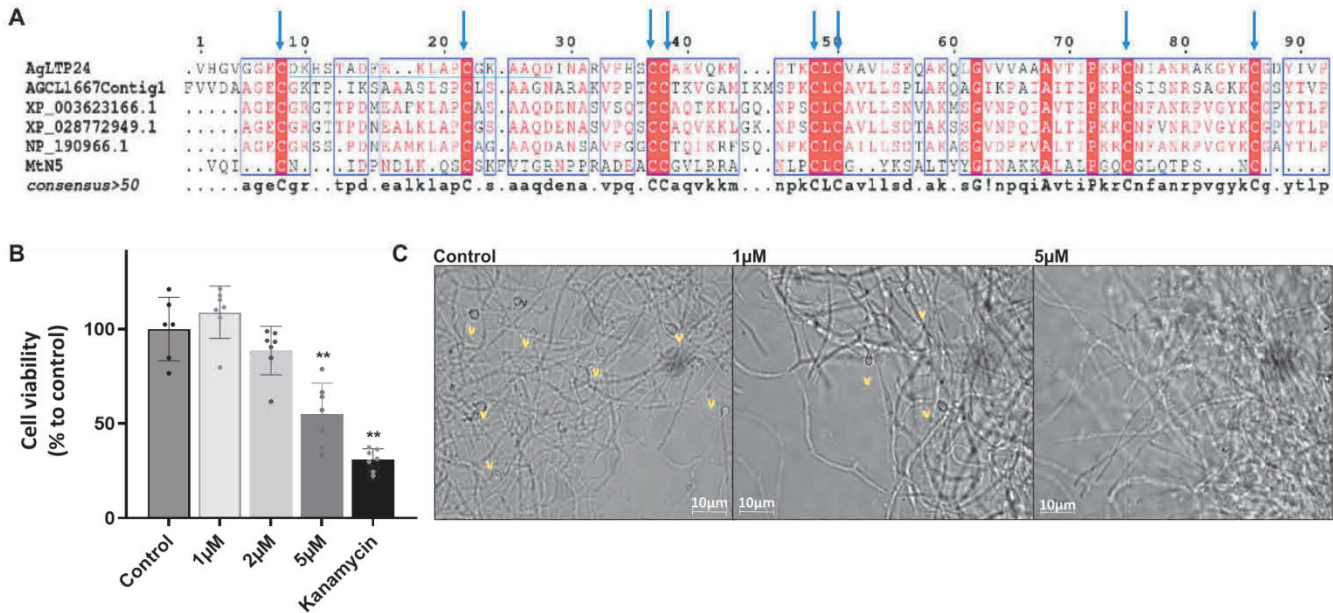


Figure 4: Alignment of AgLTP24 with nsLTPs and physiological bioassays on *Frankia alni* ACN14a growth and cellular development. (A) Alignment of AgLTP24 with several nsLTPs from NCBI database using multalin tool program (DayHoff_8_0 algorithm, <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>). (B) Blue arrows indicated cysteine motifs and black line underlines epitope used for anti AgLTP24 antibodies production. Resazurin bioassay on *Frankia alni* ACN14a growth after supplementation of 1 to 5 µM of AgLTP24. (C) Cell viability was calculated by normalizing the fluorescence of the assay with the mean of the negative control (*Frankia* without AgLTP24). Kanamycin (40 µg ml⁻¹) was used as positive control. Data are expressed as mean values ± SD. Differences between normalized data were assessed by the Mann Whitney test compared to control. Graphic representation and statistical analysis of results was conducted with GraphPad Prism version 9.2.0. *p-value <0.05, **p-value <0.01. C. *F. alni* ACN14a cells observation without or with gradual concentration of AgLTP24 from 0 (Control) to 5µM and obtained during the different physiological bioassays. nsLTPs from *A. glutinosa* (AgLTP24 and AGCL1667Contig1), *Medicago truncatula* (XP_003623166.1 and MtN5); *Prosopis alba* (XP_028772949.1), *Arabidopsis thaliana* (NP_190966.1). v, *Frankia* vesicles.

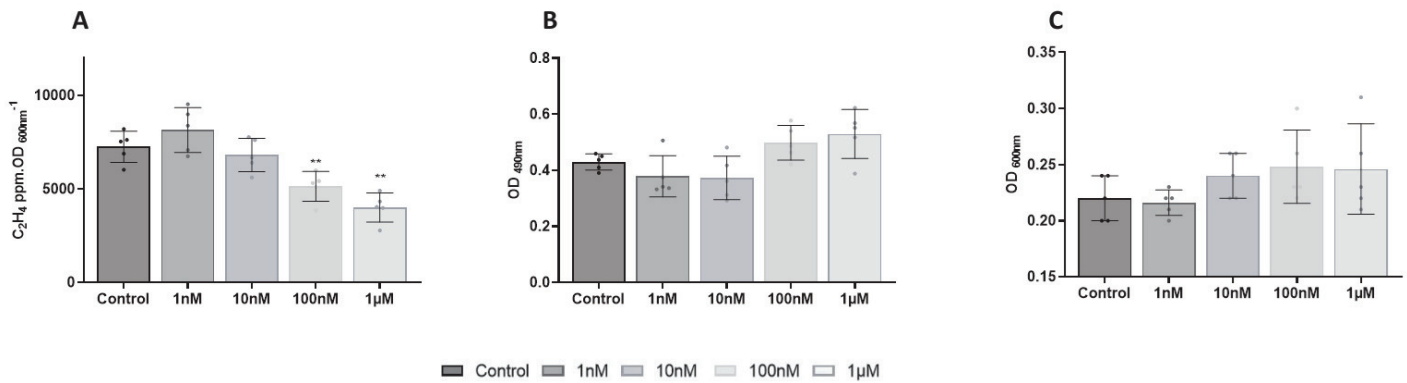


Figure 5: Effect of AgLTP24 in physiology of *Frankia alni* ACN14a after 7 days of growth on (A) Nitrogen fixation; (B) respiratory activity and (C) growth by measuring OD_{600nm}. Data were extracted from the kinetic assay (Figure S5). Data are expressed as mean values ± SD. Differences between means were assessed by the Mann Whitney test compared to control. Graphic representation and statistical analysis of results was conducted with GraphPad Prism 9.2.0. *p value <0.05, **p value < 0.01.

DISCUSSION

Early interactions between *A. glutinosa* and *Frankia* start with a molecular dialogue through the secretion of flavonoids by the plant (Benoit and Berry, 1997; Hughes et al., 1999) and of a bacterial factor by *Frankia* (Cérémonie et al., 1999; Perrine-Walker et al., 2011). This factor is called the root hair deforming factor (RHDF) because it induces a reorientation of root-hair tip growth. This step is followed by penetration of *Frankia* into the root hair, formation of an infection thread (IT) and cell division induction in inner cortical cells. This process leads to organogenesis of a nodule where *Frankia* will be housed and will exchange products with its plant partner. Even though the RHDF structure remains unknown, previous studies have shown that this factor of around 3 kDa is present in *Frankia* cell-free supernatant and acts at nanomolar levels (Cissoko et al., 2018). In addition, this factor is able to induce a high frequency nuclear Ca²⁺ spiking (Granqvist et al., 2015). Due to the lack of a genetic transformation system for *A. glutinosa*, other approaches besides genetic inactivation had to be used to identify the host symbiotic determinants.

Focusing on the mature nodule (Hocher et al., 2011b), transcriptomic analysis showed that the CSSP known in legumes (that interact with rhizobia) and in most land plants (that interact with arbuscular mycorrhiza) (Genre and Russo, 2016) was also present in actinorhizal plants (Gherbi et al., 2008; Hocher et al., 2011b; Hocher et al., 2011a). Previously, differential screening of cDNA libraries from roots and nodules of *A. glutinosa* permitted to identify

several symbiotic genes among which a subtilisin-like protease (Ribeiro et al., 1995), a sucrose synthase, an enolase (van Ghelue et al., 1996), and a dicarboxylate transporter (Jeong et al., 2004). These genes are evocative of tissue reorganization and trophic exchanges but shed no light on the triggering of organogenesis. The present study aimed at investigating the plant molecular response at early symbiotic steps by using the same transcriptomic microarray used in our previous work on mature nodules (Hocher et al., 2011b).

Global plant response at early step of symbiosis

First, the evaluation of *Frankia* trapped in a dialysis tube and supernatant contact assays induced different levels of response in the plant partner with a stronger signal in the *F* mDyn assay, suggesting that even though the supernatant is sufficient to trigger root-hair deformation, the dynamic delivering of *Frankia* secretome through a dialysis membrane would yield a stronger response. Indeed, in the *F* mDyn assay, *F. alni* ACN14a could respond to its plant partner by inducing novel compounds not present in the supernatant. In addition, the supernatant after 2.5 dpi could be degraded, which would consequently impact its efficiency. Indeed, *Frankia* secretes a variety of proteolytic and other catabolic enzymes such as glycosidases, esterases, or proteases (Mastrorunzio et al., 2008) that could be targeted by plant proteases.

Among the differentially expressed genes encoding proteins involved in oxidative stress (oxidase, peroxidase); response to pathogens (chitinase) or plant signaling (kinase) are found mainly in the *F* mDyn assay suggesting that this dynamic contact induced a response similar to that against pathogens. Inversely, the punctual addition of *Frankia* supernatant induced an enrichment of subtilisin-like protease. Those proteins not only have a broad spectrum of functions in plant development, they also play a role in plant-microbe interactions ranging from symbiosis (Taylor and Qiu, 2017) to diseases (Figueiredo et al., 2018). For instance, Cg12 found in *Casuarina glauca* and its homologous Dt12 found in *Discaria trinervis* are subtilisin-like serine proteases specifically secreted during *Frankia* infection (Svistoonoff et al., 2003; Fournier et al., 2018).

Oxidative stress in root hairs repressed in nodule

The plant global response reveals a common pattern with a strong modulation of genes involved in stress response. This biological process, specific to the early response is made up of genes encoding proteins involved in oxidative stress (oxidase, peroxidase); defense against pathogens such as pathogenesis related (PR) proteins (chitinase, defensin, thaumatin or nsLTP). Focusing on oxidative stress, the overall GO analysis showed a strong induction of genes involved in oxido-reduction metabolism (oxidase, peroxidase). These enzymes involved in oxidative stress initially increase the level of reactive oxygen species (ROS) and rapidly reduce it afterward as previously observed for rhizobia over the course of nodule establishment (Peleg-Grossman et al., 2009; Peleg-Grossman et al., 2012). In legume roots, the enzymatic activities of catalase, ascorbate peroxidase, glutathione reductase or NADPH oxidase significantly increase upon inoculation with bacterial symbiont (Bueno et al., 2001; Den Herder et al., 2007; Peleg-Grossman et al., 2009; Peleg-Grossman et al., 2012). After this initial burst, ROS production is reduced drastically to prevent further root hair curling and IT formation (Shaw and Long, 2003; Lohar et al., 2007) and to provide a livable environment for the microbe and its fragile nitrogenase.

To follow this dynamic of expression over the course of symbiosis establishment, we extracted transcriptional data from our previous work made on mature nodules (Hoche et al., 2011b). Many of those genes are not modulated or repressed in the mature nodule (Table 1, Fig. 2), suggesting a similar profile. Consequently, *A. glutinosa* host could be repressing the stress response.

From defense mechanisms activation to perception of Frankia

After the oxidative stress triggered by *Frankia* contact, *A. glutinosa* activates numerous genes encoding PR proteins which are key components of the plant innate immune system against both biotic and abiotic challenges (Ali et al., 2018), such as glucanases, chitinases, thaumatins, peroxidases, defensins, nsLTPs or thionins. We found numerous upregulated genes encoding chitinases as observed in legumes (Staelin et al., 1994; Goormachtig et al., 1998; Xie et al., 1999) and described as important for rhizobia infection and IT formation (Malolepszy et al., 2018). Also, genes encoding oxidative stress protein and chitinases are repressed or no

differentially modulated in *A. glutinosa* nodules compared to the non-infected roots (Fig. 3) suggesting that they are important at early steps.

A similar profile was observed for PR10 in *M. truncatula* when associated to symbiont or pathogen infection, it is activated early but its expression is transitory suggesting that defense signaling pathways are suppressed during the establishment of symbiosis (Chen et al., 2017). Here, the transitory activation of this gene encoding *A. glutinosa* PR protein could be induced by *Frankia* factors even though a specific response must be demonstrated by comparing to other biotic and abiotic challenges.

Some PR proteins are classified as AMPs based on their small size, the conservation of cysteine rich motifs and their potential action as antimicrobial compounds (Tam et al., 2015). In *A. glutinosa* transcriptome, we distinguished the overexpression of genes encoding plant defensins (Ag3, Ag5, and Ag11), a thaumatin (AG-N01f_038_P13) and a nsLTP (AGCL115Contig1).

This thaumatin like protein overexpressed in nodule compared to non-infected roots is considered as a defense system but also as implicated in plant development (de Jesús-Pires et al., 2020). This expression profile is quite different from that of the well-documented Rj4, a thaumatin like in soybean. The *rj4* gene was described as constitutive in roots and nodules, and involved at a very early stage of IT formation to inhibit nodule formation with incompatible strains (Hayashi et al., 2014). This suggests that thaumatin-like proteins in *A. glutinosa* could intervene as incompatibility determinants but their overexpression in the nodule also raises the possibility of another function in nodule organogenesis.

Little is known about the symbiotic signals produced by *Frankia* but their perception requires a plant receptor. The RLK homolog to legume NF receptors Lys6/Lys7/Nfr1 (AG-R01f_025_F02) has already been in *A. glutinosa* (Hocher et al., 2011b). It harbors LysM and protein kinase domains and its level of expression after 2.5 dpi is similar to that of non-inoculated roots. This gene was not differentially expressed in *C. glauca* (Hocher et al., 2011b) but upregulated in *Ceanothus thyrsiflorus* (Salgado et al., 2018). Upregulation would thus not appear essential for a determinant that aims to trigger the upregulation of other determinants as was found to be the case for symRK, a gene encoding a receptor kinase acting after the NF receptor in the CSSP. It was found not to be regulated in *M. truncatula* (Capoen et al., 2005) or *C. glauca* (Gherbi et al., 2008) following nodulation suggesting a constitutive transcription in the plant root. The same profile was found in *A. glutinosa* after nodulation (Hocher et al., 2011b) or after 2.5 dpi

(AG-R01f_005_M15, Table S8). Among the 12 genes defined as potentially involved in the CSSP in *A. glutinosa* (Hocher et al., 2011b), 8 were detected and only hap2-1 encoding a transcription factor was found up-regulated in inoculated roots after *F. alni* ACN14a supernatant contact as well as after nodulation (Table S8), which is comparable to what was found in *M. truncatula* (El Yahyaoui et al., 2004).

AgLTP24: from *Frankia* infection to nodule functioning

Function at early steps

Global omic approaches of early steps of *A. glutinosa* symbiosis pointed to a strong signal from one gene, *agltp24* encoding an AMP belongs to the nsLTPs family. The specific fluorescence of AgLTP24 in the vascular system of infected roots suggests other functions not directly related to the symbiont. In several plants, nsLTPs were detected by proteomic to accumulate within the xylem or phloem vessels after biotic or abiotic stress (Liu et al., 2021). For instance, DIR1 in *A. thaliana* was transported to distant tissues via the phloem during systemic acquired resistance (SAR) after pathogen attacks (Carella et al., 2015) It was suggesting that it is important for SAR long-distance signal movement. AgLTP24 could play the same function but its localization needs to be confirmed in the vessel system.

Regarding symbiosis, we detected strong fluorescent spots targeting numerous root hair nooks which correspond to *Frankia* embedding sites before internalization through IT formation and new powerful technologies such as tomography (DeVree et al., 2021) will be useful to study the global distribution of AgLTP24 in all hairs of a root. This suggests that AgLTP24 acts at the point of initiation of *Frankia* infection. Such an induction was seen for another nsLTP (MtN5) found in *M. truncatula* which was also active at an early stage of symbiosis and in the nodule (Pii et al., 2009; Pii et al., 2012). Its silencing resulted in an increased number of curling events with a reduced number of invading primordia, whereas its overexpression resulted in an increased number of nodules, which led the authors to conclude that MtN5 is necessary for the successful establishment of the symbiotic interaction but not for nodule formation (Pii et al., 2013). Similar to MtN5 (Pii et al., 2009), AgLTP24 possesses a slight antimicrobial activity *in vitro* against its symbiont at 5 μ M and below since to the 100 nM threshold, it reduces its nitrogen fixation activity without affecting growth. As *Frankia* cell integrity must be preserved for infection and cell activity must be efficient for trophic

exchange with its host plant, we hypothesize that AgLTP24 concentration in contact with *Frankia* must be below 100 nM. In addition, AgLTP24 could be important during IT development or nodule primordia invasion and its genetic silencing in plant is an exciting challenge to complete our knowledge gap regarding its potential role during symbiosis.

Function in mature nodule

A. glutinosa host plant overexpressed AgLTP24 in nodules (Table 1) and targets *Frankia*'s vesicle and to a lesser extent hyphae in the nodule fixation zone (Fig. 3G) but this localization is different from that of MtN5 binding in the distal zone of the nodule (Pii et al., 2012) indicating a different function for AgLTP24. However, another nsLTP (AsE246) found in a legume (*Astragalus sinicus*) specifically targets the symbiosome membranes through binding a lipid component: digalactosyldiacylglycerol (Lei et al., 2014). In this legume, silencing of *asE246* impacts nodulation development with fewer matured nodule.

Thus, AgLTP24 could bind to the vesicle wall made up of a multilamellar hopanoid lipid envelope (Berry et al., 1993; Nalin et al., 2000) or to the plant perisymbiotic membrane coating *Frankia* cells in nodule. The perisymbiosome membrane composition is less documented but that of non-symbiotic *Alnus rubra* roots is mainly composed of glycerol, phosphatidylethanolamine, phosphatidylserine and phosphatidylcholine (Berry et al., 1991). A lipidomic study in *A. glutinosa* roots followed by a binding bioassay is a promising perspective to decipher AgLTP24 mechanisms. It is worthy to note that regarding their sequence, AsE246 and MtN5 shared no or low similarity with AgLTP24 (Fig. 4A and see supplemental Table S7), which opens perspectives on specific functions in this actinorhizal model. Furthermore, by deciphering for the first time the role of an nsLTP in a Fagales model, we extended the fact that nsLTPs participate in symbiosis functioning outside the legume family, however further investigations in other phylogenetic orders are needed to get a more comprehensive view.

The level of expression of AgLTP24 was similar to the defensin AgDef5, also upregulated at 2.5 dpi (Table 1) and localized to *Frankia*'s vesicles in nodule (Carro et al., 2015b), however its effects in vitro were different from those of AgLTP24, inducing a better nitrogen fixation and growth at sub-inhibitory concentrations. This suggests that the plant delivers a fluctuating

cocktail of molecules all along the symbiosis to finely control formation of infection threads or nodule primordia to the control of *Frankia* proliferation.

MATERIALS AND METHODS

Strains and growth condition before total RNA extraction

Plantlets at an early stage of infection were obtained as described previously (Pujic et al. 2019). Two independent assays were performed. In the first one (*Frankia* membrane dynamic contact: *F* mDyn), 8ml of *Frankia* cells were transferred to dialysis tubes (MWCO=100kDa) and these arranged into a plastic pot containing 8 seedlings of *A. glutinosa* and filled with Fåhraeus solution without KNO₃. Five biological replicates were performed with 4 plastic pots per replicate. In the second assay (*Frankia* supernatant direct contact or *F* SupC). Supernatants were prepared as follows: 250 ml log-phase culture cells were removed by centrifugation and the supernatant filtered through 0.22 µm membranes (Millipore, Billerica, MA). Solid phase extractions of the supernatants were done using benzene sulfonic acid cation exchanger on silica (Macherey Nagel, Hoerd, France). Elutions were done using 50:50 v/v methanol-water followed by a final one with 100 % methanol. Each elution was lyophilized under vacuum, dissolved in 1 ml of sterile water and tested for root hair deformation activity on independent plant roots. All elutions inducing root hair deformation were pooled together and used for the cell free supernatant plant response. One ml of *Frankia* cell free supernatants extracts was added in Fåhraeus' solution. In parallel, as a control condition, an equivalent volume of growth medium was treated with the same extraction protocol. Three biological replicates were performed using 6 seedlings per replicate.

The root hair deformation process was observed by stereomicroscope observations (Leica MZ8, Wetzlar, Germany). After 2.5 days (64 hours) with root hairs highly deformed, a 2 cm long segment in the central part of the root was cut at 2 cm from the distal end, quickly washed with sterile water before squashing in liquid nitrogen and stored at -80° C. Condition (T0) without *Frankia* was prepared in parallel. Porosity of the dialysis tubes was tested by using the same condition than *F* mDyn but the plants were grown for one month after *Frankia* contact, confirming the absence of root hairs deformation and nodule formation.

Transcriptomics of *A. glutinosa* at 2.5 dpi

Transcriptomics was done as described earlier (Hocher et al. 2011a). Total RNA was purified from roots using RNeasy plant mini kits (Qiagen, Courtaboeuf, France). Residual DNA was removed using the Turbo DNA free kit (Ambion, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE), quantified using a NanoDrop spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, US) and qualitatively assessed using a Bioanalyzer 2100 (Agilent, Waldbronn, Germany).

Microarrays were designed (13909 probes; 1 probe/*A. glutinosa* unigene), manufactured and hybridized by Imaxio (<http://www.imaxio.com/index.php>), using Agilent Technologies (<http://www.home.agilent.com/agilent/home.jspx>) as previously described (Hocher et al. 2011a). The microarrays were scanned with an Agilent G2505C Scanner. The Feature Extraction software (Agilent, version 11.5.1.1) was used to quantify the intensity of fluorescence signals and the microarray raw data were analyzed using GeneSpring GX 12.0 software (Agilent technologies). Normalizations per chip (to the 75th percentile) and per probe (to the median) were performed to allow comparison of samples. The two assays *F* mDyn and *F* supC were analyzed separately. In order to limit false positive results, microarray data were filtered according to the flag parameter “detected”. Thus, probes taken into account were uniform, non-outlying, non-saturated and displaying an intensity level above the background in at least one of the two biological conditions.

In the *F* mDyn assay, 1590 probes yielding an intensity level significantly below the background in the 10 samples were discarded. In addition, 1146 probes did not yield the flag “detected” in at least one of the two biological conditions and were also discarded. Thus, 11 173 probes were considered for subsequent analyses of *F* mDyn.

In *F* supC, 1765 probes yielded an intensity level significantly below the background in the 6 samples and were discarded. In addition, 1113 probes did not yield the flag “detected” in at least one of the two biological conditions and were also discarded. Thus, 11031 probes were considered for subsequent analyses of *F* supC. Pairwise T-tests with no correction were done by comparing *F* mDyn roots vs. control roots in *F* mDyn and *F* supC roots vs. control roots in *F* supC were done and only those genes with an average FC above 2 (up-regulated) or below 0.5 (down-regulated) with a p -value < 0.05 were considered significant. The normalized and raw

microarray data values have been deposited in the Gene Expression Omnibus database (www.ncbi.nlm.nih.gov/geo; accession nos. E-MTAB-8936 and E-MTAB-8937).

Quantitative real-time RT-PCR

Reverse transcription (RT) and real time quantitative PCR (qRT-PCR) were performed using the aliquots of biological replicates as for microarray experiments. For *A. glutinosa* analyses, RT was performed with 5 µg of total mRNA using Transcriptor Reverse Transcriptase and oligo (dT)₁₅ primer (Roche, Mannheim, Germany). The qRT-PCR were run on a LightCycler 480 (Roche) using LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche) under the following conditions: 95 °C for 5 min; 45 cycles of 95 °C for 20 s, 60 °C for 20 s and 72 °C for 15 s. Primer sets were designed using ProbeFinder (Roche) and Primer 3 softwares (see supplemental Table S1). Two qRT-PCR reactions were run for each biological replicate and each primer set. Expression values were normalized using the expression level of the *Ag-ubi* gene that encodes ubiquitin (Hocher et al. 2011a).

Cloning of the *agLTP24* gene

The *agltp24* gene was PCR amplified from cDNA prepared as described above using designed primers (see supplemental Table S5) under the following conditions: 98 °C for 30 s; 30 cycles of 98 °C for 7 s, 63 °C for 20 s and 72 °C for 8 s. The reaction mixture of 50 µl PCR contained 1X Phusion HF buffer, 200 µM dNTPs, 0.5 µM forward primer, 0.5 µM reverse primer, 87 ng template DNA and 1-unit Phusion DNA Polymerase (NEB, Evry, France). The long primers were used to permit obtaining PCR products with 29 nucleotides extremities homologous to the multicloning sequence pET30a+ vector (Merck, Molsheim France) to clone using the hot fusion method (Fu et al. 2014). The pET30a+ vector was pre-digested with *EcoRI* and *BglII* and recombination done to yield AgLTP24 with an N-terminal 6xHis tail. The ligation mixture was transformed into *Escherichia coli* DH5α chemocompetent cells (Chung et al. 1989) for plasmid DNA propagation and sequencing (pET30a-HIS-AgLTP24, supplemental Figure S3). Plasmids DNA were prepared using Nucleospin Plasmid DNA kit (Macherey Nagel, Hœrdt, France) from 4 independent clones, each *E. coli* culture grown overnight in 5ml of LB medium at 37 °C with shaking. Cloned insert DNA was checked by dideoxy sequencing (Biofidal, Vaulx-en-Velin,

France) and used for electrotransformation into iSHuffle T7 *lysY E. coli* cells (NEB), a strain with the capacity to form proteins with disulfide bonds (Lobstein et al. 2012).

AgLTP24 production and purification

Cultures were grown in LB medium supplemented with kanamycin ($40 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) at 30°C at 130 rpm until log phase was reached ($\text{OD}_{600\text{nm}} \sim 0,5$) then the HIS-AgLTP24 expression was induced with 1 mM isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). Induced cultures were incubated at 30°C for 3 h at 130 rpm and harvested by centrifugation (5100 g for 10 min at 4°C). Expression was analyzed by 4-20 % Tricine SDS-PAGE (Schagger 2006). Pellets were lysed by freeze thaw and resuspended in a binding buffer (100 mM Tris, 500 mM NaCl, 5 mM imidazole, pH 7.4). A second lysis step was performed using silica beads and Fastprep 24™ 5G (MP Biomedicals, Illkirch-Graffenstaden, France). The cell lysate was harvested by centrifugation at 5100 g, 4°C for 30 min and the HIS-AgLTP24 purified using His GravityTrap columns (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) with modified binding (100 mM Tris, 500 mM NaCl, 5mM imidazole, pH 7.4) and elution buffers (100 mM Tris, 500 NaCl, 500 mM imidazole, pH 7.4). Purification of HIS-AgLTP24 was verified by 4-20 % Tricine SDS-PAGE electrophoresis. Elution fractions were applied onto a 3 kDa MWCO Amicon Ultra-15 centrifugal filter (Millipore, Burlington, Ma, USA) for buffer exchange with the enterokinase buffer (20 mM Tris, 50 mM NaCl, 2 mM CaCl_2 , pH 6.8) and concentration. The HIS tag was removed from the mature sequence of AgLTP24 by enterokinase treatment (NEB) for 16 h at room temperature. Cleavage was confirmed by 4-20 % Tricine SDS-PAGE electrophoresis. The enterokinase was removed from the mixture using the Enterokinase Removal Kit (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Mo, USA). His tag removal was done with a His GravityTrap column (GE Healthcare) using an imidazole free binding buffer (100 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7.4). Wash fractions containing AgLTP24 purified were applied to a 3 kDa MWCO Amicon Ultra-15 centrifugal filter (Millipore) for buffer exchange with NH_4^+ -free FBM medium (FBM-). Final concentration was determined using the Qubit Protein Assay Kit (ThermoFisher, Villebon-sur-Yvette, France). The purified AgLTP24 protein was further analyzed by UPLC-ESI-HRMS, an ultra-performance liquid chromatography Ultimate 3000 (ThermoFisher, Villebon-sur-Yvette, France) coupled to a high-resolution hybrid quadrupole-time of flight mass spectrometer (Impact II, Bruker, Bremen, Germany) equipped with an

electrospray ionization source (ESI) (Bruker). Instrument control and data collection were performed using Data Analysis 5.0 software.

Immunolocalization of AgLTP24

Immunostaining and fluorescence microscopy were done as described earlier (Login et al. 2011). An AgLTP24 specific epitope (DKHSTADFEKLAPCGKAAQD) covering a most variable region of the gene (Figure 4A), sharing less than 61% of identity with the closest sequences proteins sequences in *A. glutinosa* was selected for chemical synthesis, followed by a two month immunization program in rabbit. Polyclonal antibodies were purified using standard commercial service and tested by Elisa before use (Covalab, Bron, France). Plant immunolocalization was performed on *A. glutinosa* roots (2.5 dpi) as described above in *F* mDyn. Mature nodules (21 dpi) were also used to localize AgLTP24 in symbiosis. Plant tissues were fixed in paraformaldehyde 4 % (wt/vol). Afterward, fixative was replaced by several baths of phosphate buffered saline (PBS) before embedding in agar 1.3 %, (wt/vol) and dehydration through a graded ethanol series. Samples were then moved in 1-butanol at 4 °C until paraffin impregnation with Paraplast Plus (Leica biosystems, Richmond, USA). Wax blocks were kept in a cold and dust free place until sectioning. Five µm thick tissue sections were done using a rotary microtome (HM340E, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) placed on poly-lysine coated slides, dried overnight in a 37 °C oven and kept at 4 °C until immunostaining. For immunostaining, paraffin sections were dewaxed in 2 baths of methylcyclohexane for 10 min, rinsed in ethanol 100 %, and rehydrated through an ethanol gradient to PBS. All slides were incubated with 1 % bovine serum albumin (BSA) in PBS during 30 min prior primary antibody incubation, overnight at 4 °C. Primary antibodies (rabbit anti-LTP, Covalab) were diluted at 1:200 in PBS containing 0.1 % BSA. Pre-immune serum from the same rabbit was used as negative control, in the same conditions as the immune serum. Afterward, sections were washed with PBS containing Tween 0.2 %. Then samples were incubated with secondary antibodies (Donkey anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488, ThermoFisher Scientific), diluted in 0.1 % BSA, for 1 hour at room temperature. Sections were then washed with PBS-Tween, rinsed with PBS and with several baths of water. Then sections were left to dry on the bench and mounted using Fluoro Gel with DABCO™ (Merck) mounting medium with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) added

for nuclear staining (3 μg per ml of medium). Images were taken with a IX81 epifluorescence microscope (Olympus, Tokyo, Japon), using appropriate filters for antibody visualisation of green antibodies, DAPI nuclear, and unspecific autofluorescence from tissues. Images were processed with ImageJ and image reconstitution of large specimen like roots was done using the Stitching Fiji Plugin (Preibisch et al. 2009). T0 non-infected seedlings were used as control. Those immunolocalization analyses were done on two independent plants and for each plant, at least 3 different organs were observed (nodules, uninfected or infected roots).

Physiological assays with AgLTP24 on *Frankia alni* ACN14a.

The antimicrobial activity of AgLTP24 (at 1 μM , 2 μM and 5 μM), was assayed using the resazurin assay in 24-well microplates (Greiner bio-one, Les Ulis, France). A 2-week-old *Frankia alni* ACN14a culture grown in FBM medium supplemented with 5mM of NH_4Cl (FBM+) was centrifuged at 5100 g for 15 minutes, the supernatant was removed, and the pellet was homogenized in FBM- by repeated passage through syringes. Using those culture homogenates, effects on *Frankia* were evaluated in 1ml of FBM- per well with a final optical density (600 nm) of 0.02 supplemented or not with the corresponding concentration of AgLTP24 peptide. Four replicates were made for each condition. Two controls (*Frankia alni* ACN14a in FBM- with and without kanamycin at 40 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ final concentration) were performed. Microplates were incubated at 28 °C, with shaking at 80 rpm in an incubator. After 6 days, resazurin (Fisher Scientific) was added to a final concentration of 6.25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ in each well and the microplates were incubated at 28 °C, with shaking at 80 rpm for 16 hours in the dark. Fluorescence measurements were performed with a microplate reader (infinite M200PRO, TECAN, Männedorf, Switzerland) with an excitation wavelength of 530 nm and an emission wavelength of 590nm. The results obtained were normalized using the mean fluorescence of the negative control.

