



**HAL**  
open science

# Etude de l'interaction de *Medicago truncatula* avec *Fusarium oxysporum* et du rôle de l'acide salicylique dans les interactions de la plante avec différents agents pathogènes et symbiotiques

Montserrat Ramirez-Suero

## ► To cite this version:

Montserrat Ramirez-Suero. Etude de l'interaction de *Medicago truncatula* avec *Fusarium oxysporum* et du rôle de l'acide salicylique dans les interactions de la plante avec différents agents pathogènes et symbiotiques. Biologie végétale. Institut National Polytechnique de Toulouse - INPT, 2009. Français. NNT : 2009INPT015A . tel-04401072

**HAL Id: tel-04401072**

**<https://theses.hal.science/tel-04401072>**

Submitted on 17 Jan 2024

**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.



# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *Institut National Polytechnique de Toulouse*  
Discipline ou spécialité : *Interaction Plantes-Microorganismes*

---

Présentée et soutenue par *Montserrat RAMÍREZ-SUERO*  
Le *03 Décembre 2009*

**Titre :** *"Etude de l'interaction de Medicago truncatula avec Fusarium oxysporum et du rôle de l'acide salicylique dans les interactions de la plante avec différents agents pathogènes et symbiotiques"*

---

### JURY

*Dr. Chantal OLIVAIN*  
*Dr. Philippe REIGNAULT*  
*Prof. Simon HAWKINS*  
*Prof. Christophe ROUX*

*Université de Bourgogne, Dijon*  
*Université du Littoral, Calais*  
*Université de Lille*  
*UMR 5546, Toulouse*

*Rapporteur*  
*Rapporteur*  
*Examineur*  
*Examineur*

---

**Ecole doctorale :** *S.E.V.A.B*  
**Unité de recherche :** *Laboratoire Symbiose et Pathologie des Plantes (SP2)*  
**Directeur(s) de Thèse :** *Martina RICKAUER*

N° d'ordre:

**THÈSE**

présentée  
pour obtenir

**LE TITRE DE DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL  
POLYTECHNIQUE DE TOULOUSE**

**Spécialité:** Interactions Plantes-Microorganismes  
Ecole doctorale S.E.V.A.B

par

**Montserrat Ramírez Suero**

**"Etude de l'interaction de *Medicago truncatula* avec *Fusarium oxysporum* et du rôle de l'acide salicylique dans les interactions de la plante avec différents agents pathogènes et symbiotiques"**

<b>Dr. Chantal OLIVAIN</b>	Université de Bourgogne, Dijon	Rapportrice
<b>Dr. Philippe REIGNAULT</b>	Université du Littoral, Calais	Rapporteur
<b>Prof. Simon HAWKINS</b>	Université de Lille	Examineur
<b>Prof. Christophe ROUX</b>	UMR 5546, Toulouse	Examineur
<b>Prof. Martina RICKAUER</b>	INP-ENSAT, Toulouse	Directrice de thèse

**Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse (ENSAT)**



**Titre: " Etude de l'interaction de *Medicago truncatula* avec *Fusarium oxysporum* et du rôle de l'acide salicylique dans les interactions de la plante avec différents agents pathogènes et symbiotiques".**

## **Résumé**

Des études de l'interaction de la plante modèle des légumineuses *Medicago truncatula* avec des microorganismes pathogènes et symbiotiques ont été réalisées.

Tout d'abord un pathosystème fongique a été caractérisé: *M. truncatula* en interaction avec *Fusarium oxysporum* spp., champignon responsable des fusarioses, soit du flétrissement vasculaire ou de la pourriture racinaire chez de nombreuses plantes cultivées.

Deux lignées de *M. truncatula*: A17 et F83005.5 ont été identifiées comme sensible et tolérante respectivement à *F. oxysporum* f.sp. *medicaginis*, la *forma specialis* attribuée à la luzerne. De plus 9 souches de *F. oxysporum* isolées de différentes plantes hôtes et une souche non pathogène du sol ont été testées dans des expériences d'inoculation avec ces deux lignées. Elles ont toutes été capables d'induire les symptômes de la maladie chez *M. truncatula*. A l'aide d'une souche de *F. oxysporum* f.sp. *medicaginis* exprimant le gène rapporteur *GFP*, les étapes de colonisation de la racine par le champignon ont été caractérisées. Les observations en microscopie à fluorescence et microscopie confocale des racines d'A17 et F83005.5 ont indiqué un patron de colonisation inhabituel et ont montré que la tolérance de F83005.5 n'était pas corrélée à un mécanisme d'exclusion du cylindre central. Cependant, des différences dans l'expression de gènes de défense ont été détectées entre les deux lignées.

Dans la deuxième partie, le rôle de l'acide salicylique a été étudié. Les résultats d'expériences avec l'acide salicylique exogène ont indiqué que le prétraitement de racines avec ce composé pouvait conférer une protection aux plantes vis-à-vis de *F. oxysporum* f.sp. *medicaginis* et la bactérie phytopathogène *Ralstonia solanacearum*.

Avec l'objectif d'étudier le rôle de l'acide salicylique endogène dans les interactions avec les microorganismes, la transformation génétique de *M. truncatula* avec le gène *NahG* codant le salicylate hydroxylase a été entreprise. Cette enzyme dégrade l'acide salicylique en catechol. Seulement la lignée 2HA a pu être transformée et régénérée en plantes transgéniques. Ces plantes 2HA-NahG ont été inoculées avec des microorganismes pathogènes (*R. solanacearum*, *Verticillium albo-atrum*, *F. oxysporum* f. sp. *medicaginis*, *Colletotrichum trifolii* et *C. higginsianum*) ainsi qu'avec le champignon endomycorhizien *Glomus intraradices*. Les limitations expérimentales n'ont pas permis de conclure définitivement, mais indiquent qu'il est possible que la signalisation par l'acide salicylique ne soit pas impliquée dans les défenses de *M. truncatula* face à ces microorganismes pathogènes et symbiotiques.

**Mots clés:** Acide salicylique, colonisation, défense, embryogenèse, *Fusarium oxysporum*, GFP, *Medicago truncatula*, microscopie, racine, signalisation, transformation génétique.



**Title: “A study on the interaction between *Medicago truncatula* and *Fusarium oxysporum* and of the role of salicylic acid during the interactions of the plant with various pathogenic and symbiotic micro-organisms”.**

### **Abstract**

A study on the interactions of the plant model legume *Medicago truncatula* (*M.t.*) with pathogens and symbiotic microorganisms was undertaken.

First, a fungal pathosystem was characterized: *M. truncatula* in interaction with *Fusarium oxysporum* spp., the causal agent of Fusariosis, of Fusarium wilt and of root rot in many crop plants.

Two *M. truncatula* lines, A17 and F83005.5, were identified as susceptible and tolerant respectively to *F. oxysporum* f.sp. *medicaginis*, the *forma specialis* related to alfalfa. Besides, 9 strains of *F. oxysporum* isolated from different host plants and a non-pathogenic soil-borne strain were tested in inoculation experiments with both lines. All the strains were able to trigger disease symptoms in *M. truncatula*. Using the *F. oxysporum* f.sp. *medicaginis* strain transformed with the GFP reporter gene, the stages of the root colonization by the fungi were characterized. Fluorescence and confocal microscopy observations on A17 and F83005.5 roots showed an unusual pattern of colonization and showed that the F83005.5 tolerance was not related to an exclusion mechanism in the central cylinder. However, differences on defence gene expression were detected in both lines.

In the second part, the role of salicylic acid was studied. Results of experiments with exogenous salicylic acid indicated that prior treatment of roots with this compound may confer a protection towards *F. oxysporum* f. sp. *medicaginis* and the phytopathogenic bacterium *Ralstonia solanacearum*.

With the goal to study the role of endogenous salicylic acid, the genetic transformation of *M. truncatula* with the NahG gene was initiated. This gene codes for a salicylate hydroxylase which degrades salicylic acid to catechol. Only the highly embryogenic 2HA line could be transformed and regenerated into transgenic plants. These 2HA plants were inoculated with pathogenic microorganisms (*Ralstonia solanacearum*, *Verticillium albo-atrum*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *medicaginis* *Colletotrichum trifolii* and *C. higginsianum*) as well as the mycorrhiza fungus *Glomus intraradices*. Experimental limitations did not allow us to conclude definitely, but it seems possible that the salicylic acid signaling way may not be implicated in the defence of *M. truncatula* against these pathogenic and symbiotic microorganisms.

**Key words:** salicylic acid, colonization, defence, embryogenesis, *Fusarium oxysporum*, GFP, *Medicago truncatula*, *Fusarium oxysporum*, microscopy, root, signaling, genetic transformation.



## REMERCIEMENTS

Tout d'abord je voudrais remercier le Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) et La Secretaría de Relaciones Públicas du Mexique (SEP) par leur financement qui ont rendu possible la réalisation de cette thèse.

Je remercie ma directrice de thèse le Pr. Martina RICKAUER de m'avoir accueillie dans le laboratoire SP2 et d'avoir dirigé ce travail.

Merci aux membres du laboratoire SP2, un spécial à Carine TORREGROSA et Marie Françoise JARDINAUD pour leurs conseils scientifiques et pour leur soutien.

Un grand merci à mes anciens collègues du laboratoire SP2 qui m'ont apporté une grande aide technique et pour leur amitié : Annie PERRAULT, Marie-Josée TAVELLA et Philippe ANSON.

Merci aux stagiaires qui ont participé à certaines parties de ce travail de thèse : Dominique RABY, Anas KANSHOUR, Pierre PÉRICARD, Caroline LAURENDON, Guillaume FARBRE, Guillaume MATHIEU et Mäel BAUDIN, ainsi qu'à Damien FORMEY pour sa participation aux expériences de mycorhization.

Je remercie aussi au Dr. Mireille CHABAUD (LIPM), à Francis CARBONNE (UMR 5546) et au Dr. Jean KALLERHOFF (ENSAT) pour leurs conseils avisés.

Merci aux Dr. Chantal OLIVAIN, Dr. Philippe REIGNAULT, Prof. Simon HAWKINS et Prof. Christophe ROUX pour avoir accepté de juger ce travail et pour avoir enrichi ma thèse de leurs observations.

Merci beaucoup à mes parents Mario et Francisca, et ma sœur Cynthia Alejandra ; très importants pour moi et qui ont été avec moi pour m'encourager et me soutenir à tout moment. Merci aussi à mes amis; vous vous reconnaissez, et merci à Mr. Henri Plat et Mme Dominique PLAT, Mr. Claude et Mme. Andrée LAVERNHE et Mr. Lucien et Mme. Marie Pierre ROUX pour leur soutien et accueil chaleureux pendant mon séjour en France.



## ABBREVIATIONS

ACC	acide-1-aminocyclopropane carboxylique
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN	acide ribonucléique
<i>Avr</i>	avirulence
CFU	Colony-Forming Unit
CIM	Callus-Inducing Medium
<i>C.t.</i>	<i>Colletotrichum trifolii</i>
<i>Dmi</i>	<u>does</u> n't <u>make</u> <u>infections</u>
DO	Densité Optique
dpi	days post-inoculation
EDM	Embryo Development Medium
ET	éthylène
<i>Fom</i>	<i>Fusarium oxysporum medicaginis</i>
GFP	Green Fluorescent Protein
<i>G.i.</i>	<i>Glomus intraradices</i>
HR	Réponse hypersensible
ISR	résistance systémique induite
JA	acide jasmonique
MAMP	Microbe-Associated Molecular Patterns
MeJa	Méthyle Jasmonate
MS	milieu de Murashige et Skoog
<i>M.t.</i>	<i>Medicago truncatula</i>
Nfp	Nod Factor Perception
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDA	Potato Dextrose Agar
PDM	Plant Development Medium
PR	Pathogenesis Related
q-RT-PCR	quantitative real-time PCR
QTL	Quantitative Trait Loci
ROS	espèces réactives de l'oxygène



<i>R.s.</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>
SA	acide salicylique
SAR	résistance systémique acquise
<i>skI</i>	<u>s</u> ickle
<i>sunn</i>	<u>s</u> uper <u>n</u> umerary <u>n</u> odules
TTSS	système de sécrétion de type III
UHQ	Ultra haute qualité
<i>V.a.a</i>	<i>Verticillium albo- atrum</i>



<b>1. INTRODUCTION GÉNÉRALE</b>	<b>21</b>
<b>1.1. LES INTERACTIONS ENTRE LES PLANTES ET LES MICROORGANISMES</b>	<b>21</b>
1.1.1. Interaction non-hôte	23
1.1.2. Interaction hôte incompatible	23
1.1.3. Interaction hôte compatible	25
<b>1.2. TYPES DE MÉCANISMES DE DÉFENSE</b>	<b>27</b>
1.2.1. Défense Préformée	27
1.2.2. Défense Induite	29
<b>1.3. BASES GÉNÉTIQUES DE LA RÉSISTANCE</b>	<b>35</b>
1.3.1. Résistance gène-pour-gène	35
1.3.2. Résistance quantitative	37
<b>1.4. MÉCANISMES DE SIGNALISATION</b>	<b>41</b>
1.4.1. Perception	43
1.4.2. Transduction du signal	47
1.4.2.1. L'éthylène	49
1.4.2.2. L'acide jasmonique	51
1.4.2.3. L'acide salicylique	53
<b>1.5. <i>Medicago truncatula</i> – PLANTE MODÈLE DES LÉGUMINEUSES</b>	<b>55</b>
1.5.1. Les légumineuses	55
1.5.2. <i>Medicago truncatula</i>	57
1.5.3. Interactions plantes-microorganismes chez <i>M. truncatula</i>	61
1.5.3.1. Symbioses	61
1.5.3.2. Agents Pathogènes	65
<b>1.6. OBJECTIFS DE LA THÈSE</b>	<b>71</b>
<b>2.- ÉTUDE DE L'INTERACTION ENTRE <i>F. OXYSPORUM</i> ET <i>M. TRUNCATULA</i></b>	<b>73</b>
<b>2.1. INTRODUCTION</b>	<b>73</b>
2.1.1. Taxonomie	73
2.1.2. Biologie de <i>F. oxysporum</i>	75
	13



2.1.3. Les maladies causées par <i>F. oxysporum</i>	77
2.1.3.1. Le flétrissement vasculaire	79
2.1.3.2. La pourriture racinaire	83
2.1.4. Lutte contre la fusariose	83
2.1.5. Résistance contre la fusariose vasculaire	85
<b>2.2. RÉSULTATS</b>	<b>89</b>
2.2.1. <i>M. truncatula</i> est une plante hôte pour <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>medicaginis</i>	89
2.2.2. <i>M. truncatula</i> est sensible à différentes souches de <i>F.oxysporum</i>	93
2.2.3. Etude microscopique de la colonisation de la racine par <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>medicaginis</i>	97
2.2.4. L'expression de gènes de défense est modifiée chez <i>M. truncatula</i> après inoculation avec <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>medicaginis</i>	105
2.2.5. Des mutants de nodulation de <i>M. truncatula</i> sont modifiés dans leur sensibilité à <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>medicaginis</i>	107
<b>2.3. DISCUSSION</b>	<b>109</b>
<b>3. L'ACIDE SALICYLIQUE</b>	<b>127</b>
<b>3.1. INTRODUCTION</b>	<b>127</b>
3.1.1. Structure et synthèse	127
3.1.2. Rôle physiologique	129
3.1.3 Etudes avec des plantes NahG et mutantes affectées dans la voie SA	133
3.1.4. SA chez les légumineuses (symbiose et pathogénie)	135
<b>3.2. RÉSULTATS</b>	<b>139</b>
3.2.1. Effets d'un traitement par l'acide salicylique sur la sensibilité à deux agents pathogènes racinaires : <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>medicaginis</i> et <i>Ralstonia solanacearum</i>	139
3.2.1.1. Effet sur l'interaction <i>M. truncatula</i> – <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>medicaginis</i>	139
3.2.1.2. Effet sur l'interaction <i>M. truncatula</i> – <i>R. solanacearum</i>	141
3.2.2. Approche plantes transgéniques	145
3.2.2.1. Transformation génétique de <i>M. truncatula</i> avec le gène NahG	145
3.2.2.1.1. Essais infructueux	147
3.2.2.1.2. Transformation	163
3.2.2.2. Caractérisation de leur phénotype	171
3.2.2.2.1. Expression de la transgénése	171
3.2.2.2.2. Réponse à des microorganismes	173
3.2.2.2.2.1. <i>Colletotrichum trifolii</i>	173



3.2.2.2.2. <i>Verticillium albo-atrum</i>	175
3.2.2.2.3. <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>medicaginis</i>	177
3.2.2.2.4. <i>Ralstonia solanacearum</i> GMI 1000	181
3.2.2.2.5. <i>Glomus intraradices</i>	181
3.2.3.2.2. Dosage de l'acide salicylique	185
<b>3.3. DISCUSSION</b>	<b>187</b>
<b>4. CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES</b>	<b>199</b>
<b>5. MATÉRIELS ET MÉTHODES</b>	<b>205</b>
<b>5.1. MATÉRIEL BIOLOGIQUE ET CULTURE</b>	<b>205</b>
5.1.1. <i>Medicago truncatula</i>	205
5.1.2. Microorganismes	205
5.1.2.1. <i>Colletotrichum trifolii</i>	205
5.1.2.2. <i>Fusarium oxysporum</i>	209
5.1.2.3. <i>Verticillium albo-atrum</i>	209
5.1.2.4. <i>Ralstonia solanacearum</i>	211
5.1.2.5. <i>Glomus intraradices</i>	211
<b>5.2. BIOESSAIS</b>	<b>211</b>
5.2.1. Inoculations avec <i>Colletotrichum trifolii</i>	211
5.2.2. Inoculations avec <i>Fusarium oxysporum</i>	213
5.2.3. Inoculations avec <i>Verticillium albo-atrum</i>	213
5.2.4. Inoculations avec <i>Ralstonia solanacearum</i>	213
5.2.5. Inoculations avec <i>Glomus intraradices</i>	215
<b>5.3. MÉTHODES DE TRANSFORMATION GÉNÉTIQUE</b>	<b>217</b>
5.3.1. <i>Medicago truncatula</i>	217
5.3.1.1. Protocole de transformation de feuilles de Chabaud et al. (2003)	217
5.3.1.2. Autres protocoles de transformation	221
<b>5.4. MÉTHODES DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE</b>	<b>221</b>
5.4.1. Extractions d'ADN de <i>M. truncatula</i>	221
5.4.2. Extractions d'ARN	223
5.4.3. Transformation de bactéries	223
5.4.3.1. Préparation de cellules compétentes	223
5.4.3.2. Électroporation	225



5.4.4. PCR	225
5.4.5. q RT-PCR	225
<b>5.5. MÉTHODES D'OBSERVATION</b>	<b>227</b>
5.5.1. Microscopie des folioles inoculées par <i>C.t.</i>	227
5.5.2. Microscopie des racines inoculées avec <i>Fom-GFP</i>	227
5.5.3. Observation de la mycorhization sur racines	229
5.5.3.1.-Coloration à l'encre	229
5.5.3.2. Détermination du taux de mycorhization	231
<b>6. RÉFÉRENCES</b>	<b>233</b>
<b>7. ANNEXES</b>	<b>273</b>



# 1. INTRODUCTION GÉNÉRALE

## 1.1. LES INTERACTIONS ENTRE LES PLANTES ET LES MICROORGANISMES

Lors de leur cycle de vie, les plantes sont confrontées à des stress divers, de nature abiotique (chaleur, froid, sécheresse,..) et biotique (microorganismes, insectes ravageurs, herbivores). Elles ont développé des mécanismes adaptatifs vis-à-vis de ces facteurs de l'environnement. Ainsi, la plupart des plantes sont résistantes à la plupart des agents pathogènes avec lesquelles elles sont en contact. Elles possèdent une résistance naturelle aux agents pathogènes, herbivores et insectes à travers des barrières préformées et des mécanismes induits (Mauch-Mani et Métraux, 1998; Lamb *et al.*, 1989).