A second bioassay was made using an FBM+ culture of *Frankia* homogenized by syringing through a series of needles (21G, 23G, 25G and 27G) and resuspended in 1ml of FBM- at an OD_{600} of 0.1. They were incubated for 10 days at 28°C (5 replicates per kinetic point and per condition). At each time point (3, 5, 7 and 10 days), the effects on nitrogen fixation (ARA), respiration through idonitrotetrazolium/formazan respiratory activity (or IRA) and on morphology through imagery microscopy (Axioskop 40 epifluorescence microscope, Carl

Zeiss) were monitored (Prin et al. 1990, Carro et al. 2015b). For ARA analysis, the acetylene was injected in the sealed tubes containing the *Frankia* cultures 24h before analysis. For both bioassays, since data were not normally distributed (Shapiro-Wilk test), mean comparisons were performed with a Mann-Whitney test. Statistical analyses and graphic representation were made using GraphPad Prism 9.2.0 (GraphPad software Inc; San Diego, CA, USA).

Bioinformatics

BLAST analyses and GO assignments were performed on Blast2GO v5.2 (www.blast2go.com) using BLASTX against the NCBI non-redundant database, Gene Ontology (GOs) and InterProScan (Conesa et al. 2008). Fishers' exact test implemented in Blast2GO was used to identify significantly enriched GO categories. A GO category was considered significantly enriched only when the *p*-value for that category was < 0.05 after applying the false discovery rate (FDR) correction. Molecular mass of proteins and their isoelectric points were calculated using the ExPasy software (web.expasy.org/protparam/).

SUPPLEMENTAL DATA

Les figures supplémentaires sont disponibles en Annexes.

Figure S1: Gene Ontology (GO) analysis. Percent of distribution of genes giving a functional annotation (Hit), annotated as unknown protein and those yielding no BLAST in *F mDyn/F supC* up or down-regulated genes (Tables S1 and S2).

Figure S2: Negative control of immunolocalisation on non- infected roots using antibodies anti-AgLTP24 (A) or rabbit serum obtained before intramuscular injection of AgLTP24 epitope (B). Blue: DAPI; red: autofluorescence; green: Alexa Fluor 488 dye anti-rabbit antibody (Life Technologies, Saint Aubin, France).

Figure S3: Genetic map of the plasmid used to express AgLTP24 in *E. coli*. KanR: Kanamycin resistance coding sequence, MCS: multiple cloning sites, 6xHis: HisTag coding sequence, *agltp24*: AgLTP24 mature peptide coding sequence.

Figure S4: RP-UPLC chromatogram and ESI-HRMS mass spe $[M+9H]^+$ m/z 1077.7572; $[M+8H]^+$ m/z 1385.5429 ; $[M+7H]^+$ m/z 1212.4770; the theoretical monoisotopic m/z calculated for $C_{415}H_{676}N_{123}O_{126}S_9$: is 9686.7760.ctrum of the purified folded AgLTP24 protein.

Figure S5: Kinetic assay of *Frankia alni* ACN14a after addition of AgLTP24. Effects on (A) nitrogen fixation through ARA activity (B) respiratory activity through IRA and (C) growth as OD 600 nm level. Data are expressed as mean values \pm SD. Differences between means were assessed by the Mann Whitney test (bilateral and unpaired) compared to control. Graphic representation and statistical analysis of results was conducted with GraphPad Prism version 9.2.0 (GraphPad software Inc; San Diego, CA, USA). * p value <0.05 , ** p value < 0.01 .

Tableaux supplémentaires

Table S1: List of up- and down-regulated genes during early root hair deformation of *Alnus glutinosa* after 2.5 dpi with *Frankia alni* ACN14a membrane dynamic contact (*F* mDyn) and compared to nodule condition (21dpi) and compared to non-infected roots.

Table S2: List of up- and down-regulated genes during early root hair deformation of *Alnus glutinosa* after 2.5 dpi with *Frankia alni* ACN14a supernatant contact (*F* supC) and compared to nodule condition (21 dpi) and compared to non-infected roots.

Table S3: List of up- and down-regulated genes during early root hair deformation of *Alnus glutinosa* in both bioassays at 2.5 dpi: membrane dynamic contact with *Frankia alni* ACN14a trapped in a dialysis tube (*F* mDyn) and with *Frankia* supernatant contact (*F* supC) and compared to nodule condition (21 dpi) and compared to non-infected roots.

Table S4: List of GO categories statically found through Fishers' exact test implemented in Blast2GO in *F* mDyn condition by comparing up-regulated vs down-regulated genes (A) and in *F* mDyn and *F* sup conditions by comparing up-regulated genes from each condition (B).

Table S5: *Alnus glutinosa* primers used.

Table S6: Validation of microarray results for Basic blue copper protein and AgLTP24 by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) in both experiments, with *Frankia alni* ACN14a membrane dynamic (*F* mDyn) and with *F. alni* ACN14a supernatant contact (*F* SupC) conditions.

Table S7: Similarity of AgLTP24 with nsLTPs from NCBI database. Score were obtained after NCBI BLASTP using AgLTP24 without signal sequence and against the different plant models.

Table S8: List of genes encoding transcriptional factors or proteins and involving in CSSP of *Alnus glutinosa* and their level of expression in roots after 2.5 dpi with *Frankia alni* ACN14a (in membrane dynamic (*F* mDyn) contact or using supernatant (*F* supC)) or in nodules (21dpi) and compared to non-infected roots.

ACKNOWLEDGEMENTS

Thanks are expressed to Elise Lacroix and the Greenhouse facility (Université Lyon1), to Danis Abrouk in the ibio platform (Université Lyon1), for help in submission of omic data to international database, Jonathan Gervais in the AME platform (Université Lyon1), to do the ARA measurements and Philippe Bulet (Archamps) for his technical advice on peptide purification. We thank the PGE platform for other measurements. This project has been funded by the FR BioEnviS (Biodiversité, Environnement et Santé, Université Lyon1, France) and the EC2CO (Ecosphère Continentale et Côtière) grant (reference: 10459).

AUTHOR CONTRIBUTION

M.G., N.A., A.H., L.C., P.N., P.P. and H.B. conceived and designed the study. M.G., N.A., P.F., S.B., O.K, J.T., P.D.S., P.P and H.B carried out the experiments. M.G., P.N., P.P. and H.B. performed the data analysis. M.G., S.B., P.D.S., and H.B. performed the figure drawing. M.G., P.N., P.P., A.H. and H.B. provided critical biological interpretations of the data. P.N. and H.B. wrote the manuscript.

COMPETING INTERESTS

The authors declare no competing interests.

REFERENCES

- Ali S, Ganai BA, Kamili AN, Bhat AA, Mir ZA, Bhat JA, Tyagi A, Islam ST, Mushtaq M, Yadav P, Rawat S, Grover A** (2018) Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance. *Microbiological Research* **212-213**: 29-37
- Alloisio N, Queiroux C, Fournier P, Pujic P, Normand P, Vallenet D, Medigue C, Yamaura M, Kakoi K, Kucho K** (2010) The *Frankia alni* symbiotic transcriptome. *Mol Plant Microbe Interact* **23**: 593-607
- Benoit LF, Berry AM** (1997) Flavonoid-like compounds from seeds of red alder (*Alnus rubra*) influence host nodulation by *Frankia* (Actinomycetales). *Physiologia Plantarum* **99**: 588-593
- Berry AM, Harriott OT, Moreau RA, Osman SF, Benson DR, Jones AD** (1993) Hopanoid lipids compose the *Frankia* vesicle envelope, presumptive barrier of oxygen diffusion to nitrogenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **90**: 6091-6094
- Berry AM, Moreau RA, Jones AD** (1991) Bacteriohopanetetrol: abundant lipid in *Frankia* cells and in nitrogen-fixing nodule tissue. *Plant Physiol* **95**: 111-115

Berry AM, Torrey JG (1983) Root hair deformation in the infection process of *Alnus rubra*. *Botany* **61**: 2863-2876

Brooks JM, Benson DRJS (2016) Comparative metabolomics of root nodules infected with *Frankia* sp. strains and uninfected roots from *Alnus glutinosa* and *Casuarina cunninghamiana* reflects physiological integration. *Symbiosis* **70**: 87-96

Bueno P, Soto MJ, Rodríguez-Rosales MP, Sanjuan J, Olivares J, Donaire JP (2001) Time-course of lipoxygenase, antioxidant enzyme activities and H₂O₂ accumulation during the early stages of Rhizobium–legume symbiosis. *New Phytologist* **152**: 91-96

Carella P, Isaacs M, Cameron RK (2015) Plasmodesmata-located protein overexpression negatively impacts the manifestation of systemic acquired resistance and the long-distance movement of Defective in Induced Resistance1 in *Arabidopsis*. *Plant Biol (Stuttg)* **17**: 395-401

Carro L, Persson T, Pujic P, Alloisio N, Fournier P, Boubakri H, Pawlowski K, Normand P (2015a) Organic acids metabolism in *Frankia alni*. *Symbiosis* **70**: 37-48

Carro L, Pujic P, Alloisio N, Fournier P, Boubakri H, Hay AE, Poly F, Francois P, Hocher V, Mergaert P, Balmand S, Rey M, Heddi A, Normand P (2015b) *Alnus* peptides modify membrane porosity and induce the release of nitrogen-rich metabolites from nitrogen-fixing *Frankia*. *ISME J* **9**: 1723-1733

Carro L, Pujic P, Alloisio N, Fournier P, Boubakri H, Poly F, Rey M, Heddi A, Normand P (2016) Physiological effects of major up-regulated *Alnus glutinosa* peptides on *Frankia* sp. ACN14a. *Microbiology* **162**: 1173-1184

Cérémonie H, Debelle F, Fernandez MP (1999) Structural and functional comparison of *Frankia* root hair deforming factor and rhizobia Nod factor. *Canadian Journal of Botany* **77**: 1293-1301

Chen T, Duan L, Zhou B, Yu H, Zhu H, Cao Y, Zhang Z (2017) Interplay of Pathogen-Induced Defense Responses and Symbiotic Establishment in *Medicago truncatula*. *Frontiers in microbiology* **8**: 973-973

Chung CT, Niemela SL, Miller RH (1989) One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 2172-2175

Cissoko M, Hocher V, Gherbi H, Gully D, Carré-Mlouka A, Sane S, Pignoly S, Champion A, Ngom M, Pujic P, Fournier P, Gtari M, Swanson E, Pesce C, Tisa LS, Sy MO, Svistoonoff S (2018) Actinorhizal Signaling Molecules: *Frankia* Root Hair Deforming Factor Shares Properties With NIN Inducing Factor. *Frontiers in Plant Science* **9**

Conesa A, Gotz S (2008) Blast2GO: A comprehensive suite for functional analysis in plant genomics. *Int J Plant Genomics* **2008**: 619832

D’Haeze W, Holsters M (2002) Nod factor structures, responses, and perception during initiation of nodule development. *Glycobiology* **12**: 79R-105R

de Jesús-Pires C, Ferreira-Neto JRC, Pacifico Bezerra-Neto J, Kido EA, de Oliveira Silva RL, Pandolfi V, Wanderley-Nogueira AC, Binneck E, da Costa AF, Pio-Ribeiro G, Pereira-Andrade G, Sittolin IM, Freire-Filho F, Benko-Iseppon AM (2020) Plant Thaumatin-like Proteins: Function, Evolution and Biotechnological Applications. *Curr Protein Pept Sci* **21**: 36-51

- Den Herder J, Lievens S, Rombauts S, Holsters M, Goormachtig S** (2007) A Symbiotic Plant Peroxidase Involved in Bacterial Invasion of the Tropical Legume *Sesbania rostrata*. *Plant Physiology* **144**: 717-727
- Edstam MM, Viitanen L, Salminen TA, Edqvist J** (2011) Evolutionary history of the non-specific lipid transfer proteins. *Mol Plant* **4**: 947-964
- Figueiredo J, Sousa Silva M, Figueiredo A** (2018) Subtilisin-like proteases in plant defence: the past, the present and beyond. *Mol Plant Pathol* **19**: 1017-1028
- Fournier J, Imanishi L, Chabaud M, Abdou-Pavy I, Genre A, Brichet L, Lascano HR, Munoz N, Vayssières A, Piroles E, Brottier L, Gherbi H, Hocher V, Svistoonoff S, Barker DG, Wall LG** (2018) Cell remodeling and subtilase gene expression in the actinorhizal plant *Discaria trinervis* highlight host orchestration of intercellular *Frankia* colonization. *New Phytol* **219**: 1018-1030
- Fu C, Donovan WP, Shikapwashya-Hasser O, Ye X, Cole RH** (2014) Hot Fusion: an efficient method to clone multiple DNA fragments as well as inverted repeats without ligase. *PLoS One* **9**: e115318
- Genre A, Russo G** (2016) Does a common pathway transduce symbiotic signals in plant–microbe interactions? *Front Plant Sci.* **7**: 96
- Ghelue MV, Løvaas E, Ringø E, Solheim B** (1997) Early interactions between *Alnus glutinosa* and *Frankia* strain Ar13. Production and specificity of root hair deformation factor(s). *Physiologia Plantarum* **99**: 579-587
- Gherbi H, Markmann K, Svistoonoff S, Estevan J, Autran D, Giczey G, Auguy F, Peret B, Laplaze L, Franche C, Parniske M, Bogusz D** (2008) SymRK defines a common genetic basis for plant root endosymbioses with arbuscular mycorrhiza fungi, rhizobia, and *Frankia* bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 4928-4932
- Goormachtig S, Lievens S, Van de Velde W, Van Montagu M, Holsters M** (1998) Srchi13, a Novel Early Nodulin from *Sesbania rostrata*, Is Related to Acidic Class III Chitinases. *The Plant Cell* **10**: 905-915
- Granqvist E, Sun J, Op den Camp R, Pujic P, Hill L, Normand P, Morris RJ, Downie JA, Geurts R, Oldroyd GE** (2015) Bacterial-induced calcium oscillations are common to nitrogen-fixing associations of nodulating legumes and nonlegumes. *New Phytol* **207**: 551-558
- Griesmann M, Chang Y, Liu X, Song Y, Haberer G, Crook MB, Billault-Penneteau B, Laressergues D, Keller J, Imanishi L, Roswanjaya YP, Kohlen W, Pujic P, Battenberg K, Alloisio N, Liang Y, Hilhorst H, Salgado MG, Hocher V, Gherbi H, Svistoonoff S, Doyle JJ, He S, Xu Y, Xu S, Qu J, Gao Q, Fang X, Fu Y, Normand P, Berry AM, Wall LG, Ané J-M, Pawlowski K, Xu X, Yang H, Spannagl M, Mayer KFX, Wong GK-S, Parniske M, Delaux P-M, Cheng S** (2018) Phylogenomics reveals multiple losses of nitrogen-fixing root nodule symbiosis. *Science* **361**: eaat1743
- Hammad Y, Nalin R, Marechal J, Fiasson K, Pepin Rg, Berry AM, Normand P, Domenach A-M** (2003) A possible role for phenyl acetic acid (PAA) on *Alnus glutinosa* nodulation by *Frankia*. *Plant Soil* **254**: 193-205
- Hay A-E, Herrera-Belaroussi A, Rey M, Fournier P, Normand P, Boubakri H** (2020) Feedback Regulation of N Fixation in *Frankia-Alnus* Symbiosis Through Amino Acids Profiling in Field and Greenhouse Nodules. *Molecular Plant-Microbe Interactions*® **33**: 499-508

- Hayashi M, Shiro S, Kanamori H, Mori-Hosokawa S, Sasaki-Yamagata H, Sayama T, Nishioka M, Takahashi M, Ishimoto M, Katayose Y, Kaga A, Harada K, Kouchi H, Saeki Y, Umehara Y (2014)** A Thaumatin-Like Protein, Rj4, Controls Nodule Symbiotic Specificity in Soybean. *Plant and Cell Physiology* **55**: 1679-1689
- Hocher V, Alloisio N, Auguy F, Fournier P, Doumas P, Pujic P, Gherbi H, Queiroux C, Da Silva C, Wincker P, Normand P, Bogusz D (2011a)** Transcriptomics of actinorhizal symbioses reveals homologs of the whole common symbiotic signaling cascade. *Plant Physiol* **156**: 700-711
- Hocher V, Alloisio N, Bogusz D, Normand P (2011b)** Early signaling in actinorhizal symbioses. *Plant signaling & behavior* **6**: 1377-1379
- Hughes M, Donnelly C, Crozier A, Wheeler CT (1999)** Effects of the exposure of roots of *Alnus glutinosa* to light on flavonoids and nodulation. *Canadian Journal of Botany* **77**: 1311-1315
- Jeong J, Suh S, Guan C, Tsay YF, Moran N, Oh CJ, An CS, Demchenko KN, Pawlowski K, Lee Y (2004)** A nodule-specific dicarboxylate transporter from alder is a member of the peptide transporter family. *Plant Physiol* **134**: 969-978
- Lalonde M (1979)** Immunological and Ultrastructural Demonstration of Nodulation of the European *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. Host Plant by an Actinomycetal Isolate from the North American *Comptonia peregrina* (L.) Coult. Root Nodule. *Botanical Gazette* **140**: S35-S43
- Lei L, Chen L, Shi X, Li Y, Wang J, Chen D, Xie F, Li Y (2014)** A Nodule-Specific Lipid Transfer Protein AsE246 Participates in Transport of Plant-Synthesized Lipids to Symbiosome Membrane and Is Essential for Nodule Organogenesis in Chinese Milk Vetch. *Plant Physiology* **164**: 1045-1058
- Liu Y, Lin T, Valencia MV, Zhang C, Lv Z (2021)** Unraveling the Roles of Vascular Proteins Using Proteomics. *Molecules* **26**
- Lobstein J, Emrich CA, Jeans C, Faulkner M, Riggs P, Berkmen M (2012)** SHuffle, a novel *Escherichia coli* protein expression strain capable of correctly folding disulfide bonded proteins in its cytoplasm. *Microbial cell factories* **11**: 56-56
- Login FH, Balmand S, Vallier A, Vincent-Monégat C, Vigneron A, Weiss-Gayet M, Rochat D, Heddi A (2011)** Antimicrobial peptides keep insect endosymbionts under control. *Science* **334**: 362-365
- Lohar DP, Haridas S, Gantt JS, VandenBosch KA (2007)** A transient decrease in reactive oxygen species in roots leads to root hair deformation in the legume-rhizobia symbiosis. *New Phytol* **173**: 39-49
- Malolepszy A, Kelly S, Sørensen KK, James EK, Kalisch C, Bozsoki Z, Panting M, Andersen SU, Sato S, Tao K, Jensen DB, Vinther M, Jong Nd, Madsen LH, Umehara Y, Gysel K, Berentsen MU, Blaise M, Jensen KJ, Thygesen MB, Sandal N, Andersen KR, Radutoiu S (2018)** A plant chitinase controls cortical infection thread progression and nitrogen-fixing symbiosis. *Elife* **7**: e38874
- Mastrorunzio JE, Tisa LS, Normand P, Benson DR (2008)** Comparative secretome analysis suggests low plant cell wall degrading capacity in *Frankia* symbionts. *BMC Genomics* **9**: 47
- Nalin R, Putra S, Domenach AM, Rohmer M, Gourbière F, Berry A (2000)** High hopanoid/total lipids ratio in *Frankia* mycelia is not related to the nitrogen status. *Microbiology* **146 (Pt 11)**: 3013-3019

- Navarro E, Bousquet J, Moiroud A, Munive A, Piou D, Normand P** (2003) Molecular phylogeny of *Alnus* (Betulaceae), inferred from nuclear ribosomal DNA ITS sequences. *Plant and Soil* **254**: 207-217
- Normand P, Fernandez MP** (2019) *Frankia*. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. (eds W.B. Whitman, F.A. Rainey, P. Kämpfer, M.E. Trujillo, P. DeVos, B. Hedlund and S. Dedysh), pp 1-19
- Normand P, Lapierre P, Tisa LS, Gogarten JP, Alloisio N, Bagnarol E, Bassi CA, Berry AM, Bickhart DM, Choisne N, Couloux A, Cournoyer B, Cruveiller S, Daubin V, Demange N, Francino MP, Goltsman E, Huang Y, Kopp OR, Labarre L, Lapidus A, Lavire C, Marechal J, Martinez M, Mastronunzio JE, Mullin BC, Niemann J, Pujic P, Rawnsley T, Rouy Z, Schenowitz C, Sellstedt A, Tavares F, Tomkins JP, Vallenet D, Valverde C, Wall LG, Wang Y, Medigue C, Benson DR** (2007) Genome characteristics of facultatively symbiotic *Frankia* sp. strains reflect host range and host plant biogeography. *Genome Res* **17**: 7-15
- Peleg-Grossman S, Golani Y, Kaye Y, Melamed-Book N, Levine A** (2009) NPR1 protein regulates pathogenic and symbiotic interactions between *Rhizobium* and legumes and non-legumes. *PLoS One* **4**: e8399
- Peleg-Grossman S, Melamed-Book N, Levine A** (2012) ROS production during symbiotic infection suppresses pathogenesis-related gene expression. *Plant signaling & behavior* **7**: 409-415
- Perrine-Walker F, Gherbi H, Imanishi L, Hocher V, Ghodhbane-Gtari F, Lavenus J, Benabdoun FM, Nambiar-Veeti M, Svistoonoff S, Laplaze L** (2011) Symbiotic signaling in actinorhizal symbioses. *Curr Protein Pept Sci* **12**: 156-164
- Pii Y, Astegno A, Peroni E, Zaccardelli M, Pandolfini T, Crimi M** (2009) The *Medicago truncatula* N5 gene encoding a root-specific lipid transfer protein is required for the symbiotic interaction with *Sinorhizobium meliloti*. *Mol Plant Microbe Interact* **22**: 1577-1587
- Pii Y, Molesini B, Masiero S, Pandolfini T** (2012) The non-specific lipid transfer protein N5 of *Medicago truncatula* is implicated in epidermal stages of *rhizobium*-host interaction. *BMC Plant Biol* **12**: 233
- Pii Y, Molesini B, Pandolfini T** (2013) The involvement of *Medicago truncatula* non-specific lipid transfer protein N5 in the control of rhizobial infection. *Plant signaling & behavior* **8**: e24836-e24836
- Preibisch S, Saalfeld S, Tomancak P** (2009) Globally optimal stitching of tiled 3D microscopic image acquisitions. *Bioinformatics (Oxford, England)* **25**: 1463-1465
- Prin Y, Neyra M, Diem HG** (1990) Estimation of *Frankia* growth using Bradford protein and INT reduction activity estimations: application to inoculum standardization. *FEMS Microbiology Letters* **69**: 91-95
- Pujic P, Alloisio N, Fournier P, Roche D, Sghaier H, Miotello G, Armengaud J, Berry AM, Normand P** (2019) Omics of the early molecular dialogue between *Frankia alni* and *Alnus glutinosa* and the cellulase synton. *Environmental Microbiology* **0**
- Ribeiro A, Akkermans AD, van Kammen A, Bisseling T, Pawlowski K** (1995) A nodule-specific gene encoding a subtilisin-like protease is expressed in early stages of actinorhizal nodule development. *Plant Cell* **7**: 785-794

- Salgado MG, van Velzen R, Nguyen TV, Battenberg K, Berry AM, Lundin D, Pawlowski K** (2018) Comparative Analysis of the Nodule Transcriptomes of *Ceanothus thyrsiflorus* (Rhamnaceae, Rosales) and *Datisca glomerata* (Datiscaceae, Cucurbitales). **9**
- Schagger H** (2006) Tricine-SDS-PAGE. *Nat Protoc* **1**: 16-22
- Shaw SL, Long SR** (2003) Nod factor inhibition of reactive oxygen efflux in a host legume. *Plant physiology* **132**: 2196-2204
- Stahelin C, Granado J, Müller J, Wiemken A, Mellor RB, Felix G, Regenass M, Broughton WJ, Boller T** (1994) Perception of Rhizobium nodulation factors by tomato cells and inactivation by root chitinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91**: 2196-2200
- Svistoonoff S, Laplaze L, Auguy F, Runions J, Duponnois R, Haseloff J, Franche C, Bogusz D** (2003) cg12 expression is specifically linked to infection of root hairs and cortical cells during *Casuarina glauca* and *Allocauarina verticillata* actinorhizal nodule development. *Mol Plant Microbe Interact* **16**: 600-607
- Tam JP, Wang S, Wong KH, Tan WL** (2015) Antimicrobial Peptides from Plants. *Pharmaceuticals* **8**: 711-757
- Taylor A, Qiu YL** (2017) Evolutionary History of Subtilases in Land Plants and Their Involvement in Symbiotic Interactions. *Mol Plant Microbe Interact* **30**: 489-501
- van Ghelue M, Ribeiro A, Solheim B, Akkermans AD, Bisseling T, Pawlowski K** (1996) Sucrose synthase and enolase expression in actinorhizal nodules of *Alnus glutinosa*: comparison with legume nodules. *Mol Gen Genet* **250**: 437-446
- Xie Z-P, Stahelin C, Wiemken A, Broughton WJ, Müller J, Boller T** (1999) Symbiosis-stimulated chitinase isoenzymes of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *Journal of Experimental Botany* **50**: 327-333

Chapitre 2

NsLTPs et symbioses fixatrices d'azote : Distribution, evolution et effet d'AgLTP24 sur le transcriptome de *Frankia alni* ACN14a

PREAMBULE

Les nsLTPs sont impliqués dans de nombreux processus biologiques de la plante dont les symbioses fixatrices d'azote chez les plantes nodulantes. Nous avons vu dans le chapitre 1 que *Alnus glutinosa* au contact de son symbiote sécrète des étapes précoces jusqu'à la nodosité un peptide, AgLTP24, appartenant à une famille d'AMPs. Ce peptide est adressé aux poils racinaires déformés et cible le symbiote dans les cellules infectées de la nodosité au niveau des hyphes et des diazovésicules fixatrices d'azote de *Frankia*. Dans cette partie nous nous sommes intéressés à la réponse moléculaire du symbiote face à ce peptide. Dans la nodosité, le symbiote doit être viable et efficace pour assurer son activité fixatrice d'azote et les échanges trophiques avec l'hôte. Ainsi, nous avons étudié la réponse moléculaire de *Frankia alni* ACN14a face à des concentrations sub-inhibitrices d'AgLTP24. Grâce à cette analyse transcriptomique, il semblerait que *Frankia*, au contact du peptide, fait face à un stress qu'elle est capable de gérer grâce à une stratégie permettant le maintien de ses activités respiratoires et de fixation d'azote. Dans les symbioses actinorhiziennes, ce travail constitue la première analyse de la réponse moléculaire de *F. alni* ACN14a face à un AMP produit par l'hôte lors de la nodulation. De plus, ces données transcriptomiques ouvrent de nouvelles perspectives d'étude sur d'éventuels mécanismes de résistance de *Frankia* face à un AMP.

Certains AMPs de la famille des nsLTPs ont été décrits comme impliqués dans les symbioses fixatrices d'azote formées par des plantes nodulantes du clade RNF : les légumineuses et les plantes actinorhiziennes avec l'étude d'AgLTP24. C'est pourquoi, nous avons recherché les nsLTPs chez des plantes nodulantes et non nodulantes du clade RNF et mené une analyse phylogénétique afin d'étudier l'histoire évolutive de cette famille dans les symbioses fixatrices d'azote.

Pour cet article, j'ai réalisé la production et la purification du peptide. J'ai analysé avec Hasna Boubakri, Petar Pujic et Philippe Normand les résultats des données obtenues par RNAseq. J'ai construit les amorces ciblant les nsLTPs prédites d'*A. glutinosa* pour les rt-qPCRs qui ont été ensuite menées par Pascale Fournier. Pour la recherche des nsLTPs, j'ai identifié les outils et la méthode d'identification puis Jean Keller a écrit le script python nsLTPFinder en ajoutant la recherche par expression régulière. J'ai utilisé ce script pour rechercher les nsLTPs dans les 15 protéomes de plantes. J'ai réalisé l'alignement des séquences codantes ces nsLTPs, le nettoyage de l'alignement et l'analyse phylogénétique. J'ai analysé cet arbre phylogénétique avec Jean Keller. J'ai classé les nsLTPs par type selon les classifications proposées dans la littérature. J'ai recherché les données transcriptomiques disponibles dans la littérature pour obtenir le niveau d'expression des nsLTPs dans des nodosités fonctionnelles pour les 4 plantes nodulantes. J'ai réalisé toutes les représentations graphiques et les analyses statistiques. J'ai rédigé la totalité du manuscrit avec les corrections d'Hasna Boubakri, Petar Pujic, Philippe Normand et Jean Keller.

NsLTP and nitrogen fixing symbiosis: distribution, evolution and sub-inhibitory effects of AgLTP24 on the transcriptome of the actinorhizal symbiont *Frankia alni* ACN14a

Mélanie Gasser¹, Jean Keller², Pascale Fournier¹, Petar Pujic¹, Philippe Normand¹, Hasna Boubakri^{1#}

1-Université de Lyon, F-69361, Lyon, France; Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR 5557, INRA UMR1418, Ecologie Microbienne, F-69622, Villeurbanne, France

2- Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales, Université de Toulouse, CNRS, UPS, Castanet Tolosan, France

#corresponding author: hasna.boubakri@univ-lyon1.fr, tel: 33-472 44 82 00

SUMMARY

Non-specific lipid transfer proteins (nsLTPs) are secreted peptides classified as antimicrobial peptides, present in all plant lineages and tissues. They contain a hydrophobic cavity that allows to bind and transfer lipid molecules and are involved in several plant biological processes including nitrogen fixing symbiosis. Nodulating plants belonging to the root nodule nitrogen fixation (RNF) clade can establish symbioses with nitrogen fixing bacteria rhizobia and *Frankia* by forming a nodule within the roots. The nsLTPs family is involved in nitrogen fixing symbiosis at early and nodule stages in both rhizobia and *Frankia* associated plant species. In *Medicago truncatula* and *Astragalus sinicus*, nsLTPs (Mtn5 and AsE246 respectively) could regulate symbiont invasion, promote root cortex infection, membrane biosynthesis and symbiosis efficiency. In actinorhizal plants, only one has been studied in *Alnus glutinosa*, AgLTP24, which localised in nodule around *Frankia's* nitrogen fixing vesicles and inhibits nitrogen fixation, *in vitro*, at the highest concentrations tested.

Here, the molecular response of the symbiont to AgLTP24 at sub-inhibitory concentration was investigated using RNAseq and it appears that *Frankia* copes with a stress by maintaining its respiratory and nitrogen fixation activities. In addition, transcriptomic data permitted to identify several genes potentially involved in AMP resistance. As nsLTPs are still poorly described in nitrogen fixing symbioses we identified nsLTPs in RNF plants species to investigate their distribution and their evolution history in nitrogen fixing symbiosis. Thus, 31 genes potentially involved in symbiosis were identified in two legumes and three actinorhizal plants.

Furthermore, phylogenetic analysis revealed that the function of nsLTPs in symbiosis would have evolved independently in nitrogen fixing symbiosis.

This study constitutes the first analysis of the *Frankia alni* ACN14a 's molecular response to an AMP and provides a first insight on how *Frankia* responds to nsLTPs produced during symbiosis. More broadly, since little is known about the role of these nsLTPs in symbiosis, our study allowed the identification of nsLTPs that may be involved in symbiosis and constitutes a first step to assess nsLTPs evolutionary history in the nitrogen-fixing symbiosis.

Keywords: antimicrobial peptide, Lipid transfer protein, nitrogen fixation, symbiosis, transcriptomic

INTRODUCTION

Root nodule nitrogen fixation (RNF) symbioses are established in plants of the orders Fabales, Fagales, Cucurbitales and Rosales and the nitrogen fixing bacteria rhizobia and *Frankia*. Nitrogen-fixing bacteria rhizobia establish symbioses with plants of the order Fabales and the species *Parasponia* (Rosales). The actinobacteria *Frankia* have a wider spectrum and establish symbiosis with Fagales, Cucurbitales and Rosales comprising about 220 plant species (Svistoonoff et al. 2014). Bacteria in contact with the plant roots induce root hairs deformation. In these deformed root hairs, the plant establishes an infection thread to guide the symbiont into the cortical parenchyma from which nodule formation is triggered (Berry et al. 1983). In this nodule, the bacterium fixes atmospheric nitrogen and thus provides nitrogenous compounds to the plant, which in exchange transfers organic compounds derived from photosynthesis (Berry et al. 2011). The recognition, entry and maintenance of the bacterium in the nodule require a fine coordination on the part of both partners, which is established through a molecular dialogue between the two partners.

In *Alnus glutinosa*, which grows in pioneer biotopes such as volcanic ashes, glacial moraines and mine spoils (Normand et al. 2019) physiological and transcriptomic studies on pre-nodules and nodules colonized by *Frankia* allowed the identification of symbiotic mechanisms such as the common symbiotic signalling cascade (Hoher et al. 2011a). Recently, plant transcriptomic data at early stage of symbiosis showed the activation of the plant immunity response, while the recognition of *Frankia* switches off part of the defence system to ensure nodulation (Gasser et al. 2022, submitted). It turns out that 80% of the overexpressed genes encode

secreted peptides that could be involved in the symbiosis. Among these peptides, some qualified as antimicrobial peptides (AMPs), are described in the literature as part of the plant's innate immunity (Edqvist et al. 2018). However, these AMPs also have a crucial role during symbiosis such as the defensin AgDef5 (Carro et al. 2015) or AgLTP24 belonging to the non-specific lipid transfer protein (nsLTPs) family (Gasser et al 2022, submitted).

The nsLTPs are small secreted peptides with 4 disulphide bridges formed by a conserved 8 Cysteines Motif (8CM): "C-Xn-C-Xn-CC-Xn-CXC-Xn-C-Xn-C" (Boutrot et al. 2008). These disulphide bridges stabilize 4 alpha helices and give rise to a hydrophobic tunnel-like cavity allowing the binding and transport of hydrophobic molecules (Edqvist et al. 2018). The structure of nsLTPs allows them to resist heat, denaturing agents, and proteases (Lindorff-Larsen et al. 2001). nsLTPs are widely distributed in plant tissues and in all land plants and it is hypothesized that nsLTPs evolved early in plant evolution (Edstam et al. 2011, Fonseca-García et al. 2021). nsLTPs are involved in several biological processes such as stress resistance, reproduction, germination, plant defence against pathogen attacks, cuticle formation, pollen tube formation and nitrogen fixing symbioses (Pii et al. 2013, Lei et al. 2014, Edqvist et al. 2018, Zhou et al. 2019). Concerning symbioses, these nsLTPs are secreted by legumes, *Medicago truncatula*, *Astragalus sinicus* (Chinese milk vetch), and *Phaseolus vulgaris*, in contact with their symbiont at the early stage of nodulation and at nodule stage (Pii et al. 2009, Santi et al. 2020, Fonseca-García et al. 2021). *M. truncatula* secretes nsLTPs, MtN5, which regulate symbiont invasion into the root epidermis and promote infection in the root cortex (Pii et al. 2009, Pii et al. 2012, Pii et al. 2013, Santi et al. 2017). Another *M. truncatula* nsLTPs, MtLTP7, expressed in the pre-nodule and in the nodule, regulates the primordia invasion (Santi et al. 2020). In *A. sinicus* an nsLTP, AsE246 is also expressed at early and late stages of symbiosis and is localized on the symbiosome membrane, could be involved in membrane biosynthesis and symbiosis efficiency (Lei et al. 2014).

Focusing on actinorhizal symbiosis, at the early stage, *A. glutinosa* addresses AgLTP24 to the deformed root hairs induced after contact with *Frankia* and target the symbiont's nitrogen fixing vesicles in infected plant cell at nodule stage (Gasser et al. 2022, submitted). Vesicles are differentiated *Frankia* cells with a hopanoid lipids-enriched wall for control of oxygen that would otherwise inhibit nitrogenase (Berry et al. 1993). This peptide above 100nM, inhibits *Frankia* nitrogen fixation *in vitro* and lowest concentration does not impact *Frankia*

physiology. *In natura*, AMP concentration required to be bactericidal is not always achievable, and recent studies have shown that a sub-inhibitory dose induces effects at a molecular level (Vasilchenko et al. 2019). In the nodule, it is likely that the plant secretes a sub-inhibitory dose of AgLTP24 targeting the nitrogen-fixing vesicles of *Frankia* considering that *in planta* the symbiont is viable with efficient nitrogen-fixing activity. Therefore, in this study the molecular response of the symbiont to a sub-inhibitory dose of AgLTP24 was investigated. To enlarge our investigation, the distribution and evolutionary history of nsLTPs among 15 nodulating and non-nodulating plant species were reviewed and thus provide insights into the involvement of nsLTPs in nitrogen fixing symbioses. For five nodulating plants, we coupled these data with the gene's differential expression values in the nodule. Thus, 31 genes encoding nsLTPs, which could be involved in symbiosis including 17 nsLTPs in actinorhizal plants, were identified. Moreover, a phylogenetic analysis was conducted to unravel the evolutionary history of the nsLTPs family in RNF plants and showed that nsLTPs function in symbiosis would have evolved independently, which would point to a convergence of function in symbiosis.

RESULTS

Molecular response of *Frankia alni* ACN14a to AgLTP24 through RNAseq

A previous study had demonstrated that *agltp24* was highly expressed in *A. glutinosa* from an early stage of infection to the late stage corresponding to nodule (Gasser et al. 2022, submitted). After biological production and purification of this peptide, a bioassay was performed by adding this peptide to *Frankia* cultures, which showed that AgLTP24 above 100nM inhibited *Frankia* nitrogen fixation (Gasser et al. 2022, submitted). Therefore, the molecular response of *Frankia alni* ACN14a under N-replete conditions in contact or not with a sub-inhibitory concentration of AgLTP24 (1nM) was investigated using RNAseq method (Table 1, Table 2). Physiological measurements such as ARA, IRA and growth (OD_{600nm}) were conducted on these assays (see materials and methods) and confirmed that AgLTP24 did not affect *Frankia* physiology as shown earlier (Supplementary Fig. S1) (Gasser et al. 2022, submitted).

Transcriptomic analysis showed 107 up-regulated genes (Table 1), and 35 down-regulated genes (Table 2) when AgLTP24 was added to *Frankia* culture.

Table 1: *Frankia alni* ACN14a overexpressed gene in N-replete condition supplemented with AgLTP24 versus N-replete conditions.

p-value adjusted (padj) ≤ 0,05 and Log2FoldChange ≥ 1. Gene label, name and annotation come from Genoscope database.

Label	Name	Log2FoldChange	padj	Annotation
FRAAL1882		5,01	5,57E-03	Small heat shock protein
FRAAL4716		4,14	3,89E-02	Putative oxidoreductase
FRAAL6701	groL	4,10	4,24E-04	chaperone Hsp60 (GroEL), part of GroE chaperone system
FRAAL4715		3,87	3,95E-02	Putative transcriptional regulator of the TetR family
FRAAL1884	ribD	3,55	1,10E-03	Putative riboflavin/cytosine deaminase (partial)
FRAAL0166		3,46	4,42E-03	conserved hypothetical protein; putative membrane protein
FRAAL5655	sdhB	3,40	4,90E-03	Succinate dehydrogenase iron-sulfur protein
FRAAL1764	lon	3,29	2,11E-03	DNA-binding ATP-dependent protease La; heat shock K-protein
FRAAL2325		3,23	4,90E-03	putative 3-(3-hydroxy-phenyl)propionate hydroxylase, FAD/NAD(P)-binding
FRAAL5654	sdhA	3,10	5,06E-03	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit A
FRAAL6439		3,07	1,30E-02	putative MoxR-like regulatory protein
FRAAL5653	sdhC	3,04	5,57E-03	Succinate dehydrogenase cytochrome B subunit
FRAAL6438		2,95	8,43E-03	hypothetical protein
FRAAL6814	nifV	2,94	4,90E-03	Nitrogenase-associated homocitrate synthase
FRAAL5037	livG	2,88	7,01E-03	high-affinity branched-chain amino acid transport protein (ABC superfamily, atp_bind)
FRAAL6643	clpB	2,82	4,90E-03	ATP-dependent protease, Hsp 100, part of multi-chaperone system with DnaK, DnaJ, and GrpE
FRAAL0168		2,81	1,56E-02	hypothetical protein; putative signal peptide; putative Dyp-type peroxidase domain
FRAAL6804	nifZ	2,79	5,06E-03	NifZ protein
FRAAL4308	copD	2,79	7,90E-03	Copper resistance membrane protein
FRAAL2326		2,76	2,55E-02	hypothetical protein; Putative serine-threonine protein kinase
FRAAL0988		2,69	5,06E-03	putative regulator
FRAAL6807		2,62	4,62E-03	conserved hypothetical protein
FRAAL6813	nifH	2,62	1,11E-02	Nitrogenase iron protein (Nitrogenase component II) (Nitrogenase Fe protein) (Nitrogenase reductase, Dinitrogenase reductase)
FRAAL1134	groL	2,61	5,55E-03	chaperone Hsp60 (GroEL), part of GroE chaperone system
FRAAL0989		2,61	1,16E-02	Cation-transporting P-type ATPase A
FRAAL6812	nifD	2,60	9,91E-03	Nitrogenase molybdenum-iron protein alpha chain (Nitrogenase component I) (Dinitrogenase)
FRAAL6811	nifK	2,59	1,65E-02	Nitrogenase molybdenum-iron protein beta chain (Nitrogenase component I) (Dinitrogenase)
FRAAL1133	groS	2,58	6,17E-03	chaperone Hsp10 (GroES), part of GroE chaperone system
FRAAL6638		2,57	1,41E-02	hypothetical protein
FRAAL6640	grpE	2,56	1,52E-02	heat shock protein (HSP-70 cofactor)
FRAAL4648		2,50	3,88E-02	(2,3-dihydroxybenzoyl)adenylate synthase (2,3-dihydroxybenzoate-AMP ligase; Dihydroxybenzoic acid- activating enzyme)
FRAAL4645	cetJ2	2,48	2,55E-02	conserved hypothetical protein
FRAAL6859		2,47	1,43E-02	conserved hypothetical protein
FRAAL4644	cetJ3	2,42	2,98E-02	conserved hypothetical protein
FRAAL2286		2,42	1,16E-02	Putative WhiB-family transcriptional regulator; putative role in cell cycle control
FRAAL6639	dnaK	2,41	2,01E-02	chaperone Hsp70 in DNA biosynthesis/cell division
FRAAL5036		2,38	1,21E-02	putative high-affinity branched-chain amino acid transport protein (ABC superfamily, atp_bind)
FRAAL1506		2,36	4,90E-03	hypothetical protein
FRAAL4245		2,35	7,01E-03	hypothetical integral membrane protein
FRAAL1607		2,34	4,35E-02	putative integral membrane protein
FRAAL6437		2,34	1,64E-02	Putative transglutaminase, putative cysteine proteases, putative membrane protein
FRAAL5911		2,33	1,63E-02	hypothetical protein; putative signal peptide
FRAAL6335		2,32	2,91E-02	hypothetical protein
FRAAL6641	dnaJ	2,32	1,98E-02	heat shock protein (Hsp40), co-chaperone with DnaK
FRAAL6197		2,28	4,92E-02	hypothetical protein; putative signal peptide
FRAAL6808	nifX	2,26	4,59E-02	NifX protein
FRAAL0596		2,20	4,24E-04	Putative regulator
FRAAL1002		2,13	3,31E-02	Putative cytochrome C biogenesis membrane protein
FRAAL6802	erpA	2,13	2,19E-02	Conserved hypothetical protein; Thioredoxin-like domain
FRAAL6860		2,13	3,70E-02	Putative 1L-myo-inositol-1-phosphate synthase
FRAAL0060		2,11	1,21E-02	putative transcription regulator protein
FRAAL6803	nifB	2,08	2,09E-02	FeMo cofactor biosynthesis protein nifB
FRAAL1763		2,07	2,19E-02	hypothetical protein

FRAAL6337		2,06	1,68E-02	hypothetical protein
FRAAL5912	sigE	2,01	4,97E-02	Putative RNA polymerase ECF-subfamily sigma factor
FRAAL1001		1,98	2,55E-02	Thiol:disulfide interchange protein helX precursor (Cytochrome c biogenesis protein helX)
FRAAL4136		1,98	3,31E-02	Putative iron sulphur protein (Putative secreted protein)
FRAAL4747		1,97	2,80E-02	Putative stress-inducible protein; putative adenine nucleotide-binding domain
FRAAL6642		1,97	1,72E-02	putative heat shock protein hspR
FRAAL6118		1,91	1,43E-02	putative glycosyltransferase
FRAAL5016		1,91	4,59E-02	hypothetical protein
FRAAL5461		1,82	2,25E-02	putative Epoxide hydratase
FRAAL5462		1,80	5,06E-03	putative TetR-family transcriptional regulator
FRAAL3287		1,76	2,20E-02	Glycine-rich cell wall structural protein
FRAAL1786		1,74	2,20E-02	hypothetical protein
FRAAL4148		1,73	2,91E-02	hypothetical protein
FRAAL3704		1,73	4,65E-02	putative TetR-family transcriptional regulator
FRAAL5121		1,70	4,15E-02	putative integral membrane protein
FRAAL4491	oxyR	1,69	5,06E-03	transcriptional regulator of oxidative stress, regulates intracellular hydrogen peroxide (LysR family)
FRAAL4781		1,68	4,22E-02	conserved hypothetical protein
FRAAL0075		1,67	2,98E-02	conserved hypothetical protein
FRAAL3899		1,66	1,98E-02	putative ATP/GTP binding protein; putative beta WD-40 repeat and TPR domains
FRAAL0863		1,66	1,21E-02	RicinB lectin
FRAAL0081		1,65	1,21E-02	Manganese transport system ATP-binding protein
FRAAL1576		1,63	4,22E-02	hypothetical protein; putative signal peptide
FRAAL6408		1,63	5,06E-03	conserved protein of unknown function
FRAAL6119		1,62	1,64E-02	putative succinoglycan biosynthesis protein
FRAAL5109	qcrB	1,61	2,19E-02	Ubiquinol-cytochrome c reductase cytochrome b subunit
FRAAL1508		1,59	5,06E-03	hypothetical protein; putative membrane protein
FRAAL5649		1,59	1,21E-02	Integral membrane protein with Succinyl-CoA ligase domain
FRAAL6227		1,52	1,86E-02	putative NADH dehydrogenase
FRAAL5552		1,51	2,58E-02	hypothetical protein; putative signal peptide
FRAAL4430		1,47	1,21E-02	hypothetical protein; putative signal peptide
FRAAL1766		1,45	3,88E-02	Putative pirin-like protein
FRAAL1505	murI	1,43	2,98E-02	Glutamate racemase
FRAAL0938		1,43	3,56E-02	putative molybdopterin converting factor
FRAAL1699	groL	1,39	1,56E-02	chaperone Hsp60 (GroEL), part of GroE chaperone system
FRAAL4024		1,38	2,79E-02	putative monooxygenase with luciferase-like ATPase activity
FRAAL1427		1,35	4,97E-02	Short-chain dehydrogenase/oxidoreductase with several Glucose/ribitol dehydrogenase and 17-Beta hydroxysteroid dehydrogenase domains
FRAAL6502		1,35	6,17E-03	conserved hypothetical protein
FRAAL1154	accD	1,33	2,55E-02	Acetyl-coenzyme A carboxylase carboxyl transferase subunit beta (ACCASE beta chain)
FRAAL0924		1,33	4,97E-02	Putative MarR-family transcriptional regulator; putative signal peptide
FRAAL2626		1,33	1,43E-02	hypothetical protein
FRAAL5351		1,31	4,90E-02	Putative Na ⁺ /H ⁺ antiporter; putative membrane protein
FRAAL5685		1,29	4,45E-02	Membrane-bound Ribonuclease BN
FRAAL5137		1,29	1,88E-02	hypothetical protein
FRAAL4890		1,25	2,19E-02	Putative transcriptional regulator (partial match)
FRAAL1577		1,24	3,56E-02	Short-chain dehydrogenase, NAD(P)-binding domain
FRAAL1016		1,23	1,65E-02	hypothetical protein
FRAAL0229		1,22	4,57E-02	hypothetical protein
FRAAL6260		1,22	2,55E-02	Secreted subtilisin-like serine protease
FRAAL2542		1,21	2,01E-02	Non-ribosomal peptide synthetase
FRAAL1157	sucD	1,13	3,88E-02	succinyl-CoA synthetase, alpha subunit, NAD(P)-binding
FRAAL5156	lipB	1,11	4,85E-02	Lipoyltransferase (Lipoyl-[acyl-carrier protein]-protein -N-lipoyltransferase) (Lipoate-protein ligase B)
FRAAL5646	fecD	1,02	4,97E-02	citrate-dependent iron (III) transport protein (ABC superfamily, membrane)
FRAAL4818		1,02	1,16E-02	hypothetical protein
FRAAL6723		1,01	3,51E-02	hypothetical protein; putative ATPase domain

Table 2: *Frankia alni* ACN14a underexpressed gene in N-replete condition supplemented with AgLTP24 versus N-replete conditions.

p-value adjusted (padj) ≤ 0,05 and Log2FoldChange ≤ -1. Gene label, name and annotation come from Genoscope database.

Label	Name	Log2FoldChange	padj	Annotation
FRAAL3352		-1,02	1,63E-02	putative Phosphatidylinositol diacylglycerol-lyase
FRAAL0541		-1,05	2,19E-02	putative dehydrogenase/oxidoreductase
FRAAL0375		-1,11	2,97E-02	Putative GntR-family transcriptional regulator
FRAAL0640		-1,13	1,21E-02	Putative secreted cell wall peptidase
FRAAL2594		-1,16	1,98E-02	Putative epoxide hydrolase
				putative conserved protein; glyoxalase and dihydroxybiphenyl
FRAAL1590		-1,19	2,80E-03	dioxygenase domain
FRAAL2705		-1,19	2,98E-02	hypothetical protein
FRAAL6479		-1,20	3,47E-02	Short-chain dehydrogenase
FRAAL3995		-1,22	3,58E-02	putative hydrolase
FRAAL2484		-1,32	2,19E-02	conserved hypothetical protein
FRAAL3997		-1,38	7,64E-03	conserved hypothetical protein
				putative glutathione S-transferase enzyme with thioredoxin-like
FRAAL4133		-1,42	3,45E-02	domain
FRAAL2519		-1,43	3,09E-02	Putative short-chain dehydrogenase
FRAAL2937		-1,45	2,25E-02	hypothetical protein
FRAAL3838		-1,46	4,97E-02	hypothetical protein; putative signal peptide
FRAAL3585		-1,48	3,31E-02	Putative esterase
FRAAL3774		-1,54	2,55E-02	hypothetical protein
FRAAL1571		-1,57	1,64E-02	Putative acyl-CoA dehydrogenase
FRAAL0744		-1,59	5,55E-03	hypothetical protein; putative endonuclease domain
FRAAL2938		-1,62	8,43E-03	putative protein kinase
FRAAL3965		-1,63	2,11E-02	hypothetical protein; putative signal peptide
FRAAL2509		-1,63	3,31E-02	putative 3-ketoacyl-CoA thiolase
FRAAL0201		-1,67	2,98E-02	Putative cytochrome P450 reductase
FRAAL3923		-1,69	4,22E-02	putative cytochrome P450
FRAAL0376		-1,71	1,88E-02	Cytosine/purine/uracil/thiamine/allantoin permease family protein
FRAAL4527		-1,71	5,57E-03	putative Glycoside hydrolase
FRAAL2508		-1,73	2,63E-02	protein associated with acetyl-CoA C-acyltransferase
FRAAL0316		-1,76	1,43E-02	Carveol dehydrogenase.
FRAAL0200		-1,87	6,87E-04	NAD ⁺ -dependent aldehyde dehydrogenase
FRAAL2706		-1,89	1,98E-02	hypothetical protein
FRAAL0348		-1,90	1,30E-02	putative 6-methylsalicylic acid synthase
FRAAL2076	narK	-2,00	2,91E-02	Nitrite membrane extrusion protein
FRAAL2707		-2,00	1,43E-02	Coenzyme PQQ synthesis protein
FRAAL2513		-2,00	2,19E-02	Putative Acyl-CoA dehydrogenase
FRAAL3766		-2,65	1,52E-02	hypothetical protein

Among the under-expressed genes, only one gene was annotated (*nark*), the others were not described enough to provide further information. Among up-regulated genes, some encoded chaperones involved in refolding protein and proteins for repairing DNA damages were overexpressed such as *groL*, *groS*, *lon* and a gene cluster (FRAAL6639-FRAAL6643) with *dnaK*, *grpE*, *dnaJ*, and *clpB*. Genes encoding putative proteins involved in cell wall/membrane/envelope biogenesis were also induced such as FRAAL6118 and FRAAL6119 encoding a glycosyltransferase and a succinoglycan biosynthesis protein, respectively. Other upregulated genes encode membrane transporters such as, ABC transporters, manganese transport, cation transporting P-type ATPase A and a citrate transporter (*fecD*).

Several genes encoding enzymes involved in energy conversion and metabolism, aerobic respiration (succinate dehydrogenase, cytochromes) and nitrogen fixation (*nif* genes) were overexpressed while *narK* allowing nitrate and nitrite import were repressed. However, obtained physiological results confirmed that *Frankia alni* ACN14a nitrogen fixing and respiratory activities were similar with or without AgLTP24.

nsLTPs identification and characterisation

During symbiosis, *A. glutinosa* produces and secretes AgLTP24 which targets the symbiont in the nodule and triggers in *Frankia* a mild molecular response. This nsLTPs is the only one that has been identified as involved in actinorhizal symbioses and three other (Mtn5, MtLTP7 and AsE246) has been described as involved in symbiosis between Fabales and rhizobia (Pii et al. 2009, Pii et al. 2012, Pii et al. 2013, Lei et al. 2014, Santi et al. 2017, Santi et al. 2020). To analyze the nsLTP distribution, we mined the proteomes of nodulating and non-nodulating plants distributed in the RNF clade as well as *Arabidopsis thaliana* belonging to the Brassicales order (Table 3).

Table 3: nsLTPs characteristics

Species	Order	Nodulating	Nbr of up and down regulated gene in nodule	nsLTPs total	nsLTPs number by Type										
					I	II	III	IV	V	VI	VIII	IX	XI	NA	
<i>Alnus glutinosa</i>	Fagales	Yes	15	37	6	4	1	4	3	2	1	0	0	16	
<i>Casuarina glauca</i>	Fagales	Yes	5	23	4	3	1	2	2	3	0	0	0	8	
<i>Juglans regia</i>	Fagales	No	-	36	10	1	0	3	3	2	2	1	0	14	
<i>Quercus lobata</i>	Fagales	No	-	48	10	2	0	1	4	5	3	1	2	20	
<i>Datisca glomerata</i>	Cucurbitales	Yes	12	33	7	1	1	3	3	1	2	1	0	14	
<i>Cucumis sativus</i> PI183967	Cucurbitales	No	-	36	4	6	1	1	2	0	0	1	3	18	
<i>Discaria trinervis</i>	Rosales	Yes	-	35	7	4	0	4	0	2	1	0	0	17	
<i>Dryas drummondii</i>	Rosales	Yes	-	39	8	3	0	5	1	1	3	1	0	17	
<i>Parasponia andersonii</i>	Rosales	Yes	10	45	10	4	0	2	1	1	0	0	0	27	
<i>Pyrus communis</i>	Rosales	No	-	42	8	2	2	4	2	1	2	1	0	20	
<i>Lupinus albus</i>	Fabales	Yes	-	75	24	8	0	2	0	1	1	1	0	38	
<i>Medicago truncatula</i>	Fabales	Yes	28	91	40	4	1	3	2	4	1	1	0	35	
<i>Chamaecrista fasciculata</i>	Fabales	Yes	-	41	8	3	0	6	2	0	1	1	1	19	
<i>Nissolia schottii</i>	Fabales	No	-	34	9	1	1	2	0	0	1	0	1	19	
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Brassicales	No	-	90	11	13	3	5	3	3	4	2	2	44	
Total			number	705	166	59	11	47	28	26	22	11	9	326	
			%	100	24	8	2	7	4	4	3	2	1	46	
nsLTPs in nodulating plants species			number	419	114	34	4	31	14	15	10	5	1	191	
			%	100	27	8	1	7	3	4	2	1	0	46	

Because their sequences are hypervariable, nsLTPs are described as plant AMPs and cannot be retrieved exhaustively using keywords search and BLAST analyses (Santos-Silva et al. 2020).

Therefore, a Python wrapper script, nsLTPFinder

(<https://github.com/jeankeller/nsLtpFinder.git>) was used to identify nsLTPs containing a N-terminal signal peptide, with a mature nsLTPs containing a conserved 8 Cysteines Motif (8CM), characteristic of this peptide family (Supplementary Fig. S2). The 8CMs allowing disulphide bridge formations was initially predicted using HMMERSEARCH and for maximum coverage of sequence variability, the identification was confirmed using regular expression approach, which identifies 8CM containing proteins without considering sequence similarity. For all identified nsLTPs, the 8CM were manually checked (see materials and methods).

Among the 15 proteomes, 705 putative nsLTPs were predicted (Table 3 and Supplementary Table S1). The number of predicted nsLTPs (Table 3) varies according to and the plant orders analysed. Indeed, species containing the lowest number of predicted nsLTPs (33 to 36) are found in all plants orders belonging to the RNF clade. Moreover, the species belonging to the RNF clade with the highest number of predicted nsLTPs (>70) were nodulating plant belonging to the Fabales order (*Luteus albus* and *Medicago truncatula*). However, these results are unlikely to indicate a link between nsLTPs and symbiosis because the Brassicaceae, *A. thaliana* has the highest number of predicted nsLTPs (90). The number of nsLTPs is not correlated with the ability of the species to nodulate (Table 3). Indeed, nodulating plants had between 23 and 91 nsLTPs predicted and non-nodulating plants between 34 and 90 nsLTPs. Similarly, nodulating and non-nodulating plants belonging to the same order have a similar number of nsLTPs: in Rosales, *Pyrus communis* and *Parasponia andersonii* have 42 and 45 predicted nsLTPs respectively, for Cucurbitales: *Cucumis sativus* and *Datisca glomerata* have 36 and 35 predicted nsLTPs respectively and for Fagales *Juglans regia* and *A. glutinosa* have 36 and 37 predicted nsLTPs respectively. Moreover, plant proteomes used in this study do not have the same level of annotation, thus the number of nsLTPs predicted for these species are susceptible to evolve with the high resolution of genome sequencing or proteomic studies. To go further, the nsLTPs were grouped according to the classification proposed by Boutrot et al. (Boutrot et al. 2008) with the addition of the XI type proposed by Li et al. (Li et al. 2014) (Table 3, Supplementary Table S1). Only 54% of the predicted nsLTPs in this dataset could be classified and the most represented was type I with 24%. We did not find sequences belonging to types VII and X in these proteomes. Furthermore, for nodulating plants, there is no over- or under-representation of types compared to non-nodulating plants (Table 3). The 326 other sequences did not correspond to any type of classification. These untyped nsLTPs are grouped

in clades with typed nsLTPs at the phylogenetic level and share the same conserved protein motifs (Fig. 1). Indeed, a conserved protein motif analysis using MEME suite were conducted and showed that the majority of nsLTPs grouped in the same phylogenetic clade shared mostly the same conserved protein motifs (Fig. 1). In addition, the tools used to predict nsLTPs identify some with a large domain composed by more than 40 amino acids between the second and third cysteine of the 8CM. This domain is rich in proline, aspartic acid and histidine.

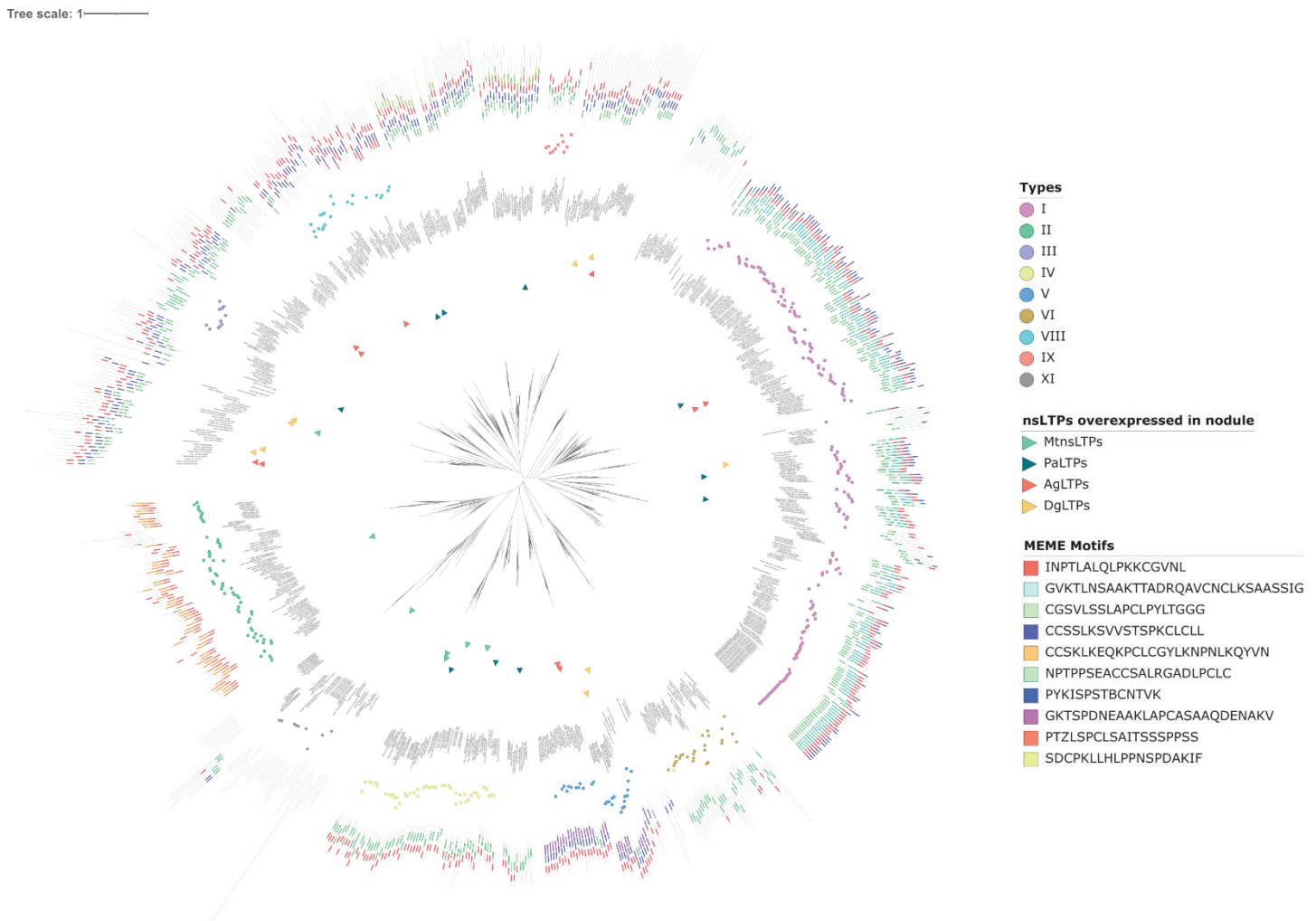


Fig. 1. Phylogenetic tree representing nsLTPs evolution in nitrogen fixing symbiosis.