Les agents pathogènes de plantes peuvent être classés en deux catégories : ceux qui tuent leur hôte et se nourrissent de son contenu (nécrotrophes) et ceux qui ont besoin d'un hôte vivant pour se nourrir et compléter leur cycle de développement (biotrophes). Cette classification est indépendante du fait que l'infection peut conduire éventuellement à la mort de la cellule hôte.

Les champignons produisent des structures spécialisées comme les haustoria qui leur permettent de prélever des éléments nutritifs de la cellule hôte sans trop la perturber dans son fonctionnement. Les microorganismes pathogènes produisent des toxines et des enzymes de dégradation de la cellule végétale. Les insectes peuvent blesser les plantes par leur mastication et induire une réponse à la blessure.

Les plantes ne possèdent pas un système immunitaire mobile et adaptatif comme les animaux, mais elles ont développé dans leur évolution, une immunité innée au niveau de leurs cellules, ainsi que des signaux systémiques produits au site d'infection et capables de migrer dans la plante (Dangl et Jones, 2001).

Parmi les interactions plantes-microorganismes, il est possible de distinguer trois types d'interactions: non-hôte, hôte compatibles ou hôte incompatibles. Ils sont décrits dans les paragraphes suivants.



### **1.1.1. Interaction non-hôte**

Dans cette interaction le microorganisme potentiellement pathogène est incapable de pénétrer ou de reproduire et la plante n'est pas affectée par l'infection. Une des raisons de cette résistance peut être que la plante ne possède pas les éléments nécessaires pour une colonisation efficace par l'agent pathogène. La plupart des interactions entre les plantes et les agents pathogènes sont des interactions non-hôte.

Ainsi, la résistance non hôte est définie comme l'immunité d'une espèce présentée par la plante entière contre toutes les variantes génétiques de l'agent pathogène (Heath, 2000). La résistance non hôte pourrait dépendre de multiples mécanismes protecteurs que constituent les barrières constitutives et des réactions induites (Heath, 2000; Kamoun, 2001; Nürnberger *et al.*, 2004).

Ce type d'immunité, parfois limitée dans le temps, est très fréquente dans la nature mais n'est pas encore très bien connue en comparaison avec la résistance spécifique à la maladie chez certains géotypes de plantes hôtes qui sont habituellement sensibles.

### **1.1.2. Interaction hôte incompatible**

Une interaction est incompatible entre un hôte résistant et un agent pathogène avirulent même si l'espèce végétale est un hôte pour l'agent pathogène. La reconnaissance race-spécifique du microorganisme est le produit de l'incompatibilité génétique entre celui-ci et la plante. Cette forme d'immunité est déclenchée par une reconnaissance directe ou indirecte entre deux protéines : une qui est le produit d'un gène de résistance (R) de plante génotype-spécifique et l'autre qui est le produit d'un gène d'avirulence (Avr) de l'agent pathogène race-spécifique (Flor, 1971; Keen, 1990).

Dans cette interaction l'agent pathogène perd considérablement sa capacité à croître et se multiplier et souvent la plante produit une réponse hypersensible (HR) (Agrios 2005). Dans la HR associée à la résistance, on observe une mort cellulaire rapide des cellules en réponse à l'attaque par l'agent pathogène (Pontier *et al.*, 1998). Les cellules qui entourent



ces lésions nécrotiques deviennent complètement résistantes à l'infection; cette forme de résistance est appelée résistance localisée acquise (Fritig *et al.*, 1998). Ces réponses locales déclenchent souvent une résistance non spécifique dans toute la plante qui est connue sous le nom de résistance systémique acquise (SAR), laquelle donne une protection contre les infections provoquées par un large spectre d'agents pathogènes (Sticher *et al.*, 1997 ; van Loon, 1997, Fritig *et al.*, 1998).

### **1.1.3. Interaction hôte compatible**

L'interaction compatible se produit entre un hôte sensible ou de tolérance modérée et un agent pathogène virulent. Il n'y a pas d'implication de produits de gènes spécifiques des deux partenaires (gène R de la plante et Avr- du pathogène) dans ces interactions, et donc pas de reconnaissance spécifique du pathogène qui peut alors coloniser la plante (Agrios, 2005).

Néanmoins, la plante peut activer certains mécanismes de défense, induits principalement par des composés appelés MAMPs (Microbe-Associated Molecular Patterns) produits par des microorganismes, et ainsi limiter la croissance du pathogène (résistance partielle). Les réponses de défense (aussi appelées défenses basales) qui sont induites dans cette interaction modifient le degré de sensibilité de l'hôte et la plupart sont corrélées avec une résistance quantitative.



## 1.2. TYPES DE MÉCANISMES DE DÉFENSE

### 1.2.1. Défense Préformée

Parmi les mécanismes de résistance de la plante face aux agents pathogènes, des barrières physiques préformées de la plante (comme la cuticule des feuilles) empêchent l'entrée de l'agent pathogène dans les tissus de la plante. Par conséquent, l'agent pathogène s'il n'a pas les moyens de détruire ces barrières, doit recourir aux ouvertures naturelles (stomate et hydathodes, blessures) pour pénétrer dans la plante. Une fois que l'agent pathogène est rentré dans la plante, il doit persister à l'intérieur dans l'espace apoplastique. Cependant le pH bas, des enzymes de dégradation ou des composés antimicrobiens produits par la plante constituent une autre barrière que les agents pathogènes doivent surmonter. Des phénols, glycosides phénoliques, lactones non saturées, composés sulfuriques, saponines, glycosides cyanogéniques et glucosinolates sont des composés constitutifs des plantes qui ont aussi une activité antifongique (Mansfield, 1983 ; Osbourn, 1996). De plus, les cellules de la plante sont entourées par une paroi rigide que la plupart des microorganismes ne peuvent pas pénétrer.

Pour survivre dans la plante, accéder au cytoplasme et puiser des nutriments, les microorganismes ont développé des mécanismes qui leur permettent de surmonter ou inactiver les défenses préformées et dégrader la paroi (Göhre et Robatzek, 2008).

Un grand nombre d'agents pathogènes établissent un contact physique intime avec les cellules de la plante hôte : les nématodes et pucerons se nourrissent par l'insertion directe d'un stylet dans une cellule de la plante, à travers la paroi cellulaire. Certaines bactéries produisent un système de sécrétion de type III (Type III Secretion System: TTSS) qui forme une seringue moléculaire pénétrant à travers la paroi végétale et la membrane plasmique pour injecter des molécules appelées effecteurs dans le cytoplasme (Göhre et Robatzek, 2008; Mc Dowell et Simon, 2008). Certains champignons et oomycètes peuvent pénétrer dans les cellules de l'épiderme en formant des appressoria; ces structures avec une paroi épaisse mélanisée permettent la pénétration de l'hyphe à travers la paroi végétale par pression osmotique interne. Par la suite, des structures nourricières appelées haustoria



peuvent être formées, entourées par la membrane plasmique de la plante (Göhre et Robatzek, 2008; Jones et Dangl, 2006). La sécrétion d'enzymes de dégradation des polymères de la paroi par les microorganismes (enzymes pectolytiques, cellulases, xylanases, protéases ...) peut permettre la pénétration sans structures spécialisées. Tous ces structures et mécanismes permettent de surmonter les défenses préformées et contribuent à la virulence de l'agent pathogène.

### **1.2.2. Défense Induite**

En plus des barrières physiques et chimiques préformées, les plantes possèdent des systèmes de reconnaissance et de réponses de défense induites qui sont déclenchées immédiatement après le premier contact avec des molécules étrangères et sont renforcées par l'interaction prolongée avec les agents pathogènes (Göhre et Robatzek, 2008).

Les plantes ne possèdent pas un système immunitaire comme les animaux, mais elles ont une immunité innée pour reconnaître des agents pathogènes potentiels et induire des réponses de défense qui vont arrêter ou ralentir la croissance de l'agent pathogène (Jones et Dangl, 2006).

Dans le modèle décrit par Jones et Dangl (2006), l'immunité innée est constituée de deux niveaux apparus au cours de l'évolution, avec des amplitudes de réactions de défense différentes. Le premier niveau de défense est déclenché par la perception de motifs moléculaires associés aux microorganismes (MAMPs). Les MAMPs sont des structures moléculaires conservées lors de l'évolution, présentes uniquement chez les microorganismes et absentes chez les plantes, et qui jouent un rôle important dans la vie microbienne (Bolton, 2009). Parmi les MAMPs on compte la flageline et le facteur d'élongation EF-Tu bactériens ou des fragments de chitine ou glucane fongiques. Leur reconnaissance peut déclencher les réactions de défense de la plante d'un niveau modéré qui la feront résister au microorganisme. Cependant, au cours de l'évolution, les agents pathogènes ont développé des mécanismes qui suppriment la résistance déclenchée par les MAMPs à travers des protéines appelées effecteurs qui fonctionnent donc comme modulateurs de l'immunité de la plante. En conséquence la plante devient sensible. Le deuxième niveau de l'immunité

Tableau 1.- Familles de protéines PR (van Loon et van Strien, 1999; van Loon *et al.*, 2006).

Famille	Activité	Cible chez les pathogènes
PR-1	?	membrane
PR-2	$\beta$ 1,3-glucanase	glucane de la paroi cellulaire
PR-3	endochitinase	chitine de la paroi cellulaire
PR-4	endochitinase	chitine de la paroi cellulaire
PR-5	thaumatin-like	membrane
PR-6	Inhibiteur de protease	protéase
PR-7	endoprotease	?
PR-8	endochitinase	chitine de la paroi cellulaire
PR-9	peroxydase	*
PR-10	Rnase-like	?
PR-11	endochitinase	chitine de la paroi cellulaire
PR-12	défensine	
PR-13	thionine	
PR-14	protéine de transfert de lipide	
PR15	oxalate oxydase	
PR16	oxalate oxydase	
PR17	inconnu	
<b>Non classifié</b>	$\alpha$ -amylase Inhibiteur polygalacturonase (PGI)	glucane de la paroi cellulaire polygalacturonase

\* La peroxydase exerce une activité antimicrobienne indirecte en catalysant la liaison oxydative de protéines et des phénols dans la paroi cellulaire . Elle renforce ainsi la barrière physique.

innée est atteint quand la plante a développé la capacité de reconnaître les effecteurs directement ou indirectement, par des protéines de résistance (R). Il y a donc de nouveau activation de la défense, en réponse à la reconnaissance de l'effecteur, ce qui permet à la plante de résister à l'agression (Chisholm *et al.*, 2006, de Wit, 2007). Cette forme de résistance est souvent associée à la HR.

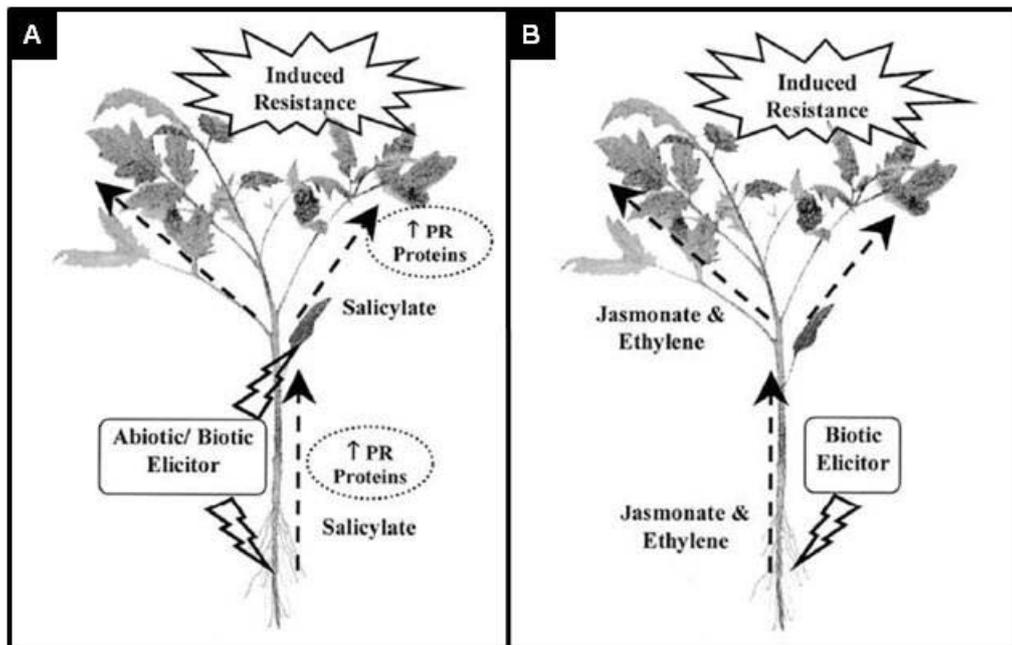
Différents composés participent à la mise en place de l'état de résistance de la plante (van Loon *et al.*, 2006) : des protéines associées à la défense, aussi appelées Pathogenesis-Related proteins (PR-proteins) et des métabolites secondaires qui peuvent s'accumuler localement et systémiquement.

Les PR-protéines sont classées d'après leurs caractères physicochimiques et fonctions. Il s'agit de protéines de petite taille, souvent sécrétées dans l'espace extracellulaire dans la plante. On distingue maintenant 14 classes (**Tableau 1**), et pour certaines comme les protéines PR-1 ou PR-5 la fonction n'a pas encore été découverte ou affirmée expérimentalement.

Les métabolites secondaires appelés phytoalexines ont des propriétés antifongiques. Leur synthèse est induite par activation de l'expression de gènes codant des enzymes de biosynthèse. La nature chimique de ces composés est spécifique d'une famille ou d'un groupe de plantes. Par exemple chez les légumineuses les phytoalexines sont des isoflavonoïdes, tandis que chez les solanacées on trouve des terpénoïdes.

D'autres métabolites secondaires antimicrobiens peuvent être constitutifs et exister dans les plantes sous des formes biologiquement inactives, comme les glucosides cyanogéniques et glucosinolates, qui seront activés en réponse à la blessure du tissu ou l'attaque par un agent pathogène. Cette activation s'effectue grâce à la libération d'enzymes de la plante lors de la rupture de l'intégrité de la cellule. VanEtten *et al.*, (1994) ont proposé le terme de phytoanticipines pour ce groupe de composés permettant de les distinguer des phytoalexines (Mansfield 1983; VanEtten *et al.*, 1994).

L'ensemble de ces mécanismes de défense induite permet à la plante de résister plus ou moins à l'agent pathogène qui les déclenche. Mais une conséquence de cette première



**Figure 1.- Comparaison des deux formes de résistance induite caractérisées chez les plantes.** La résistance systémique acquise **(A)** est induite par l'exposition des racines ou des tissus foliaires aux éliciteurs abiotiques ou biotiques, est dépendante du salicylate (acide salicylique) et associée à l'accumulation de protéines PR. La résistance systémique induite **(B)** est induite par l'exposition de racines aux souches de rhizobactéries stimulant la croissance des plantes, est dépendante des phytohormones éthylène et jasmonate (acide jasmonique), indépendante du salicylate et n'est pas associée à l'accumulation de protéines PR. Cependant, les deux réponses sont liées moléculairement, comme il a été démontré par leur dépendance vis-à-vis à une version fonctionnelle du gène NPR1 chez *Arabidopsis thaliana* (Vallad et Goodman, 2004) .

réaction peut être une protection ultérieure contre d'autres agresseurs. On parle alors de résistance induite.

Les deux formes les mieux définies de résistance induite sont la résistance systémique acquise (SAR) et la résistance systémique induite (ISR) (**Figure 1**). Ces deux types de résistance peuvent être différenciés par la nature de l'agent inducteur et les voies régulatrices impliquées (Pieterse *et al.*, 1996; Knoester *et al.*, 1999; Schenk *et al.*, 2000).

La SAR peut être déclenchée en exposant la plante aux microorganismes avirulents, non virulents ou bien artificiellement avec des produits chimiques comme l'acide salicylique, l'acide 2,6 -dichloro-isonicotinique (INA) ou l'acide benzol (1,2,3) thiadiazole-7-carbothioique s-méthyle ester (BTH) (Sticher *et al.*, 1997). Une HR est souvent observée localement, mais n'est absolument pas nécessaire. La SAR est associée à une accumulation de protéines de défense du groupe des PR protéines dépendant de l'acide salicylique. Selon la plante et l'éliciteur, un certain temps est nécessaire pour établir la SAR, qui correspond au temps nécessaire pour l'accumulation simultanée des protéines PR et de l'acide salicylique dans toute la plante (Cameron *et al.*, 1994; Uknes *et al.*, 1992; Ward *et al.*, 1991).

La résistance ISR est induite par le contact des racines de la plante avec des bactéries bénéfiques, les « Plant Growth Promoting Rhizobacteries, PGPR », notamment du genre *Pseudomonas* et *Bacillus*. On n'observe pas de synthèse de protéines de défense mais la plante est préparée à des attaques ultérieures et réagit plus rapidement par des mécanismes de défense, c'est le phénomène du « priming ». La signalisation à distance ne dépend pas de l'acide salicylique mais implique l'éthylène et le jasmonate (Pieterse *et al.*, 1998).



## 1.3. BASES GÉNÉTIQUES DE LA RÉSISTANCE

### 1.3.1. Résistance gène-pour-gène

La résistance gène pour gène est connue aussi sous le nom « résistance hôte spécifique », « résistance qualitative », ou « résistance race-cultivar-spécifique ». Elle est observée dans des interactions où l'espèce de la plante est sensible et l'agent pathogène virulent.

En 1950, Flor a défini les gènes de résistance (R) à partir d'une analyse génétique dans l'interaction entre le lin (*Linum usitatissimum*) et *Melampsora lini*, le champignon responsable de la rouille du lin. Il a observé que le caractère de résistance chez le lin était dominant et contrôlé par un gène (ou locus), et que le caractère d'avirulence chez le champignon (c'est-à-dire l'incapacité d'induire la maladie) était également dominant et contrôlé par un gène (ou locus).

Ces résultats ont été généralisés par la suite dans le concept gène-pour-gène :

Le locus du gène de résistance (R) est fonctionnellement polymorphe, il peut consister en allèles multiples qui reconnaissent différentes souches du même agent pathogène ou différentes espèces d'agents pathogènes. Par exemple le locus R du lin existe en 13 allèles fonctionnels, chacun reconnaît une autre race de *Melampsora lini*. Le locus du gène d'avirulence (Avr) est également fonctionnellement polymorphe, il peut consister en allèles multiples qui sont perçus par le produit du gène R correspondant (Mc Dowell et Simon, 2008). La résistance de la plante est le résultat de la présence simultanée des allèles du gène R chez celle-ci et du gène Avr chez le pathogène ; si l'un des deux est absent, le résultat sera la maladie (Flor, 1971).