Unrooted maximum-likelihood phylogenetic tree of nsLTPs from RNF plants (see Table 3) was constructed with IQ-TREE. The colored circles correspond to the nsLTPs type and the unannotated one are those that do not correspond to any type. The triangles represent the overexpressed gene encoding nsLTPs at the nodule stage. The schematic representation of conserved protein motifs predicted with the MEME suite is shown outside the tree.

nsLTPs expression during nodulation and evolution history in nodulating plants

Regarding the ability to establish or not symbiosis, there is no correlation between number of predicted nsLTPs and the abundance of each nsLTP type (Table 3). To determine which nsLTPs

might be involved in symbiosis, the differential expression of their genes at the nodule stage were investigated. Therefore, we collected differential expression data of genes encoding nsLTPs in nodules for species belonging to the four orders of RNF clade: two plants establishing symbioses with rhizobia (*M. truncatula* and *P. andersonii*) and three actinorhizal plants establishing symbiosis with *Frankia* (*A. glutinosa*, *Casuarina glauca* and *D. glomerata*). For *A. glutinosa*, 37 nsLTPs (AgLTPs) were identified, previous transcriptomic data based on EST microarrays led to the identification of three genes (corresponding to 3 ESTs) differentially expressed in the nodule ($\text{Log}_2\text{FoldChange} >1$ or <-1). (Supplementary Table S2). A fourth EST has been found but matches both with *agltip1* and *agltip3* as their sequences share a high percentage of identity. Thus, for *A. glutinosa* in association with *Frankia alni* ACN14a EST data were deepened using qRT-PCR targeting all genes encoding AgLTPs to characterize differential expression in the nodule compared to non-infected roots. We retrieved the differential expression of 49% of *A. glutinosa* gene encoding nsLTPs. Furthermore, qRT-PCR data confirmed the EST expression data and were able to distinguish the expression of *agltip1* and *agltip3* and (Fig. 2, Supplementary Table S2). We deepened the differential expression data with 10 genes encoding AgLTPs differentially expressed in the nodule: 4 overexpressed and 6 underexpressed (Fig. 2, Supplementary Fig. S2). Among them, *agltip30*, such as *agltip24*, was highly expressed in nodules ($\text{Log}_2\text{FC}=8$) (Supplementary Table S2).

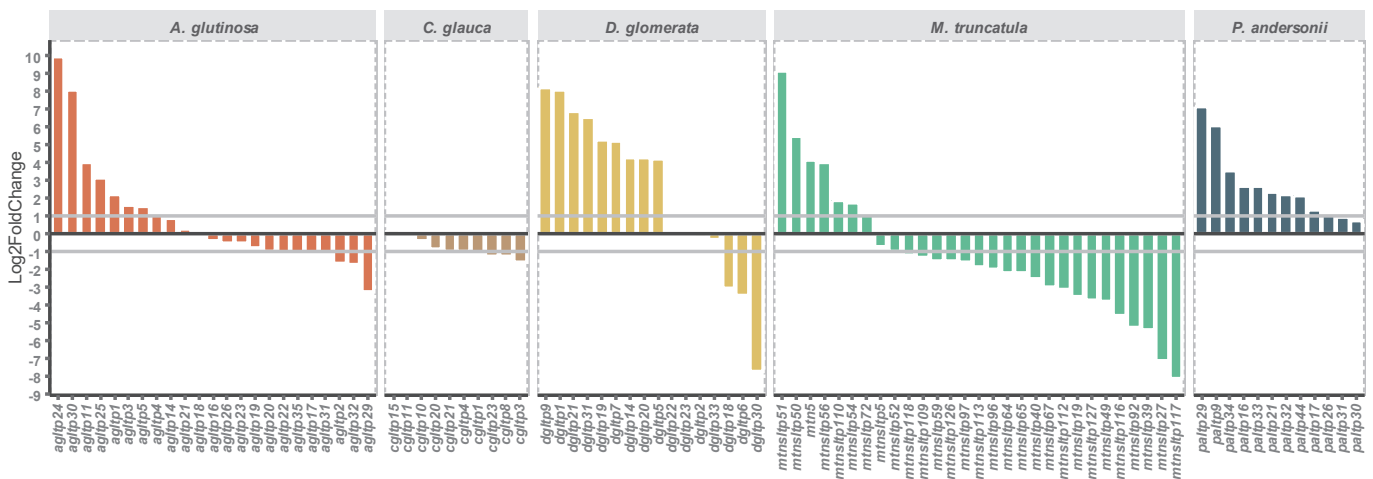


Fig.2. Gene encoding nsLTPs differential expression at nodule stage

Graphic representing the differential of the genes encoding nsLTPs at nodule stage. The x-axis indicates the gene name, y-axis level expression in $\text{Log}_2\text{FoldChange}$ (overexpressed $\text{Log}_2\text{FC}>1$ and underexpressed genes <-1). For *A. glutinosa* nsLTPs expression at nodule stage, qRT-PCR data are represented (this study). The genes expression of the four other plants were retrieved from databases (see materials and methods).

In the transcriptomes atlas of the three other nodulating plants, the expression of 67 genes encoding nsLTPs were retrieved among the 192 nsLTPs identified, 26 overexpressed and 29 underexpressed in the nodule compared to non-infected roots (Fig. 2, Supplementary Fig. S3). These include, *agltp24* (Log2FC = 9.93), *mtn5* (Log2FC=4.12) and *mtnsltp54* (Log2FC=1.76) already described as involved in nitrogen fixing symbiosis. MtnsLTP54 corresponds to MtLTP7 described by Santi et al. (Santi et al. 2020) (see material and methods section). It may be relevant to identify whether the 31 other genes overexpressed in the nodule encoding predicted nsLTPs are involved in nodulation. Indeed, in the actinorhizal plants 16 nsLTPs were promising (8 in *A. glutinosa* and 9 in *D. glomerata*) such as DgLTP9 which has a high level of expression in the nodule (Fig. 2, Supplementary Table S3) and groups in the same phylogenetic clade with AgLTP24 (Fig. 1). All genes encoding nsLTPs that are differentially expressed in *C. glauca* are under-expressed. Concerning legumes, in the nodule of *M. truncatula* 7 genes encoding nsLTPs are overexpressed including *mtnsltp51* and *mtnsltp50* which present a higher expression level in the nodule compared to *mtn5* (Fig. 2, Supplementary Fig. S3). In *P. andersonii*, 10 of the 12 genes encoding nsLTPs were overexpressed whereas no under-expressed gene was observed. About their features, mature nsLTPs coding by gene differentially expressed in the nodule had an average isoelectric point of 7.5 ranging from 4.2 (CgLTP8) to 10.6 (MtnsLTP67) (Supplementary Table S1). Concerning their type, only 35% of nsLTPs could be classified according to the existing classifications and are distributed in the types, I, II, IV, V and VIII (Table 3, Supplementary Table S3).

Evolution history was assessed using these 9 nodulating and 5 non-nodulating species belonging to Fagales, Fabales, Rosales and Cucurbitales orders and one specie as outgroup, *Arabidopsis* (Table 3). The phylogenetic analysis of nsLTPs showed that nsLTPs would have an ancient origin since nsLTPs of all plant species are present in all clades. Moreover, it was also showed that there would have been several duplication events. The nsLTPs described as involved in symbiosis in the literature and those overexpressed in the nodule are grouped in different clades and have different conserved protein motifs (Fig. 1). This would indicate that nsLTPs have evolved with ancient and recent duplication events in nodulating plants belonging to the RNF clade and that involvement of nsLTPs in symbiosis would have evolved independently by convergence of function.

DISCUSSION

The nsLTPs, classified as AMP, are present in all plant lineages and all plant tissues are involved in several biological processes such as biotic and abiotic stress and nitrogen fixing symbiosis. During symbiosis, the host and the symbiont have a mutualistic interaction therefore the plant has must refrain from inhibiting or killing its symbiont. Another AMPs family are involved in nitrogen fixing symbioses, such as the Nodule Cysteine-Rich peptides (NCR) and the defensin. NCRs are found in legumes belonging to the inverted repeat-lacking clade (IRLC) and Dalbergioids clade with a symbiont differentiated into bacteroid in nodule (Czernic et al. 2015, Montiel et al. 2017). These NCRs are AMPs with a cysteine motif close to the specific motif of defensins and neurotoxin (Mergaert et al. 2003). They are secreted specifically at nodule stage and induced bacteria terminal differentiation into large polyploid cells called bacteroids and control the strain compatibility (Guefrachi et al. 2014). In actinorhizal symbiosis, a class of closely related AMPs, the defensins, was involved in symbiosis. The defensin AgDef5 is secreted plant protein in the nodule and targets the nitrogen-fixing vesicles of the symbiont (Carro et al. 2015). It was concluded that AgDef5 permeabilized the symbiont's membranes to improve trophic exchanges between the two partners (Carro et al. 2015).

The nsLTPs family is involved in nitrogen fixing symbiosis in both rhizobia and *Frankia* associated plant species. These peptides are secreted at the early stage of symbiosis and in the nodule. In *P. vulgaris*, nsLTPs would have a putative role and possible interaction with RBOH-dependant ROS production (Fonseca-García et al. 2021). In *M. truncatula* and *A. sinicus* nsLTPs (Mtn5 and Ase246 respectively) and could regulate symbiont invasion, promote root cortex infection, membrane biosynthesis and symbiosis efficiency (Pii et al. 2009, Pii et al. 2012, Pii et al. 2013, Lei et al. 2014, Santi et al. 2017, Santi et al. 2020). In actinorhizal plants, only one nsLTPs was studied in *A. glutinosa*, (Gasser et al. 2020, submitted), AgLTP24, which was secreted from the establishment to the maintenance of the symbiosis and was localised in nodule around *Frankia's* vesicle. Purified AgLTP24 peptide inhibited nitrogen fixation above 100nM and reduced viability above 5µM (Gasser et al. 2022, submitted). Current techniques do not permit the identification of AgLTP24 concentration in the nodule, so it would be relevant to perform mass spectrometry coupled with imaging on root nodule sections to assess its relative abundance. Regarding this concentration *in planta*, it is possible that the plant secretes a high concentration to control its symbiont to restrict it in the nodule cells or

to modulate its nitrogen fixation activity. However, it was hypothesized that these inhibitory concentrations were difficult to achieve *in planta* as the symbiont in the nodule is viable and has efficient nitrogen-fixing activity. Therefore, the molecular response of *Frankia alni* ACN14a to a sub-inhibitory concentration of AgLTP24 was investigated.

***Frankia alni* ACN14a response to AgLTP24**

AgLTP24 at a subinhibitory concentration had no impact on the physiology of *F. alni* ACN14a under N-replete condition, indeed, no significant modulations of nitrogen fixation, respiration or growth activity were detected as shown previously (Gasser et al. 2022, submitted). Transcriptomic analysis of *Frankia* under N-replete condition supplemented with subinhibitory concentrations of AgLTP24 compared to N-replete without nsLTP addition indicated that the bacterium cope with a stress to ensure its survival by maintaining nitrogen fixation, growth and respiration and that it was preparing for symbiosis. (Table 1). Several stress related genes coding for chaperones were overexpressed, as well as genes coding for transporters (Liu et al. 2016, Zhao et al. 2016). These genes involved in stress response were also overexpressed at an early stage of symbiosis when the bacterium is in indirect contact with the plant (Pujic et al. 2019). Genes encoding nitrogenase and proteins involved in respiration and the TCA cycle were overexpressed when *Frankia* was in contact with AgLTP24. In addition, *Frankia* overexpressed several genes encoding transporters that could contribute to stress response by maintaining homeostasis. We could make the hypothesis that *Frankia* in contact with AgLTP24 at subinhibitory concentrations underwent a stress. To overcome this, *Frankia* could establish resistance systems to fight against the effects of AMPs. Indeed, some overexpressed genes encoded ABC transporters that could be a mechanism of resistance to nsLTPs are overexpressed. An ABC transporter, BacA, allows *Sinorhizobium meliloti* to cope with the toxicity of NCR peptides secreted by *M. truncatula*, and is essential for the survival of the symbiont in the nodule. (Haag et al. 2011, Barrière et al. 2017). Two genes encoding peptide possibly involved in succinoglycan synthesis were overexpressed by *Frankia*. Succinoglycan in rhizobia has been shown to allow resistance to NCRs (Arnold et al. 2018). It would be relevant to determine the role of these transporters and succinoglycan in peptide resistance in *Frankia* using molecular approach. *Frankia* stable transformations protocols have been proposed a few years ago (Gifford et al. 2019, Pesce et al. 2019) which could open the

perspectives for the development of tools for genetic manipulation of *Frankia*. Furthermore, as it was described that sub-inhibitory concentration of AMP can act at membrane or intracellular level (Vasilchenko et al. 2019), it would be relevant to identify whether this response is induced following the interaction of AgLTP24 with *Frankia* membranes or intracellular target molecules.

nsLTPs: Implication during nodulation and evolution history in symbiosis

Beyond the control of the symbiont, the regulation of bacterial entry into plant tissues, and the formation of infection thread, nsLTPs could also be involved in the modulation of symbiont gene expression as demonstrated in this study. This raises a perspective on other functions in symbiosis. While this family is abundant in plants, their involvement in symbiosis is still underestimated. Few analyses were performed to investigate their distribution in nodulating plants of the RNF clade (Fonseca-García et al. 2021) especially in actinorhizal plants. Therefore, a study of the distribution and evolutionary history of nsLTPs among nodulating and non-nodulating plant species belonging to RNF clade were made and provide insights into the involvement of nsLTPs in nitrogen fixing symbioses.

First, 705 putative nsLTPs were identified in 14 plants proteomes of the RNF clade and one Brassicales proteome. These data allowed us to do a phylogenetic analysis which showed that nsLTPs had an evolutionary history marked by both ancient but also recent duplications in species and groups of species (Fig.2). This conclusion is consistent with Edstam's findings which showed that nsLTPs had an ancient origin and would have emerged in the first land plants since no nsLTPs in their dataset were identified in algae (Edstam et al. 2011). However, a recent study found a nsLTP in a green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*, thus nsLTPs could have emerged in the common ancestor of green plants (Fonseca-García et al. 2021). This study also shows that in the proteomes studied there is a high percentage of nsLTPs not corresponding to any type proposed by Boutrot et al. but grouped phylogenetically in the same clade with close conserved protein motifs. As there is no official classification for these peptides, it would be relevant to complete or establish an alternate classification using nsLTPs from plants covering the whole plant kingdom and improving the identification of these peptides in proteomes.

Gene expression analysis in nodule of five nodulating plant belonging to the RNF clade showed that 34 genes encoding nsLTPs were overexpressed in nodule compared to non-infected roots. Among them, three genes overexpressed in nodule encoding nsLTPs, *mtn5*, *mtnsLTP54* and *agLTP24* which had previously shown an important role in symbiosis were retrieved these data (Pii et al. 2009, Santi et al. 2020). Concerning legumes, MtN5 was the first nsLTP studied in *M. truncatula*, then two other nsLTPs close to MtN5 in terms of protein sequence and cysteine motif organization (Pii et al. 2013) were studied (MtLTP3 and MtLTP7) (Santi et al. 2020). This approach permits to identify five other genes that could be involved in symbiosis, two of them with a differential expression in the nodule higher to *mtn5*. In *P. andersonii*, no study has yet been made of the nsLTPs involved in symbiosis, but 9 identified nsLTPs could play a role. Concerning actinorhizal plants, in *A. glutinosa*, in addition to *agLTP24*, five additional genes encoding nsLTPs are overexpressed during nodulation (*agLtp30*, *agLtp29*, *agLtp4*, *agLtp1* and *agLtp3*). It would be wise to explore AgLTP30 in more details as it has a high overexpression at nodule stage such as the gene encoding AgLTP24. In actinorhizal plants, 8 DgLTPs are overexpressed in *D. glomerata* nodule which have never been described notably DgLTP9 which had a high level of expression in the nodule and group in the same phylogenetic clade as AgLTP24 (Fig. 2). This *in silico* analysis allowed the identification of nsLTPs that would be pertinent to study to determine their possible role in symbiosis. Complementary transcriptomic and peptidomic approaches would be relevant to deepen the identification of nsLTPs produced in the nodule and to determine if these peptides undergo post-translational modification.

AMPs are generally described as cationic proteins capable of interacting with negatively charged membranes. In *M. truncatula*, cationic and anionic NCRs were found to be important for symbiosis (Montiel et al. 2017). In these data similarly overexpressed genes in nodules encode both cationic and anionic nsLTPs. Furthermore, among nsLTPs already described in the symbiosis, MtN5 is cationic (mature peptide IP: 8.88) and MtnsLTP54 (MtLTP7) is anionic (mature peptide IP: 4.36).

It appears that genes encoding nsLTPs involved in symbiosis are expressed at early stage and in nodule (Pii et al. 2009, Santi et al. 2020) (Gasser et al 2022, submitted), it could be relevant to check expression profiles at different stages of symbiosis. However, nsLTPs are also involved cutin and wax formation, seed development and germination, membrane

development, signalling, nodulation and plant's innate response (Edqvist et al. 2018). During symbiosis, some defence genes are activated (Gourion et al. 2015), so it is possible that some identified nsLTPs do not directly influence symbiosis but they may be part of plant defences or have a dual function. It was assumed that MtN5 had a dual function by participating in the symbiotic interaction and also in the host defence against pathogens. Indeed, *mtn5* is overexpressed in the root-pathogen interaction and has antimicrobial activity *in vitro*. (Pii et al. 2009).

Regarding the evolutionary history of nsLTPs in the RNF symbiosis, it seems that the involvement of nsLTP in symbiosis may have evolved independently by convergence of function in nodulating plants. Indeed, nsLTPs described as being involved in symbiosis (MtN5, MtNsLTP54 and AgLTP24) as well as the nsLTPs overexpressed in the nodule are distributed in all the phylogenetic clades and present different conserved protein motifs. To confirm the convergence of function it would be necessary to identify if nsLTPs have the same function in nitrogen fixing symbiosis in nodulating plants. The NCRs secreted by legumes have a distribution and complexity that correlates with bacteroid shapes (Montiel et al. 2017) and NCRs secreted by plant belonging to IRLC and Dalbergioids clade do not share the same feature (Alunni et al. 2016). Thus, it was hypothesized that these NCRs had specialized in each plant lineage during evolution. More broadly, concerning the evolutionary history of nitrogen-fixing symbioses, two hypotheses have been proposed, one with an evolutionary model based on several independent acquisitions (Werner et al. 2014) of this function in nodulating plants and another based on a single gain of function in a common ancestor followed by a multiple loss. Recently, strong arguments have been published supporting the second hypothesis however it could be possible that some function has evolved through function convergence (Griesmann et al. 2018). Thus, for AMPs, studies so far have tended to converge in function while the origin of the symbiosis appears to come from a common ancestor followed by multiple loss of this capacity in RNF clade. It would be relevant to deepen research on AMPs involved in nitrogen fixing symbiosis to shed light on the evolutionary history of these AMP in nodulating plant belonging to the RNF clade and their role in reciprocal host symbiont interactions.

MATERIALS AND METHODS

nsLTPs identification and characterisation

nsLTPs detection was performed using 15 plant proteomes: *Datisca glomerata*, *Chamaecrista fasciculata*, *Nissolia schottii*, *Alnus glutinosa*, *Casuarina glauca*, *Discaria trinervis*, *Dryas drummondii* (Griesmann et al. 2018), *Cucumis sativus* PI18396 (Qi et al. 2013), *Lupinus albus* (Hufnagel et al. 2020), *Medicago truncatula* (Pecrix et al. 2018), *Parasponia andersonii* (Van Velzen et al. 2018), *Arabidopsis thaliana* (Lamesch et al. 2011), *Juglans regia* (Martínez-García et al. 2016), *Pyrus communis* (Chagné et al. 2014) and *Quercus lobata*. A wrapper script, nsLTPFinder (Supplementary Fig. S2), was used to identify putative nsLTPs peptides in plant proteomes. First, a HMMSEARCH from the HMMER v3.3 package was performed using the Hidden Markov Model (HMM) profile of Probable lipid transfer (PF14368.6), Hydrophobic seed protein (PF14547.6) and Protease inhibitor/seed storage/LTP family (PF00234.22) (<http://pfam.xfam.org/>). Searches were performed using an e-value threshold of 10 for full and domain hits. The conserved 8 cysteines motif (8CM) "C.(6,15)C.(6,80)CC.(8,29)C.C.(8,37)C.(4,25)C" was also searched in proteomes using regular expressions. Signal sequences were searched using SignalP 5.0 (Almagro Armenteros et al. 2019) (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Isoelectric point, molecular weight, and grand average hydropathy (GRAVY) were retrieved for peptides and mature peptides which correspond to the peptide without its signal sequence with the ExPasy ProtParam tool (<https://web.expasy.org/protparam/>) (Gasteiger et al. 2005). Proteins identified by regular expression search and HMMSEARCH with an identified signal peptide and containing 8 cysteines in the mature sequence were extracted as "top candidates" and proteins identified only with a signal peptide, 8 cysteines in the mature sequence were extracted as low confidence candidates but not through HMMSEARCH. Conserved motifs were predicted using the MEME (Bailey et al. 1994) suite on the top and low confidence mature peptides for each species and on all top and low confidence for all species. The 8CM was manually checked in the mature peptide's amino acid sequences for top and low confidence candidates. The identified nsLTPs were grouped according to the classification proposed by Boutrot et al. (Boutrot et al. 2008) and completed with the type XI proposed by Li et al (Li et al. 2014).

Phylogenetic analyse and sequence alignment

Multiple sequence alignments of nsLTPs CDS sequences were performed using MAFFT v7.487 with local pairwise and alignments were cleaned using TrimAl 1.4.1 (Capella-Gutiérrez et al. 2009) to remove positions with more than 50% of gaps. Maximum-likelihood phylogenetic tree was reconstructed using Iqtree2 2.1.4_beta (Minh et al. 2020) with the GTR+F+R9 model with 10000 replicates of Ultrafast Bootstrap. The tree was visualized with iTOL 6.3.2 platform (Letunic et al. 2021). Maximum-likelihood phylogenetic tree reconstructed with iqtree with bootstraps values is available in Supplementary Fig. S3.

Strain and plant growth condition

Frankia alni strain ACN14a (Normand et al. 1982) was grown at 28°C with 200 rpm stirring in FBM medium with 5mM ammonium as described earlier (Hay et al. 2020) to the exponential phase. The cells were then harvested, sedimented by centrifugation (5000 x g, 10min), washed twice with corresponding NH₄⁺-free FBM medium. Plant growth, inoculation and nodule harvesting were done as described earlier (Carro et al. 2016b).

Molecular response of *F. alni* ACN14a in contact with AgLTP24 through RNAseq

AgLTP24 was produced and purified as described earlier (Gasser et al 2022, submitted). Three independent cultures of *F. alni* ACN14a were made in 240ml of FBM- liquid medium (N-replete condition) supplemented or not with 1nM of AgLTP24 and grown for 7 days at 28°C. The pellets were collected by centrifugation at 5100 x g. Then, mRNA were extracted and converted into cDNA as described previously (Lurthy et al. 2018). Ribosomal RNAs were depleted using Truseq stranded total RNA (Illumina) and the cDNA were sequenced using Novaseq6000 (Illumina at the MGX, Montpellier, France). Bioinformatic and statistic treatments were made by the MGX platform. The sequences were aligned on the *F. alni* strain ACN14a genome using the BWA 0.7.17-r1188 software. Statistical analyses were made using DESeq2 1.26.0. with R 3.6.1.

Bioassays were conducted by growing *F. alni* strain ACN14a in FBM- and incubating it for 7 days at 28°C, 3 replicates per conditions were performed as described previously (Gasser et al. 2022, submitted). *Frankia's* nitrogen fixation activity (or ARA), respiration (IRA) and growth (OD_{600nm}) were tested as described in previous work (Gasser et al. 2022, submitted). Statistical

analyses were computed using RStudio 4.1.2. Normality of the distribution was tested with a Shapiro-Wilk normality test, variances homogeneity was tested with a Fisher's test. Means comparison were performed with a Student's *t*-test. Graphics were made using GraphPad Prism 9.2.0 (GraphPad software Inc; San Diego, CA, USA).

nsLTPs differential expression at nodule stage

To investigate differential expressions of genes encoding nsLTPs in the nodule, transcriptomic data from five nodulating plants were recovered. For *M. truncatula*, expression data were obtained after 14 days post-inoculation (dpi) with *Sinorhizobium meliloti* 1021 (de Bang et al. 2017) via the MtSSBPdb platform (Boschiero et al. 2020). Gene annotation correspondence was done using the LeGOO database (Carrère et al. 2019). Concerning *P. andersonii* expression data were obtained at stage 3 (corresponding to functional nodule) after inoculation with *Mesorhizobium plurifarium* BOR2 (Van Velzen et al. 2018). Differential expressions of *D. glomerata* were obtained after 24 dpi with nodule crush (Battenberg et al. 2018). For *C. glauca* the expression data had been obtained on 21 dpi nodule with *Frankia casuarinae* Cci3 (Hocher et al. 2006) using SESAM database (Ngom et al. 2020).

nsLTPs of *A. glutinosa* (AgLTPs) genes expression in nodule (21 dpi) infected with *F. alni* ACN14a were analysed using EST (Expressed Sequence Tag) database and microarray analysis, which are available on the Gene Expression Omnibus database (www.ncbi.nlm.nih.gov/geo; accession number GSE24153). Correspondence between EST and *A. glutinosa* gene name (Griesmann et al. 2018) was determined with a BLAST. Differential expression of genes encoding AgLTPs was determined using the microarray dataset with a *p*-value threshold of 0.05. Briefly, Student's *t*-test was applied to compare nodules versus non-inoculated roots and average Fold Changes (FC) were calculated. To complement and confirm these microarray data, reverse transcription (RT) and quantitative real-time PCR (qRT-PCR) using nodules from 3 plant biological replicates obtained after infection with *F. alni* ACN14a (21 dpi) were performed. The results obtained were compared to uninfected roots as a reference. RT was performed using 5 µg of total mRNA using Transcriptor Reverse Transcriptase and oligo (dT)₁₅ primer (Roche, Mannheim, Germany). qRT-PCR was run on BioRad QX 100 using iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-rad) under the following conditions: 95°C for 5min; 44 cycles of 95°C for 20s, 60°C for 20s 72°C for 15s. Primer sets were designed using Primer3Plus software

and can be found in Supporting Information (Supplementary Table S4). Expression values were normalised using the expression level of the *Ag-ubi* gene that encodes ubiquitin (Hocher et al. 2011b).

ACKNOWLEDGEMENTS

Thanks are expressed to Danis Abrouk and the Ibio platform (Université Lyon1) and Elise Lacroix and the Greenhouse facility (Université Lyon1). We thank Benoit Alunni (CNRS, Gif), Ricardo Rodriguez De La Vega (Université Paris-Saclay) and Valérie Hocher (IRD, Montpellier) for technical advice. This project has been funded by the FR BioEnviS (Biodiversité, Environnement et Santé, Université Lyon1, France) and the EC2CO (Ecosphère Continentale et Côtière) grant (reference: 10459).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

H.B, J.K, M.G initiated this work. M.G performed peptide production and purification, P.F perform physiological assay and RNA extraction. H.B., M.G, P.P and P.N analyzed RNAseq data. J.K created Phyton nsLTPFinder wrapper. J.K and M.G performed the bioinformatic analysis. M.G and H.B wrote the manuscript.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no competing interests.

SUPPLEMENTAL DATA

Les figures supplémentaires sont disponibles en Annexes.

Fig. S1. Kinetics assay of *Frankia alni* ACN14a after supplementation of 1nM of AgLTP24

Fig. S2. Schematic representation of nsLTPFinder workflow

Fig. S3. Unrooted maximum-likelihood phylogenetic tree with bootstrap values

Tableaux supplémentaires

Table S1: Characteristics of all nsLTPs predicted - nsLTPFinder results

Table S2: Differential expression of gene encoding nsLTPs in *A. glutinosa* nodule using qRT-PCR and EST data

Table S3: Differential expression of gene encoding nsLTPs up and down regulated in nodules of five nodulating plant

Table S4: qRT-PCR primers

BIBLIOGRAPHY

Almagro Armenteros, J. J., K. D. Tsirigos, C. K. Sønderby, T. N. Petersen, O. Winther, S. Brunak, G. von Heijne and H. Nielsen (2019). "SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks." *Nature Biotechnology* **37**(4): 420-423.

Alskog, G. and K. Huss-Danell (1997). "Superoxide dismutase, catalase and nitrogenase activities of symbiotic *Frankia* (*Alnus incana*) in response to different oxygen tensions." *Physiologia Plantarum* **99**(2): 286-292.

Alunni, B. and B. Gourion (2016). "Terminal bacteroid differentiation in the legume–rhizobium symbiosis: nodule-specific cysteine-rich peptides and beyond." *New Phytologist* **211**(2): 411-417.

Arnold, M. F. F., J. Penterman, M. Shabab, E. J. Chen, G. C. Walker and Y. V. Brun (2018). "Important Late-Stage Symbiotic Role of the *Sinorhizobium meliloti* Exopolysaccharide Succinoglycan." *Journal of Bacteriology* **200**(13): e00665-00617.

Bailey, T. L. and C. Elkan (1994). "Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers." *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol* **2**: 28-36.

Barrière, Q., I. Guefrachi, D. Gully, F. Lamouche, O. Pierre, J. Fardoux, C. Chaintreuil, B. Alunni, T. Timchenko, E. Giraud and P. Mergaert (2017). "Integrated roles of BclA and DD-carboxypeptidase 1 in *Bradyrhizobium* differentiation within NCR-producing and NCR-lacking root nodules." *Scientific Reports* **7**(1): 9063.

Battenberg, K., D. Potter, C. A. Tabuloc, J. C. Chiu and A. M. Berry (2018). "Comparative Transcriptomic Analysis of Two Actinorhizal Plants and the Legume *Medicago truncatula* Supports the Homology of Root Nodule Symbioses and Is Congruent With a Two-Step Process of Evolution in the Nitrogen-Fixing Clade of Angiosperms." *Frontiers in Plant Science* **9**(1256).

Berry, A. M., O. T. Harriott, R. A. Moreau, S. F. Osman, D. R. Benson and A. D. Jones (1993). "Hopanoid lipids compose the *Frankia* vesicle envelope, presumptive barrier of oxygen diffusion to nitrogenase." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**(13): 6091-6094.

Berry, A. M., A. Mendoza-Herrera, Y.-Y. Guo, J. Hayashi, T. Persson, R. Barabote, K. Demchenko, S. Zhang and K. Pawlowski (2011). "New perspectives on nodule nitrogen assimilation in actinorhizal symbioses." *Functional Plant Biology* **38**(9): 645-652.

Berry, A. M. and J. G. Torrey (1983). "Root hair deformation in the infection process of *Alnus rubra*." *Canadian Journal of Botany* **61**(11): 2863-2876.

Boschiero, C., X. Dai, P. K. Lundquist, S. Roy, T. Christian de Bang, S. Zhang, Z. Zhuang, I. Torres-Jerez, M. K. Udvardi, W.-R. Scheible and P. X. Zhao (2020). "MtSSPdb: The *Medicago truncatula* Small Secreted Peptide Database." Plant Physiology **183**(1): 399-413.

Boutrot, F., N. Chantret and M.-F. Gautier (2008). "Genome-wide analysis of the rice and arabidopsis non-specific lipid transfer protein (nsLtp) gene families and identification of wheat nsLtp genes by EST data mining." BMC Genomics **9**(1): 86.

Capella-Gutiérrez, S., J. M. Silla-Martínez and T. Gabaldón (2009). "trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses." Bioinformatics **25**(15): 1972-1973.

Carrère, S., M. Verdenaud, C. Gough, J. Gouzy and P. Gamas (2019). "LeGOO: An Expertized Knowledge Database for the Model Legume *Medicago truncatula*." Plant and Cell Physiology **61**(1): 203-211.

Carro, L., P. Pujic, N. Alloisio, P. Fournier, H. Boubakri, A. E. Hay, F. Poly, P. Francois, V. Hocher, P. Mergaert, S. Balmand, M. Rey, A. Heddi and P. Normand (2015). "Alnus peptides modify membrane porosity and induce the release of nitrogen-rich metabolites from nitrogen-fixing *Frankia*." ISME J **9**(8): 1723-1733.

Carro, L., P. Pujic, N. Alloisio, P. Fournier, H. Boubakri, F. Poly, M. Rey, A. Heddi and P. Normand (2016). "Physiological effects of major up-regulated *Alnus glutinosa* peptides on *Frankia* sp. ACN14a." Microbiology (Reading) **162**(7): 1173-1184.

Chagné, D., R. N. Crowhurst, M. Pindo, A. Thrimawithana, C. Deng, H. Ireland, M. Fiers, H. Dzierzon, A. Cestaro, P. Fontana, L. Bianco, A. Lu, R. Storey, M. Knäbel, M. Saeed, S. Montanari, Y. K. Kim, D. Nicolini, S. Larger, E. Stefani, A. C. Allan, J. Bowen, I. Harvey, J. Johnston, M. Malnoy, M. Troglio, L. Perchepied, G. Sawyer, C. Wiedow, K. Won, R. Viola, R. P. Hellens, L. Brewer, V. G. M. Bus, R. J. Schaffer, S. E. Gardiner and R. Velasco (2014). "The Draft Genome Sequence of European Pear (*Pyrus communis* L. 'Bartlett')." PLOS ONE **9**(4): e92644.

Ciccarelli, F. D., T. Doerks, C. von Mering, C. J. Creevey, B. Snel and P. Bork (2006). "Toward automatic reconstruction of a highly resolved tree of life." Science **311**(5765): 1283-1287.

Czernic, P., D. Gully, F. Cartieaux, L. Moulin, I. Guefrachi, D. Patrel, O. Pierre, J. Fardoux, C. Chaintreuil, P. Nguyen, F. Gressent, C. Da Silva, J. Poulain, P. Wincker, V. Rofidal, S. Hem, Q. Barrière, J.-F. Arrighi, P. Mergaert and E. Giraud (2015). "Convergent Evolution of Endosymbiont Differentiation in Dalbergioid and Inverted Repeat-Lacking Clade Legumes Mediated by Nodule-Specific Cysteine-Rich Peptides." Plant Physiology **169**(2): 1254-1265.

de Bang, T. C., P. K. Lundquist, X. Dai, C. Boschiero, Z. Zhuang, P. Pant, I. Torres-Jerez, S. Roy, J. Nogales, V. Veerappan, R. Dickstein, M. K. Udvardi, P. X. Zhao and W. R. Scheible (2017). "Genome-Wide Identification of *Medicago* Peptides Involved in Macronutrient Responses and Nodulation." Plant Physiol **175**(4): 1669-1689.

Dingler, C. and J. Oelze (1985). "Reversible and irreversible inactivation of cellular nitrogenase upon oxygen stress in *Azotobacter vinelandii* growing in oxygen controlled continuous culture." Arch Microbiol **141**(1): 80-84.

Edqvist, J., K. Blomqvist, J. Nieuwland and T. A. Salminen (2018). "Plant lipid transfer proteins: are we finally closing in on the roles of these enigmatic proteins?" Journal of lipid research **59**(8): 1374-1382.

Edstam, M. M., L. Viitanen, T. A. Salminen and J. Edqvist (2011). "Evolutionary History of the Non-Specific Lipid Transfer Proteins." Molecular Plant **4**(6): 947-964.

Fonseca-García, C., J. Solis-Miranda, R. Pacheco and C. Quinto (2021). "Non-specific Lipid Transfer Proteins in Legumes and Their Participation During Root-Nodule Symbiosis." Frontiers in Agronomy **3**(18).

Gasteiger, E., C. Hoogland, A. Gattiker, S. e. Duvaud, M. R. Wilkins, R. D. Appel and A. Bairoch (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. The Proteomics Protocols Handbook. J. M. Walker. Totowa, NJ, Humana Press: 571-607.

Gifford, I., S. Vance, G. Nguyen and A. M. Berry (2019). "A Stable Genetic Transformation System and Implications of the Type IV Restriction System in the Nitrogen-Fixing Plant Endosymbiont Frankia alni ACN14a." Frontiers in Microbiology **10**.

Gourion, B., F. Berrabah, P. Ratet and G. Stacey (2015). "Rhizobium–legume symbioses: the crucial role of plant immunity." Trends in Plant Science **20**(3): 186-194.

Griesmann, M., Y. Chang, X. Liu, Y. Song, G. Haberer, M. B. Crook, B. Billault-Penneteau, D. Lauressergues, J. Keller, L. Imanishi, Y. P. Roswanjaya, W. Kohlen, P. Pujic, K. Battenberg, N. Alloisio, Y. Liang, H. Hilhorst, M. G. Salgado, V. Hocher, H. Gherbi, S. Svistoonoff, J. J. Doyle, S. He, Y. Xu, S. Xu, J. Qu, Q. Gao, X. Fang, Y. Fu, P. Normand, A. M. Berry, L. G. Wall, J.-M. Ané, K. Pawlowski, X. Xu, H. Yang, M. Spannagl, K. F. X. Mayer, G. K.-S. Wong, M. Parniske, P.-M. Delaux and S. Cheng (2018). "Phylogenomics reveals multiple losses of nitrogen-fixing root nodule symbiosis." Science **361**(6398): eaat1743.

Guefrachi, I., M. Nagymihaly, C. I. Pislariu, W. Van de Velde, P. Ratet, M. Mars, M. K. Udvardi, E. Kondorosi, P. Mergaert and B. Alunni (2014). "Extreme specificity of NCR gene expression in *Medicago truncatula*." BMC Genomics **15**(1): 712.

Haag, A. F., M. Baloban, M. Sani, B. Kerscher, O. Pierre, A. Farkas, R. Longhi, E. Boncompagni, D. Hérouart, S. Dall'Angelo, E. Kondorosi, M. Zanda, P. Mergaert and G. P. Ferguson (2011). "Protection of *Sinorhizobium* against Host Cysteine-Rich Antimicrobial Peptides Is Critical for Symbiosis." PLoS Biology **9**(10): e1001169.

Hay, A.-E., A. Herrera-Belaroussi, M. Rey, P. Fournier, P. Normand and H. Boubakri (2020). "Feedback Regulation of N Fixation in Frankia-Alnus Symbiosis Through Amino Acids Profiling in Field and Greenhouse Nodules." Molecular Plant-Microbe Interactions[®] **33**(3): 499-508.

Hocher, V., N. Alloisio, F. Auguy, P. Fournier, P. Dumas, P. Pujic, H. Gherbi, C. Queiroux, C. Da Silva, P. Wincker, P. Normand and D. Bogusz (2011). "Transcriptomics of actinorhizal symbioses reveals homologs of the whole common symbiotic signaling cascade." Plant physiology **156**(2): 700-711.

Hocher, V., N. Alloisio, F. Auguy, P. Fournier, P. Doumas, P. Pujic, H. Gherbi, C. Queiroux, C. Da Silva, P. Wincker, P. Normand and D. Bogusz (2011). "Transcriptomics of actinorhizal symbioses reveals homologs of the whole common symbiotic signaling cascade." Plant Physiol **156**: 1-12.

Hocher, V., F. Auguy, X. Argout, L. Laplaze, C. Franche and D. Bogusz (2006). "Expressed sequence-tag analysis in *Casuarina glauca* actinorhizal nodule and root." New Phytologist **169**(4): 681-688.

Hufnagel, B., A. Marques, A. Soriano, L. Marquès, F. Divol, P. Doumas, E. Sallet, D. Mancinotti, S. Carrere, W. Marande, S. Arribat, J. Keller, C. Huneau, T. Blein, D. Aimé, M. Laguerre, J. Taylor, V. Schubert, M. Nelson, F. Geu-Flores, M. Crespi, K. Gallardo, P.-M. Delaux, J. Salse, H. Bergès, R. Guyot, J. Gouzy and B. Péret (2020). "High-quality genome sequence of white lupin provides insight into soil exploration and seed quality." Nature Communications **11**(1): 492.

Lamesch, P., T. Z. Berardini, D. Li, D. Swarbreck, C. Wilks, R. Sasidharan, R. Muller, K. Dreher, D. L. Alexander, M. Garcia-Hernandez, A. S. Karthikeyan, C. H. Lee, W. D. Nelson, L. Ploetz, S. Singh, A. Wensel and E. Huala (2011). "The Arabidopsis Information Resource (TAIR): improved gene annotation and new tools." Nucleic Acids Research **40**(D1): D1202-D1210.

Lei, L., L. Chen, X. Shi, Y. Li, J. Wang, D. Chen, F. Xie and Y. Li (2014). "A Nodule-Specific Lipid Transfer Protein AsE246 Participates in Transport of Plant-Synthesized Lipids to Symbiosome Membrane and Is Essential for Nodule Organogenesis in Chinese Milk Vetch." Plant Physiology **164**(2): 1045-1058.

Li, J., G. Gao, K. Xu, B. Chen, G. Yan, F. Li, J. Qiao, T. Zhang and X. Wu (2014). "Genome-Wide Survey and Expression Analysis of the Putative Non-Specific Lipid Transfer Proteins in *Brassica rapa* L." PLOS ONE **9**(1): e84556.

Lindorff-Larsen, K. and J. R. Winther (2001). "Surprisingly high stability of barley lipid transfer protein, LTP1, towards denaturant, heat and proteases." FEBS Letters **488**(3): 145-148.

Liu, X., M. Sun, Y. Cheng, R. Yang, Y. Wen, Z. Chen and J. Li (2016). "OxyR is a key regulator in response to oxidative stress in *Streptomyces avermitilis*." Microbiology **162**(4): 707-716.

Lurthy, T., N. Alloisio, P. Fournier, S. Anchisi, P. Normand, P. Pujic and H. Boubakri (2018). "Molecular response to nitrogen starvation by *Frankia alni* ACN14a revealed by transcriptomics and functional analysis with a fosmid library in *Escherichia coli*." Research in Microbiology

Martínez-García, P. J., M. W. Crepeau, D. Puiu, D. Gonzalez-Ibeas, J. Whalen, K. A. Stevens, R. Paul, T. S. Butterfield, M. T. Britton, R. L. Reagan, S. Chakraborty, S. L. Walawage, H. A. Vasquez-Gross, C. Cardeno, R. A. Famula, K. Pratt, S. Kuruganti, M. K. Aradhya, C. A. Leslie, A. M. Dandekar, S. L. Salzberg, J. L. Wegrzyn, C. H. Langley and D. B. Neale (2016). "The walnut (*Juglans regia*) genome sequence reveals diversity in genes coding for the biosynthesis of non-structural polyphenols." The Plant Journal **87**(5): 507-532.

Mergaert, P., K. Nikovics, Z. Kelemen, N. Maunoury, D. Vaubert, A. Kondorosi and E. Kondorosi (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 physiology **132**(1): 161-173.

Minh, B. Q., H. A. Schmidt, O. Chernomor, D. Schrepf, M. D. Woodhams, A. von Haeseler and R. Lanfear (2020). "IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era." *Molecular Biology and Evolution* **37**(5): 1530-1534.

Montiel, J., J. A. Downie, A. Farkas, P. Bihari, R. Herczeg, B. Bálint, P. Mergaert, A. Kereszt and É. Kondorosi (2017). "Morphotype of bacteroids in different legumes correlates with the number and type of symbiotic NCR peptides." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **114**(19): 5041-5046.

Ngom, M., M. Cissoko, K. Gray, V. Hoher, L. Laplaze, M. O. Sy, S. Svistoonoff and A. Champion (2020). Establishment of Actinorhizal Symbiosis in Response to Ethylene, Salicylic Acid, and Jasmonate. *Jasmonate in Plant Biology: Methods and Protocols*. A. Champion and L. Laplaze. New York, NY, Springer US: 117-130.

Normand, P. and M. P. Fernandez (2019). *Frankia*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*: 1-19.

Normand, P. and M. Lalonde (1982). "Evaluation of *Frankia* strains isolated from provenances of two *Alnus* species." *Can J Microbiol* **28**: 1133-1142.

Pecrix, Y., S. E. Staton, E. Sallet, C. Lelandais-Brière, S. Moreau, S. Carrère, T. Blein, M.-F. Jardinaud, D. Latrasse, M. Zouine, M. Zahm, J. Kreplak, B. Mayjonade, C. Satgé, M. Perez, S. Cauet, W. Marande, C. Chantry-Darmon, C. Lopez-Roques, O. Bouchez, A. Bérard, F. Debellé, S. Muños, A. Bendahmane, H. Bergès, A. Niebel, J. Buitink, F. Frugier, M. Benhamed, M. Crespi, J. Gouzy and P. Gamas (2018). "Whole-genome landscape of *Medicago truncatula* symbiotic genes." *Nature Plants* **4**(12): 1017-1025.

Pesce, C., R. Oshone, S. G. Hurst, V. A. Kleiner and L. S. Tisa (2019). "Stable Transformation of the Actinobacteria *Frankia* spp." *Applied and Environmental Microbiology* **85**(15): e00957-00919.

Pii, Y., A. Astegno, E. Peroni, M. Zaccardelli, T. Pandolfini and M. Crimi (2009). "The *Medicago truncatula* N5 Gene Encoding a Root-Specific Lipid Transfer Protein Is Required for the Symbiotic Interaction with *Sinorhizobium meliloti*." *Molecular Plant-Microbe Interactions*® **22**(12): 1577-1587.

Pii, Y., B. Molesini, S. Masiero and T. Pandolfini (2012). "The non-specific lipid transfer protein N5 of *Medicago truncatula* implicated in epidermal stages of rhizobium-host interaction." *BMC Plant Biology* **12**(1): 233.

Pii, Y., B. Molesini and T. Pandolfini (2013). "The involvement of *Medicago truncatula* non-specific lipid transfer protein N5 in the control of rhizobial infection." *Plant Signaling & Behavior* **8**(7): e24836.

Pujic, P., N. Alloisio, P. Fournier, D. Roche, H. Sghaier, G. Miotello, J. Armengaud, A. M. Berry and P. Normand (2019). "Omics of the early molecular dialogue between *Frankia alni* and *Alnus glutinosa* and the cellulase synton." *Environmental Microbiology* **21**(9): 3328-3345.

Qi, J., X. Liu, D. Shen, H. Miao, B. Xie, X. Li, P. Zeng, S. Wang, Y. Shang, X. Gu, Y. Du, Y. Li, T. Lin, J. Yuan, X. Yang, J. Chen, H. Chen, X. Xiong, K. Huang, Z. Fei, L. Mao, L. Tian, T. Städler, S. S. Renner, S. Kamoun,

W. J. Lucas, Z. Zhang and S. Huang (2013). "A genomic variation map provides insights into the genetic basis of cucumber domestication and diversity." Nature Genetics **45**(12): 1510-1515.

Santi, C., B. Molesini, F. Guzzo, Y. Pij, N. Vitulo and T. Pandolfini (2017). "Genome-Wide Transcriptional Changes and Lipid Profile Modifications Induced by *Medicago truncatula* N5 Overexpression at an Early Stage of the Symbiotic Interaction with *Sinorhizobium meliloti*." Genes **8**(12): 396.

Santi, C., B. Molesini and T. Pandolfini (2020). Which role for *Medicago truncatula* non-specific lipid transfer proteins in rhizobial infection? The Model Legume *Medicago truncatula*: 637-644.

Santos-Silva, C. A. d., L. Zupin, M. Oliveira-Lima, L. M. B. Vilela, J. P. Bezerra-Neto, J. R. Ferreira-Neto, J. D. C. Ferreira, R. L. d. Oliveira-Silva, C. d. J. Pires, F. F. Aburjaile, M. F. d. Oliveira, E. A. Kido, S. Crovella and A. M. Benko-Iseppon (2020). "Plant Antimicrobial Peptides: State of the Art, In Silico Prediction and Perspectives in the Omics Era." Bioinformatics and Biology Insights **14**: 1177932220952739.

Svistoonoff, S., V. Hocher and H. Gherbi (2014). "Actinorhizal root nodule symbioses: what is signalling telling on the origins of nodulation?" Current Opinion in Plant Biology **20**: 11-18.

Touati, D. (2000). "Iron and Oxidative Stress in Bacteria." Archives of Biochemistry and Biophysics **373**(1): 1-6.

van Velzen, R., R. Holmer, F. Bu, L. Rutten, A. van Zeijl, W. Liu, L. Santuari, Q. Cao, T. Sharma, D. Shen, Y. Roswanjaya, T. A. K. Wardhani, M. S. Kalhor, J. Jansen, J. van den Hoogen, B. GÜngör, M. Hartog, J. Hontelez, J. Verver, W.-C. Yang, E. Schijlen, R. Repin, M. Schilthuizen, M. E. Schranz, R. Heidstra, K. Miyata, E. Fedorova, W. Kohlen, T. Bisseling, S. Smit and R. Geurts (2018). "Comparative genomics of the nonlegume *Parasponia* reveals insights into evolution of nitrogen-fixing rhizobium symbioses." Proceedings of the National Academy of Sciences **115**(20): E4700-E4709.

Vasilchenko, A. S. and E. A. Rogozhin (2019). "Sub-inhibitory Effects of Antimicrobial Peptides." Frontiers in Microbiology **10**.

Zhao, Y., L. M. Nickels, H. Wang, J. Ling, Z. Zhong and J. Zhu (2016). "OxyR-regulated catalase activity is critical for oxidative stress resistance, nodulation and nitrogen fixation in *Azorhizobium caulinodans*." FEMS Microbiology Letters **363**(13).

Zhou, D., Y. Li, X. Wang, F. Xie, D. Chen, B. Ma and Y. Li (2019). "Mesorhizobium huakuii HtpG interaction with nsLTP Ase246 is required for symbiotic nitrogen fixation." Plant Physiology: pp.00336.02018.

DISCUSSION PERSPECTIVES

I. Rôle biologique d'AgLTP24 lors de la symbiose entre *Alnus glutinosa* et *Frankia alni* ACN14a

Les données transcriptomiques d'*Alnus glutinosa* obtenues au cours des différentes étapes de la symbiose avec son symbiote *Frankia alni* ACN14a ont permis d'identifier des gènes surexprimés codant des AMPs. Parmi ces AMPs, des défensines sont sécrétées dans la nodosité comme notamment AgDef5 qui a été localisé dans la nodosité autour des diazovésicules de *Frankia*. Ce peptide perméabilise *in vitro* les diazovésicules de *Frankia* conduisant à un relargage d'acides aminés ce qui suggère un rôle dans les échanges trophiques entre les deux partenaires (Carro et al. 2015, Carro et al. 2016b). De plus, de nouvelles données transcriptomiques acquises avant mon arrivée en thèse ont permis d'identifier un gène codant un AMP de la famille des « non-specific lipid transfer proteins » (nsLTPs), *aglt24* qui est le plus surexprimé au stade précoce de la symbiose (Fold Change = 140) et fait partie des plus surexprimés dans la nodosité (Fold Change= 2145). Ainsi, ce projet de thèse a pour objectif d'étudier le rôle d'une nsLTP, AgLTP24, dans la symbiose actinorhizienne entre *A. glutinosa* et *F. alni* ACN14a.


L'étude du rôle biologique des nsLTPs dans les symbioses actinorhiziennes a été initiée en ciblant AgLTP24. La première partie de ces travaux a permis de localiser AgLTP24 au niveau des poils racinaires déformés d'*A. glutinosa* dans les étapes précoces de la symbiose et dans les cellules infectées par *Frankia* dans la nodosité et plus particulièrement autour des diazovésicules fixatrices d'azote. Ensuite, le peptide a été produit biologiquement afin de déterminer son effet sur le symbiote bactérien *Frankia*. Pour cela, des tests physiologiques *in vitro* sur *F. alni* ACN14a ont été menés et ont montré que ce peptide réduit la viabilité de *Frankia* à partir de 5µM et inhibe sa fixation d'azote à partir de 100nM dans des conditions de culture carencées en azote.

Du fait que les nsLTPs soient capables de lier et transférer des lipides et qu'elles soient impliquées dans divers processus biologiques au sein de la plante (Edqvist et al. 2018), de nombreuses hypothèses peuvent être formulées concernant le ou les rôles biologiques possibles d'AgLTP24 lors de la symbiose entre *A. glutinosa* et *F. alni* ACN14a. En effet, AgLTP24 pourrait être impliquée dans la réorganisation des membranes, le transport des lipides, le contrôle du symbiote ou encore la défense de la plante. Ces hypothèses sont développées

dans les paragraphes suivants ainsi que les moyens à mettre en œuvre pour les tester et les perspectives de recherche.

1. Réorganisation des membranes

Les nsLTPs, participent à la biosynthèse de membranes lipidiques dans différentes parties de la plante telles que les parties aériennes, les racines ou encore les tissus reproducteurs (Edqvist et al. 2018). En effet, bien que les fonctions biologiques soient peu décrites, les nsLTPs ont été décrites dans les processus de biosynthèse de la cuticule, de la subérine ou encore de la sporopollénine. Les nsLTPs, interagissant avec des lipides, pourraient les transporter à travers la paroi cellulaire directement ou à l'aide de transporteurs. Concernant les tissus reproducteurs, les nsLTPs sont impliquées dans la morphogénèse du pollen et la fertilité de la plante (Zhang et al. 2010, Chen et al. 2022). En effet, certaines nsLTPs participent au développement du tapetum qui est la couche de cellules présente dans la partie terminale de l'étamine qui renferme le pollen (anthère). De plus, certaines nsLTPs guideraient le dépôt ou l'assemblage de sporopollénine qui est un composé retrouvé dans une couche protectrice du pollen (exine) (Tao et al. 2021). Lors de la symbiose fixatrice d'azote impliquant *Astragalus sinicus*, l'hôte sécrète dans la nodosité une nsLTP, AsE246, importante lors de l'infection et de la nodosité (Lei et al. 2014). La mutation de ce gène entraîne au niveau de la plante, une réduction du contenu lipidique, une altération du symbiosome et une diminution du nombre de nodosités ayant un aspect plus clair et de plus petite taille. Dans ce modèle, AsE246 serait impliquée dans la réorganisation et la formation des membranes en participant au transport de lipides au niveau du symbiosome. Ainsi, de part ces différentes fonctions dans la biosynthèse des membranes, AgLTP24 pourrait être impliquée directement ou indirectement dans le développement du symbiosome ou dans le transport lipidique au travers du symbiosome à l'instar d'AsE246 (Figure 1.B ①②). Etant donné que les nsLTPs jouent un rôle dans le réarrangement des membranes, AgLTP24 pourrait intervenir dans la déformation des poils racinaires (Figure 1.A ③). D'autre part, *F. alni* ACN14a présente des vésicules fixatrices d'azote avec un plus grand diamètre *in planta* qu'*in vitro* (Carro et al. 2016a). Ce peptide pourrait alors participer au réarrangement des parois riches en lipides hopanoïdes (Figure 1.B. ④) afin d'améliorer l'efficacité de fixation d'azote de son symbiote étant donné que ce peptide cible les diazovésicules de *Frankia*. Par ailleurs, d'autres nsLTPs sont impliquées dans

le développement et dans le guidage du tube pollinique chez *Arabidopsis thaliana* et *Lilium longiflorum* (Kim et al. 2004, Chae et al. 2009, Chae et al. 2011). Dans ce cas, AgLTP24 pourrait, dans les étapes précoces de la symbiose, participer au développement et/ou au guidage du cordon d'infection (Figure 1.A )

2. Défense de la plante et contrôle du symbiote

Les nsLTPs, classées en tant que « pathogenesis related protein » (PR14) peuvent intervenir dans l'immunité de la plante et dans la gestion de stress biotiques et abiotiques. Concernant les stress biotiques, ces peptides permettent la protection de la plante lors d'interaction avec des organismes pathogènes (Sarowar et al. 2009, Schmitt et al. 2018, Zhao et al. 2020, Wang et al. 2021). En effet, la surexpression de gène codant des nsLTPs augmente la résistance de la plante et inversement l'inhibition de ces gènes conduit à une sensibilité accrue face à des pathogènes fongiques (*Phytophthora nicotianae*, *Phytophthora infestans*) bactériens (*Pseudomonas syringae*, *Fusarium oxysporum*, *Xanthomonas campestris*) et viraux (mosaïque du piment).

A. Défense

AgLTP24 pourrait faire partie de la réponse immunitaire innée de la plante induite lors de l'interaction symbiotique. En effet, les données transcriptomiques d'*A. glutinosa* montrent que l'hôte, en contact avec son symbiote, module des processus biologiques impliqués dans la défense de la plante (Chapitre 1) qui pourraient être maintenus au stade de la nodosité. Le projet de thèse de Mathilde VINCENT en cours dans l'équipe permettra prochainement de répondre partiellement à cette hypothèse. Ce projet vise à étudier les défenses d'*A. glutinosa* nodulée par *Frankia* et d'étudier la modulation de gènes de défenses lorsque la plante nodulée est en contact avec l'oomycète pathogène, *Phytophthora alni*. Cette étude permettra de déterminer si une plante nodulée est plus résistante ou plus sensible à un pathogène. Pour cela, des études protéomiques et transcriptomiques dans différents compartiments végétaux sont en cours de réalisation. Ces données permettront de déterminer l'expression spatiale d'AgLTP24 lors de ces interactions symbiotique et pathogénique. Plus largement, ces données permettront de déterminer l'expression des gènes codants des nsLTPs identifiées dans la

deuxième partie de ce travail de thèse. Grâce à cela, les nsLTPs impliquées dans des stress biotiques ou abiotiques seront identifiées ainsi que celles spécifiques à l'interaction avec le pathogène. Les *Phytophthora* sont des oomycètes infectant un grand nombre d'espèces végétales dont des plantes cultivées (Blair et al. 2008). L'identification de ces nsLTPs permettrait d'identifier de nouvelles molécules actives contre ce pathogène.

Pour aller plus loin, AgLTP24 pourrait faire partie de la défense immunitaire de la plante et être sécrétée dans le but d'éliminer des microorganismes sans inhiber son symbiote. Dans le chapitre 2, nous avons testé l'effet d'AgLTP24 sur le transcriptome de *F. alni* ACN14a par RNAseq. Le symbiote en contact avec une dose sub-inhibitrice d'AgLTP24 semble subir un stress qui est géré via l'activation de différents processus moléculaires pour garantir sa croissance et son activité de fixation d'azote. Ces données ont également permis d'identifier des gènes candidats potentiellement impliqués dans la résistance à AgLTP24. Dans l'hypothèse où AgLTP24 présente une activité antimicrobienne, ce peptide permettrait alors d'éliminer ou d'inhiber des microorganismes sans inhiber *Frankia*. Ainsi, ce peptide pourrait avoir une activité antimicrobienne contre des organismes pathogènes pour se protéger et protéger son symbiote dans les étapes précoces de la symbiose et dans la nodosité (Figure 1.A.B. ①) ou encore intervenir dans la compatibilité des souches en éliminant les *Frankia* non compatibles (Figure 1.A ②).



Concernant la compatibilité des *Frankia*, les facteurs impliqués sont encore inconnus cependant il est possible que des AMPs produits par l'hôte y participent. Dans les symbioses fixatrices d'azote impliquant les légumineuses, des NCRs produits par *Medicago truncatula* sont impliqués dans la compatibilité de souches de rhizobia (Introduction – III.3.A). Ainsi, AgLTP24 pourrait intervenir dans ce processus.

Concernant l'activité antimicrobienne contre d'autres microorganismes, cette hypothèse repose sur le fait que *F. alni* ACN14a serait capable de gérer la toxicité d'AgLTP24 alors que d'autres organismes ne le font pas. C'est pourquoi, nous avons initié lors de ma thèse des tests d'activité antimicrobienne de ce peptide contre des bactéries rhizosphériques à savoir *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas fluorescens* et *Bacillus subtilis*. Aux concentrations testées (15µM maximum), AgLTP24 n'a pas d'effet antimicrobien sur ces souches. Cependant, aux plus fortes concentrations testées, ce peptide induit un changement morphologique de *P. fluorescens* et *B. subtilis*. En effet, un allongement des cellules a été observé au microscope à

épifluorescence grâce à une coloration au DAPI qui colore les acides nucléiques et au FM4-64 qui permet de colorer les membranes. Il semblerait qu'AgLTP24 ait une activité inhibitrice sur *Frankia* et non sur les autres bactéries testées, ce qui invaliderait notre hypothèse de départ. Cependant, ces tests n'ayant pas été réalisés dans les mêmes conditions, ces effets ne sont pas comparables. C'est pourquoi ces tests préliminaires et doivent être refaits et approfondis pour confirmer ou invalider ces résultats.

B. Contrôle des *Frankia*

Le changement morphologique des cellules bactériennes par des AMPs a été décrit dans les symbioses fixatrices d'azote. En effet, les NCRs produits par les légumineuses permettent d'induire une différenciation terminale du symbiote en bactéroïde. De la même manière, AgLTP24 pourrait contrôler son symbiote de cette façon, or aucune donnée n'est encore disponible sur l'organisation des hyphes de *Frankia in planta*. Il serait pertinent de déterminer l'effet d'AgLTP24 sur l'organisation des hyphes de *Frankia* en utilisant la démarche décrite précédemment et de déterminer la morphologie des hyphes de *Frankia* par cette même méthode dans les nodosités.

Dans les symbioses fixatrices d'azote, les légumineuses *M. truncatula* et *A. sinicus* sécrètent respectivement MtN5 et AsE246, des étapes précoces jusqu'au stade de nodosité (Pii et al. 2009, Pii et al. 2012, Pii et al. 2013, Lei et al. 2014). La mutation de *mtn5* chez *M. truncatula* entraîne une augmentation des poils racinaires déformés et une réduction du nombre de nodosités. Par conséquent, MtN5 participerait au contrôle du symbiote dans les premières étapes d'infection en limitant l'invasion de la racine et en favorisant l'infection. De ce fait, AgLTP24 pourrait jouer un rôle similaire en permettant de contrôler le symbiote dans les premières étapes de l'infection et dans la nodosité en confinant le symbiote dans les cellules végétales du cortex (Figure 1.A.B ). Dans le premier chapitre, nous avons vu qu'AgLTP24 inhibe l'activité de fixation d'azote à partir de 100nM. Etant donné que les techniques actuelles ne permettent pas d'identifier la concentration exacte de ce peptide dans une cellule végétale infectée par *Frankia*, AgLTP24 pourrait être sécrétée à de fortes concentrations afin de moduler l'activité de fixation d'azote du symbiote selon les besoins de l'hôte (Figure 1.B .

). En effet, la fixation d'azote est variable selon la saison (J D Tjepkema et al. 1986) et les mécanismes impliqués dans la modulation de cette activité sont peu décrits.