Par la suite, des analyses moléculaires ont montré que les gènes Avr codent des effecteurs reconnus spécifiquement par des protéines R. Un effecteur est en fait une protéine d'avirulence si la protéine R de la plante le perçoit. Donc, les effecteurs peuvent promouvoir la virulence ou déclencher des réponses immunitaires s'ils sont détectés par la plante (Dangl et Jones, 2001). Cette reconnaissance peut se faire directement par contact



physique entre les deux molécules, ou indirectement. En effet, il a été démontré que certaines protéines R ne reconnaissent pas la protéine AVR mais le produit de l'interaction d'AVR avec une cible dans la cellule végétale. La protéine R agirait comme sentinelle dans cette interaction et protégerait la cible contre l'action de AVR ; ce modèle est appelé «guard hypothesis» ou «modèle de garde» (Dangl et Jones, 2001).

Comme l'indique le nom, cette résistance spécifique est conditionnée par un locus ou un petit nombre de loci, et par conséquent peut être introduite facilement par les sélectionneurs. Par contre, elle est moins durable car des petits changements dans l'allèle de R ou Avr peuvent abolir la perception de l'agent pathogène.

Dans les dernières années, plus de 40 gènes de résistance race-cultivar spécifiques ont été clonés (Hulbert *et al.*, 2001; Martin *et al.*, 2003). La plupart d'entre eux codent des récepteurs, ce qui est cohérent avec le modèle gène pour gène, qui prédit les fonctions des protéines de résistance hôte spécifique.

### **1.3.2. Résistance quantitative**

Le plus souvent, la résistance de la plante hôte est le résultat de l'action de plusieurs gènes et conduit à une nature quantitative de la résistance. Le phénotype résistant est le résultat de l'expression de multiples loci à caractère quantitatif (QTL) (Paran et Zamir, 2003), avec parfois des effets qui peuvent être additifs ou épistatiques (Young, 1996). On parle aussi de résistance horizontale ou multigénique, opposée à la résistance verticale dans laquelle une plante est soit résistante, soit sensible (cas de la résistance gène-pour-gène). Du fait de la participation de plusieurs gènes, cette résistance est plus durable dans le temps et préférée par les sélectionneurs.

Les premières analyses quantitatives ont reposé sur l'analyse statistique des phénotypes observés sur la descendance du croisement des lignées parentales (Sax, 1923). Avec cette stratégie, il a été possible de déterminer la partie héréditaire, le nombre des loci



impliqués, le degré de dominance et les interactions phénotype-environnement (Salvi et Tuberosa, 2005).

Depuis, la découverte des marqueurs moléculaires et les données issues de l'analyse des génomes ont permis une avancée considérable dans l'identification des gènes responsables de l'expression de la résistance quantitative et avec notamment l'apparition du concept de cartographie des QTL ou « QTL mapping » (Young, 1996). Ces avancées ont permis de localiser avec précision les loci responsables de la résistance aux maladies chez diverses plantes (Yano et Sasaki, 1997; Paran et Zamir, 2003). Chez les légumineuses, la quasi-totalité de la résistance aux maladies est de type quantitative (Geffroy *et al.*, 2000; Vaillau *et al.*, 2007; Djébali *et al.*, 2009), excepté chez *M. truncatula* dans le cadre de la résistance à *Colletotrichum trifolii* (Yang *et al.*, 2008).



## 1.4. MÉCANISMES DE SIGNALISATION

Dès que les plantes sont attaquées par un agent pathogène, elles activent une réponse de défense à plusieurs composantes. Cette activation est déclenchée par la perception de molécules élicitrices et médiée par des mécanismes moléculaires de signalisation.

Dans une résistance race-cultivar spécifique, la présence de l'agent pathogène est reconnue directement ou indirectement par des protéines codées par les gènes R de la plante reconnaissant spécifiquement les protéines Avr provenant de l'agent pathogène (Glazebrook, 2001). En revanche, dans la cadre de la résistance non hôte ou de compatibilité, des éliciteurs exogènes (provenant du parasite) ou endogènes (produits de dégradation de la paroi cellulaire hôte) sont reconnus.

La reconnaissance de ces molécules entraîne l'activation d'un réseau de signalisation complexe. Ceci implique notamment une augmentation sélective de la perméabilité de la membrane plasmique qui conduit à des flux de  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{H}^+$ ,  $\text{K}^+$  et  $\text{Cl}^-$  (Mc Dowell et Dangl 2000). Par exemple en réponse à l'éliciteur bactérien flageline on observe une alcalinisation rapide et transitoire du milieu dans des cultures cellulaires de tomate (Felix *et al.* 1999).

Des espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont produites, comme l'ion superoxyde ( $\text{O}_2^-$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) et le radical hydroxyle ( $\text{OH} \bullet$ ), par l'intermédiaire de la NADPH oxydase localisée dans la membrane plasmique et/ou des peroxydases localisées dans la membrane apoplastique (Somssich et Hahlbrock, 1998). Ces réactions transitoires initiales sont au moins partiellement pré-requises pour des étapes tardives d'une complète transduction du signal qui fait intervenir les phytohormones éthylène, jasmonate et acide salicylique et déclenchera la réponse de défense (Legendre *et al.*, 1992; Glazebrook, 2001).



### 1.4.1. Perception

La réactivité et donc la survie de la plante suite à l'attaque par les agents pathogènes dépend en premier lieu de la grande sensibilité de ses systèmes de perception.

La perception spécifique ou non des éliciteurs exo- ou endogènes induira la cascade de transduction du signal intracellulaire responsable à terme de la mise en place des défenses efficaces (Nürnberger, 1999).

A l'origine, le terme « éliciteur » était utilisé pour les molécules capables d'induire la production de phytoalexines. Actuellement, il est utilisé pour toute molécule capable d'induire des réponses de défense chez la plante (Ebel et Cosio, 1994; Nürnberger, 1999). Les éliciteurs sont classés dans deux catégories. Les éliciteurs généraux d'une part, qui sont capables de déclencher les réactions de défense chez les plantes hôtes et non-hôtes, et les éliciteurs race-spécifiques d'autre part, qui induisent les réponses de défense uniquement dans des cultivars spécifiques (Nürnberger, 1999). La transduction du signal de l'éliciteur implique une reconnaissance moléculaire et une interaction physique entre les molécules élicitrices et les récepteurs spécifiques de la plante (Yoshikawa *et al.*, 1993). Par ailleurs, les éliciteurs peuvent aussi être classés selon leur provenance. Ils peuvent être exogènes (originaires de champignons, bactéries, virus et herbivores), ou endogènes (libérés *in planta* par l'attaque du pathogène). Certaines molécules abiotiques (comme les ions des métaux et des composés inorganiques), capables d'induire des défenses chez les plantes sont aussi appelées éliciteurs.

Les éliciteurs les mieux décrits dans la littérature sont ceux provenant des bactéries et des champignons. Ils peuvent être de nature protéique, glucidique ou lipidique.

L'éliciteur général stimule les réponses de défense dans différentes espèces végétales. La nature non-spécifique des éliciteurs généraux est relative, puisque dans quelques cas les éliciteurs sont reconnus uniquement par un nombre limité de plantes (Shibuya et Minami, 2001). Les MAMPs comme par exemple la flageline, les fragments de chitine ou glucanes fongiques font partie de ce groupe.

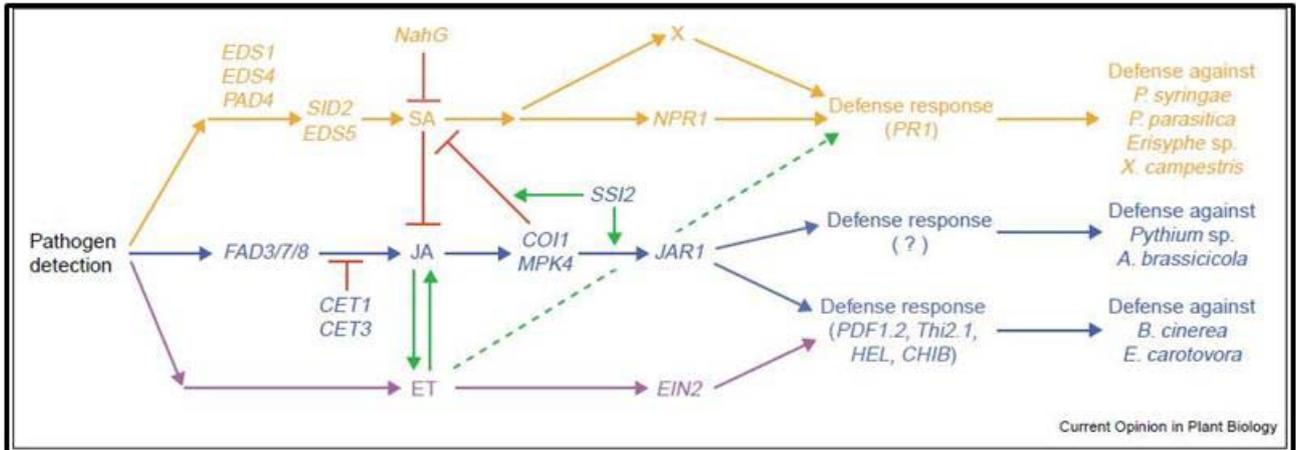
La caractérisation des réponses de l'éliciteur bactérien flageline a été la clé dans la compréhension de l'immunité de la plante hôte (Asai *et al.*, 2002; Felix *et al.*, 1999). Les



flagelines provenant uniquement de certaines bactéries Gram négatives ont une activité élicitrice, celles de microorganismes spécialisés comme *Rhizobium melioli* et *Agrobacterium tumefaciens* en sont dépourvues (Felix *et al.*, 1999). Des études ont montré que la flageline de *Pseudomonas syringae* provoque la production d'éthylène dans des cultures cellulaires de tomate (Felix *et al.* 1999), mais aussi le dépôt de callose et l'activation de gènes de défense chez *Arabidopsis* (Gómez-Gómez *et al.*, 1999). Des récepteurs membranaires ont été caractérisés et clonés pour plusieurs MAMPs (Zipfel, 2009).

L'éliciteur race-spécifique est le produit du gène d'avirulence (Avr) présent dans une race particulière d'un agent pathogène. Il induira la résistance uniquement chez une plante hôte qui possède le gène de résistance correspondant (Hammond-Kosack et Jones, 1997). Les éliciteurs ou déterminants d'avirulence peuvent être reconnus directement ou indirectement par les récepteurs de la plante ou par les protéines R cytoplasmiques ou localisées dans la membrane plasmique avant d'induire les voies de signalisation. Parmi les éliciteurs fongiques, le champignon *Cladosporium fulvum* sécrète de nombreuses protéines riches en cystéine dans l'apoplaste des feuilles de tomate (Luderer *et al.*, 2002). Plusieurs des gènes de ces éliciteurs ont été clonés et ont été identifiés comme gènes d'avirulence. Le transfert d'un de ces gènes (le gène Avr9) dans une souche virulente confère l'avirulence, rendant l'interaction incompatible chez les plantes contenant le gène de résistance correspondant Cf9 (Van den Ackerveken *et al.*, 1992).

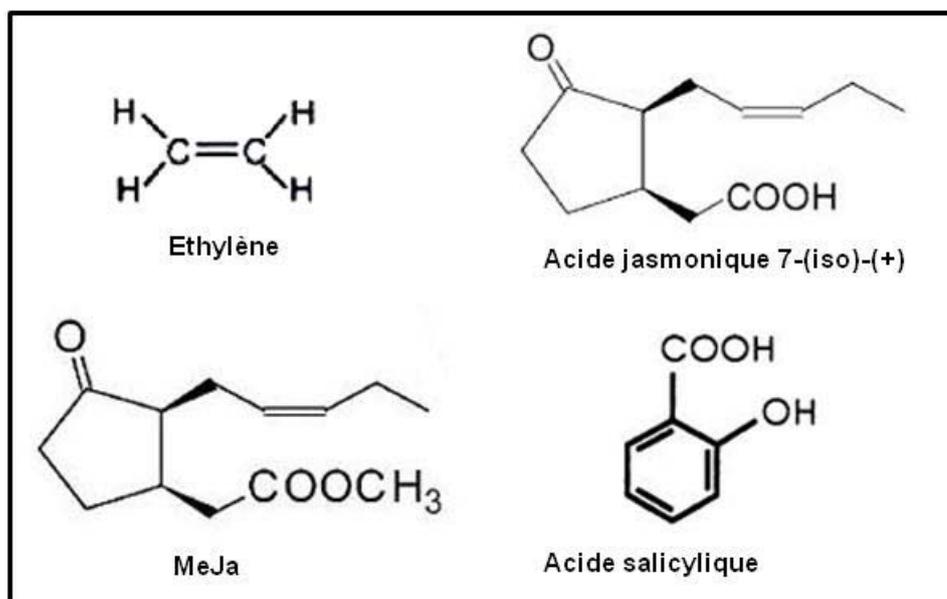
D'une manière générale, les éliciteurs activent les voies de signalisation correspondantes en induisant un changement dans la conformation du récepteur ou via l'activation de protéines kinases. Ceci entraîne des modifications au niveau de canaux ioniques, de protéines G, de lipases et de kinases, lesquels vont permettre ensuite de transmettre le signal en aval, aboutissant aux réponses de défense (Zhao *et al.*, 2005).



**Figure 2.-** Modèle des voies de signalisation du SA, JA et ET dans la défense contre les agents pathogènes chez *Arabidopsis thaliana* (Kunkel *et al.*, 2002). Positions des gènes (étudiés à travers des mutants chez *A. thaliana*) dans les différentes voies de signalisation. Les interactions régulées positivement parmi ces voies de signalisation sont indiquées avec des flèches vertes tandis que les antagonistes sont indiquées avec des lignes rouges. L'hypothèse que SSI2 module des nœuds de communication entre la signalisation des voies du JA et SA sont indiqués par les flèches courtes vertes.

Les flèches discontinues vertes indiquent les interactions positives potentielles parmi les voies du SA et ET.

**cet:** constitutive expressor of thionin, **CHIB:** CHITINASEB, **coi1:** coronatine insensitive1, **eds1:** enhanced disease susceptibility1, **ein2:** ethylene insensitive2, **ET:** ethylene, **fad:** fatty acid desaturase, **HEL:** HEVEIN-LIKE PROTEIN, **JA:** jasmonic acid, **jar1:** jasmonic acid resistant1, **mpk4:** mitogen-activated protein kinase4, **nahG:** salicylate hydroxylase, **pad4:** phytoalexin deficient4, **PDF1.2:** PLANT DEFENSIN1.2, **PR:** pathogenesis-related, **SA:** salicylic acid, **SAR:** systemic acquired resistance, **sid2:** SA induction deficient2, **ssi2:** suppressor of SA insensitivity2, **THI2.1:** THIONIN2.1.



**Figure 3.-** Structure de l'éthylène, acide jasmonique, méthyle-jasmonate (MeJa) et acide salicylique.

### 1.4.2. Transduction du signal

Parmi les molécules signaux présentes dans les interactions de plantes-pathogènes, les phytohormones telles que l'éthylène (ET), l'acide jasmonique (JA) et l'acide salicylique (SA) ont été démontrées jouer un rôle important dans la régulation des voies de transduction de signal.

La transduction du signal est le résultat d'un réseau très complexe de régulation et de connexion entre les différentes voies.

Le SA occupe le rôle majeur dans l'activation de défense contre les pathogènes biotrophes, tandis que le JA et ET sont préférentiellement associés à la défense contre les pathogènes nécrotrophes (Kunkel et Brooks, 2002; Turner *et al.*, 2002; Glazebrook, 2005; van Loon *et al.*, 2006).

Des nœuds de communication («cross-talk») entre la voie de signalisation médiée par l'ET et d'autres voies de signalisation hormone-dépendantes, comme l'auxine, l'acide abscisique, les cytokinines, gibbérellines et brassinostéroïdes ont été rapportés (Chen *et al.*, 2005).

Le terme de «cross-talk» est réservé à la communication entre deux voies de signalisation indépendantes et linéaires qui sont activées simultanément dans la même cellule. Par conséquent, les composants des deux voies de signalisation doivent être exprimés dans le même compartiment cellulaire (Noselli et Perrimon, 2000). Le « cross-talk » aide la plante à minimiser ses dépenses énergétiques et crée un réseau de signalisation flexible qui lui permettra d'ajuster sa réponse de défense aux envahisseurs rencontrés (Reymond et Farmer, 1998; Pieterse *et al.*, 2001; Kunkel et Brooks, 2002).

La **Figure 2** montre un schéma proposé de la communication entre les différentes voies de signalisation (ET, JA et SA) chez *Arabidopsis thaliana* (Kunkel *et al.*, 2002) et la **Figure 3** montre la structure de ces molécules.

Les voies de signalisation ET, JA et SA sont brièvement décrites ci-après.



#### 1.4.2.1. L'éthylène

L'éthylène (ET) est une phytohormone gazeuse impliquée dans la croissance et le développement de la plante. Il a un rôle dans plusieurs aspects du cycle de vie du végétal, comme la germination de graines, le développement des poils absorbants sur les racines et la maturation des fruits (Ecker, 1995).

L'éthylène est aussi un régulateur des réponses de la plante suite à un stress abiotique (blessure, hypoxie, ozone, sécheresse, basses températures) ou biotique suite à l'attaque par un agent pathogène (Wang *et al.*, 2002; Mattoo et Suttle, 1991; Abeles *et al.*, 1992).

Le précurseur de l'ET lors de sa biosynthèse est la S-adénosyl méthionine transformée en 1-acide carboxylique 1-aminocyclopropane (ACC) par la ACC synthase. L'ACC est ensuite transformé par l'action de l'ACC oxydase en éthylène, CO<sub>2</sub> et cyanide (Yang et Hoffman, 1984). L'expression des gènes d'ACC synthase et ACC oxydase a été démontrée induite chez les plantes après inoculation avec des agents pathogènes (van Loon *et al.*, 2006).

Le rôle de l'éthylène dans la défense des plantes peut être différent selon le type d'agent pathogène et l'espèce de la plante. En réponse à un pathogène nécrotrophe, l'éthylène en déclenchant des réponses de défense pourrait inhiber le développement de symptômes. En revanche, il pourrait augmenter la mort cellulaire provoquée par les pathogènes biotrophes (van Loon *et al.*, 2006). Par exemple, le mutant d'*Arabidopsis thaliana* insensible à l'éthylène 2 (ein2) montre une augmentation de la sensibilité à *Botrytis cinerea* (Thomma *et al.*, 1999) et *Erwinia carotovora* (Norman-Setterblad *et al.*, 2000) tandis qu'il affiche une meilleure résistance contre *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* ou *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Bent *et al.*, 1992).