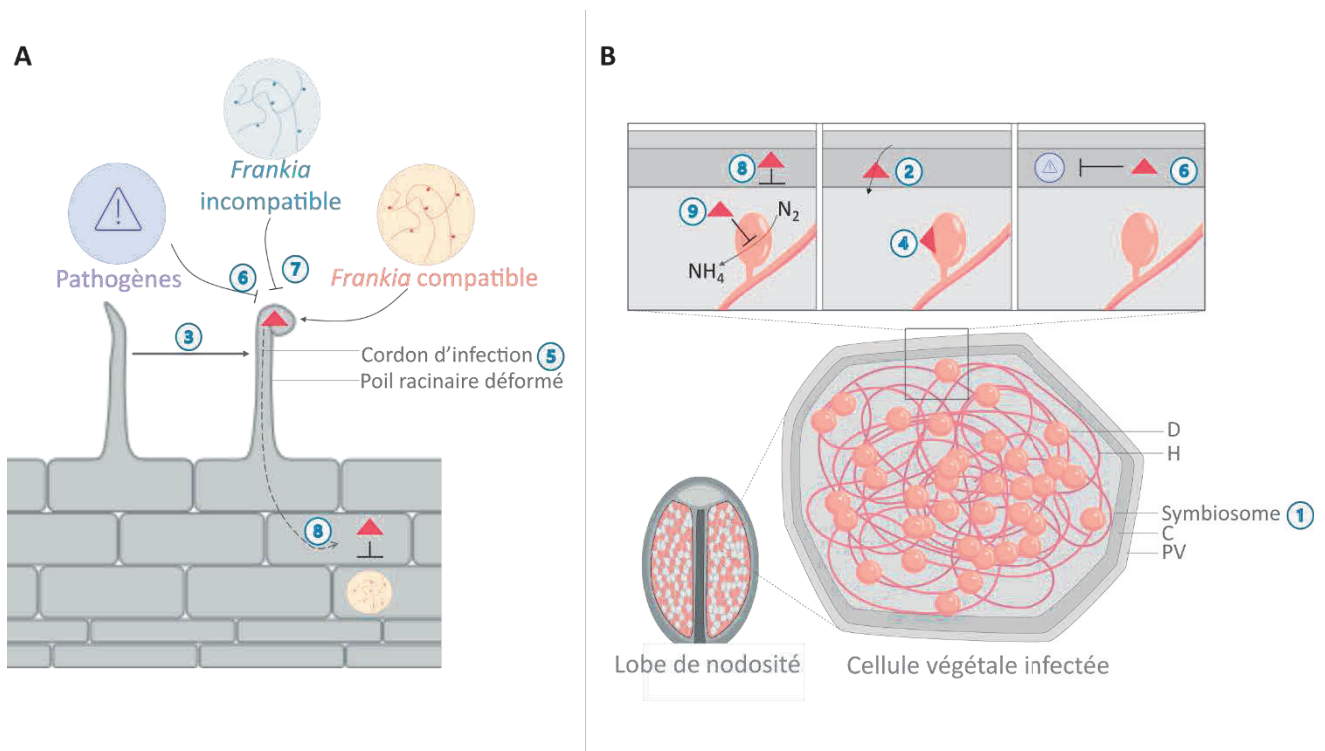


Figure 1 : Rôles biologiques possibles d'AgLTP24 lors de la symbiose

1. Développement du symbiosome, 2. Transport lipidique, 3. Déformation des poils racinaires, 4. Réarrangement de la paroi des diazovésicules, 5. Développement et guidage du cordon d'infection, 6. Activité antimicrobienne contre des pathogènes, 7. Compatibilité, 8. Contrôle du symbiote lors de l'infection et dans la nodosité, 9. Modulation de la fixation d'azote. Triangle rouge : AgLTP24. (A) Etapes précoces, (B) nodosité. D : Diazovésicules de *Frankia*, H : Hyphes de *Frankia*, C : Cytoplasme de la cellule végétale, PV : Paroi cellulaire végétale.

3. Approches à développer

A. Mutagénèse chez *A. glutinosa*

Afin de tester ces différentes fonctions ou encore d'en établir de nouvelles, il serait tout d'abord nécessaire de muter le gène codant AgLTP24 chez *A. glutinosa*. En effet, les effets d'AgLTP24 identifiés *in vitro* ne prennent pas en compte l'environnement moléculaire retrouvé *in planta*. Le rôle d'AgLTP24 peut être différent *in planta*, c'est pourquoi la mutation d'*agltp24* est pertinente. La mutation de l'aulne est un grand défi étant donné que les outils de modification par génie génétique ne sont pas encore maîtrisés pour cette plante. Mon équipe d'accueil souhaite développer la technique d'ARN interférence pour éteindre

l'expression du gène chez *A. glutinosa*. Les premières étapes de développement de cet outil sont un succès. En effet, un vecteur contenant un gène codant une GFP sous le contrôle d'un promoteur constitutif de la plante a été inséré avec succès chez *A. glutinosa* (Figure 2). Ces résultats préliminaires sont prometteurs pour maîtriser l'inhibition de gène chez cette plante.

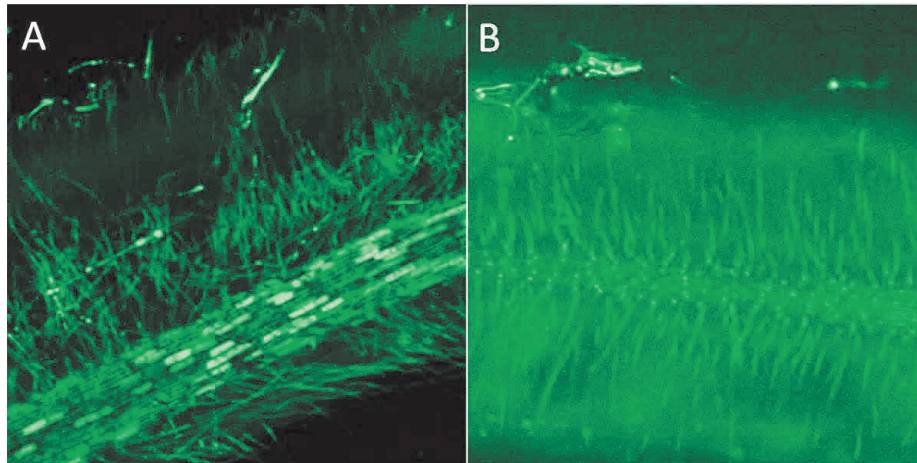


Figure 2 : Transformation d'*Alnus glutinosa*

Racine et poils racinaires déformés d'*Alnus glutinosa*. (A) Racine transformée avec *A. rhizogenes* A4RS contenant un vecteur exprimant une protéine fluorescente (Pro35S:GFP). Le signal fluorescent est localisé au niveau des cellules corticales de la racine. (B) Racines transformées et poils racinaires avec *A. rhizogenes* A4RS contenant un vecteur vide. (Travaux réalisés par H. Boubakri et P. Pujic)

B. Localisation *in planta* et interaction peptide-lipide

Afin d'élucider la fonction biologique de ce peptide lors de la nodulation, le développement d'outils génétiques chez la plante doit être accompagné d'approches complémentaires permettant d'améliorer la localisation du peptide dans les tissus végétaux et l'identification des lipides avec lesquels AgLTP24 est capable d'interagir. Dans ces travaux la localisation d'AgLTP24 a été réalisée par immunolocalisation, pour aller plus loin dans la détection dans les tissus végétaux de la microscopie confocale ou de la microscopie électronique seraient intéressantes à développer. En effet, l'immunolocalisation permet de localiser le peptide seulement sur un plan de coupe alors que la microscopie confocale localise ce peptide sur plusieurs plans d'une même coupe afin d'avoir une meilleure résolution spatiale. Ainsi, il sera possible d'identifier si AgLTP24 dans les étapes précoces est localisée sur tous les poils racinaires, si elle est localisée au niveau des sites d'endocytose de *Frankia* ou encore au niveau du cordon d'infection. Dans la nodosité cela permettrait de savoir si AgLTP24 est localisée au

niveau du symbiosome, des vésicules fixatrices de *Frankia* ou encore au niveau des hyphes. De plus, la microscopie électronique permet de localiser plus précisément le peptide afin de déterminer par exemple si ce dernier se situe à l'intérieur ou à l'extérieur des diazovésicules.

Pour compléter ces informations, il serait intéressant d'identifier les lipides auxquels AgLTP24 est capable de se lier. En effet, dans un premier temps il serait pertinent de déterminer si ce peptide est capable d'interagir avec des lipides d'origine végétale et/ou d'origine bactérienne puis de les identifier.

4. Un arsenal de peptide sécrété par *A. glutinosa* ciblant son symbiote ?

Deux familles de peptide antimicrobiens ont été retrouvées lors de la symbiose entre *A. glutinosa* et *F. alni ACN14a*, les défensines et les nsLTPs. Parmi ces deux familles, la défensine AgDef5 et la nsLTP AgLTP24 ont été localisées dans la nodosité au niveau des cellules végétales infectées par *Frankia* et plus précisément au niveau des diazovésicules fixatrices d'azote. Les peptides AgDef5 et AgLTP24 ont la même cible. Cependant, nous ne savons pas si ces deux peptides sont sécrétés au même moment dans la nodosité. Afin de répondre à cette question, une co-immunolocalisation de ces peptides sur des coupes de nodules serait à réaliser avec de la microscopie confocale. Dans le cas où ces peptides co-localisent il serait nécessaire de tester leur synergie *in vitro*. Comme mentionné précédemment, nous ne pouvons pas encore identifier leurs concentrations au contact de *Frankia in planta*, cependant, il est possible d'obtenir leurs concentrations relatives et d'identifier un ratio AgDef5/AgLTP24 à tester *in vitro*.

Etant donné que plusieurs gènes codant des défensines et des nsLTPs (Chapitre 2) sont surexprimés dans la nodosité d'*A. glutinosa*, il est possible que l'hôte sécrète un arsenal de peptide ciblant son symbiote de la même manière que certaines légumineuses adressent de nombreux NCRs à leur symbiote.

II. Identification des AMPs impliqués dans les symbioses fixatrices d'azote

Dans les symbioses actinorhiziennes, peu d'information sont encore disponibles sur le rôle des AMPs dans cette association. En effet, des gènes codants des défensines sont surexprimés dans la nodosité de *Ceanothus thyrsiflorus* (Salgado et al. 2018), *Datisca glomerata* (Demina et al. 2013) et *A. glutinosa* (Carro et al. 2015). L'effet de ces peptides sur le symbiote bactérien a été étudié uniquement chez *A. glutinosa* (Carro et al. 2015, Carro et al. 2016b). Grâce à ces travaux de thèse, l'étude du rôle d'un AMP appartenant à une seconde famille, les nsLTPs, a été initiée chez cette même plante. Dans le but d'améliorer nos connaissances sur l'importance des nsLTPs dans les symbioses fixatrices d'azote et plus particulièrement dans les symbioses actinorhiziennes nous avons mené une étude sur la distribution des nsLTPs dans les plantes nodulantes et retracé leur histoire évolutive dans les symbioses fixatrice d'azote (Chapitre 2). Ainsi, 167 gènes dans 5 protéomes de plantes actinorhiziennes ont été identifiés. Pour trois d'entre elles (*A. glutinosa*, *D. glomerata* et *Casuarina glauca*), ces données ont été couplées avec des données d'expression différentielle de ces gènes dans la nodosité fonctionnelle disponible dans la littérature. Grâce à cela, nous avons identifié 7 et 9 gènes candidats potentiellement impliqués dans la symbiose chez *A. glutinosa* et *D. glomerata* respectivement. Pour *A. glutinosa*, les données transcriptomiques (EST) ont été approfondies grâce à une approche de qRT-PCR ciblant les gènes codants des nsLTPs et ont permis d'en identifier 5 autres surexprimés dans la nodosité, notamment *agltp30* (Log2Fold Change = 8). AgLTP30 et AgLTP24 diffèrent de par leurs séquences protéiques matures. En effet, ces séquences partagent seulement 29% d'identité et sont retrouvés au niveau phylogénétique dans deux clades distincts avec des motifs protéiques conservés différents (Chapitre 2, Fig. 1). Le peptide mature AgLTP30 a un point isoélectrique de 7,68 et une masse moléculaire de 13,9kDa et contient en C-terminal un GPI qui permet l'accrochage aux membranes. Les nsLTPs possédants un GPI peuvent s'insérer dans les membranes et sont principalement décrites comme impliquées dans la biosynthèse des membranes (Edqvist et al. 2018). Ainsi, cette nsLTP pourrait avoir une localisation et un rôle différent de celui d'AgLTP24 dans le processus symbiotique. Lors de ma thèse, nous avons initié l'étude d'AgLTP30 dans la symbiose. La synthèse d'un épitope et la production d'anticorps anti-AgLTP30 ont été réalisées en vue de localiser ce peptide dans la nodosité. La production biologique de ce peptide a également été initiée. La construction du vecteur permettant son expression chez la souche hétérologue *E.*

coli Shuffle T7 lysY capable de produire des peptides avec des pont disulfures a été réalisée ainsi que les premiers tests de production. Cependant, la purification de ce peptide reste encore à développer.

L'identification des nsLTPs dans les protéomes de plantes n'est pas exhaustive étant donné que certains protéomes utilisés dans cette étude (Chapitre 2) n'ont pas le même niveau d'annotation, notamment pour les plantes actinorhiziennes (Griesmann et al. 2018). Pour compléter ces données il serait nécessaire d'approfondir l'identification des nsLTPs et plus globalement des AMPs produits lors du processus symbiotique. Pour cela, des analyses peptidomiques permettraient d'avoir accès aux peptides présents dans les différentes étapes de la symbiose et d'identifier de possibles modifications post-traductionnelles (Moyer et al. 2021). De plus, cette approche de peptidomique permettrait d'identifier des peptides dont les gènes n'auraient pas été prédits dans le génome. En effet, les algorithmes d'annotations peuvent sous estimer les petites séquences codantes afin d'éviter d'introduire un trop grand nombre d'erreurs dans l'annotation du génome.

Pour aller plus loin dans l'identification de peptides impliqués dans la symbiose, ces analyses peptidomiques peuvent être couplées à de l'imagerie sur coupe de nodule ou racines en contact avec le symbiote afin de déterminer leurs localisations temporelle et spatiale (Ryan et al. 2019). Ainsi, ces analyses permettraient de déterminer si l'hôte sécrète un arsenal de peptide ciblant son symbiote dans le processus symbiotique.

De plus, les différents modèles de symbioses actinorhiziennes sont très diversifiés notamment au niveau de la gestion de l'azote, la répartition des cellules infectées par le symbiote dans les nodosités, les mécanismes d'entrée du symbiote, la gestion de l'oxygène, ou encore la sporulation *in planta*. Il serait intéressant de déterminer si les AMPs ont des rôles biologiques similaires dans ces modèles ou s'ils sont associés à des mécanismes spécifiques à chaque interaction symbiotique et de coupler ces informations avec leurs histoires évolutives dans la symbiose fixatrices d'azote.

BIBLIOGRAPHIE

- Abdel-Lateif, K., D. Bogusz and V. Hocher (2012). "The role of flavonoids in the establishment of plant roots endosymbioses with arbuscular mycorrhiza fungi, rhizobia and *Frankia* bacteria." Plant Signaling & Behavior **7**(6): 636-641.
- Abdel-Lateif, K., V. Vaissayre, H. Gherbi, C. Verries, E. Meudec, F. Perrine-Walker, V. Cheynier, S. Svistoonoff, C. Franche, D. Bogusz and V. Hocher (2013). "Silencing of the chalcone synthase gene in *Casuarina glauca* highlights the important role of flavonoids during nodulation." New Phytologist **199**(4): 1012-1021.
- Abedini, A., S. Chollet, A. Angelis, N. Borie, J. M. Nuzillard, A. L. Skaltsounis, R. Reynaud, S. C. Gangloff, J. H. Renault and J. Hubert (2016). "Bioactivity-guided identification of antimicrobial metabolites in *Alnus glutinosa* bark and optimization of oregonin purification by Centrifugal Partition Chromatography." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **1029-1030**: 121-127.
- Ali, S., B. A. Ganai, A. N. Kamili, A. A. Bhat, Z. A. Mir, J. A. Bhat, A. Tyagi, S. T. Islam, M. Mushtaq, P. Yadav, S. Rawat and A. Grover (2018). "Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance." Microbiological Research **212-213**: 29-37.
- Alloisio, N., C. Queiroux, P. Fournier, P. Pujic, P. Normand, D. Vallenet, C. Medigue, M. Yamaura, K. Kakoi and K. Kucho (2010). "The *Frankia alni* symbiotic transcriptome." Mol Plant Microbe Interact **23**(5): 593-607.
- Almagro Armenteros, J. J., K. D. Tsirigos, C. K. Sønderby, T. N. Petersen, O. Winther, S. Brunak, G. von Heijne and H. Nielsen (2019). "SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks." Nature Biotechnology **37**(4): 420-423.
- Alskog, G. and K. Huss-Danell (1997). "Superoxide dismutase, catalase and nitrogenase activities of symbiotic *Frankia* (*Alnus incana*) in response to different oxygen tensions." Physiologia Plantarum **99**(2): 286-292.
- Alunni, B. and B. Gourion (2016). "Terminal bacteroid differentiation in the legume–rhizobium symbiosis: nodule-specific cysteine-rich peptides and beyond." New Phytologist **211**(2): 411-417.
- Arnold, M. F. F., J. Penterman, M. Shabab, E. J. Chen, G. C. Walker and Y. V. Brun (2018). "Important Late-Stage Symbiotic Role of the *Sinorhizobium meliloti* Exopolysaccharide Succinoglycan." Journal of Bacteriology **200**(13): e00665-00617.
- Bailey, T. L. and C. Elkan (1994). "Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers." Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol **2**: 28-36.
- Baker, D. D. (1987). "Relationships among pure cultured strains of *Frankia* based on host specificity." Physiologia Plantarum **70**(2): 245-248.
- Barker, D. G., M. Chabaud, G. Russo and A. Genre (2017). "Nuclear Ca²⁺ signalling in arbuscular mycorrhizal and actinorhizal endosymbioses: on the trail of novel underground signals." New Phytologist **214**(2): 533-538.
- Barrière, Q., I. Guefrachi, D. Gully, F. Lamouche, O. Pierre, J. Fardoux, C. Chaintreuil, B. Alunni, T. Timchenko, E. Giraud and P. Mergaert (2017). "Integrated roles of BclA and DD-carboxypeptidase 1 in *Bradyrhizobium* differentiation within NCR-producing and NCR-lacking root nodules." Scientific Reports **7**(1): 9063.

- Battenberg, K., D. Potter, C. A. Tabuloc, J. C. Chiu and A. M. Berry (2018). "Comparative transcriptomic analysis of two actinorhizal plants and the legume *Medicago truncatula* supports the homology of root nodule symbioses and is congruent with a two-step process of evolution in the nitrogen-fixing clade of angiosperms." Frontiers in Plant Science **9**(1256).
- Bautista, G. H. H., H. A. Cruz, X. Nesme, M. Valdés, H. A. Mendoza and M. P. Fernandez (2011). "Genomespecies identification and phylogenomic relevance of AFLP analysis of isolated and non-isolated strains of *Frankia* spp." Systematic and Applied Microbiology **34**(3): 200-206.
- Beauchemin, N. J., T. Furnholm, J. Lavenus, S. Svistoonoff, P. Doumas, D. Bogusz, L. Laplaze and L. S. Tisa (2012). "Casuarina Root Exudates Alter the Physiology, Surface Properties, and Plant Infectivity of *Frankia* sp. Strain Cc13." Applied and Environmental Microbiology **78**(2): 575-580.
- Benoit, L. F. and A. M. Berry (1997). "Flavonoid-like compounds from seeds of red alder (*Alnus rubra*) influence host nodulation by *Frankia* (Actinomycetales)." Physiologia Plantarum **99**(4): 588-593.
- Berg, R. H. and L. McDowell (1987). "Endophyte differentiation in *Casuarina actinorhizae*." Protoplasma **136**(2): 104-117.
- Berg, R. H. and L. McDowell (1988). "Cytochemistry of the wall of infected cells in *Casuarina actinorhizae*." Canadian Journal of Botany **66**(10): 2038-2047.
- Berry, A. M. (1991). "Bacteriohopanetetrol: Abundant Lipid in *Frankia* Cells and in Nitrogen-Fixing Nodule Tissue." Plant Physiology **95**(1): 111-115.
- Berry, A. M., O. T. Harriott, R. A. Moreau, S. F. Osman, D. R. Benson and A. D. Jones (1993). "Hopanoid lipids compose the *Frankia* vesicle envelope, presumptive barrier of oxygen diffusion to nitrogenase." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **90**(13): 6091-6094.
- Berry, A. M., A. Mendoza-Herrera, Y.-Y. Guo, J. Hayashi, T. Persson, R. Barabote, K. Demchenko, S. Zhang and K. Pawlowski (2011). "New perspectives on nodule nitrogen assimilation in actinorhizal symbioses." Functional Plant Biology **38**(9): 645-652.
- Berry, A. M. and L. A. Sunell (1990). The Infection Process and Nodule Development. The Biology of Frankia and Actinorhizal Plants. C. R. Schwintzer and J. D. Tjepkema, Academic Press: 61-81.
- Berry, A. M. and J. G. Torrey (1983). "Root hair deformation in the infection process of *Alnus rubra*." Canadian Journal of Botany **61**(11): 2863-2876.
- Blair, J. E., M. D. Coffey, S.-Y. Park, D. M. Geiser and S. Kang (2008). "A multi-locus phylogeny for *Phytophthora* utilizing markers derived from complete genome sequences." Fungal Genetics and Biology **45**(3): 266-277.
- Bogusz, D. and C. Franche (2020). Chapter 29 - *Frankia* and the actinorhizal symbiosis. Molecular Aspects of Plant Beneficial Microbes in Agriculture. V. Sharma, R. Salwan and L. K. T. Al-Ani, Academic Press: 367-380.
- Boschiero, C., X. Dai, P. K. Lundquist, S. Roy, T. Christian de Bang, S. Zhang, Z. Zhuang, I. Torres-Jerez, M. K. Udvardi, W.-R. Scheible and P. X. Zhao (2020). "MtSSPdb: The *Medicago truncatula* Small Secreted Peptide Database." Plant Physiology **183**(1): 399-413.

- Boutrot, F., N. Chantret and M.-F. Gautier (2008). "Genome-wide analysis of the rice and arabidopsis non-specific lipid transfer protein (nsLtp) gene families and identification of wheat nsLtp genes by EST data mining." *BMC Genomics* **9**(1): 86.
- Boyd, E. S., A. D. Anbar, S. Miller, T. L. Hamilton, M. Lavin and J. W. Peters (2011a). "A late methanogen origin for molybdenum-dependent nitrogenase." *Geobiology* **9**(3): 221-232.
- Boyd, E. S., T. L. Hamilton and J. W. Peters (2011b). "An alternative path for the evolution of biological nitrogen fixation." *Front Microbiol* **2**: 205.
- Bueno, P., M. J. Soto, M. P. Rodríguez-Rosales, J. Sanjuan, J. Olivares and J. P. Donaire (2001). "Time-course of lipoxygenase, antioxidant enzyme activities and H₂O₂ accumulation during the early stages of Rhizobium-legume symbiosis." *New Phytologist* **152**(1): 91-96.
- Burleigh, S. and J. G. Torrey (1990). "Effectiveness of Different *Frankia* Cell Types as Inocula for the Actinorhizal Plant Casuarina." *Appl Environ Microbiol* **56**(8): 2565-2567.
- Campos, M. L., C. M. de Souza, K. B. S. de Oliveira, S. C. Dias and O. L. Franco (2018). "The role of antimicrobial peptides in plant immunity." *Journal of Experimental Botany* **69**(21): 4997-5011.
- Capella-Gutiérrez, S., J. M. Silla-Martínez and T. Gabaldón (2009). "trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses." *Bioinformatics* **25**(15): 1972-1973.
- Carella, P., M. Isaacs and R. K. Cameron (2015). "Plasmodesmata-located protein overexpression negatively impacts the manifestation of systemic acquired resistance and the long-distance movement of Defective in Induced Resistance1 in *Arabidopsis*." *Plant Biol (Stuttg)* **17**(2): 395-401.
- Carlos-Shanley, C., T. Guerra and D. Hahn (2021). "Draft genomes of non-nitrogen-fixing *Frankia* strains." *Journal of genomics* **9**: 68-75.
- Carrère, S., M. Verdenaud, C. Gough, J. Gouzy and P. Gamas (2019). "LeGOO: An Expertized Knowledge Database for the Model Legume *Medicago truncatula*." *Plant and Cell Physiology* **61**(1): 203-211.
- Carro, L., T. Persson, P. Pujic, N. Alloisio, P. Fournier, H. Boubakri, K. Pawlowski and P. Normand (2016a). "Organic acids metabolism in *Frankia alni*." *Symbiosis* **70**(1): 37-48.
- Carro, L., P. Pujic, N. Alloisio, P. Fournier, H. Boubakri, A. E. Hay, F. Poly, P. Francois, V. Hocher, P. Mergaert, S. Balmand, M. Rey, A. Heddi and P. Normand (2015). "Alnus peptides modify membrane porosity and induce the release of nitrogen-rich metabolites from nitrogen-fixing *Frankia*." *ISME J* **9**(8): 1723-1733.
- Carro, L., P. Pujic, N. Alloisio, P. Fournier, H. Boubakri, F. Poly, M. Rey, A. Heddi and P. Normand (2016b). "Physiological effects of major up-regulated *Alnus glutinosa* peptides on *Frankia* sp. ACN14a." *Microbiology* **162**(7): 1173-1184.
- Cérémonie, H., F. Debellé and M. P. Fernandez (1999). "Structural and functional comparison of *Frankia* root hair deforming factor and rhizobia Nod factor." *Canadian Journal of Botany* **77**(9): 1293-1301.
- Chaubaud, M., H. Gherbi, E. Pirolles, V. Vaissayre, J. Fournier, D. Moukouanga, C. Franche, D. Bogusz, L. S. Tisa, D. G. Barker and S. Svistoonoff (2016). "Chitinase-resistant hydrophilic symbiotic factors secreted by *Frankia* activate both Ca²⁺ spiking and NIN gene expression in the actinorhizal plant *Casuarina glauca*." *New Phytol* **209**(1): 86-93.

Chae, K., C. A. Kieslich, D. Morikis, S.-C. Kim and E. M. Lord (2009). "A Gain-of-Function Mutation of Arabidopsis Lipid Transfer Protein 5 Disturbs Pollen Tube Tip Growth and Fertilization " The Plant Cell **21**(12): 3902-3914.

Chae, K. and E. M. Lord (2011). "Pollen tube growth and guidance: roles of small, secreted proteins." Annals of botany **108**(4): 627-636.

Chagné, D., R. N. Crowhurst, M. Pindo, A. Thrimawithana, C. Deng, H. Ireland, M. Fiers, H. Dzierzon, A. Cestaro, P. Fontana, L. Bianco, A. Lu, R. Storey, M. Knäbel, M. Saeed, S. Montanari, Y. K. Kim, D. Nicolini, S. Larger, E. Stefani, A. C. Allan, J. Bowen, I. Harvey, J. Johnston, M. Malnoy, M. Troggio, L. Perchepped, G. Sawyer, C. Wiedow, K. Won, R. Viola, R. P. Hellens, L. Brewer, V. G. M. Bus, R. J. Schaffer, S. E. Gardiner and R. Velasco (2014). "The Draft Genome Sequence of European Pear (*Pyrus communis* L. 'Bartlett')." PLOS ONE **9**(4): e92644.

Chen, L., C. Ji, D. Zhou, X. Gou, J. Tang, Y. Jiang, J. Han, Y.-G. Liu, L. Chen and Y. Xie (2022). "OsLTP47 may function in a lipid transfer relay essential for pollen wall development in rice." Journal of Genetics and Genomics.

Chen, T., L. Duan, B. Zhou, H. Yu, H. Zhu, Y. Cao and Z. Zhang (2017). "Interplay of Pathogen-Induced Defense Responses and Symbiotic Establishment in *Medicago truncatula*." Frontiers in microbiology **8**: 973-973.

Chung, C. T., S. L. Niemela and R. H. Miller (1989). "One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(7): 2172-2175.

Cissoko, M., V. Hocher, H. Gherbi, D. Gully, A. Carré-Mlouka, S. Sane, S. Pignoly, A. Champion, M. Ngom, P. Pujic, P. Fournier, M. Gtari, E. Swanson, C. Pesce, L. S. Tisa, M. O. Sy and S. Svistoonoff (2018). "Actinorhizal Signaling Molecules: *Frankia* Root Hair Deforming Factor Shares Properties With NIN Inducing Factor." Frontiers in Plant Science **9**(1494).

Conesa, A. and S. Gotz (2008). "Blast2GO: A comprehensive suite for functional analysis in plant genomics." Int J Plant Genomics **2008**: 619832.

Cotin-Galvan, L., A. C. Pozzi, G. Schwob, P. Fournier, M. P. Fernandez and A. Herrera-Belaroussi (2016). "*In-planta* Sporulation Capacity Enhances Infectivity and Rhizospheric Competitiveness of *Frankia* Strains." Microbes and Environments **31**(1): 11-18.

Czernic, P., D. Gully, F. Cartieaux, L. Moulin, I. Guefrachi, D. Patrel, O. Pierre, J. Fardoux, C. Chaintreuil, P. Nguyen, F. Gressent, C. Da Silva, J. Poulain, P. Wincker, V. Rofidal, S. Hem, Q. Barrière, J.-F. Arrighi, P. Mergaert and E. Giraud (2015). "Convergent evolution of endosymbiont differentiation in dalbergioid and inverted repeat-lacking clade legumes mediated by nodule-specific cysteine-rich peptides." Plant Physiology **169**(2): 1254-1265.

D'Haese, W. and M. Holsters (2002). "Nod factor structures, responses, and perception during initiation of nodule development." Glycobiology **12**(6): 79R-105R.

Darme, P., S. Escotte-Binet, J. Cordonnier, S. Remy, J. Hubert, C. Sayagh, N. Borie, I. Villena, L. Voutquenne-Nazabadioko, M. Dauchez, S. Baud, J.-H. Renault and D. Aubert (2022). "Anti-Toxoplasma gondii effect of lupane-type triterpenes from the bark of black alder (*Alnus glutinosa*) and identification of a potential target by reverse docking." Parasite (Paris, France) **29**: 7-7.

Darme, P., J. Spalenka, J. Hubert, S. Escotte-Binet, L. Debelle, I. Villena, C. Sayagh, N. Borie, A. Martinez and B. Bertaux (2021). "Investigation of antiparasitic activity of ten European tree bark extracts on *Toxoplasma gondii* and bioguided identification of triterpenes in *Alnus glutinosa* barks." Antimicrobial Agents and Chemotherapy: AAC. 01098-01021.

de Bang, T. C., P. K. Lundquist, X. Dai, C. Boschiero, Z. Zhuang, P. Pant, I. Torres-Jerez, S. Roy, J. Nogales, V. Veerappan, R. Dickstein, M. K. Udvardi, P. X. Zhao and W. R. Scheible (2017). "Genome-Wide Identification of *Medicago* Peptides Involved in Macronutrient Responses and Nodulation." Plant Physiol **175**(4): 1669-1689.

De Bary, A. (1879). Die erscheinung der symbiose, De Gruyter.

de Jesús-Pires, C., J. R. C. Ferreira-Neto, J. Pacifico Bezerra-Neto, E. A. Kido, R. L. de Oliveira Silva, V. Pandolfi, A. C. Wanderley-Nogueira, E. Binneck, A. F. da Costa, G. Pio-Ribeiro, G. Pereira-Andrade, I. M. Sittolin, F. Freire-Filho and A. M. Benko-Iseppon (2020). "Plant Thaumatin-like Proteins: Function, Evolution and Biotechnological Applications." Curr Protein Pept Sci **21**(1): 36-51.

Demina, I. V., T. Persson, P. Santos, M. Plaszczycza and K. Pawlowski (2013). "Comparison of the nodule vs. root transcriptome of the actinorhizal plant *Datisca glomerata*: Actinorhizal nodules contain a specific class of defensins." PLOS ONE **8**(8): e72442.

Den Herder, J., S. Lievens, S. Rombauts, M. Holsters and S. Goormachtig (2007). "A Symbiotic Plant Peroxidase Involved in Bacterial Invasion of the Tropical Legume *Sesbania rostrata* " Plant Physiology **144**(2): 717-727.

Dingler, C. and J. Oelze (1985). "Reversible and irreversible inactivation of cellular nitrogenase upon oxygen stress in *Azotobacter vinelandii* growing in oxygen controlled continuous culture." Arch Microbiol **141**(1): 80-84.

Dommergues, Y. (1997). "Contribution of actinorhizal plants to tropical soil productivity and rehabilitation." Soil Biology and Biochemistry **29**(5-6): 931-941.