Le rôle de l'éthylène comme régulateur dans la défense n'est pas encore tout à fait élucidé, mais il a été démontré que cette hormone induit préférentiellement les protéines PR basiques. Le jasmonate et l'éthylène s'associent dans la régulation de l'expression de

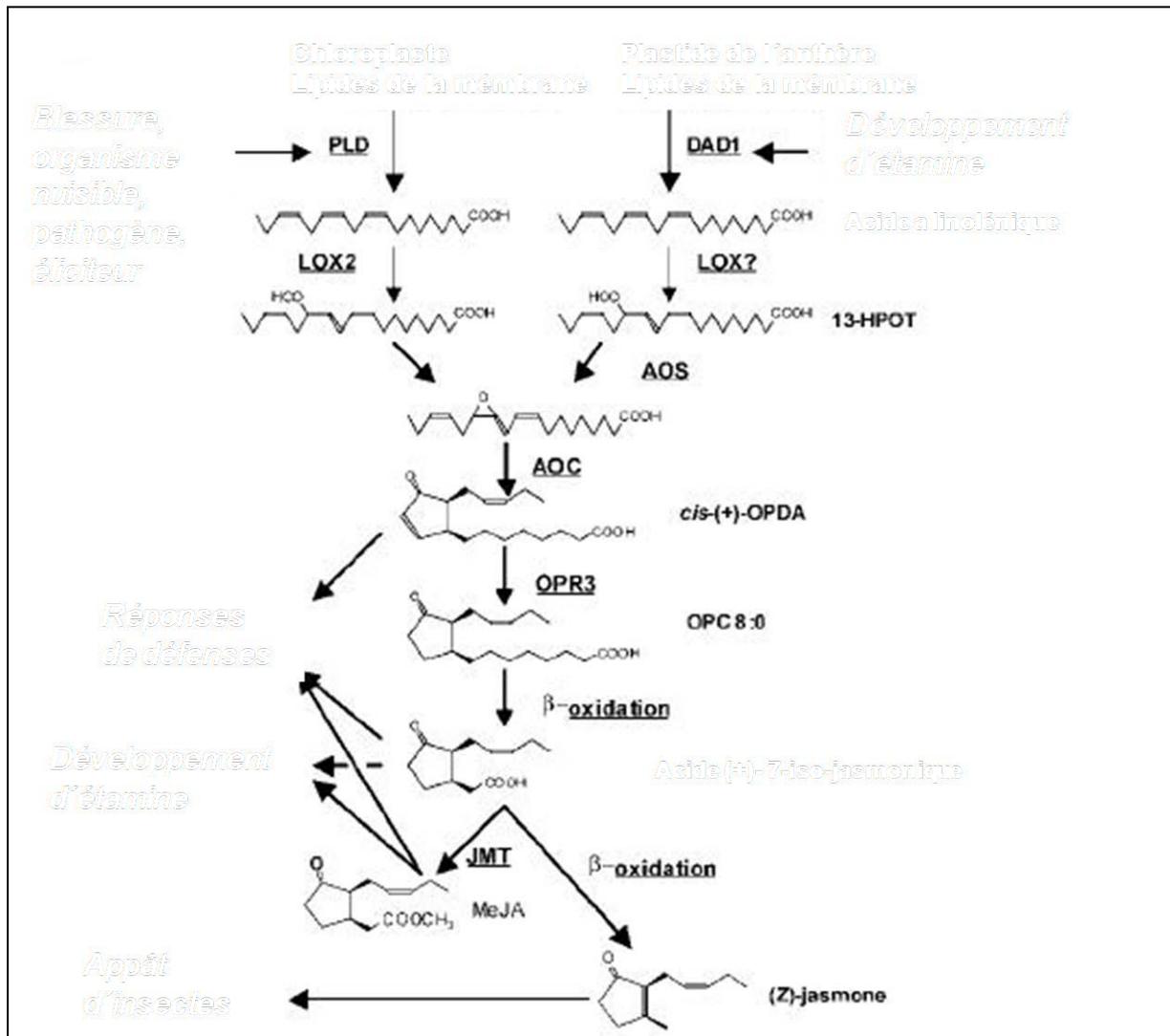


Figure 4.- Modèle de biosynthèse de jasmonates. Les abréviations des noms des enzymes sont soulignées; les abréviations des noms d'intermédiaires sont gras (Turner *et al.*, 2002).

nombreux gènes. Par exemple, certains gènes induits par le jasmonate ne sont pas induits chez les plantes incapables de produire ou détecter l'éthylène (Reymond et Farmer 1998).

#### **1.4.2.2. L'acide jasmonique**

L'acide jasmonique (JA) est une molécule signal dérivée d'acides gras. Il est impliqué dans plusieurs aspects de la biologie de la plante comme le développement du pollen et de la graine, la défense contre les blessures, l'ozone, les insectes et les agents pathogènes (Turner *et al.* 2002; Li *et al.* 2001).

La voie générale de la biosynthèse de JA débute à partir de l'acide linoléique (18 :3) qui est oxydé par la lipoxygénase. Cependant Weber *et al.*, (1997) ont proposé une voie alternative de biosynthèse à partir de l'acide hexadécatriénoïque (16 :3). La biosynthèse de l'acide 12-oxo-phytodienoïque (OPDA) à partir de l'acide linoléique a lieu dans le chloroplaste, lequel contient une grande quantité d'acides linoléiques estérifiés sous forme de glycérolipides et de phospholipides. L'acide linoléique serait libéré par la phospholipase A à partir des lipides de la membrane plasmique tout comme chez les mammifères (Turner *et al.*, 2002). La biosynthèse du JA implique des enzymes comme la lipase, lipoxygénase (LOX), allène oxyde synthase (AOS) et allène oxyde cyclase (AOC) (Schaller, 2001), **Figure 4**.

Le terme de jasmonate comprend les intermédiaires biologiquement actifs de la voie de biosynthèse de l'acide jasmonique (par exemple OPDA) ainsi que les dérivés biologiquement actifs comme le méthyl jasmonate volatil. Ces composés sont largement présents chez les plantes et affectent différents phénomènes physiologiques (Creelman et Mullet, 1997).

En 1992, Farmer et Ryan ont proposé que les jasmonates aient une fonction dans la défense suite à des observations d'une relation causale entre les blessures provoquées par des insectes herbivores, la formation de JA et l'induction de gènes d'inhibiteurs de protéases. Ces inhibiteurs interfèrent avec la digestion chez les insectes ce qui affecte leur développement. Il a été suggéré que les blessures provoquaient la libération d'acide



linoléique (LA), précurseur supposé de JAs, à partir de la membrane plasmique (Turner *et al.*, 2002).

La voie de signalisation du JA implique plusieurs évènements allant de l'induction de la biosynthèse de JA; la perception locale et à distance du JA, et l'intégration du JA dans les autres voies de signalisation comme le SA et l'ET (Turner *et al.*, 2002).

Un des meilleurs exemples de communication croisée du signal associé à la défense est l'interaction entre les voies de JA et SA (Kunkel et Brooks, 2002; Glazebrook *et al.*, 2003; Beckers et Spoel, 2006; Koornneef et Pieterse, 2008; Spoel et Dong, 2008). Plusieurs études ont démontré que le SA endogène est un antagoniste des défenses JA-dépendantes (Peña-Cortés *et al.*, 1993; Gupta *et al.*, 2000; Spoel *et al.*, 2003).

### **1.4.2.3. L'acide salicylique**

L'acide salicylique (SA) est synthétisé dans les plantes en réponse à l'attaque de divers pathogènes et constitue un élément clef pour l'établissement de la résistance locale et la SAR (Loake et Grant, 2007). Il est impliqué dans plusieurs réponses aux stress biotiques (infection par les pathogènes) et abiotiques (excès de radiation UV, des niveaux d'ozone accrus) et qui interagissent avec les espèces réactives d'oxygène dans un réseau de signalisation encore pas bien élucidé. Le SA module aussi la mort cellulaire associée à la réponse hypersensible, l'activation de la peroxydation des lipides et la génération de radicaux libres (Dempsey *et al.*, 1999; Shah et Klessig, 1999).

Le SA et ses analogues fonctionnels comme benzothiadiazole S-méthyle-ester (BTH) et l'acide 2,6-dichloroisocotinique (INA) induisent des gènes PR en permettant une meilleure résistance contre les pathogènes (virus, bactéries, oomycètes et champignons) chez les plantes dicotylédones (Ryals *et al.*, 1996; Shah et Klessig, 1999) et monocotylédones (Morris *et al.*, 1998 ; Gorchach *et al.*, 1996). Le BTH est commercialisé comme stimulateur de défense des plantes sous le nom de Bion®.

Les aspects de la voie du SA seront plus détaillés dans le Chapitre 3.



## **1.5. *Medicago truncatula* – PLANTE MODÈLE DES LÉGUMINEUSES**

### **1.5.1. Les légumineuses**

Les légumineuses (Fabacées) sont une grande et diverse famille qui comprend des plantes herbacées annuelles jusqu'à des arbres pérennes. Ces plantes sont des composantes essentielles dans les écosystèmes terrestres dû à leur capacité de fixer l'azote atmosphérique dans les nodules symbiotiques, et elles sont donc d'excellents colonisateurs des environnements pauvres en azote.

Depuis le début de la civilisation, les graines et gousses (fruits spécifiques des légumineuses) ont joué un rôle très important dans l'alimentation humaine, car elles constituent une source de protéines (légumineuses protéagineuses : le pois, la féverole, le haricot, le pois chiche, les lentilles) et de lipides (légumineuses oléo-protéagineuses : le soja et l'arachide). Les légumineuses sont aussi une source importante de fourrage pour les animaux (luzerne, trèfle).

Les légumineuses avec plus de 18,000 espèces sont la troisième plus grande famille de plantes supérieures et la deuxième plus importante pour les pâturages d'intérêt agricoles, après les poacées (autrefois appelées graminées) qui incluent la canne à sucre et les céréales tels maïs, riz, blé, orge, avoine, seigle et millet (Young *et al.*, 2003 ; de Faria *et al.*, 1989).

La capacité de différencier des nodules sur leurs racines hébergeant des bactéries symbiotiques capables de fixer l'azote a été démontrée pour 88% des espèces examinées jusqu'à ce jour (de Faria *et al.*, 1989). Le partenaire bactérien de cette symbiose, appartenant à la famille des Rhizobiacées réduit l'azote à l'intérieur des nodules grâce à la nitrogénase. L'activité de cette enzyme est inhibée par l'oxygène d'où la présence dans les nodules fonctionnels de la leghémoglobine régulant les taux d'oxygène libre. L'intérêt agronomique des légumineuses a son origine dans cette fixation symbiotique de l'azote qui leur permet de produire en abondance des protéines en l'absence de fertilisation azotée.



Dans une politique désireuse de promouvoir l'agriculture durable et de réduire les nitrates, la culture de ces plantes trouve un regain justifié.

Un obstacle à leur culture constitue néanmoins la sensibilité à des maladies et un manque à la fois en traitements phytosanitaires efficaces et en sources de résistance.

### **1.5.2. *Medicago truncatula***

Parmi les légumineuses *Medicago truncatula*, proche de la luzerne cultivée (*Medicago sativa*) présente un intérêt particulier. En plus de sa parenté avec la luzerne, qui est la légumineuse fourragère économiquement la plus importante au monde, *M. truncatula* a un intérêt agronomique propre, puisqu'elle est utilisée comme plante fourragère dans un grand nombre de régions dans le monde en incluant la zone méditerranéenne, l'Afrique du Sud et l'Australie (Crawford *et al.*, 1989).

Il y a 20 ans des chercheurs ont commencé à proposer *M. truncatula* comme plante modèle des légumineuses (Barker *et al.*, 1990). *M. truncatula* est une espèce sauvage annuelle du pourtour méditerranéen également cultivée comme légumineuse fourragère. Des populations et lignées collectionnées autour de la Méditerranée représentent un réservoir de ressources génétiques d'adaptation à des conditions environnementales variées. Des caractéristiques comme son petit génome (~500 Mbp - Bennett et Leitch, 1995), la diploïdie ( $2n = 16$ ), l'autogamie et un temps de régénération court (environ trois mois dans des conditions les plus favorables) ont contribué à en faire la plante modèle des légumineuses, pour laquelle les ressources ont été développées plus vite et à plus grande échelle (<http://www.medicago.org/genome>) que pour l'autre plante modèle, le lotier (*Lotus japonicus*). Le séquençage complet de son génome est annoncé pour fin 2009.

Jusqu'aux années 1990s, il n'existait que deux plantes modèles. La première plante modèle *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh; de la famille des crucifères, elle a permis des progrès considérables dans la connaissance des bases moléculaires de la biologie des plantes. Le séquençage de son génome (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000), a permis



d'avoir des outils de génétique et de génomique disponibles pour accélérer la recherche. *Arabidopsis thaliana* a été choisie grâce à sa petite taille, son petit génome nucléaire, son court temps de génération et sa grande production de graines. De plus elle pouvait être transformée facilement. La deuxième plante modèle fut le riz pour les monocotylédones (céréales) qui sont le groupe des plantes cultivées économiquement le plus important..

Cependant, ces deux espèces ne sont pas suffisantes pour représenter toute la diversité biologique du monde végétale (Adam, 2000). Il fallait surtout trouver une plante représentative d'un des taxons végétaux les plus importantes : les légumineuses. Ni *Arabidopsis* ni le riz ne font des symbioses fixant l'azote atmosphérique. De plus, contrairement à la majorité des espèces végétales, *Arabidopsis* est incapable d'établir une symbiose mycorhizienne.

*M. truncatula* comme plante modèle permet d'apporter un outil de recherche pour mieux comprendre la biologie des légumineuses et en particulier la génétique moléculaire de deux associations plantes-microorganismes importantes : la symbiose *Rhizobium*-légumineuses (Cook *et al.*, 1995) et la symbiose avec des mycorhizes arbusculaires-vésiculaires (Harrison et Dixon, 1994). Elle permet également de comparer les mécanismes qui lui permettent de former les relations symbiotiques avec ceux qui la défendent contre des agents pathogènes.

La luzerne, le pois et le soja figurent parmi les légumineuses les mieux caractérisées génétiquement avec de nombreux marqueurs génétiques, des cartes génétiques bien développées et d'autres d'outils génomiques. Cependant, ces espèces ne pouvaient pas être utilisées pour faire des études de génétique moléculaire à cause de leurs caractéristiques défavorables comme un génome de grande taille, une ploïdie complexe, de l'allogamie et des difficultés à être transformées. Pour cette raison *M. truncatula* et *Lotus japonicus* ont été proposées comme plantes modèles et elles sont actuellement utilisées par de nombreux laboratoires dans le monde (Barker *et al.*, 1990; Cook *et al.*, 1997; Harrison, 2000; Frugoli et Harris, 2001; Udvardi, 2001).

*M. truncatula* et *Lotus japonicus* ont des caractéristiques génétiques similaires mais leurs nodules se développent de façon différente. De ces deux légumineuses, *M. truncatula*



est la plus proche phylogénétiquement des légumineuses cultivées en Europe, puisque *M. truncatula* appartient au groupe des Galégoïdes renfermant les Trifoliées (luzernes, trèfles), Viciées (pois, féveroles, lentilles, vesces) et Cicérées (pois chiche).

Beaucoup d'espèces de la famille des légumineuses sont difficiles à régénérer, ce qui constitue un handicap pour des études fonctionnelles par transformation génétique. Barker *et al.* (1990) ont réalisé des études de transformation de *M. truncatula* Gaertn cv Jemalong avec *Agrobacterium tumefaciens*, et sa capacité de régénération a été un argument en faveur du rôle de *M. truncatula* comme plante modèle. Les travaux de Nolan *et al.* (1989) ont permis d'augmenter la capacité de régénération de *M. truncatula* cv. Jemalong par des cycles de culture *in vitro* et de régénération, donnant la lignée Jemalong 2HA (Rose *et al.*, 1999). La lignée de référence A17 est également obtenu à partir de la variété Jemalong.

Ainsi, *M. truncatula* est maintenant bien établie comme plante modèle pour les légumineuses, permettant l'étude des symbioses de fixation d'azote et de mycorhizes, mais aussi des stress biotiques, de la biologie de la plante et de la réponse aux agents pathogènes.

### **1.5.3. Interactions plantes-microorganismes chez *M. truncatula***

#### **1.5.3.1. Symbioses**

Les bactéries symbiotiques du genre *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* et *Sinorhizobium* connues collectivement comme Rhizobia sont capables d'induire dans leurs hôtes (légumineuses) la formation de nodules. Les nodules ou nodosités qui sont le plus souvent formé sur les racines, sont des organes spécialisés dans lesquelles les bactéries capables de fixer l'azote atmosphérique sont hébergées (Mylona *et al.*, 1995; Schultze et Kondorosi, 1998).

Les bactéries induisent des réponses symbiotiques par des molécules signal de nature lipo-chito-oligosaccharidiques sécrétées (les facteurs Nod) dans leurs racines hôtes. Ces réponses vont de la courbure des poils absorbants à l'induction de divisions cellulaires dans



les couches internes du cortex et la formation d'un nodule, et sont associées à l'induction de gènes spécifiquement exprimés lors de cette symbiose (Spaink, 2000). La production de facteurs Nod spécifiques de souche et leur perception par les plantes sont à la base de la spécificité étroite dans cette interaction. Dans le cas de la symbiose mycorhizienne l'existence de facteurs Myc est suggérée mais les molécules n'ont pas encore été purifiées et identifiées (Olah *et al.*, 2005). Contrairement à la symbiose fixatrice d'azote, ce type de symbiose n'est pas très spécifique et une espèce fongique peut coloniser un grand nombre d'espèces végétales.

Des mutants de *M. truncatula* déficients dans la symbiose avec *Sinorhizobium meliloti* ou des champignons mycorhiziens arbusculaires (AM) ont été isolés et caractérisés. Certains des gènes mis en évidence, comme les gènes SYM (*Medicago truncatula* symbiotic gene) sont importants dans les deux types de symbioses. Par exemples les gènes DMI1, DMI2 et DMI3 (pour Doesn't Make Infections) et le gène SUNN sont impliqués dans la signalisation des facteurs Nod et Myc (Ané *et al.* 2004; Stacey *et al.* 2006). Leur mutation a permis de leur attribuer un rôle dans la mise en place de la mycorhization (dmi1, dmi2/Mtsym2, dmi3/Mtsym13) ou de sa régulation (sunn, hypermycorrhizal phénotype) mais aussi dans la symbiose (Morandi *et al.*, 2005). Pour certains gènes on connaît leur fonction, et des orthologues ont été identifiés chez le lotier et d'autres légumineuses (Parniske, 2004). Par exemple DMI1, DMI2 et DMI3 codent pour un canal ionique, une récepteur-kinase et une protéine kinase calcium-calmoduline dépendante, respectivement. Les analogies entre nodulation et mycorhiza vont au-delà des premières étapes de signalisation, comme l'a montré l'induction d'un gène de noduline, ENOD11, lors de la mycorhization (Chabaud *et al.*, 2002). Parmi les gènes spécifiques d'un type de symbiose on peut citer le transporteur de phosphate MtPT4 qui est indispensable pour l'acquisition de phosphate libéré par le champignon AM (Harrison *et al.*, 2002; Javot *et al.*, 2007).

Chez *M. truncatula* la formation des arbuscules par le champignon AM commence dans les couches de cellules du cortex, près du tissu vasculaire. Quelques champignons AM (comme *Glomus intraradices*) développent aussi des vésicules à l'intérieur des racines. Puis une fois que les hyphes et les arbuscules sont développés dans les racines, le champignon



émet un hyphes (« extra-radical ») pour se développer dans le sol. Ce mycélium externe participe à l'acquisition de nutriments, l'envahissement d'autres racines et la formation de spores (Gianinazzi-Pearson, 1996; Parniske, 2004).

La croissance de l'hyphes et l'activité transcriptionnelle des champignons AM sont stimulées par la présence de strigolactones et d'autres exsudats des plantes hôtes (Buee *et al.*, 2000 ; Besserer *et al.*, 2006). Les gènes de fonction prédite dans la transduction du signal chez *M. truncatula* sont induits en même temps que la formation de l'appressorium a lieu à la surface de la racine (Genre *et al.*, 2005). Un rôle du JA a été reporté dans les interactions mycorhiziennes. La colonisation de *M. truncatula* par *G. intraradices* induisait la production de JA endogène, et la suppression d'une enzyme de la voie de biosynthèse du JA réduisait le taux de JA et de la mycorhization (Isayenkov *et al.*, 2005).

### **1.5.3.2. Agents Pathogènes**

*Medicago truncatula* est aussi un très bon modèle pour étudier l'interaction avec des agents pathogènes. Notamment l'existence de croisements entre des lignées avec phénotypes contrastés et la disponibilité de lignées recombinantes issues de ces croisements, a été exploitée pour cartographier des loci de résistance.

*M. truncatula* est une plante hôte pour certains nématodes et des comparaisons entre la signalisation dans le cas de symbioses et celle dans le cas de l'interaction avec les nématodes ont montré des points communs (Mathesius, 2003). Les nématodes RKN (Root knot nematodes) induisent la formation d'énormes cellules dans le cylindre vasculaire où ils habitent. Il a été reporté que la signalisation de ces nématodes dans la racine peut être influencée par les mutations dans les gènes de récepteurs des facteurs Nod (Bird 2004; Weerasinghe *et al.*, 2005).

Dans les interactions avec différents pucerons, des gènes et loci de résistance ont été identifiés (Klingler *et al.*, 2005; Stewart *et al.*, 2009). Des interactions avec plusieurs microorganismes pathogènes ont été décrites à ce jour. Parmi les champignons causant des



maladies des parties aériennes de la plante, on peut citer *Colletotrichum trifolii*, *Botrytis cinerea*, *Uromyces striatus*, et *Erysiphe pisi* (Torregrosa *et al.*, 2004; Stuteville et Erwin 1990; Huang *et al.*, 2000; Kemen *et al.*, 2005; Ameline-Torregrosa *et al.*, 2006). Des microorganismes telluriques comme *Aphanomyces euteiches*, *Phytophthora medicaginis*, *Phymatotrichopsis omnivora*, responsables de pourritures racinaires, et la bactérie *Ralstonia solanacearum* responsable du flétrissement vasculaire chez *M. truncatula* ont également été étudiés (Nyamsuren *et al.*, 2003; Colditz *et al.*, 2005; Salzer *et al.*, 2000; Uppalapati *et al.*, 2009; Vaillau *et al.*, 2007).

Ellwood *et al.*, (2001, 2004, 2005a et 2005b) dans un travail de screening de la collection australienne de *Medicago* spp avec 25 agents pathogènes foliaires comme *Ascochyta*, *Botrytis* et *Colletotrichum*, des pathogènes des tiges de plantes comme *Phoma* et de pathogènes de racines comme *Fusarium* et *Rhizoctonia*, ont montré que *M. truncatula* peut être un bon hôte des champignons nécrotrophes.

Des interactions avec deux agents pathogènes racinaires et un pathogène foliaire sont plus détaillées ici.

L'interaction avec l'oomycète ***Aphanomyces euteiches*** a été caractérisée par des approches transcriptomiques, protéomiques et génétiques. Des QTLs de résistance différents ont été détectés dans les lignées A17 et DZA45.5 (Pilet-Nayel *et al.*, 2009 ; Djébali *et al.*, 2009). Chez la lignée résistante A17, il a été démontré que l'oomycète n'arrivait pas à coloniser le cylindre central et que la réponse défensive incluait l'accumulation de lignine et des composés phénoliques solubles autour du péricycle (Djébali *et al.*, 2009). De nombreux gènes parmi lesquels on trouve des gènes de PR-protéines, sont induits dans les racines de A17 après inoculation par le pathogène (Nyamsuren *et al.*, 2003 ; Colditz *et al.*, 2005). Le rôle de PR-protéines dans cette interaction a été démontré par des expériences de RNAi. Le silencing du gène de PR-10- like protéines a été compensé par une augmentation de la production d'autres protéines PR et a augmenté la tolérance de la plante à *A. euteiches* (Colditz *et al.*, 2005).

Les travaux du laboratoire ont été les premiers à caractériser l'interaction de *M. truncatula* et ***Ralstonia solanacearum*** (Vaillau *et al.*, 2007). Cette bactérie a été décrite



originellement par Smith (1896) comme l'agent du flétrissement bactérien chez les solanacées (Hayward, 1991), et peut infecter plus de 200 espèces de plantes. Par un screening de 28 souches de *R. solanacearum* avec les lignées A17 et F83005.5 de *M. truncatula* il a été trouvé qu'elles étaient résistantes et sensibles respectivement à la souche GMI1000. Une analyse génétique de lignées recombinantes à partir d'un croisement entre A17 et F83005.5 a mis en évidence un QTL majeur de résistance au flétrissement bactérien sur le chromosome 5. Suite à une inoculation sur des racines dont l'extrémité a été coupée, les bactéries entrent dans le système vasculaire où elles se propageaient. Chez la lignée sensible A17 les bactéries vont atteindre les parties aériennes et les coloniser, tandis que chez la lignée résistante ; F83005.5 elles restent confinées dans les racines. La virulence des bactéries chez *M. truncatula* dépend d'effecteurs bactériens injectés par le système de sécrétion de type 3. Des études préliminaires ont montré que des gènes de défense sont induits dans les parties aériennes suite à l'inoculation. Une étude plus large de transcriptomique utilisant des puces Affimetrix hybridées avec de l'ADNc de racines témoins et inoculées est actuellement en cours.

***Colletotrichum trifolii***, l'agent responsable de l'antracnose de la luzerne est aussi pathogène sur *M. truncatula*. Les travaux de Torregrosa *et al.* (2004) ont révélé que les lignées Jemalong (A17) et F83005.5 étaient respectivement résistantes et sensibles au champignon *C. trifolii* race 1. Leurs études ont montré que la résistance était associée à une réponse hypersensible (HR) localisée, et à l'induction d'un plus grand nombre de gènes comparé à la réponse dans la lignée sensible. Le locus majeur responsable de la résistance aux 2 races a été cartographié sur le chromosome 4 (Ameline-Torregrosa *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008). Le gène RCT1 de ce locus a été cloné et il a été montré que la transformation de la luzerne sensible avec ce gène conférait la résistance à l'antracnose (Yang *et al.*, 2008).

Des sources de résistance à d'autres agents pathogènes ont été décrites chez *M. truncatula*, comme par exemple contre *Phoma medicaginis* (Ellwood *et al.*, 2006; Djébali *et al.*, 2007) et *Erysiphe pisi* (Ameline-Torregrosa *et al.*, 2008). Tous ces travaux montrent la puissance des outils de génétique et génomique dont on dispose pour cette plante modèle.

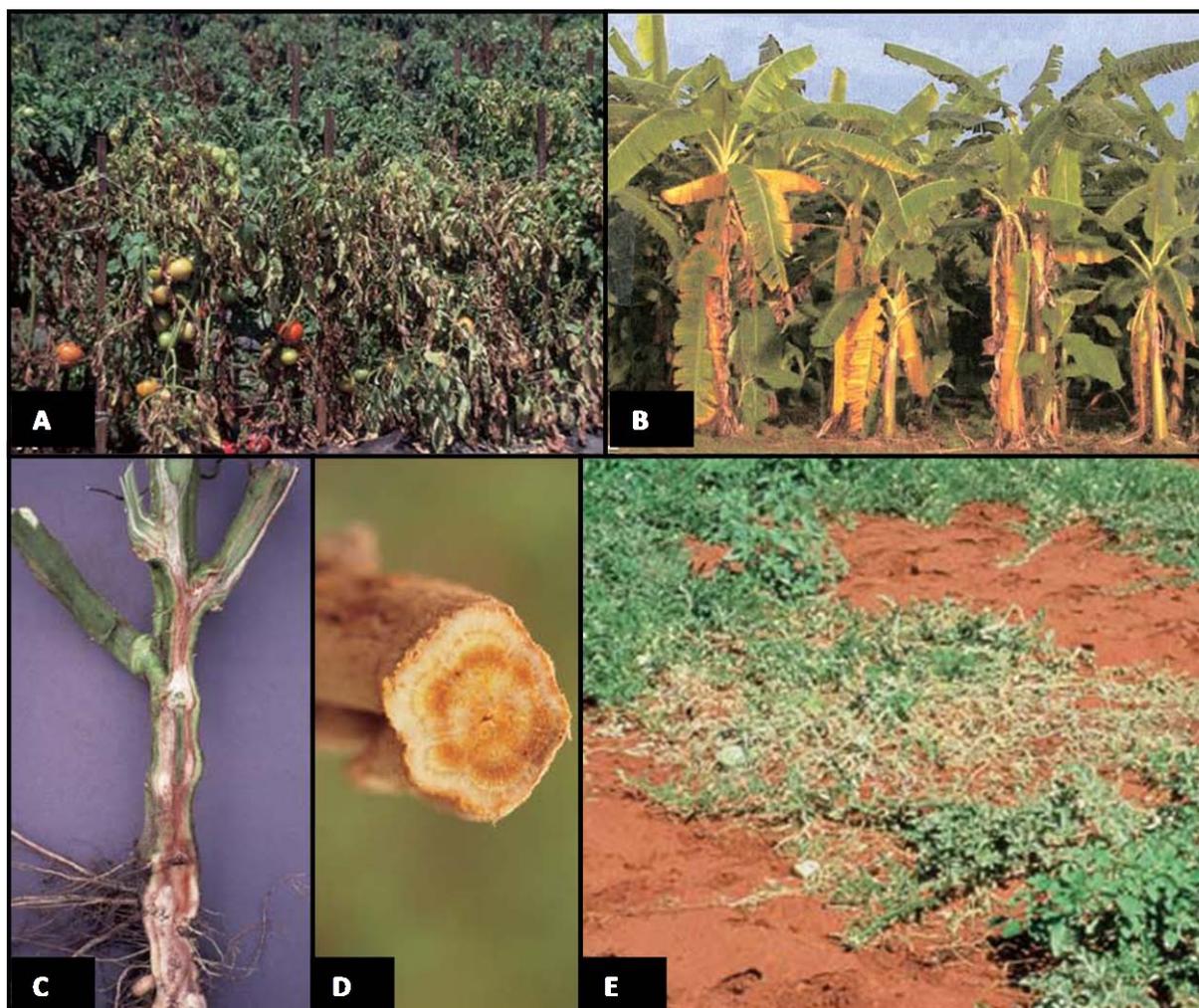


## 1.6. OBJECTIFS DE LA THÈSE

Les recherches du laboratoire sont menées avec la plante modèle *Medicago truncatula* et visent à comprendre les mécanismes de régulation qui permettent à la plante à la fois de se défendre contre les attaques par des microorganismes pathogènes tout en acceptant la colonisation de sa racine par un microorganisme symbiotique. C'est dans ce but que le pathosystème *Medicago truncatula* – *Ralstonia solanacearum* a été établi; il permettra de comparer interactions pathologique et symbiotique avec des partenaires bactériens. Les mécanismes de colonisation et de défense ne sont pas les mêmes dans le cas d'interactions avec des champignons. Afin de comparer symbiose mycorhizienne et interaction pathogène, il était nécessaire d'établir un pathosystème fongique avec un champignon du sol.

Le premier objectif de cette thèse était de caractériser une interaction entre *M. truncatula* et un champignon pathogène. Pour ce travail nous avons choisi *Fusarium oxysporum*, champignon responsable du flétrissement vasculaire chez un grand nombre de plantes cultivées. Nous avons cherché à identifier des lignées sensibles et tolérantes et de comprendre les étapes de la colonisation de la racine, à l'aide d'une souche fongique exprimant le gène *GFP*. Une étude d'expression de gènes de défense à petite échelle a été menée afin de comparer la défense chez les deux lignées.

Le second objectif était d'étudier le rôle de l'acide salicylique (SA) dans les interactions de *M. truncatula* avec des microorganismes pathogènes et symbiotiques. Dans cette partie nous avons utilisé essentiellement une approche de génie génétique en transformant la plante avec le gène *NahG* codant le salicylate hydroxylase; cette enzyme dégrade le SA en catéchol. Les plantes transgéniques ont été inoculées avec différentes microorganismes pathogènes et symbiotique et le degré de sensibilité ou résistance dans ces interactions a été déterminé.



**Figure 5. Symptômes de flétrissement vasculaire aux champs. (A)** Plantes de tomate flétrissant suite à l'infection par *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. **(B)** Flétrissement du bananier (maladie du panama) provoquée par *F. oxysporum* f. sp. *cubense*. **(C)** Coloration sévère des tissus au long de la tige d'une plante de tomate infectée. **(D)** Tissus vasculaires colorés et obstrués en coupe transversale d'une tige de plante de pastèque infecté avec *F. oxysporum* f. sp. *niveum* **(E)** Flétrissement et mort de plantes de melon dans un champ (Agrios, 2005).

## 2.- ÉTUDE DE L'INTERACTION ENTRE *F. oxysporum* ET *M. truncatula*

### 2.1. INTRODUCTION

Plusieurs genres de champignons telluriques sont capables d'infecter les racines de plantes sauvages et cultivées et de causer des dégâts importants. Il s'agit notamment de *Rhizoctonia*, *Verticillium* et *Fusarium*; à ce groupe on peut ajouter des oomycètes tels que *Phytophthora*, *Pythium* et *Aphanomyces*. L'ensemble de ces microorganismes cause des maladies soit de pourriture racinaire soit de flétrissement dû à l'obstruction des vaisseaux conducteurs (Agrios, 2005). Les espèces de *Fusarium* provoquent de maladies qui entraînent des pertes économiquement importantes comme le flétrissement vasculaire ou la pourriture racinaire et du collet chez des plantes cultivées au champs et en serre (Fravel *et al.*, 2003)

#### Figure 5.

*Fusarium oxysporum* Schlecht. Snyder et Hansen (Snyder et Hansen 1940) est l'espèce la plus répandue. C'est un champignon saprophyte du sol capable de survivre longtemps sous forme de chlamydospores (Agrios, 2005). L'espèce *F. oxysporum* peut infecter un grand nombre de plantes, souvent de façon très spécifique. Plus de 120 *formae speciales* et races ont été ainsi identifiées, basées sur leur spécificité d'hôtes (Armstrong et Armstrong, 1981).

#### 2.1.1. Taxonomie

Le genre *Fusarium* appartient au phylum des Deutéromycètes (champignons imparfaits, Fungi imperfecti), car la plupart des espèces étaient d'abord décrites sur la base de caractères morphologiques et une reproduction sexuée n'a pas été observée. Ces formes imparfaites (anamorphes) sont caractérisées par un mycélium septé et la production de conidies hyalines généralement unicellulaires sur des conidiophores libres; elles sont classées dans le groupe des Moniliales (Lepoivre, 2003). De plus, *Fusarium* produit des macroconidies composées de 2 à plusieurs cellules. Leur forme recourbée typique avec une

Tableau 2.- Téléomorphes de différentes espèces de *Fusarium* (Leslie et Summerell, 2006).

<b>Espèce de Fusarium</b>	<b>Teleomorphe</b>
<i>F. graminearum</i>	<i>Gibberella zea</i>
<i>F. fujikuroi</i>	<i>Gibberella fujikuroi</i>
<i>F. verticilloides</i>	<i>Gibberella moniliformis</i>
<i>F. avenaceum</i>	<i>Gibberella avenacea</i>
<i>F. solani</i>	<i>Nectria haematacocca</i>
<i>F. acuminatum</i>	<i>Gibberella auminata</i>
<i>F. lateritium</i>	<i>Gibberella baccata</i>
<i>F. circinatum</i>	<i>Gibberella circinata</i>
<i>F. pseudograminearum</i>	<i>Gibberella coronicola</i>

cellule apicale plus ou moins pointue est un des critères d'identification des représentants du genre ; dans beaucoup d'espèces on observe une cellule basale en forme de pied (Seifert, 2001). La production de métabolites secondaires et notamment de toxines (mycotoxines et phytotoxines) est courante parmi les *Fusarium*, et le profil de ces composés peut être utilisé pour la classification des espèces (Thrane, 2001).

Des formes sexuées (téléomorphes) ont été maintenant observées pour certaines espèces de *Fusarium*. Elles font toutes partie des Ascomycètes, de la famille des *Nectriales* et notamment des genres *Gibberella* et *Nectria* (Seifert, 2001). Quelques exemples sont montrés dans le **Tableau 2**.

Ainsi, *Fusarium oxysporum* est considéré comme ascomycète bien que le stade sexuel doive être encore trouvé. Il est proposé d'être plutôt proche du groupe téléomorphique *Gibberella* que *Nectria* (Di Pietro *et al.*, 2003, Michielse et Rep, 2009). Au sein de l'espèce *F. oxysporum* on distingue plus de 120 *formae speciales* en fonction de leur pathogénicité sur des plantes hôtes.

### **2.1.2. Biologie de *F. oxysporum***

Dans un milieu de culture solide, comme le milieu PDA, les différentes formes spéciales de *F. oxysporum* peuvent varier d'apparence. Généralement, au début de la croissance, le mycélium aérien est blanc et peut ensuite changer vers une grande variété de couleurs (du violet jusqu'au pourpre foncé) selon la souche de *F. oxysporum* (ou forme spéciale). Si les sporodochiums (amas de conidiophores provenant d'un stroma ou masse d'hyphes) sont abondants, la culture apparaîtra couleur crème ou orange (Smith *et al.*, 1988).

*Fusarium oxysporum* produit trois types de spores asexuées: microconidies, macroconidies et chlamydospores. Les microconidies sont uni- ou bicellulaires et sont produites abondamment et fréquemment par le champignon sous tout type de conditions. C'est aussi le type de spore qui est observé plus fréquemment à l'intérieur des vaisseaux des

Tableau 3.- Quelques exemples des souches de *Fusarium oxysporum* spp. et de leurs plantes hôtes. (Armstrong et Armstrong 1981; MacHardy et Beckman 1981; Alves-Santos *et al.*, 2007, Summerell *et al.*, 2001; Lamprecht *et al.*, 1986).