Edqvist, J., K. Blomqvist, J. Nieuwland and T. A. Salminen (2018). "Plant lipid transfer proteins: are we finally closing in on the roles of these enigmatic proteins?" Journal of lipid research **59**(8): 1374-1382.

Edstam, M. M., L. Viitanen, T. A. Salminen and J. Edqvist (2011). "Evolutionary History of the Non-Specific Lipid Transfer Proteins." Molecular Plant **4**(6): 947-964.

Farkas, A., G. Maróti, H. Durgó, Z. Györgypál, R. M. Lima, K. F. Medzihradsky, A. Kereszt, P. Mergaert and É. Kondorosi (2014). "Medicago truncatula symbiotic peptide NCR247 contributes to bacteroid differentiation through multiple mechanisms." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **111**(14): 5183-5188.

Figueiredo, J., M. Sousa Silva and A. Figueiredo (2018). "Subtilisin-like proteases in plant defence: the past, the present and beyond." Mol Plant Pathol **19**(4): 1017-1028.

Fonseca-García, C., J. Solis-Miranda, R. Pacheco and C. Quinto (2021). "Non-specific Lipid Transfer Proteins in Legumes and Their Participation During Root-Nodule Symbiosis." Frontiers in Agronomy **3**(18).

Fournier, J., L. Imanishi, M. Chabaud, I. Abdou-Pavy, A. Genre, L. Bricchet, H. R. Lascano, N. Munoz, A. Vayssières, E. Pirolles, L. Brottier, H. Gherbi, V. Hoher, S. Svistoonoff, D. G. Barker and L. G. Wall

(2018a). "Cell remodeling and subtilase gene expression in the actinorhizal plant *Discaria trinervis* highlight host orchestration of intercellular *Frankia* colonization." *New Phytol* **219**(3): 1018-1030.

Fournier, J., L. Imanishi, M. Chabaud, I. Abdou-Pavy, A. Genre, L. Bricchet, H. R. Lascano, N. Muñoz, A. Vayssières, E. Pirolles, L. Brottier, H. Gherbi, V. Hocher, S. Svistoonoff, D. G. Barker and L. G. Wall (2018b). "Cell remodeling and subtilase gene expression in the actinorhizal plant *Discaria trinervis* highlight host orchestration of intercellular *Frankia* colonization." *New Phytologist* **219**(3): 1018-1030.

Franche, C., K. Lindström and C. Elmerich (2009). "Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants." *Plant and Soil* **321**(1): 35-59.

Froussart, E., J. Bonneau, C. Franche and D. Bogusz (2016). "Recent advances in actinorhizal symbiosis signaling." *Plant Molecular Biology* **90**(6): 613-622.

Fu, C., W. P. Donovan, O. Shikapwashya-Hasser, X. Ye and R. H. Cole (2014). "Hot Fusion: an efficient method to clone multiple DNA fragments as well as inverted repeats without ligase." *PLoS One* **9**(12): e115318.

Gasteiger, E., C. Hoogland, A. Gattiker, S. E. Duvaud, M. R. Wilkins, R. D. Appel and A. Bairoch (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. *The Proteomics Protocols Handbook*. J. M. Walker. Totowa, NJ, Humana Press: 571-607.

Genre, A. and G. Russo (2016). "Does a common pathway transduce symbiotic signals in plant–microbe interactions?" *Front Plant Sci.* **7**: 96.

Ghelue, M. V., E. Løvaas, E. Ringø and B. Solheim (1997). "Early interactions between *Alnus glutinosa* and *Frankia* strain Ar13. Production and specificity of root hair deformation factor(s)." *Physiologia Plantarum* **99**(4): 579-587.

Ghodhbane-Gtari, F., I. Nouioui, M. Chair, A. Boudabous and M. Gtari (2010). "16S-23S rRNA intergenic spacer region variability in the genus *Frankia*." *Microb Ecol* **60**(3): 487-495.

Gifford, I., S. Vance, G. Nguyen and A. M. Berry (2019). "A Stable Genetic Transformation System and Implications of the Type IV Restriction System in the Nitrogen-Fixing Plant Endosymbiont *Frankia alni* ACN14a." *Frontiers in Microbiology* **10**.

Gincel, E., J.-P. Simorre, A. Caille, D. Marion, M. Ptak and F. Vovelle (1994). "Three-Dimensional Structure in Solution of a Wheat Lipid-Transfer Protein from Multidimensional 1H-NMR Data." *European Journal of Biochemistry* **226**(2): 413-422.

Goormachtig, S., S. Lievens, W. Van de Velde, M. Van Montagu and M. Holsters (1998). "Srchi13, a Novel Early Nodulin from *Sesbania rostrata*, Is Related to Acidic Class III Chitinases." *The Plant Cell* **10**(6): 905-915.

Gourion, B., F. Berrabah, P. Ratet and G. Stacey (2015). "Rhizobium–legume symbioses: the crucial role of plant immunity." *Trends in Plant Science* **20**(3): 186-194.

Granqvist, E., J. Sun, R. Op den Camp, P. Pujic, L. Hill, P. Normand, R. J. Morris, J. A. Downie, R. Geurts and G. E. Oldroyd (2015). "Bacterial-induced calcium oscillations are common to nitrogen-fixing associations of nodulating legumes and nonlegumes." *New Phytol* **207**(3): 551-558.

Griesmann, M., Y. Chang, X. Liu, Y. Song, G. Haberer, M. B. Crook, B. Billault-Penneteau, D. Laressergues, J. Keller, L. Imanishi, Y. P. Roswanjaya, W. Kohlen, P. Pujic, K. Battenberg, N. Alloisio, Y.

- Liang, H. Hilhorst, M. G. Salgado, V. Hocher, H. Gherbi, S. Svistoonoff, J. J. Doyle, S. He, Y. Xu, S. Xu, J. Qu, Q. Gao, X. Fang, Y. Fu, P. Normand, A. M. Berry, L. G. Wall, J.-M. Ané, K. Pawlowski, X. Xu, H. Yang, M. Spannagl, K. F. X. Mayer, G. K.-S. Wong, M. Parniske, P.-M. Delaux and S. Cheng (2018). "Phylogenomics reveals multiple losses of nitrogen-fixing root nodule symbiosis." *Science* **361**(6398): eaat1743.
- Gtari, M., F. Ghodhbane-Gtari, I. Nouiou, A. Ktari, K. Hezbri, W. Mimouni, I. Sbissi, A. Ayari, T. Yamanaka, P. Normand, L. S. Tisa and A. Boudabous (2015). "Cultivating the uncultured: growing the recalcitrant cluster-2 *Frankia* strains." *Scientific Reports* **5**(1): 13112.
- Gueddou, A., I. Sarker, A. Sen, F. Ghodhbane-Gtari, D. R. Benson, J. Armengaud and M. Gtari (2021). "Effect of actinorhizal root exudates on the proteomes of *Frankia soli* NRRL B-16219, a strain colonizing the root tissues of its actinorhizal host via intercellular pathway." *Research in Microbiology*: 103900.
- Guefrachi, I., M. Nagymihaly, C. I. Pislariu, W. Van de Velde, P. Ratet, M. Mars, M. K. Udvardi, E. Kondorosi, P. Mergaert and B. Alunni (2014). "Extreme specificity of NCR gene expression in *Medicago truncatula*." *BMC Genomics* **15**(1): 712.
- Haag, A. F., M. F. F. Arnold, K. K. Myka, B. Kerscher, S. Dall'Angelo, M. Zanda, P. Mergaert and G. P. Ferguson (2013). "Molecular insights into bacteroid development during Rhizobium–legume symbiosis." *FEMS Microbiology Reviews* **37**(3): 364-383.
- Haag, A. F., M. Baloban, M. Sani, B. Kerscher, O. Pierre, A. Farkas, R. Longhi, E. Boncompagni, D. Hérouart, S. Dall'Angelo, E. Kondorosi, M. Zanda, P. Mergaert and G. P. Ferguson (2011). "Protection of Sinorhizobium against Host Cysteine-Rich Antimicrobial Peptides Is Critical for Symbiosis." *PLOS Biology* **9**(10): e1001169.
- Haag, A. F. and P. Mergaert (2020). Terminal bacteroid differentiation in the *Medicago–Rhizobium* interaction – a tug of war between plant and bacteria. *The Model Legume Medicago truncatula*: 600-616.
- Hammad, Y., R. Nalin, J. Marechal, K. Fiasson, R. g. Pepin, A. M. Berry, P. Normand and A.-M. Domenach (2003). "A possible role for phenyl acetic acid (PAA) on *Alnus glutinosa* nodulation by *Frankia*." *Plant Soil* **254**(1): 193-205.
- Harriott, O. T., L. Khairallah and D. R. Benson (1991). "Isolation and structure of the lipid envelopes from the nitrogen-fixing vesicles of *Frankia* sp. strain Cp11." *Journal of Bacteriology* **173**(6): 2061-2067.
- Hassan, S. and U. Mathesius (2012). "The role of flavonoids in root–rhizosphere signalling: opportunities and challenges for improving plant–microbe interactions." *Journal of Experimental Botany* **63**(9): 3429-3444.
- Hay, A.-E., A. Herrera-Belaroussi, M. Rey, P. Fournier, P. Normand and H. Boubakri (2020). "Feedback Regulation of N Fixation in *Frankia-Alnus* Symbiosis Through Amino Acids Profiling in Field and Greenhouse Nodules." *Molecular Plant-Microbe Interactions*® **33**(3): 499-508.
- Hayashi, M., S. Shiro, H. Kanamori, S. Mori-Hosokawa, H. Sasaki-Yamagata, T. Sayama, M. Nishioka, M. Takahashi, M. Ishimoto, Y. Katayose, A. Kaga, K. Harada, H. Kouchi, Y. Saeki and Y. Umehara (2014). "A Thaumatin-Like Protein, Rj4, Controls Nodule Symbiotic Specificity in Soybean." *Plant and Cell Physiology* **55**(9): 1679-1689.

- Hocher, V., N. Alloisio, F. Auguy, P. Fournier, P. Dumas, P. Pujic, H. Gherbi, C. Queiroux, C. Da Silva, P. Wincker, P. Normand and D. Bogusz (2011a). "Transcriptomics of actinorhizal symbioses reveals homologs of the whole common symbiotic signaling cascade." Plant physiology **156**(2): 700-711.
- Hocher, V., N. Alloisio, D. Bogusz and P. Normand (2011b). "Early signaling in actinorhizal symbioses." Plant signaling & behavior **6**(9): 1377-1379.
- Hocher, V., F. Auguy, X. Argout, L. Laplaze, C. Franche and D. Bogusz (2006). "Expressed sequence-tag analysis in *Casuarina glauca* actinorhizal nodule and root." New Phytologist **169**(4): 681-688.
- Horváth, B., Á. Domonkos, A. Kereszt, A. Szűcs, E. Ábrahám, F. Ayaydin, K. Bóka, Y. Chen, R. Chen, J. D. Murray, M. K. Udvardi, É. Kondorosi and P. Kaló (2015). "Loss of the nodule-specific cysteine rich peptide, NCR169, abolishes symbiotic nitrogen fixation in the *Medicago truncatula* dnf7 mutant." Proceedings of the National Academy of Sciences **112**(49): 15232-15237.
- Houwers, A. and A. D. L. Akkermans (1981). "Influence of inoculation on yield of *Alnus glutinosa* in the Netherlands." Plant and Soil **61**(1): 189-202.
- Hu, Y. and M. W. Ribbe (2015). "Nitrogenase and homologs." J Biol Inorg Chem **20**(2): 435-445.
- Huan, Y., Q. Kong, H. Mou and H. Yi (2020). "Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields." Frontiers in Microbiology **11**(2559).
- Hufnagel, B., A. Marques, A. Soriano, L. Marquès, F. Divol, P. Dumas, E. Sallet, D. Mancinotti, S. Carrere, W. Marande, S. Arribat, J. Keller, C. Huneau, T. Blein, D. Aimé, M. Laguerre, J. Taylor, V. Schubert, M. Nelson, F. Geu-Flores, M. Crespi, K. Gallardo, P.-M. Delaux, J. Salse, H. Bergès, R. Guyot, J. Gouzy and B. Péret (2020). "High-quality genome sequence of white lupin provides insight into soil exploration and seed quality." Nature Communications **11**(1): 492.
- Hughes, M., C. Donnelly, A. Crozier and C. T. Wheeler (1999). "Effects of the exposure of roots of *Alnus glutinosa* to light on flavonoids and nodulation." Canadian Journal of Botany **77**(9): 1311-1315.
- J D Tjepkema, a. C R Schwintzer and D. R. Benson (1986). "Physiology of Actinorhizal Nodules." Annual Review of Plant Physiology **37**(1): 209-232.
- Jacobsen-Lyon, K., E. O. Jensen, J. E. Jørgensen, K. A. Marcker, W. J. Peacock and E. S. Dennis (1995). "Symbiotic and nonsymbiotic hemoglobin genes of *Casuarina glauca*." The Plant Cell **7**(2): 213-223.
- Jeong, J., S. Suh, C. Guan, Y. F. Tsay, N. Moran, C. J. Oh, C. S. An, K. N. Demchenko, K. Pawlowski and Y. Lee (2004). "A nodule-specific dicarboxylate transporter from alder is a member of the peptide transporter family." Plant Physiol **134**(3): 969-978.
- Kader, J.-C. (1996). "Lipid-transfer proteins in plants." Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **47**(1): 627-654.
- Kim, S., J. Dong and E. M. Lord (2004). "Pollen tube guidance: the role of adhesion and chemotropic molecules." Curr Top Dev Biol **61**: 61-79.
- Ktari, A., A. Gueddou, I. Nouioui, G. Miotello, I. Sarkar, F. Ghodhbane-Gtari, A. Sen, J. Armengaud and M. Gtari (2017a). "Host Plant Compatibility Shapes the Proteogenome of *Frankia coriariae*." Frontiers in Microbiology **8**(720).

- Ktari, A., I. Nouiou, T. Furnholm, E. Swanson, F. Ghodhbane-Gtari, L. S. Tisa and M. Gtari (2017b). "Permanent draft genome sequence of *Frankia* sp. NRRL B-16219 reveals the presence of canonical nod genes, which are highly homologous to those detected in Candidatus *Frankia* Dg1 genome." Standards in Genomic Sciences **12**(1): 51.
- Kucho, K.-i., K. Kakoi, M. Yamaura, S. Higashi, T. Uchiumi and M. Abe (2009). "Transient Transformation of *Frankia* by Fusion Marker Genes in Liquid Culture." Microbes and Environments **advpub**: 0905140089-0905140089.
- Kucho, K.-i., K. Kakoi, M. Yamaura, M. Iwashita, M. Abe and T. Uchiumi (2013). "Codon-optimized antibiotic resistance gene improves efficiency of transient transformation in *Frankia*." Journal of Biosciences **38**(4): 713-717.
- Kucho, K.-i., D. Tamari, S. Matsuyama, T. Nabekura and L. S. Tisa (2017). "Nitrogen Fixation Mutants of the Actinobacterium *Frankia Casuarinae* Ccl3." Microbes and Environments **advpub**.
- Kucho, K.-i., H. Tobita, S. Utsumi, T. Uchiumi and T. Yamanaka (2022). "Biology of actinorhizal symbiosis from genomics to ecology: the 20th International Meeting on *Frankia* and Actinorhizal Plants." Journal of Forest Research: 1-4.
- Kurdali, F., G. Rinaudo, A. Moiroud and A. M. Domenach (1990). "Competition for nodulation and 15N_2 -fixation between a Sp+ and a Sp-*Frankia* strain in *Alnus incana*." Soil Biology and Biochemistry **22**(1): 57-64.
- Lalonde, M. (1979). "Immunological and Ultrastructural Demonstration of Nodulation of the European *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. Host Plant by an Actinomycetal Isolate from the North American *Comptonia peregrina* (L.) Coult. Root Nodule." Botanical Gazette **140**: S35-S43.
- Lamesch, P., T. Z. Berardini, D. Li, D. Swarbreck, C. Wilks, R. Sasidharan, R. Muller, K. Dreher, D. L. Alexander, M. Garcia-Hernandez, A. S. Karthikeyan, C. H. Lee, W. D. Nelson, L. Plötz, S. Singh, A. Wensel and E. Huala (2011). "The Arabidopsis Information Resource (TAIR): improved gene annotation and new tools." Nucleic Acids Research **40**(D1): D1202-D1210.
- Lay, F. T., H. J. Schirra, M. J. Scanlon, M. A. Anderson and D. J. Craik (2003). "The Three-dimensional Solution Structure of NaD1, a New Floral Defensin from *Nicotiana glauca* and its Application to a Homology Model of the Crop Defense Protein alfAFP." Journal of Molecular Biology **325**(1): 175-188.
- Lei, L., L. Chen, X. Shi, Y. Li, J. Wang, D. Chen, F. Xie and Y. Li (2014). "A Nodule-Specific Lipid Transfer Protein AsE246 Participates in Transport of Plant-Synthesized Lipids to Symbiosome Membrane and Is Essential for Nodule Organogenesis in Chinese Milk Vetch." Plant Physiology **164**(2): 1045-1058.
- Letunic, I. and P. Bork (2021). "Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation." Nucleic Acids Research **49**(W1): W293-W296.
- Li, J., G. Gao, K. Xu, B. Chen, G. Yan, F. Li, J. Qiao, T. Zhang and X. Wu (2014). "Genome-Wide Survey and Expression Analysis of the Putative Non-Specific Lipid Transfer Proteins in *Brassica rapa* L." PLOS ONE **9**(1): e84556.
- Lima, R. M., S. Kylarová, P. Mergaert and É. Kondorosi (2020). "Unexplored Arsenals of Legume Peptides With Potential for Their Applications in Medicine and Agriculture." Frontiers in Microbiology **11**(1307).

Lindorff-Larsen, K. and J. R. Winther (2001). "Surprisingly high stability of barley lipid transfer protein, LTP1, towards denaturant, heat and proteases." *FEBS Letters* **488**(3): 145-148.

Liu, X., M. Sun, Y. Cheng, R. Yang, Y. Wen, Z. Chen and J. Li (2016). "OxyR is a key regulator in response to oxidative stress in *Streptomyces avermitilis*." *Microbiology* **162**(4): 707-716.

Liu, Y., T. Lin, M. V. Valencia, C. Zhang and Z. Lv (2021). "Unraveling the Roles of Vascular Proteins Using Proteomics." *Molecules* **26**(3).

Lobstein, J., C. A. Emrich, C. Jeans, M. Faulkner, P. Riggs and M. Berkmen (2012). "SHuffle, a novel *Escherichia coli* protein expression strain capable of correctly folding disulfide bonded proteins in its cytoplasm." *Microbial cell factories* **11**: 56-56.

Login, F. H., S. Balmand, A. Vallier, C. Vincent-Monégat, A. Vigneron, M. Weiss-Gayet, D. Rochat and A. Heddi (2011). "Antimicrobial peptides keep insect endosymbionts under control." *Science* **334**(6054): 362-365.

Lohar, D. P., S. Haridas, J. S. Gantt and K. A. VandenBosch (2007). "A transient decrease in reactive oxygen species in roots leads to root hair deformation in the legume-rhizobia symbiosis." *New Phytol* **173**(1): 39-49.

Lundqvist, A., L. U. Magnusson, C. Ullström, J. Krasilnikova, G. Telysheva, T. Dizhbite and L. M. Hultén (2015). "Oregonin reduces lipid accumulation and proinflammatory responses in primary human macrophages." *Biochemical and Biophysical Research Communications* **458**(3): 693-699.

Lurthy, T., N. Alloisio, P. Fournier, S. Anchisi, A. Ponsero, P. Normand, P. Pujic and H. Boubakri (2018). "Molecular response to nitrogen starvation by *Frankia alni* ACN14a revealed by transcriptomics and functional analysis with a fosmid library in *Escherichia coli*." *Research in Microbiology* **169**(2): 90-100.

Malolepszy, A., S. Kelly, K. K. Sørensen, E. K. James, C. Kalisch, Z. Bozsoki, M. Panting, S. U. Andersen, S. Sato, K. Tao, D. B. Jensen, M. Vinther, N. d. Jong, L. H. Madsen, Y. Umehara, K. Gysel, M. U. Berentsen, M. Blaise, K. J. Jensen, M. B. Thygesen, N. Sandal, K. R. Andersen and S. Radutoiu (2018). "A plant chitinase controls cortical infection thread progression and nitrogen-fixing symbiosis." *eLife* **7**: e38874.

Martin, F. M., S. Uroz and D. G. Barker (2017). "Ancestral alliances: Plant mutualistic symbioses with fungi and bacteria." *Science* **356**(6340): eaad4501.

Martínez-García, P. J., M. W. Crepeau, D. Puiu, D. Gonzalez-Ibeas, J. Whalen, K. A. Stevens, R. Paul, T. S. Butterfield, M. T. Britton, R. L. Reagan, S. Chakraborty, S. L. Walawage, H. A. Vasquez-Gross, C. Cardeno, R. A. Famula, K. Pratt, S. Kuruganti, M. K. Aradhya, C. A. Leslie, A. M. Dandekar, S. L. Salzberg, J. L. Wegrzyn, C. H. Langley and D. B. Neale (2016). "The walnut (*Juglans regia*) genome sequence reveals diversity in genes coding for the biosynthesis of non-structural polyphenols." *The Plant Journal* **87**(5): 507-532.

Mastrorunzio, J. E., L. S. Tisa, P. Normand and D. R. Benson (2008). "Comparative secretome analysis suggests low plant cell wall degrading capacity in *Frankia* symbionts." *BMC Genomics* **9**: 47.

Mergaert, P. (2018). "Role of antimicrobial peptides in controlling symbiotic bacterial populations." *Natural Product Reports* **35**(4): 336-356.

Mergaert, P., K. Nikovics, Z. Kelemen, N. Maunoury, D. Vaubert, A. Kondorosi and E. Kondorosi (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 physiology* **132**(1): 161-173.

Minh, B. Q., H. A. Schmidt, O. Chernomor, D. Schrempf, M. D. Woodhams, A. von Haeseler and R. Lanfear (2020). "IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era." Molecular Biology and Evolution **37**(5): 1530-1534.

Montiel, J., J. A. Downie, A. Farkas, P. Bihari, R. Herczeg, B. Bálint, P. Mergaert, A. Kereszt and É. Kondorosi (2017). "Morphotype of bacteroids in different legumes correlates with the number and type of symbiotic NCR peptides." Proceedings of the National Academy of Sciences **114**(19): 5041-5046.

Moyer, T. B., J. L. Allen, L. N. Shaw and L. M. Hicks (2021). "Multiple Classes of Antimicrobial Peptides in *Amaranthus tricolor* Revealed by Prediction, Proteomics, and Mass Spectrometric Characterization." J Nat Prod **84**(2): 444-452.

Myers, A. K. and L. S. Tisa (2004). "Isolation of antibiotic-resistant and antimetabolite-resistant mutants of *Frankia* strains Eul1c and Cc1.17." Canadian Journal of Microbiology **50**(4): 261-267.

Myronovskyi, M., B. Rosenkränzer, S. Nadmid, P. Pujic, P. Normand and A. Luzhetskyy (2018). "Generation of a cluster-free *Streptomyces albus* chassis strains for improved heterologous expression of secondary metabolite clusters." Metabolic Engineering **49**: 316-324.

Navarro-González, R., C. P. McKay and D. N. Mvondo (2001). "A possible nitrogen crisis for Archaean life due to reduced nitrogen fixation by lightning." Nature **412**(6842): 61-64.

Navarro, E., J. Bousquet, A. Moiroud, A. Munive, D. Piou and P. Normand (2003). "Molecular phylogeny of *Alnus* (Betulaceae), inferred from nuclear ribosomal DNA ITS sequences." Plant and Soil **254**(1): 207-217.

Ngom, M., M. Cissoko, K. Gray, V. Hocher, L. Laplaze, M. O. Sy, S. Svistoonoff and A. Champion (2020). Establishment of Actinorhizal Symbiosis in Response to Ethylene, Salicylic Acid, and Jasmonate. Jasmonate in Plant Biology: Methods and Protocols. A. Champion and L. Laplaze. New York, NY, Springer US: 117-130.

Nguyen, T. V., D. Wibberg, K. Battenberg, J. Blom, B. Vanden Heuvel, A. M. Berry, J. Kalinowski and K. Pawlowski (2016). "An assemblage of *Frankia* Cluster II strains from California contains the canonical nod genes and also the sulfotransferase gene nodH." BMC Genomics **17**(1): 796.

Niemann, J. and L. S. Tisa (2008). "Nitric oxide and oxygen regulate truncated hemoglobin gene expression in *Frankia* strain Ccl3." J Bacteriol **190**(23): 7864-7867.

Normand, P. and M. P. Fernandez (2009). Evolution and Diversity of *Frankia*. Prokaryotic Symbionts in Plants. K. Pawlowski. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg: 103-125.

Normand, P. and M. P. Fernandez (2019). *Frankia*. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria, (eds W.B. Whitman, F.A. Rainey, P. Kämpfer, M.E. Trujillo, P. DeVos, B. Hedlund and S. Dedysh): 1-19.

Normand, P. and M. Lalonde (1982). "Evaluation of *Frankia* strains isolated from provenances of two *Alnus* species." Can J Microbiol **28**: 1133-1142.

Normand, P., P. Lapierre, L. S. Tisa, J. P. Gogarten, N. Alloisio, E. Bagnarol, C. A. Bassi, A. M. Berry, D. M. Bickhart, N. Choisne, A. Couloux, B. Cournoyer, S. Cruveiller, V. Daubin, N. Demange, M. P. Francino, E. Goltsman, Y. Huang, O. R. Kopp, L. Labarre, A. Lapidus, C. Lavire, J. Marechal, M. Martinez, J. E. Mastronunzio, B. C. Mullin, J. Niemann, P. Pujic, T. Rawnsley, Z. Rouy, C. Schenowitz, A. Sellstedt, F.

Tavares, J. P. Tomkins, D. Vallenet, C. Valverde, L. G. Wall, Y. Wang, C. Medigue and D. R. Benson (2007a). "Genome characteristics of facultatively symbiotic *Frankia* sp. strains reflect host range and host plant biogeography." Genome Res **17**(1): 7-15.

Normand, P., P. Lapierre, L. S. Tisa, J. P. Gogarten, N. Alloisio, E. Bagnarol, C. A. Bassi, A. M. Berry, D. M. Bickhart, N. Choisne, A. Couloux, B. Cournoyer, S. Cruveiller, V. Daubin, N. Demange, M. P. Francino, E. Goltsman, Y. Huang, O. R. Kopp, L. Labarre, A. Lapidus, C. Lavire, J. Marechal, M. Martinez, J. E. Mastronunzio, B. C. Mullin, J. Niemann, P. Pujic, T. Rawnsley, Z. Rouy, C. Schenowitz, A. Sellstedt, F. Tavares, J. P. Tomkins, D. Vallenet, C. Valverde, L. G. Wall, Y. Wang, C. Medigue and D. R. Benson (2007b). "Genome characteristics of facultatively symbiotic *Frankia* sp. strains reflect host range and host plant biogeography." Genome Research **17**(1): 7-15.

Normand, P., S. Orso, B. Cournoyer, P. Jeannin, C. Chapelon, J. Dawson, L. Evtushenko and A. K. Misra (1996). "Molecular Phylogeny of the Genus *Frankia* and Related Genera and Emendation of the Family Frankiaceae." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **46**(1): 1-9.

Oldroyd, G. E. D. (2013). "Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants." Nature Reviews Microbiology **11**: 252.

Oldroyd, G. E. D. and R. Dixon (2014). "Biotechnological solutions to the nitrogen problem." Current Opinion in Biotechnology **26**: 19-24.

Oono, R. and R. F. Denison (2010). "Comparing Symbiotic Efficiency between Swollen versus Nonswollen Rhizobial Bacteroids." Plant Physiology **154**(3): 1541-1548.

Parisi, K., T. M. A. Shafee, P. Quimbar, N. L. van der Weerden, M. R. Bleackley and M. A. Anderson (2019). "The evolution, function and mechanisms of action for plant defensins." Semin Cell Dev Biol **88**: 107-118.

Parsons, R., W. B. Silvester, S. Harris, W. T. M. Gruijters and S. Bullivant (1987). "*Frankia* Vesicles Provide Inducible and Absolute Oxygen Protection for Nitrogenase 1." Plant Physiology **83**(4): 728-731.

Pawlowski, K. and K. N. Demchenko (2012). "The diversity of actinorhizal symbiosis." Protoplasma **249**(4): 967-979.

Pecrix, Y., S. E. Staton, E. Sallet, C. Lelandais-Brière, S. Moreau, S. Carrère, T. Blein, M.-F. Jardinaud, D. Latrasse, M. Zouine, M. Zahm, J. Kreplak, B. Mayjonade, C. Satgé, M. Perez, S. Cauet, W. Marande, C. Chantry-Darmon, C. Lopez-Roques, O. Bouchez, A. Bérard, F. Debellé, S. Muñoz, A. Bendahmane, H. Bergès, A. Niebel, J. Buitink, F. Frugier, M. Benhamed, M. Crespi, J. Gouzy and P. Gamas (2018). "Whole-genome landscape of *Medicago truncatula* symbiotic genes." Nature Plants **4**(12): 1017-1025.

Peleg-Grossman, S., Y. Golani, Y. Kaye, N. Melamed-Book and A. Levine (2009). "NPR1 protein regulates pathogenic and symbiotic interactions between *Rhizobium* and legumes and non-legumes." PLoS One **4**(12): e8399.

Peleg-Grossman, S., N. Melamed-Book and A. Levine (2012). "ROS production during symbiotic infection suppresses pathogenesis-related gene expression." Plant signaling & behavior **7**(3): 409-415.

Perrine-Walker, F., H. Gherbi, L. Imanishi, V. Hoher, F. Ghodhbane-Gtari, J. Lavenus, F. M. Benabdoun, M. Nambiar-Veeti, S. Svistoonoff and L. Laplaze (2011). "Symbiotic signaling in actinorhizal symbioses." Curr Protein Pept Sci **12**(2): 156-164.