Souche	Plante hôte	genre
	Alimentation humaine	
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	tomate	<i>Lycopersicon</i> spp
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i>	concombre	<i>Cucumis</i> spp.
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>pisi</i>	pois	<i>Pisum</i> spp.
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ciceri</i>	pois chiche	<i>Cicer arietinum</i>
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i>	melon	<i>Cucumis</i> spp.
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	haricot	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	banane	<i>Musa</i> spp.
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>coffea</i>	café	<i>Coffea</i> spp.
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>asparagi</i>	asperge	<i>Asparagus</i> spp.
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>albedinis</i>	palmier dattier	<i>Phoenix dactylifera</i>
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>raphani</i>	radis	<i>Raphanus</i> spp.
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cepae</i>	ognion	<i>Allium</i> spp.
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i>	pastèque	<i>Citrullus</i> spp.
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>batatas</i>	patate douce	<i>Ipomoea batatas</i>
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>conglutinans</i>	chou	<i>Brassica</i> spp.
Souche	Fleurs	
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i>	œillet	<i>Dianthus</i> spp.
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>gladioli</i>	glâieul	<i>Gladiolus</i> spp.
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>chrysanthemi</i>	chrysanthème	<i>Chrysanthemum</i> spp.
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>tulipae</i>	tulipe	<i>Tulipa</i> spp.
Souche	Autres cultivars importants	
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>	coton	<i>Gossypium</i> spp.
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>nicotianae</i>	tabac	<i>Nicotiana</i> spp.
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>medicaginis</i>	luzerne	<i>Medicago</i> spp.

plantes infectées. Les microconidies de *F. oxysporum* ont souvent la forme d'une virgule ou sont ellipsoïdales (Agrios, 2005 ; Nelson *et al.*, 1983). Les macroconidies sont composées de trois jusqu'à cinq cellules, elles sont pointues et courbées jusqu'au bout. Ces spores peuvent être observés dans des sporodochiums à la surface des plantes qui ont été tués par le pathogène (Agrios, 2005; Nelson *et al.*, 1983; Schippers et van Eck, 1981). Les chlamydospores sont des spores rondes d'une ou deux cellules, entourées d'une paroi épaisse plus ou moins pigmentée. Elles sont observées au milieu des hyphes ou en position terminale, souvent en forme de paires, quelques fois en triplets et rarement en forme rassemblée (Agrios, 2005; Nelson *et al.*, 1983).

*F. oxysporum* est un habitant du sol où il croit sur des débris de plantes ou survit en forme de chlamydospores. Les chlamydospores restent dormantes et immobiles jusqu'à la stimulation de la germination par des substrats organiques ou exsudats racinaires. Suite à la germination, il y a formation d'un mycélium. Si les conditions sont favorables, le thalle produit des conidies (Beckman et Roberts, 1995; Agrios, 2005). En présence d'une plante hôte, le mycélium envahit les racines suite à la pénétration de l'épiderme (Beckman et Roberts, 1995) et on observe le développement des symptômes de la maladie chez la plante (Stover 1970). A côté des souches pathogènes, ils existent des isolats non pathogènes qui colonisent les racines des plantes sans induire des symptômes de maladie.

### **2.1.3. Les maladies causées par *F. oxysporum***

Parmi les maladies causées par *F. oxysporum* on trouve le flétrissement vasculaire aussi appelé fusariose vasculaire (vascular wilt), la pourriture racinaire et du collet (root rot, crown rot) et la pourriture des semis (damping-off). La dénomination fusariose est utilisée de façon moins spécifique et peut indiquer tout syndrome causé par un *Fusarium*. De ces maladies, le flétrissement vasculaire est la maladie qui provoque les plus grandes pertes et dans un grand nombre de plantes cultivées, telles que des légumes, des fleurs, et des cultures tropicales (Agrios, 2005), dont quelques exemples sont résumés dans le **Tableau 3**.

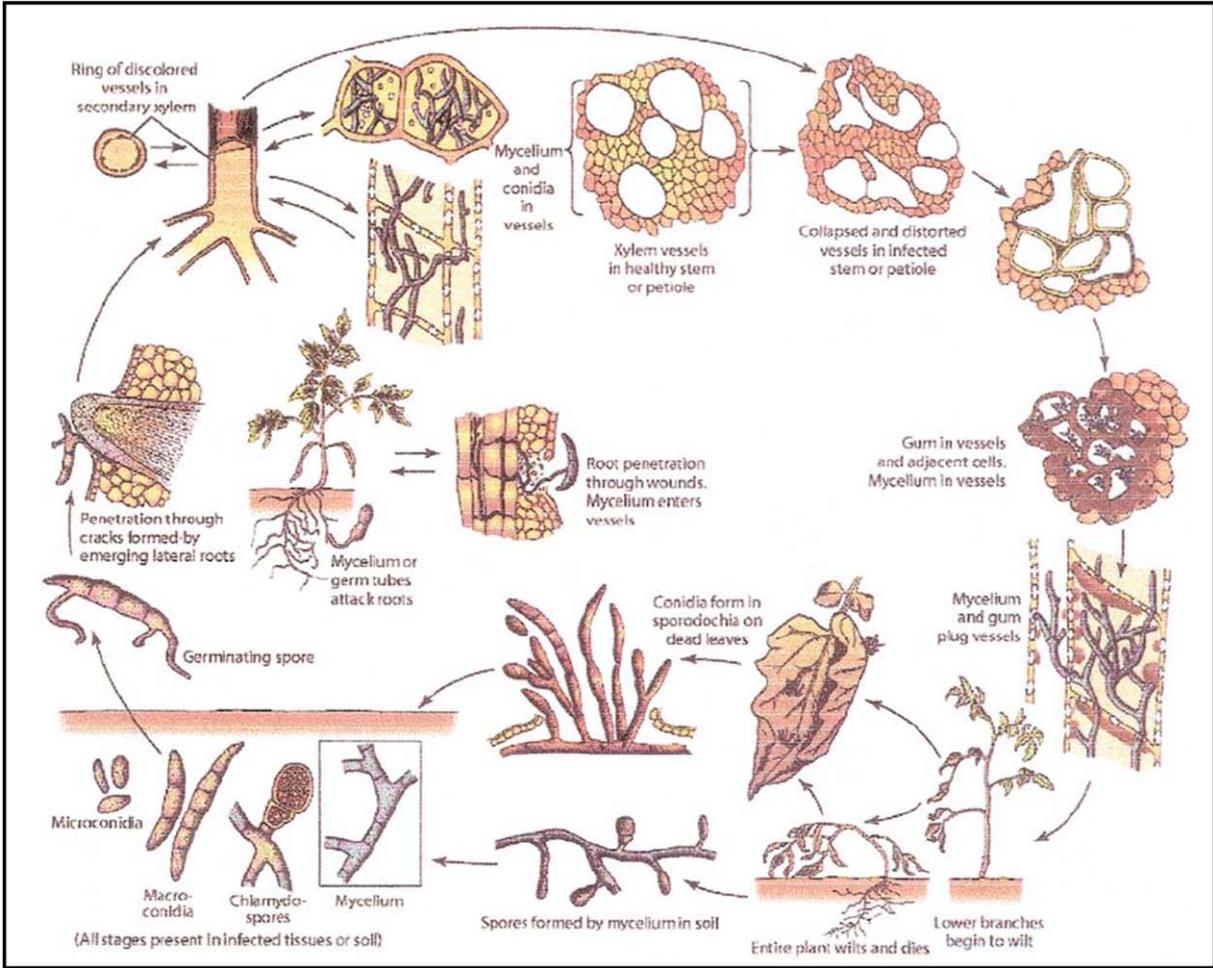


Figure 6 .- Cycle général de la maladie de flétrissement vasculaire causée par *F.oxysporum* sp. *lycopersici* chez la tomate (Agris 2005).

### 2.1.3.1. Le flétrissement vasculaire

Le flétrissement vasculaire est plus sévère dans des conditions chaudes du sol et dans les serres (Agrios, 2005). Les symptômes développés sont le résultat d'un stress sévère d'eau. Ils peuvent être très variables en fonction de la plante et incluent l'éclaircissement de la nervure, l'épinastie des feuilles, la chlorose et le dessèchement. La plupart des plantes flétrissent et meurent, tandis que les plantes qui ont été moins affectées deviennent chétives et pas productives (MacHardy et Beckman, 1981; Agrios 2005). La **Figure 6** montre le cycle de vie de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* pendant le flétrissement vasculaire chez la tomate. Des symptômes très similaires peuvent être causés par d'autres champignons, comme *Verticillium dahliae* et *V. albo-atrum*. *F. oxysporum* est unique parmi les champignons responsables de flétrissement vasculaire par sa spécificité d'hôte qui a mené à la description d'un grand nombre de *formae speciales* (groupement taxonomique appliqué à un parasite –fréquemment un champignon- qui est adapté à un hôte spécifique) et races sur la base de leur plante hôte et des cultivars au sein d'une espèce qu'elles infectent (Armstrong et Armstrong 1981).

La fusariose vasculaire de la tomate causée par *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* est le cas le plus étudié ; en ce qui concerne le cycle de la maladie et son développement, il est représentatif du flétrissement vasculaire chez d'autres plantes (Agrios, 2005). La tomate est souvent cultivée en serre où les températures élevées du sol favorisent la maladie.

Parmi les maladies à fort impact aux champs, on peut citer le Bayoud du palmier dattier causé par *F. oxysporum* f.sp. *albedinis* et qui menace cette culture dans tout le Maghreb, et la fusariose du bananier causée par *F. oxysporum* f.sp. *cubense* (panama wilt) dans les régions tropicales autour du monde. Le flétrissement vasculaire concerne aussi des cultures légumineuses à graine et fourragères dans des régions tempérées et chaudes, tels que le pois (Haglund, 2001), le pois chiche (Cachinero *et al.*, 2003; Sharma *et al.*, 2005), le haricot (Alvez-Santos *et al.*, 2002) et la luzerne (Antonopoulos, 2003; Ariss, 2003).

Le flétrissement vasculaire est caractérisé par un envahissement massif des vaisseaux conducteurs dans lesquels le champignon sporule. Les microconidies sont transportées de façon passive par le flux du xylème et peuvent ainsi infecter des parties aériennes. La

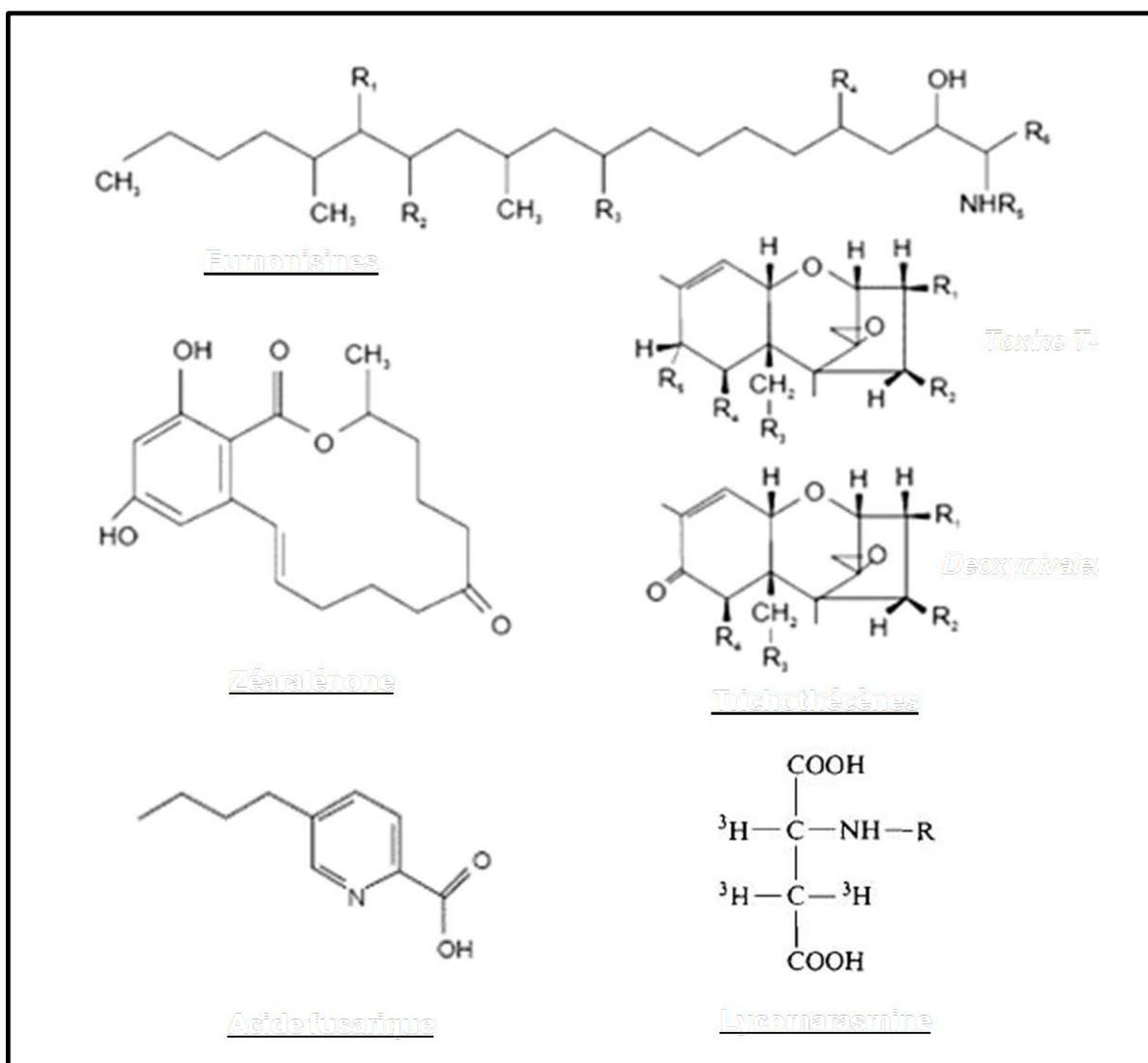


Figure 7.- Structures des mycotoxines les plus fréquents chez *Fusarium* spp. (Moss, 2002, Chaube et Pundhir, 2005). Les fumonisines sont produites par *F. moniliforme*, le zéaralénone par *F. graminearum*, les trichothécènes (toxine T-2 et deoxynivalénol, DON) produits par plusieurs *Fusarium* spp., l'acide fusarique et le lycoramine par *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* et autres *Fusarium* spp.

présence de mycélium et de ces conidies ainsi que les réponses locales de la plante (formation des tyloses, gommages) vont causer un blocage du transport d'eau dans les vaisseaux et donc des symptômes de flétrissement (Klein et Correll 2001).

Le genre *Fusarium* est connu pour produire une large gamme de toxines (mycotoxines et phytotoxines) dont quelques exemples sont montrés en **Figure 7**. Chez *F. oxysporum* deux toxines ont été identifiées capables d'induire à elles seules des symptômes. Il s'agit de la lycomarasmine et de l'acide fusarique. Leur production *in planta* a été démontrée pour le dernier chez plusieurs plantes infectées, tels le coton, la tomate ou le pois, indiquant qu'ils pourraient jouer un rôle dans l'induction de la maladie. Cependant la production de cette toxine ne peut pas être corrélée systématiquement avec la pathogénicité du champignon (Pegg, 1981).

Le mécanisme de pénétration dans la racine ainsi que les sites préférentiels sont variables, suivant la plante hôte. Ainsi l'infection du bananier et de la patate douce par *F. oxysporum* f.sp. *cubense* et f.sp. *batatas* respectivement, nécessite une blessure ouvrant l'accès au xylème, tandis que chez le chou et le radis, *F. oxysporum* f.sp. *conglutinans* pénètre directement dans l'apex ou les zones de différenciation et d'élongation, et rarement dans les poils absorbants. L'infection primaire par *F. oxysporum* f.sp. *lini* chez le lin par contre est par pénétration directe, surtout dans les poils absorbants (Nelson, 1981). Une fois pénétré dans la racine, le mycélium croît de façon dirigée vers le cylindre central et le xylème, les hyphes avançant intercellulairement ou intracellulairement. Sauf pour les stades finaux de la maladie où le cortex peut être colonisé massivement, le champignon reste confiné généralement aux vaisseaux et éventuellement dans le parenchyme du xylème (Nelson, 1981).

Le champignon persiste dans le sol des sites infectés soit sous forme de chlamydospores ou en colonisant d'autres espèces que sa plante hôte, mais sur lesquelles il n'induit pas de maladie. Par exemple *F. oxysporum* f.sp. *batatas* (fusariose de la patate douce) a été détecté dans des plantes saines de tomate, soja ou trèfle, et *F. oxysporum* f.sp. *nicotianae* (fusariose du tabac) chez le coton, okra et soja (Nelson, 1981).



La maladie peut être disséminée vers d'autres localisations par des semences (p ex. *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* sur tomate) ou des boutures lors de la multiplication végétative (p ex *F. oxysporum* f.sp. *albedinis* sur palmier dattier ou *F. oxysporum* f.sp. *cubense* sur bananier (Snyder et Smith, 1981).

### **2.1.3.2. La pourriture racinaire**

La pourriture racinaire est différente du flétrissement vasculaire et peut se produire conjointement avec d'autres maladies des racines. Chez le pois ce type de maladie peut aussi être occasionné par *F. oxysporum* f.sp. *solani*, *Aphanomyces euteiches*, *Rhizoctonia solani* ou *Pythium*. Les premiers symptômes sur les racines primaires et secondaires sont des traînées rouge-marron à noir qui se réunissent au cours de la saison (Haglund et Kraft, 2001). Chez la tomate, la pourriture racinaire et du collet est causée par *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (Jarvis et Schoemaker, 1978), mais contrairement à la fusariose vasculaire peu de *formae speciales* sont décrites. *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* pénètre les tissus corticaux des racines et de l'hypocotyle à travers des blessures et aux sites d'émergence de racines secondaires (Katan *et al.*, 1997; Jarvis et Shoemaker, 1978).

### **2.1.4. Lutte contre la fusariose**

Comme pour toutes les maladies causées par des microorganismes telluriques, les fusarioses ne peuvent pas être éradiquées par des produits chimiques et la seule mesure pour contrôler les maladies aux champs est l'utilisation de variétés des plantes résistantes. Par contre dans les serres le contrôle phytosanitaire ou des traitements thermiques du sol entre deux cultures sont possibles.

En conséquence, les stratégies du contrôle biologique des fusarioses ont acquis un intérêt particulier. On sait depuis longtemps que l'incidence de la fusariose peut varier sur des sols différents infestés de *Fusarium*. Ce phénomène de « sols suppressifs » a été trouvé



corrélé parfois aux caractéristiques pédologiques mais surtout à sa population microbienne. Des études qui portent sur ce phénomène et les microorganismes impliqués sont nombreuses. Des bactéries et des champignons ont été isolés à partir de sols suppressifs et leur potentiel en lutte biologique est étudié.

Parmi les bactéries, des espèces du genre *Pseudomonas* ont été décrites pour empêcher le développement de la maladie du Fusarium root rot chez la tomate (Simons *et al.*, 1996 ; Dekkers *et al.*, 2000 ; Bolwerk *et al.*, 2003). Il est particulièrement intéressant que parmi les champignons des sols suppressifs on trouve notamment des souches saprophytes de *Fusarium oxysporum*.

Des souches non pathogènes de *F. oxysporum* et *F. solani* ont été isolées à partir de sol de Châteaurenard en France et leur capacité à protéger des plantes de tomate contre la fusariose vasculaire a été démontrée (Alabouvette, 1986; Fravel, 2005). L'effet protecteur d'une souche, *F. oxysporum* 47 (*Fo* 47) a été particulièrement étudié, et il a été reporté qu'il était dû à plusieurs mécanismes. Fuchs *et al.*, (1997) ont montré que *Fo* 47 induisait des réactions de défense chez la tomate, ce qui indique une participation de la résistance induite dans la protection. Mais des mécanismes de compétition pour les nutriments au sol et la rhizosphère jouent aussi un rôle (Benhamou *et al.*, 2002 ; Fravel, 2005). La présence de *Fo* 47 dans le sol était capable de protéger plusieurs espèces végétales comme le lin, melon et tomate contre ses respectives *formae speciales* (Aimé *et al.*, 2008). De façon générale l'utilisation de souches protectives de *F. oxysporum* pour le contrôle du flétrissement vasculaire a été rapportée pour plusieurs plantes et souches fongiques, comme dans le cas du bananier, du concombre, du melon, du lin, d'épinard et de la pastèque (Fravel *et al.*, 2003).

#### **2.1.5. Résistance contre la fusariose vasculaire**

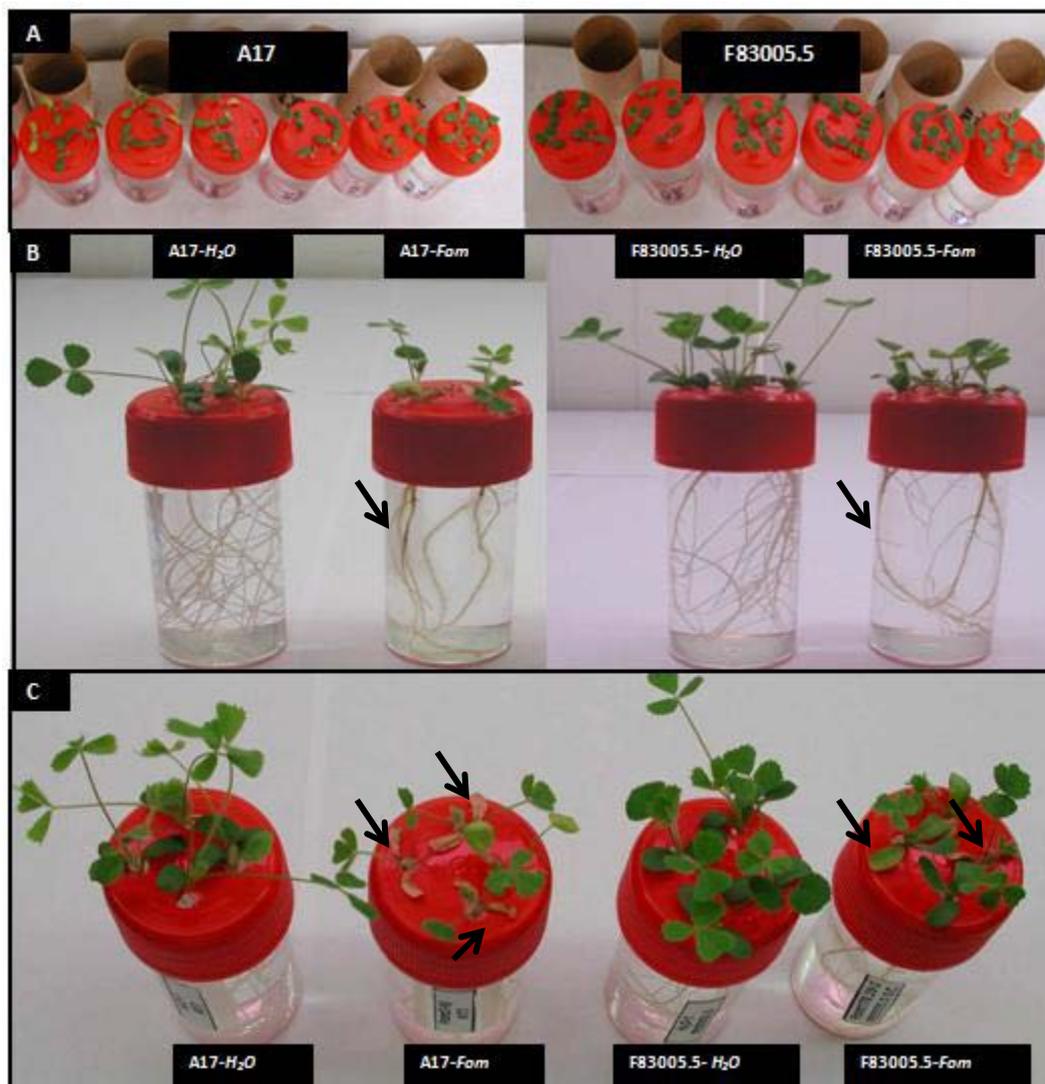
Des gènes de résistance contre *F. oxysporum* existent chez beaucoup d'espèces végétales et ont été introduits par sélection dans des variétés cultivées. Ainsi, chez la



tomate, le melon, le haricot, le pois chiche et *Arabidopsis thaliana* des gènes dominants de résistance ont été identifiés. (Huang et Lindhout, 1997; Hawkins *et al.*, 2001; Schneider *et al.*, 2001; Halila *et al.*, 2008; Diener et Ausubel, 2005). La tomate fait partie des espèces végétales impliquées dans des projets de séquençage; un membre du genre *Fusarium*, *F. graminearum* et *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* font également l'objet de projets de génomique avec séquençage du génome (Gueldener *et al.*, 2006; Cai *et al.*, 2003). Ceci facilite les analyses de l'interaction entre la tomate et *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*.

Parmi les gènes de résistance contre *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* décrits chez la tomate le gène I-2 a été cloné. Ils appartient à la famille des gènes R codant une protéine intracellulaire avec un site de liaison aux nucléotides (NBS) et des domaines riche en répétition de leucine (LRR) (Simons *et al.*, 1998). Ce gène est exprimé spécifiquement dans les cellules autour des vaisseaux conducteurs qui est le tissu colonisé par le champignon (Mes *et al.*, 2000). Côté champignon, le gène d'avirulence correspondant au gène de résistance I-3 code pour une protéine sécrétée dans le xylème lors de la colonisation (Rep *et al.*, 2004). Même si on ne peut pas généraliser, il est intéressant de noter que les gènes impliqués dans la résistance semblent exprimés de façon coordonné dans le temps et dans l'espace.

La fusariose vasculaire due à l'infection par *F. oxysporum* f.sp. *medicaginis* est une maladie sévère chez la luzerne, mais il existe très peu d'informations sur ce pathosystème au-delà de la sélection de cultivars résistants. *Medicago truncatula*, proche de la luzerne cultivée (*Medicago sativa*), a été sélectionnée comme une plante modèle pour étudier la biologie de plantes légumineuses. Plusieurs études impliquant *M. truncatula* comme plante hôte de microorganismes pathogènes ont été décrites dans la littérature. Elles portent sur des champignons attaquant les parties aériennes tel *Colletotrichum trifolii*, *Erysiphe pisi* ou *Phoma medicaginis*, et sur des pathogènes racinaires comme l'oomycète *Aphanomyces euteiches* et la bactérie *Ralstonia solanacearum* (Ameline-Torregrosa *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008; Djébali *et al.*, 2009; Vailleau *et al.*, 2007). Aucune maladie de flétrissement vasculaire n'est étudiée à ce jour chez cette plante modèle.



**Figure 8.- Dispositif expérimental en conditions hydroponiques et symptômes des plantes inoculées avec *Form 179.29*. (A) Vue du haut des pots contenant les plantes et les caches en papier enlevés pour l'observation ; (B) Lignées A17 (à gauche) et F83005.5 (à droite), 6 jours après inoculation. Le pot de gauche montre le témoin traité à l'eau, le pot de droite la plante inoculée. On note la présence de voile mycélien entourant les racines et l'inhibition de leur croissance (flèches). (C) Symptômes sur les parties aériennes (flèches) des plantes témoin (H<sub>2</sub>O) et inoculées (*Fom*) 12 jours après inoculation.**

Ainsi, il était intéressant d'étudier l'interaction entre *F. oxysporum* et *M. truncatula*, afin de mieux comprendre cette maladie et les mécanismes de défense chez cette espèce et plus généralement chez les légumineuses. Ceci permettra d'utiliser les outils d'une plante modèle légumineuse et d'un champignon également proposé comme modèle des champignons pathogènes du sol (Roncero *et al.*, 2003).

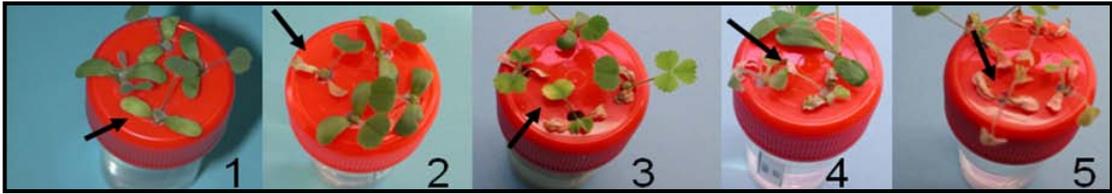
## 2.2. RÉSULTATS

### 2.2.1. *M. truncatula* est une plante hôte pour *F. oxysporum* f.sp. *medicaginis*

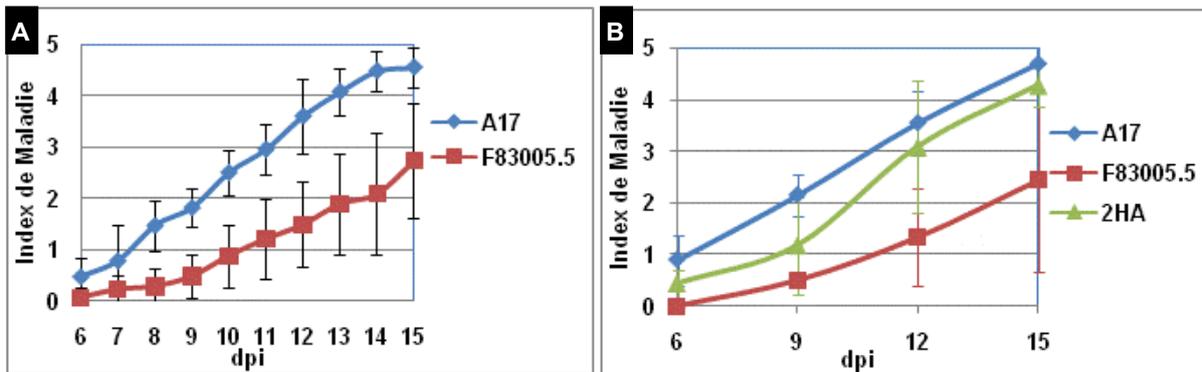
La sensibilité de la luzerne cultivée à *Fusarium oxysporum* f.sp. *medicaginis* est connue (Weimer, 1928; Armstrong et Armstrong, 1965; Graham *et al.*, 1979), mais aucune publication n'a encore décrit si la plante modèle *M. truncatula* était également hôte pour ce champignon pathogène. Pour étudier la sensibilité et une éventuelle résistance de *Medicago truncatula* vis-à-vis de *F. oxysporum* f.sp. *medicaginis* (Fom 179.29) des inoculations de jeunes plantes ont été réalisées dans des conditions de culture hydroponique miniaturisée. Le dispositif expérimental est illustré dans la **Figure 8**.

Les racines des plantules âgées de 4 jours ont été trempées 30 minutes dans une suspension de  $1 \times 10^6$  spores/mL de Fom 179.29 puis les plantes ont été transférées en culture hydroponique avec leurs racines à l'abri de la lumière. Après 6 jours de culture, une solution nutritive a été ajoutée. Différentes lignées de *M. truncatula* ont été testées dans ces premiers essais: A17, 2HA, R108, F83005.5, A10, A20, DZA315.16, et TN1.11.

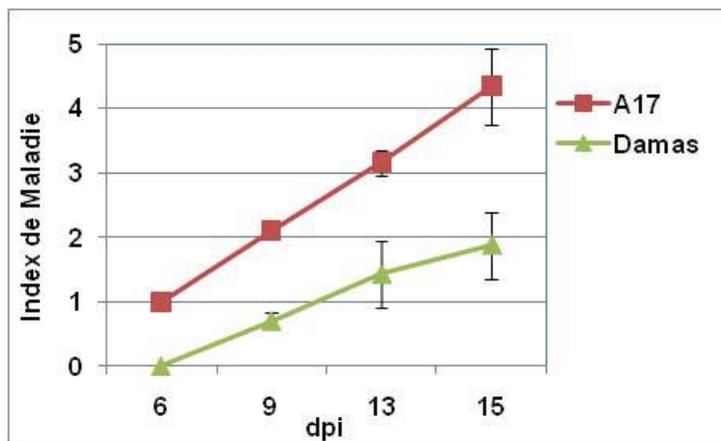
Les symptômes ont été observés pendant 3 semaines. A partir de 6 ou 7 jours les premiers symptômes ont été visibles sur les cotylédons chez les plantes plus sensibles (**Figure 8 A**), les premières feuilles ont développé ensuite des chloroses et à la fin de l'expérience une grande majorité des plantes étaient mortes. Au cours de l'infection par Fom 179.29, le mycélium du champignon s'est développé massivement à la surface des racines primaires et secondaires, entraînant une coloration marron foncé ou rouge des racines. La croissance racinaire était fortement inhibée (**Figure 8 B**). Toutes les lignées ont



**Figure 9.-** Index de maladie de 1 à 5 pour les plantes inoculées avec *F. oxysporum*. Les symptômes de maladie sont notés sur une échelle somme suit : 0) plante verte (non montrée) , 1) chlorose des cotylédons, 2) nécrose des cotylédons, 3) 1<sup>ère</sup> feuille chlorosée, 4) 1<sup>ère</sup> feuille nécrosée et 5) mort de la plante.



**Figure 10.-** Développement des symptômes chez *M. truncatula* inoculée par *F. oxysporum* f. sp. *medicaginis*. Les racines des lignées A17, F83005.5 et 2HA ont été inoculées (30 min,  $10^6$  spores/mL de *Fom* 179.29) et ensuite transférées dans l'eau dans des pots de culture hydroponique. **(A)** Les résultats montrent les moyennes de l'index de maladie et écarts types obtenus dans les inoculations d'A17 et F83005.5 ; 17 répétitions biologiques ont été réalisées avec au moins 3 répétitions techniques pour chaque génotype. **(B)** Valeurs moyennes de l'index de maladie et écarts types de 3 répétitions biologiques d'inoculations des lignées A17, F83005.5 et 2HA.



**Figure 11.-** Développement de symptômes chez A17 et Damas inoculées par *Fom* 179.29. Les racines de plantes de la lignée A17 et de la population Damas ont été inoculées (30 min,  $10^6$  spores/mL de *Fom* 179.29) et ensuite transférées dans l'eau dans des pots de culture hydroponique. Les valeurs correspondent aux moyennes de l'index de maladie obtenues après 3 répétitions biologiques (chacune avec au moins 3 répétitions techniques) et leur écart s types.

développé des symptômes, aucune n'était complètement résistante au champignon. Deux autres souches isolées à partir de la luzerne en Grèce, *Fom* 605 et *Fom* 606, ont été testées également sur les lignées A17 et F83005.5, et ont induit les mêmes symptômes que *Fom* 179.29 (résultats non montrés). On peut donc dire généralement que *M. truncatula* est une plante hôte pour *Fom*.

Même s'il n'y a aucune lignée n'était complètement résistante lors de ces premiers essais, nos observations indiquent que la lignée F83005.5 apparaissait plus tolérante que les autres lignées.

Ainsi, pour suivre l'avancement de la maladie et quantifier la sensibilité des plantes à *Fom*, nous avons établi une échelle de symptômes sur les parties aériennes (**Figure 9**), allant d'un index de maladie de 0 (aucun symptôme) à 5 (mort de la plante).

En utilisant cette approche quantitative, la lignée A17 s'est révélée très sensible. La majorité des plantes sont mortes après 15 jours. La tolérance de la lignée F83005.5 est confirmée (**Figure 10 A**). Chez F83005.5 l'apparition des premiers symptômes a été retardée : l'index de maladie final est significativement plus bas que chez A17. Cependant il faut noter que sensibilité et tolérance ont été soumises à des variations entre différents essais d'inoculation, et il était donc nécessaire de réaliser de nombreuses répétitions biologiques pour obtenir des chiffres solides. Les essais décrits ci-dessous ont été réalisés avec moins de répétitions mais les résultats permettent de dégager des tendances.

Les lignées 2HA et R108, ont été également analysées par rapport à leur sensibilité à *Fom* en conditions hydroponiques. 2HA est dérivée de A17 et a été sélectionnée pour sa bonne capacité d'embryogenèse somatique (Rose *et al.*, 1999) ; elle est utilisée par la communauté scientifique et dans le cadre de cette thèse (voir Chapitre 3), pour la transformation génétique stable de *M. truncatula*. Comme le montrent les résultats de ces analyses, 2HA possède une sensibilité à *Fom* 179.29 similaire à la lignée A17, mais en étant légèrement moins sensible (**Figure 10 A** et **10 B**). La lignée R108 est aussi fortement embryogène ; elle est utilisée pour la transformation stable et dans des programmes de création de mutants d'insertion (Hoffman *et al.*, 1997; Trinh *et al.*, 1998). R108 a montré une tolérance vis-à-vis de *Fom* 179.29 similaire à celle de F83005.5 (**Figure 24**).



**Figure 12** .-Symptômes chez les lignées A17 et F83005.5 inoculées avec *F. oxysporum* f. sp. *medicaginis* en substrat jiffy. Des plantes âgées de 10 jours ont été inoculées en coupant la base de pastilles de jiffy contenant une partie de racines et en trempant les jiffys dans une suspension de spores ( $10^6$  spores/mL) pendant 30 min. Après ce temps ils ont été mis dans des plateaux remplis de vermiculite et les symptômes ont été suivis. La figure montre les plantes non inoculées (en haut) et les plantes inoculées avec *Fom 179.29* (en bas), 8 plantes par lignée ont été traitées soit avec de l'eau soit avec les spores. A 21 dpi des symptômes de maladie (chlorose et nécrose) sont visibles chez la lignée A17 (en bas à gauche) tandis que chez F83005.5 les plantes restent vertes.

**Tableau 4.-** Souches de *Fusarium oxysporum* utilisées pour les inoculations de *M. truncatula*.

Isolats de <i>Fusarium</i>		Origines	Hôte
<i>F. oxysporum</i>	Fo 3	Grèce	concombre*
<i>F. oxysporum</i>	Fo 47	France	sol du Chateaurenard *
<i>F.o. f.sp. ciceri</i>	Fo ci 1	Espagne	pois chiche
<i>F.o. f.sp. lini</i>	Foln 3	France	lin
<i>F. o. f.sp. lycopersici</i>	Fol 8 (race 1)	France	tomate
<i>F.o. f.sp. medicaginis</i>	Fom 179.29	Inconnue	luzerne
<i>F.o.f. sp. melonis</i>	Fomel 24 Fomel 15	France	melon
<i>F.o. f.sp. phaseoli</i>	Fo sp 6	Espagne	haricot
<i>F.o. f.sp. pisi</i>	Fopi 1 (CBS 12773)	Inconnu	pois
<i>F.o. f.sp. raphani</i>	For 2, For 3, For 4.	Pays Bas	radis

\* Plante non hôte, souche non pathogène.