- Persson, T., K. Battenberg, I. V. Demina, T. Vigil-Stenman, B. Vanden Heuvel, P. Pujic, M. T. Facciotti, E. G. Wilbanks, A. O'Brien, P. Fournier, M. A. Cruz Hernandez, A. Mendoza Herrera, C. Médigue, P. Normand, K. Pawlowski and A. M. Berry (2015). "Candidatus *Frankia Datiscae* Dg1, the Actinobacterial Microsymbiont of *Datisca glomerata*, Expresses the Canonical nod Genes nodABC in Symbiosis with Its Host Plant." *PLOS ONE* **10**(5): e0127630.
- Pesce, C., R. Oshone, S. G. Hurst, V. A. Kleiner and L. S. Tisa (2019). "Stable Transformation of the Actinobacteria *Frankia* spp." *Applied and Environmental Microbiology* **85**(15): e00957-00919.
- Pii, Y., A. Astegno, E. Peroni, M. Zaccardelli, T. Pandolfini and M. Crimi (2009). "The *Medicago truncatula* N5 Gene Encoding a Root-Specific Lipid Transfer Protein Is Required for the Symbiotic Interaction with *Sinorhizobium meliloti*." *Molecular Plant-Microbe Interactions*[®] **22**(12): 1577-1587.
- Pii, Y., B. Molesini, S. Masiero and T. Pandolfini (2012). "The non-specific lipid transfer protein N5 of *Medicago truncatula* is implicated in epidermal stages of rhizobium-host interaction." *BMC Plant Biology* **12**(1): 233.
- Pii, Y., B. Molesini and T. Pandolfini (2013). "The involvement of *Medicago truncatula* non-specific lipid transfer protein N5 in the control of rhizobial infection." *Plant Signaling & Behavior* **8**(7): e24836.
- Popovici, J., G. Comte, É. Bagnarol, N. Alloisio, P. Fournier, F. Bellvert, C. Bertrand and M. P. Fernandez (2010). "Differential Effects of Rare Specific Flavonoids on Compatible and Incompatible Strains in the *Myrica gale* - *Frankia* Actinorhizal Symbiosis." *Applied and Environmental Microbiology* **76**(8): 2451-2460.
- Pozzi, A. C., H. H. Bautista-Guerrero, S. S. Abby, A. Herrera-Belaroussi, D. Abrouk, P. Normand, F. Menu and M. P. Fernandez (2018). "Robust *Frankia* phylogeny, species delineation and intraspecies diversity based on Multi-Locus Sequence Analysis (MLSA) and Single-Locus Strain Typing (SLST) adapted to a large sample size." *Systematic and Applied Microbiology* **41**(4): 311-323.
- Pozzi, A. C., H. H. Bautista-Guerrero, I. Nouioui, L. Cotin-Galvan, R. Pepin, P. Fournier, F. Menu, M. P. Fernandez and A. Herrera-Belaroussi (2015). "*In-planta* sporulation phenotype: a major life history trait to understand the evolution of *Alnus*-infective *Frankia* strains." *Environ Microbiol* **17**(9): 3125-3138.
- Preibisch, S., S. Saalfeld and P. Tomancak (2009). "Globally optimal stitching of tiled 3D microscopic image acquisitions." *Bioinformatics (Oxford, England)* **25**(11): 1463-1465.
- Price, P. A., H. R. Tanner, B. A. Dillon, M. Shabab, G. C. Walker and J. S. Griffitts (2015). "Rhizobial peptidase HrrP cleaves host-encoded signaling peptides and mediates symbiotic compatibility." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**(49): 15244-15249.
- Pujic, P., N. Alloisio, P. Fournier, D. Roche, H. Sghaier, G. Miotello, J. Armengaud, A. M. Berry and P. Normand (2019). "Omics of the early molecular dialogue between *Frankia alni* and *Alnus glutinosa* and the cellulase synton." *Environmental Microbiology* **21**(9): 3328-3345.
- Pushpanathan, M., P. Gunasekaran and J. Rajendhran (2013). "Antimicrobial peptides: versatile biological properties." *Int J Pept* **2013**: 675391.
- Qi, J., X. Liu, D. Shen, H. Miao, B. Xie, X. Li, P. Zeng, S. Wang, Y. Shang, X. Gu, Y. Du, Y. Li, T. Lin, J. Yuan, X. Yang, J. Chen, H. Chen, X. Xiong, K. Huang, Z. Fei, L. Mao, L. Tian, T. Städler, S. S. Renner, S. Kamoun, W. J. Lucas, Z. Zhang and S. Huang (2013). "A genomic variation map provides insights into the genetic basis of cucumber domestication and diversity." *Nature Genetics* **45**(12): 1510-1515.

- Quispel, A. and T. Tak (1978). "Studies on the growth of the endophyte of *Alnus glutinosa* (L.) Vill. In nutrient solutions." New Phytologist **81**: 587-600.
- Raymond, J., J. L. Siefert, C. R. Staples and R. E. Blankenship (2004). "The Natural History of Nitrogen Fixation." Molecular Biology and Evolution **21**(3): 541-554.
- Ribeiro, A., A. D. Akkermans, A. van Kammen, T. Bisseling and K. Pawlowski (1995). "A nodule-specific gene encoding a subtilisin-like protease is expressed in early stages of actinorhizal nodule development." Plant Cell **7**(6): 785-794.
- Ribeiro, A., A. M. Berry, K. Pawlowski and P. Santos (2011). "Actinorhizal plants." Functional Plant Biology **38**(9): v-vii.
- Ryan, D. J., J. M. Spraggins and R. M. Caprioli (2019). "Protein identification strategies in MALDI imaging mass spectrometry: a brief review." Current Opinion in Chemical Biology **48**: 64-72.
- Salgado, M. G., R. van Velzen, T. V. Nguyen, K. Battenberg, A. M. Berry, D. Lundin and K. Pawlowski (2018). "Comparative Analysis of the Nodule Transcriptomes of *Ceanothus thyrsiflorus* (Rhamnaceae, Rosales) and *Datisca glomerata* (Datiscaceae, Cucurbitales)." **9**(1629).
- Santi, C., B. Molesini, F. Guzzo, Y. Pii, N. Vitulo and T. Pandolfini (2017). "Genome-Wide Transcriptional Changes and Lipid Profile Modifications Induced by *Medicago truncatula* N5 Overexpression at an Early Stage of the Symbiotic Interaction with *Sinorhizobium meliloti*." Genes **8**(12): 396.
- Santi, C., B. Molesini and T. Pandolfini (2020). Which role for *Medicago truncatula* non-specific lipid transfer proteins in rhizobial infection? The Model Legume Medicago truncatula: 637-644.
- Santos-Silva, C. A. d., L. Zupin, M. Oliveira-Lima, L. M. B. Vilela, J. P. Bezerra-Neto, J. R. Ferreira-Neto, J. D. C. Ferreira, R. L. d. Oliveira-Silva, C. d. J. Pires, F. F. Aburjaile, M. F. d. Oliveira, E. A. Kido, S. Crovella and A. M. Benko-Iseppon (2020). "Plant Antimicrobial Peptides: State of the Art, *In Silico* Prediction and Perspectives in the Omics Era." Bioinformatics and Biology Insights **14**: 1177932220952739.
- Sarowar, S., Y. J. Kim, K. D. Kim, B. K. Hwang, S. H. Ok and J. S. Shin (2009). "Overexpression of lipid transfer protein (LTP) genes enhances resistance to plant pathogens and LTP functions in long-distance systemic signaling in tobacco." Plant Cell Reports **28**(3): 419-427.
- Sati, S. C., N. Sati and O. P. Sati (2011). "Bioactive constituents and medicinal importance of genus *Alnus*." Pharmacognosy reviews **5**(10): 174-183.
- Schagger, H. (2006). "Tricine-SDS-PAGE." Nat Protoc **1**(1): 16-22.
- Schmitt, A. J., A. E. Sathoff, C. Holl, B. Bauer, D. A. Samac and C. J. Carter (2018). "The major nectar protein of *Brassica rapa* is a non-specific lipid transfer protein, BrLTP2.1, with strong antifungal activity." Journal of Experimental Botany **69**(22): 5587-5597.
- Schoepp-Cothenet, B., R. van Lis, P. Philippot, A. Magalon, M. J. Russell and W. Nitschke (2012). "The ineluctable requirement for the trans-iron elements molybdenum and/or tungsten in the origin of life." Scientific Reports **2**(1): 263.
- Schweitzer, C. and J. Tjepkema (1990). "Spore-positive and spore-negative nodules." Biology of Frankia and Actinorhizal Plants: 177-193.

Schwencke, J. (1991). Rapid, exponential growth and increased biomass yield of some *Frankia* strains in buffered and stirred mineral medium (BAP) with phosphatidyl choline. Nitrogen Fixation: Proceedings of the Fifth International Symposium on Nitrogen Fixation with Non-Legumes, Florence, Italy, 10–14 September 1990. M. Polsinelli, R. Materassi and M. Vincenzini. Dordrecht, Springer Netherlands: 615-619.

Schwencke, J. and M. Carú (2001). "Advances in Actinorhizal Symbiosis: Host Plant - *Frankia* Interactions, Biology, and Applications in Arid Land Reclamation. A Review." Arid Land Research and Management **15**(4): 285-327.

Schwintzer, C. R. (2012). The Biology of *Frankia* and Actinorhizal Plants, Elsevier Science.

Schwob, G., M. Roy, A. C. Pozzi, A. Herrera-Belaroussi, M. P. Fernandez and R. M. Kelly (2018). "*In Planta* Sporulation of *Frankia* spp. as a Determinant of Alder-Symbiont Interactions." Applied and Environmental Microbiology **84**(23): e01737-01718.

Scocchi, M., M. Mardirossian, G. Runti and M. Benincasa (2016). "Non-membrane permeabilizing modes of action of antimicrobial peptides on bacteria." Current topics in medicinal chemistry **16**(1): 76-88.

Shaw, S. L. and S. R. Long (2003). "Nod factor inhibition of reactive oxygen efflux in a host legume." Plant physiology **132**(4): 2196-2204.

Staehelein, C., J. Granado, J. Müller, A. Wiemken, R. B. Mellor, G. Felix, M. Regenass, W. J. Broughton and T. Boller (1994). "Perception of Rhizobium nodulation factors by tomato cells and inactivation by root chitinases." Proceedings of the National Academy of Sciences **91**(6): 2196-2200.

Stüeken, E. E., R. Buick, B. M. Guy and M. C. Koehler (2015). "Isotopic evidence for biological nitrogen fixation by molybdenum-nitrogenase from 3.2 Gyr." Nature **520**(7549): 666-669.

Svistoonoff, F. M. Benabdoun, M. Nambiar-Veetil, L. Imanishi, V. Vaissayre, S. Cesari, N. Diagne, V. Hocher, F. de Billy, J. Bonneau, L. Wall, N. Ykhlef, C. Rosenberg, D. Bogusz, C. Franche and H. Gherbi (2013). "The Independent Acquisition of Plant Root Nitrogen-Fixing Symbiosis in Fabids Recruited the Same Genetic Pathway for Nodule Organogenesis." PLOS ONE **8**(5): e64515.

Svistoonoff, S., V. Hocher and H. Gherbi (2014). "Actinorhizal root nodule symbioses: what is signalling telling on the origins of nodulation?" Current Opinion in Plant Biology **20**: 11-18.

Svistoonoff, S., L. Laplaze, F. Auguy, J. Runions, R. Duponnois, J. Haseloff, C. Franche and D. Bogusz (2003). "cg12 expression is specifically linked to infection of root hairs and cortical cells during *Casuarina glauca* and *Allocasuarina verticillata* actinorhizal nodule development." Mol Plant Microbe Interact **16**(7): 600-607.

Tam, J. P., S. Wang, K. H. Wong and W. L. Tan (2015). "Antimicrobial Peptides from Plants." Pharmaceuticals **8**(4): 711-757.

Tao, Y., T. Zou, X. Zhang, R. Liu, H. Chen, G. Yuan, D. Zhou, P. Xiong, Z. He, G. Li, M. Zhou, S. Liu, Q. Deng, S. Wang, J. Zhu, Y. Liang, X. Yu, A. Zheng, A. Wang, H. Liu, L. Wang, P. Li and S. Li (2021). "Secretory lipid transfer protein OsLTPL94 acts as a target of EAT1 and is required for rice pollen wall development." The Plant Journal **108**(2): 358-377.

Taylor, A. and Y. L. Qiu (2017). "Evolutionary History of Subtilases in Land Plants and Their Involvement in Symbiotic Interactions." Mol Plant Microbe Interact **30**(6): 489-501.

Touati, D. (2000). "Iron and Oxidative Stress in Bacteria." Archives of Biochemistry and Biophysics **373**(1): 1-6.

van Ghelue, M., A. Ribeiro, B. Solheim, A. D. Akkermans, T. Bisseling and K. Pawlowski (1996). "Sucrose synthase and enolase expression in actinorhizal nodules of *Alnus glutinosa*: comparison with legume nodules." Mol Gen Genet **250**(4): 437-446.

Van Velzen, R., R. Holmer, F. Bu, L. Rutten, A. van Zeijl, W. Liu, L. Santuari, Q. Cao, T. Sharma, D. Shen, Y. Roswanjaya, T. A. K. Wardhani, M. S. Kalhor, J. Jansen, J. van den Hoogen, B. Güngör, M. Hartog, J. Hontelez, J. Verver, W.-C. Yang, E. Schijlen, R. Repin, M. Schilthuizen, M. E. Schranz, R. Heidstra, K. Miyata, E. Fedorova, W. Kohlen, T. Bisseling, S. Smit and R. Geurts (2018). "Comparative genomics of the nonlegume *Parasponia* reveals insights into evolution of nitrogen-fixing rhizobium symbioses." Proceedings of the National Academy of Sciences **115**(20): E4700-E4709.

Vandijk, C. and E. Merkus (1976). "A microscopical study of the development of a spore-like stage in the life cycle of the root-nodule endophyte of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn." New Phytologist **77**(1): 73-91.

Vasilchenko, A. S. and E. A. Rogozhin (2019). "Sub-inhibitory Effects of Antimicrobial Peptides." Frontiers in Microbiology **10**.

Vessey, J. K., K. Pawlowski and B. Bergman (2005). "Root-based N₂-fixing Symbioses: Legumes, Actinorhizal Plants, *Parasponia* sp. and Cycads." Plant and Soil **274**(1): 51-78.

Wang, C., H. Gao, Z. Chu, C. Ji, Y. Xu, W. Cao, S. Zhou, Y. Song, H. Liu and C. Zhu (2021). "A nonspecific lipid transfer protein, StLTP10, mediates resistance to *Phytophthora infestans* in potato." Molecular Plant Pathology **22**(1): 48-63.

Wang, Q., S. Yang, J. Liu, K. Terecskei, E. Ábrahám, A. Gombár, Á. Domonkos, A. Szűcs, P. Körmöczi, T. Wang, L. Fodor, L. Mao, Z. Fei, É. Kondorosi, P. Kaló, A. Kereszt and H. Zhu (2017). "Host-secreted antimicrobial peptide enforces symbiotic selectivity in *Medicago truncatula*." Proceedings of the National Academy of Sciences **114**(26): 6854-6859.

Werner, G. D. A., W. K. Cornwell, J. I. Sprent, J. Kattge and E. T. Kiers (2014). "A single evolutionary innovation drives the deep evolution of symbiotic N₂-fixation in angiosperms." Nature Communications **5**(1): 4087.

Xie, Z.-P., C. Staehelin, A. Wiemken, W. J. Broughton, J. Müller and T. Boller (1999). "Symbiosis-stimulated chitinase isoenzymes of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.)." Journal of Experimental Botany **50**(332): 327-333.

Yang, S., Q. Wang, E. Fedorova, J. Liu, Q. Qin, Q. Zheng, P. A. Price, H. Pan, D. Wang, J. S. Griffitts, T. Bisseling and H. Zhu (2017). "Microsymbiont discrimination mediated by a host-secreted peptide in *Medicago truncatula*." Proceedings of the National Academy of Sciences **114**(26): 6848-6853.

Zasloff, M. (2002). "Antimicrobial peptides of multicellular organisms." Nature **415**(6870): 389-395.

Zeng, S., J. D. Tjepkema and R. H. Berg (1989). "Gas diffusion pathway in nodules of *Casuarina cunninghamiana*." Plant and Soil **118**(1): 119-123.

Zerle, A. L. and S. Mikhail (2017). "The geobiological nitrogen cycle: From microbes to the mantle." Geobiology **15**(3): 343-352.

Bibliographie

Zhang, D., W. Liang, C. Yin, J. Zong, F. Gu and D. Zhang (2010). "OsC6, Encoding a Lipid Transfer Protein, Is Required for Postmeiotic Anther Development In Rice " Plant Physiology **154**(1): 149-162.

Zhao, Y., L. M. Nickels, H. Wang, J. Ling, Z. Zhong and J. Zhu (2016). "OxyR-regulated catalase activity is critical for oxidative stress resistance, nodulation and nitrogen fixation in *Azorhizobium caulinodans*." FEMS Microbiology Letters **363**(13).

Zhao, Z., X. Yang, S. Lü, J. Fan, S. Opiyo, P. Yang, J. Mangold, D. Mackey and Y. Xia (2020). "Deciphering the Novel Role of AtMIN7 in Cuticle Formation and Defense against the Bacterial Pathogen Infection." International Journal of Molecular Sciences **21**(15): 5547.

Zhou, D., Y. Li, X. Wang, F. Xie, D. Chen, B. Ma and Y. Li (2019). "*Mesorhizobium huakuii* HtpG interaction with nsLTP AsE246 is required for symbiotic nitrogen fixation." Plant Physiology: pp.00336.02018.

ANNEXES

■ No BLAST Hits ■ Hit ■ Unkown Proteins

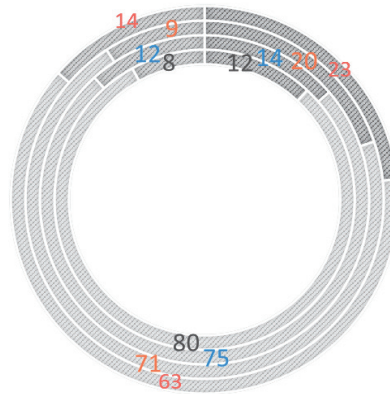


Figure S1: Gene Ontology (GO) analysis. Percent of distribution of genes giving a functional annotation (Hit), annotated as unknown protein and those yielding no BLAST in *F* mDyn/*F* supC up or down-regulated genes (Table S1 and S2).

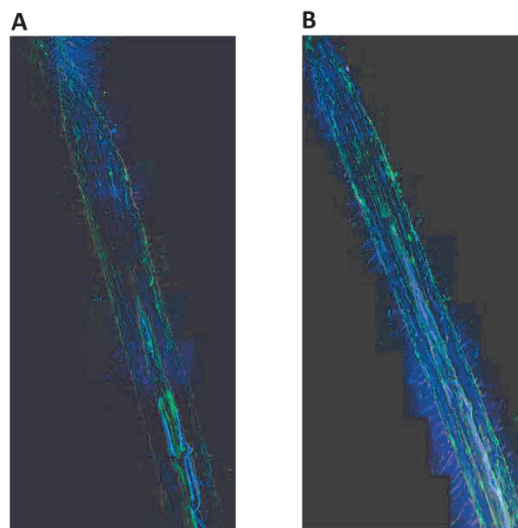


Figure S2: Negative control of immunolocalization on non- infected roots using antibodies anti-AgLTP24 (A) or rabbit serum obtained before intramuscular injection of AgLTP24 epitope (B). Blue: DAPI; red: autofluorescence; green: Alexa Fluor 488 dye anti-rabbit antibody (Life Technologies, Saint Aubin, France).

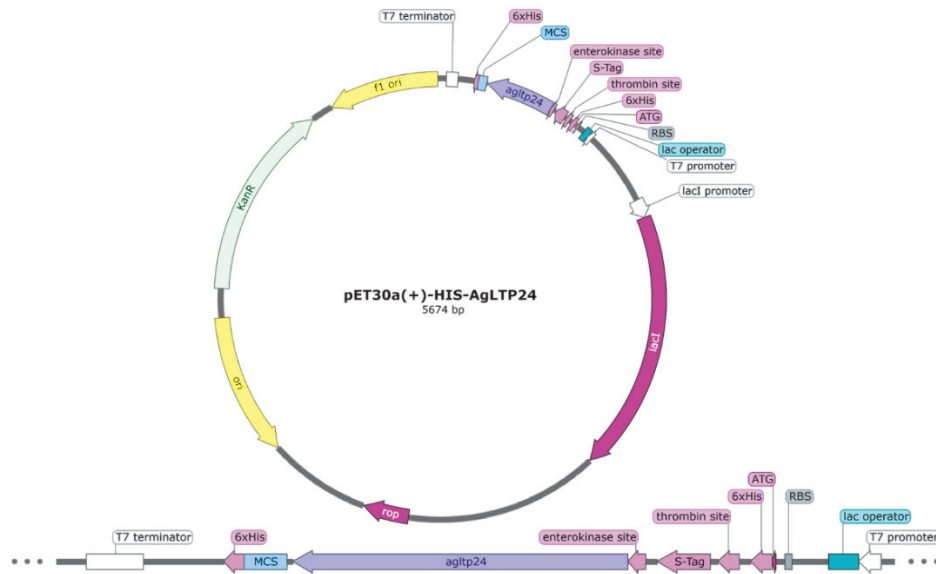


Figure S3: Genetic map of the plasmid used to express AgLTP24 in *E. coli*.

KanR: Kanamycin resistance coding sequence, MCS: multiple cloning sites, 6xHis: HisTag coding sequence, *agltp24*: AgLTP24 mature peptide coding sequence.

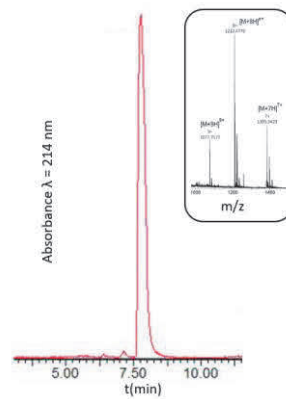


Figure S4: RP-UPLC chromatogram and ESI-HRMS mass spectrum of the purified folded AgLTP24 protein. $[M+9H]^+$ m/z 1077.7572; $[M+8H]^+$ m/z 1385.5429; $[M+7H]^+$ m/z 1212.4770; the theoretical monoisotopic m/z calculated for $C_{415}H_{676}N_{123}O_{126}S_9$: is 9686.7760.

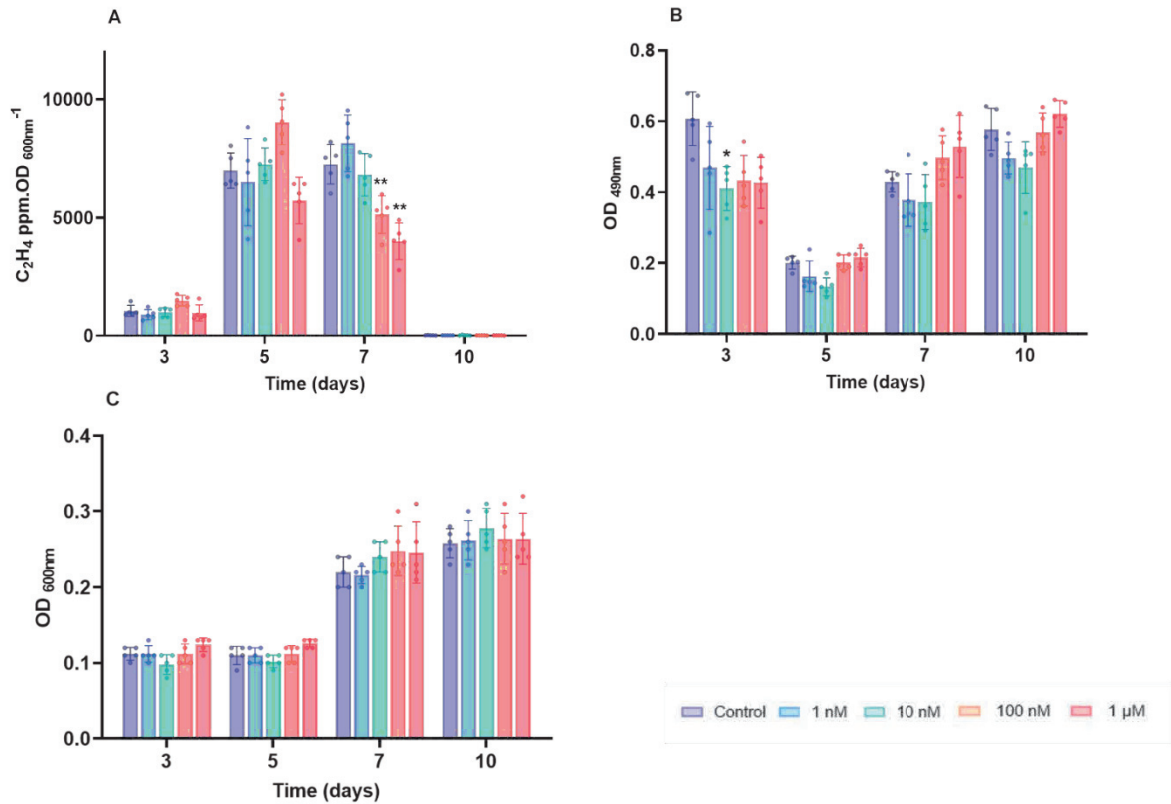


Figure S5 kinetic assay of *Frankia alni* ACN14a after addition of AgLTP24. Effects on (A) nitrogen fixation through ARA activity (B) respiratory activity through IRA and (C) growth as OD_{600nm} level. Data are expressed as mean values ± SD. Differences between means were assessed by the Mann Whitney test compared to control. Graphic representation and statistical analysis of results was conducted with GraphPad Prism version 9.2.0 (GraphPad software Inc; San Diego, CA, USA). **p* value < 0.05, ***p* value < 0.01.

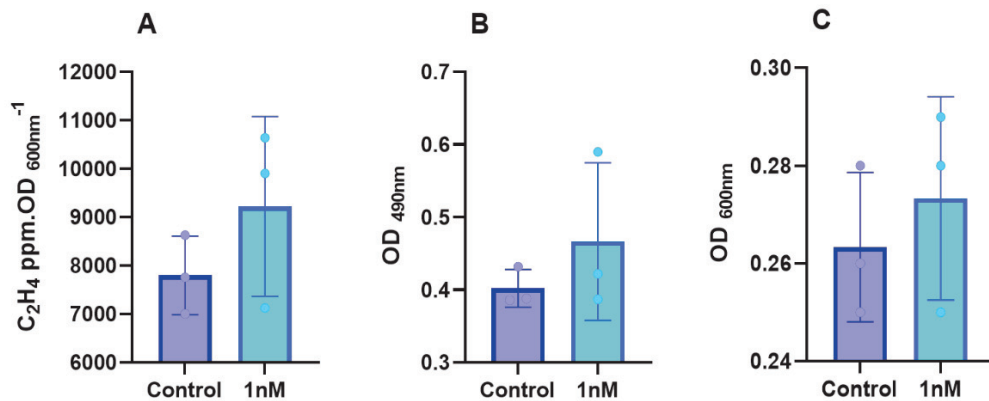


Fig. S1. Kinetics assay of *Frankia alni* ACN14a after supplementation of 1nM of AgLTP24.

Effects on **A.** nitrogen fixation through ARA activity **B.** respiratory activity through IRA and **C.** growth through OD_{600nm} . Data are expressed as mean values \pm SD. Data normality were tested by the Shapiro-wilk test and variances homogeneity were tested by the Fischer's test. The comparisons of means were assessed by the student t-test. Graphic representation and statistical analysis of results were conducted with GraphPad Prism version 9.2.0 (GraphPad software Inc; San Diego, CA, USA). *p value <0.05

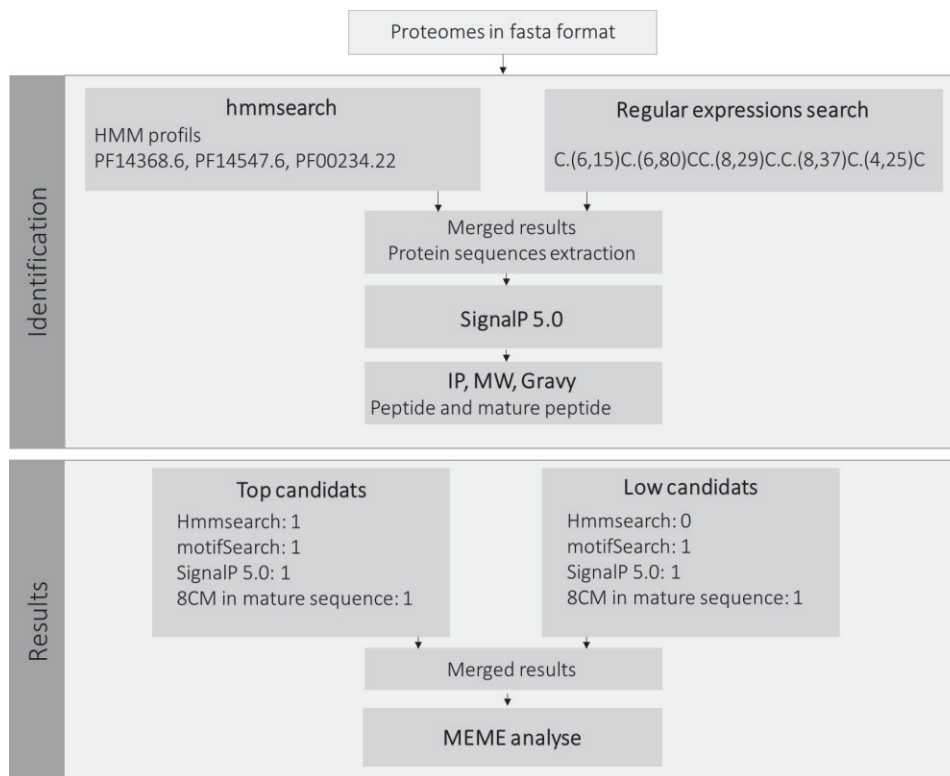


Figure S2: nsLTPFinder workflow

Fig. S2. Schematic representation of nsLTPFinder workflow.

The Python nsLTPFinder wrapper is described in material and method section.

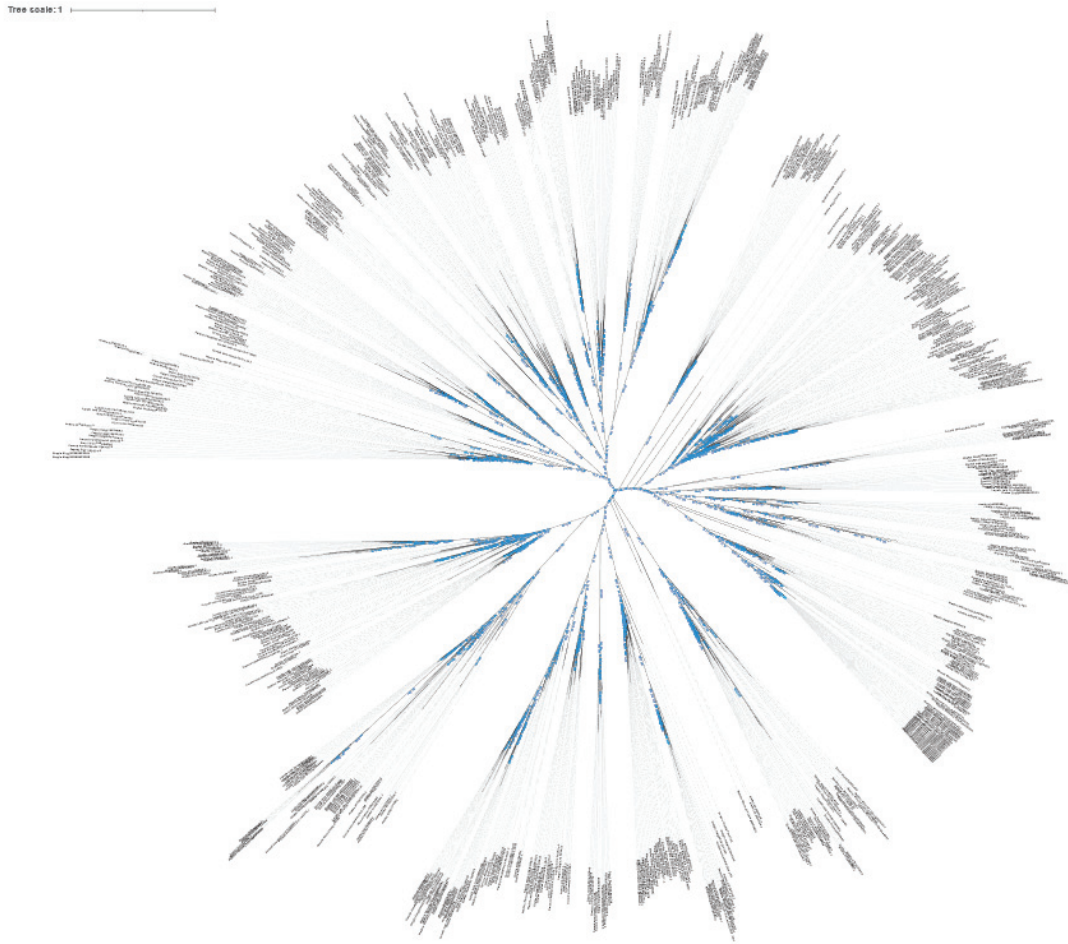


Fig. S3. Unrooted maximum-likelihood phylogenetic tree of nsLTPs with bootstrap values.

Unrooted maximum-likelihood phylogenetic tree of nsLTPs from RNF plants (see Table 3) was constructed with IQ-TREE.