\*\* Souche non pathogène

Des plantes issues de graines d'une population naturelle syrienne de *M. truncatula* ont été analysées pour leur sensibilité à *Fom* 179.29. Ces plantes apparaissent tolérantes, et même plus tolérantes que F83005.5 (**Figure 11**), mais il s'agit ici d'une population et non d'une lignée fixée utilisable immédiatement pour des approches de génétique ou de génomique fonctionnelle.

Des expériences d'inoculation de plantes dans des conditions plus naturelles ont été réalisées.

Des plantes ont été cultivées en substrat Jiffy et ont été inoculées à l'âge de 10 jours en trempant leurs racines coupées dans une suspension de spores de *Fom* 179.29 pendant 30 min avant d'être incubées dans la salle de culture. A 21 dpi les plantes de la lignée sensible A17 ont montré des symptômes de chlorose et de dessèchement des feuilles tandis que les plantes de F83005.5 ressemblaient au témoin non-inoculé (**Figure 12**). Ces différences n'étaient pas très importantes. Parallèlement à partir de 35 dpi les témoins et les plantes inoculées ont développé des perturbations physiologiques comme un blanchissement des feuilles. Ces perturbations étaient plus prononcées que les symptômes de la maladie et ont empêché de poursuivre l'expérience. A plusieurs occasions nous avons pu constater que les conditions du phytotron n'étaient pas idéales pour une culture prolongée de *M. truncatula*, et en conséquence, ces essais d'inoculation n'ont pas été poursuivis.

### **2.2.2. *M. truncatula* est sensible à différentes souches de *F.oxysporum***

Dans la recherche d'une réponse plus discriminatoire entre les lignées A17 et F83005.5 face à *F. oxysporum*, des expériences d'inoculation avec différentes *formae speciales* de *F. oxysporum* ont été réalisées (**Tableau 4**). Parmi les souches analysées, 3 ont été isolées à partir de plantes légumineuses (f.sp. *ciceri*, f.sp. *phaseoli*, f.sp. *pisi*), 4 sont issues d'autres familles de plantes (f.sp. *lini*, f.sp. *lycopersici*, f.sp. *raphani*, f.sp. *meloni*) et 2 sont des souches non pathogènes isolées du sol et du concombre (*Fo* 47 et *Fo* 3

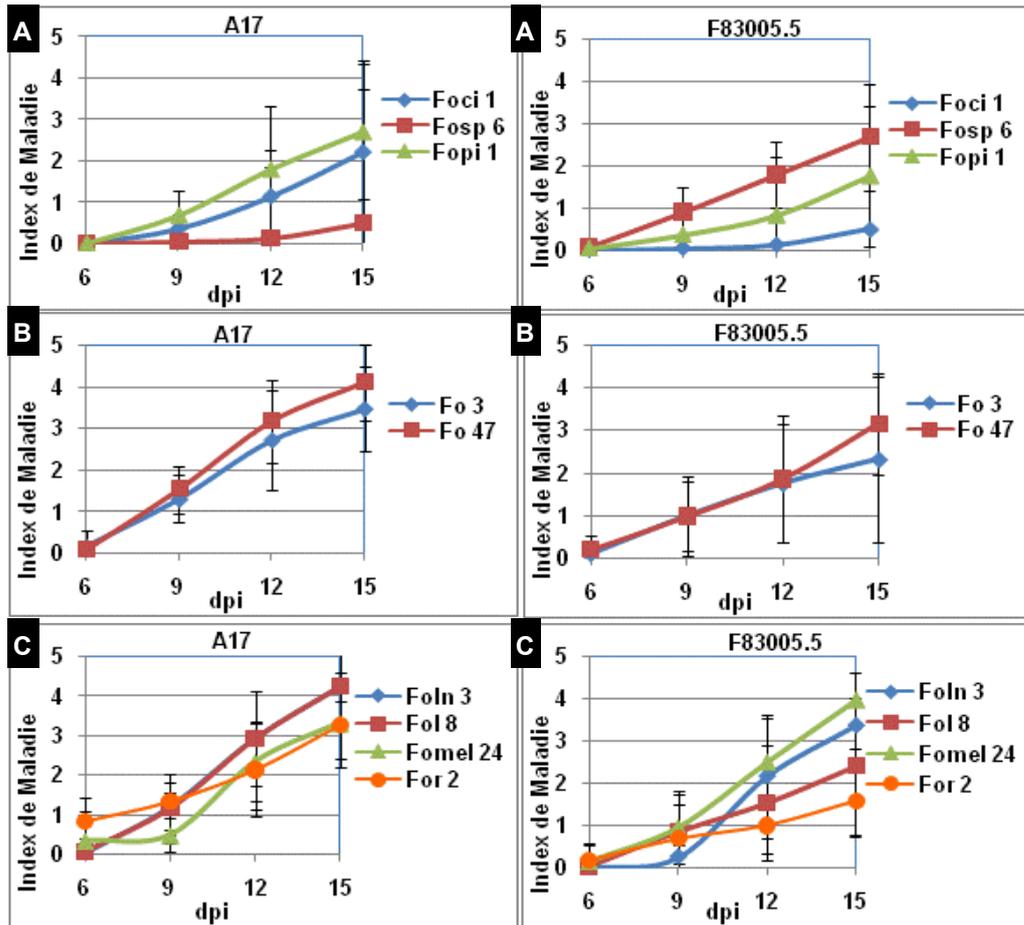


Figure 13.- Développement de la maladie chez A17 (gauche) et F83005.5 (droite) après l'inoculation de leurs racines avec des souches de *F. oxysporum* isolées de différentes plantes. (A) Avec souches isolées de plantes de la famille des légumineuses, (B) avec souches isolées de plantes d'autres familles et (C) avec souches non pathogènes. Les racines de plantes âgées de 4 jours ont été inocuées par une suspension de spores ( $10^6$  spores/mL, 30 min) et ensuite transférées dans de l'eau en pots copro. Les résultats montrent les moyennes des indices de maladie et les écarts types de 4 répétitions biologiques avec au moins 4 répétitions techniques.

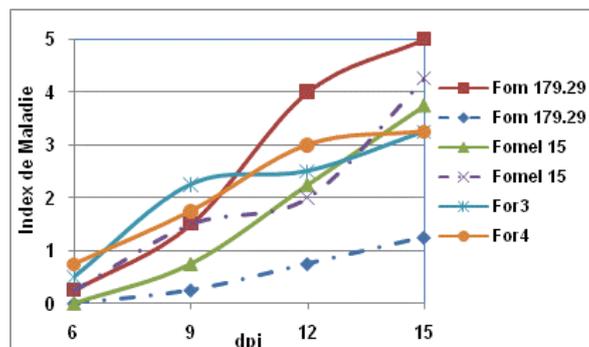


Figure 14.- Développement de la maladie chez les lignées A17 et F83005.5 de *M. truncatula* inocuées avec *F. oxysporum* spp. Des essais d'inoculation en culture hydroponique avec les lignées A17 et/ou F83005.5 ont été réalisées avec les souches *F. oxysporum* sp. *medicaginis* (Fom 179.29), *melonis* (Fomel15) et *radicis* (For3, For4). Les lignes pleines représentent A17 et les lignes pointillés F83005.5. Les valeurs sont le résultat d'une seule expérience avec au moins 4 répétitions techniques.

respectivement). Ainsi, de façon similaire aux inoculations en conditions hydroponiques décrites précédemment, les lignées A17 et F83005.5 ont été inoculées avec une suspension de spores de ces souches et l'évolution des symptômes a été suivie.

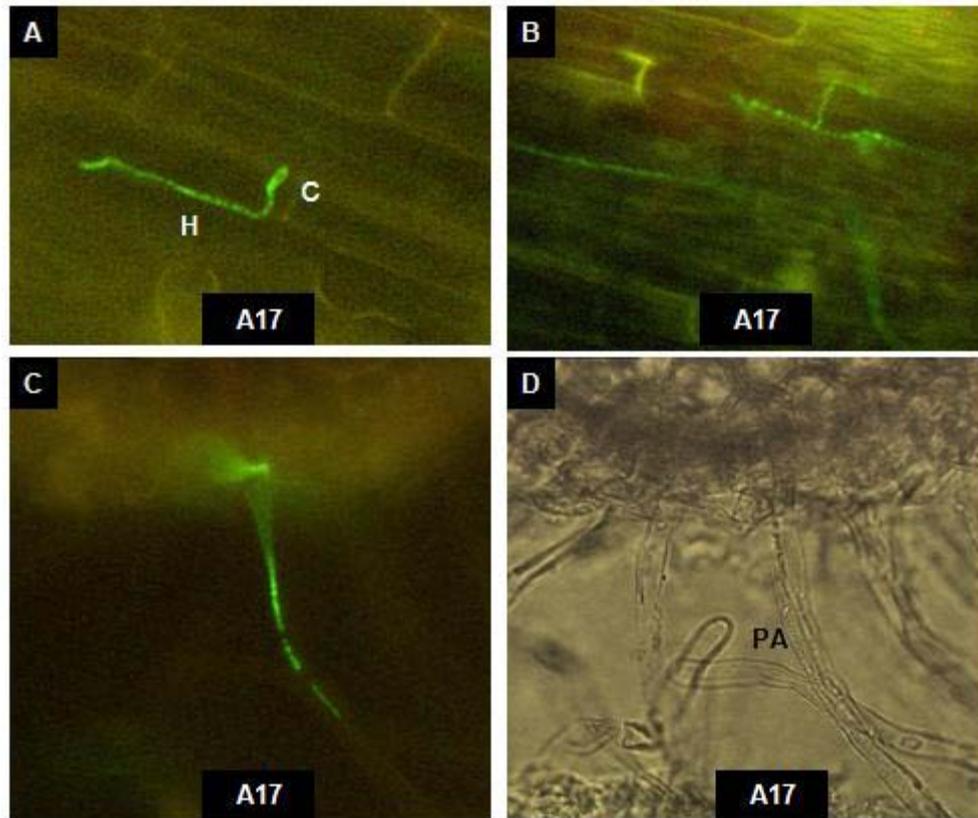
La **Figure 13** montre le développement de la maladie à l'aide de l'échelle des symptômes chez A17 et F83005.5, à 6, 9, 12 et 15 dpi. Neuf isolats ont été analysés dans ces essais, avec 4 répétitions biologiques : *Fopi 1*, *Fosp 6*, *Foci 1*, *Fol 8*, *Foln 3*, *Fomel 24*, *For 2*, *Fo 3*, et *Fo 47*. Les résultats obtenus montrent que toutes ces souches ont été capables d'induire des symptômes de maladie chez les deux lignées. Nous avons observé un résultat intéressant : les souches isolées à partir de légumineuses (*Foci 1*, *Fosp 6* et *Fopi 1*) n'ont pas été plus virulentes que celles isolées d'autres familles de plantes, et que les souches qui ont été décrites comme non pathogènes induisaient également la maladie.

On note qu'en général A17 a été plus sensible que F83005.5 *vis-à-vis* de *F. oxysporum* sauf pour *Fopi1* où la tendance est inversée. Aucun des différents isolats n'a permis d'observer une différence plus forte dans la sensibilité entre A17 et F83005.5 que celle observée avec *Fom 179.29* (**Figure 10 A**). Pour la plupart des souches (**Figure 13**) la différence entre les deux lignées était d'un point seulement dans l'échelle de symptômes tandis qu'avec la souche *Fom 179.29* la différence dans l'échelle a été de 2 points. Tous ces résultats suggèrent que *M. truncatula* est une plante hôte permissive pour *F. oxysporum*, au moins dans des conditions de culture hydroponique.

En raison de problèmes techniques, une partie des isolats a été analysée avec moins de répétitions biologiques. Il s'agit des souches *Fomel 15*, isolées de melon, ainsi que deux isolats de radis, *For 3* et *For 4*. Seulement *Fomel 15* a pu être testé sur la lignée F83005.5 qui était sensible à cette souche aussi. Les résultats obtenus avec ces trois isolats (**Figure 14**) montrent la même tendance - elles étaient moins agressives que *Fom 179.29* mais capables d'induire des symptômes chez A17.



**Figure 15.-** Jeune plante de *M. truncatula* et zones de la racine utilisées pour l'analyse en microscopie. A partir de l'apex, la racine a été coupée en fragments d'environ 1 cm, lesquels ont été inclus dans l'agarose 5%.



**Figure 16.** Etapes précoces (2 et 3 dpi) de colonisation de racines par *Fom*-GFP chez *M. truncatula*. Observation de racines par microscopie d'épifluorescence ou champ brillant (400x). **(A)** Une conidie germée et l'hyphe à la surface de la racine d'A17 à 2 dpi. **(B)** Croissance des hyphes sur A17 à 3 dpi. **(C, D)** Hyphe dans un poil absorbant de A17 à 3 dpi, observé sous UV et champ brillant respectivement. Les racines ont été observées directement entre lame et lamelle **(A,B)** ou après inclusion dans l'agarose 5% et sectionnées au vibratome (110 mm) **(C, D)**. C = conidie ; H = hyphe ; PA = poil absorbant.

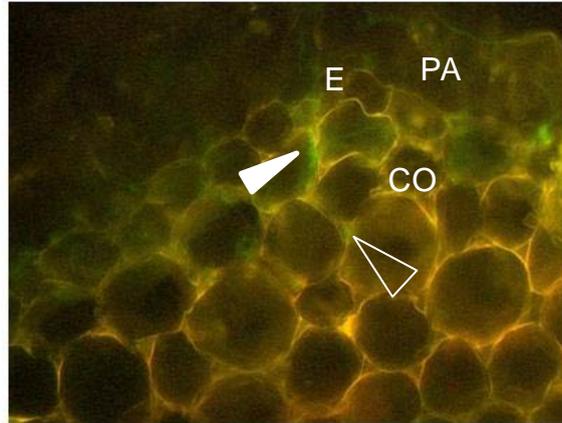
### 2.2.3. Etude microscopique de la colonisation de la racine par *F. oxysporum* f.sp. *medicaginis*

Afin de mieux comprendre les mécanismes de sensibilité et tolérance à *Fom* chez *M. truncatula*, les observations macroscopiques ont été complétées par une approche de microscopie. Des microorganismes étiquetés par un gène rapporteur sont couramment utilisés pour étudier les interactions entre plante-hôte et agent pathogène. Ainsi, la souche *Fom* 179.29 a été transformée avec la séquence codante pour la protéine verte fluorescente (GFP) sous contrôle d'un promoteur fongique constitutif pour étudier la pénétration et colonisation de la racine de *M. truncatula* par le champignon. La transformation génétique a été réalisée à l'aide d'*Agrobacterium tumefaciens*, avant mon arrivée au laboratoire. Un isolat monospore qui exhibait une forte fluorescence sans modification de sa pathogénicité a été sélectionné. Cette souche est appelée *Fom*-GFP. La stabilité de la transformation a été vérifiée par 3 cycles de culture en absence d'antibiotique sélectif.

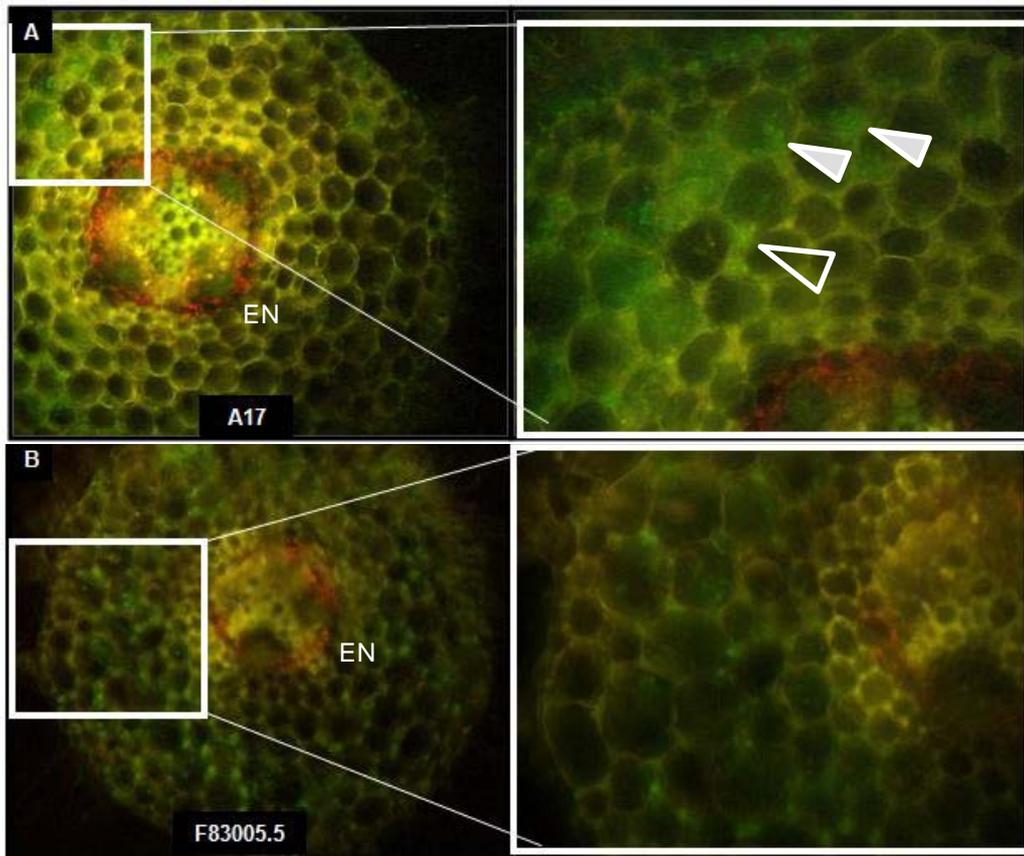
Dans l'interaction entre *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* et la tomate, des cultivars sensibles et résistants se différencient du fait que le champignon ne pénètre pas dans le cylindre central des plantes résistantes (Gao *et al.*, 1995). Nous avons utilisé la souche *Fom*-GFP pour caractériser la pénétration et la colonisation de la racine de *M. truncatula* chez la lignée sensible A17 et l'avons comparé avec la lignée tolérante F83005.5 ainsi qu'avec des plantes de la population Damas qui sont également tolérantes à *Fom*.

Les racines de jeunes plantules ont été inoculées avec une suspension de spores de *Fom*-GFP et incubées dans des cultures hydroponiques comme décrit dans le chapitre précédent. Les racines inoculées ont été récoltées à des temps différents après l'inoculation, et ont été coupées en fragments de 1 cm, 2 cm, 3 cm et dans quelques cas jusqu'au 4 cm de l'apex (**Figure 15**). Elles ont été observées par microscopie à fluorescence, directement posées dans une goutte d'eau entre lame et lamelle, également après inclusion dans de l'agarose à 5% et préparation de coupes au vibratome de 80 à 120  $\mu$ m.

Les symptômes des plantes ont été notés au moment de la récolte des racines pour s'assurer de la bonne infection des plantes par le champignon. Ces symptômes ont montré que la sensibilité d'A17 et la tolérance de F83005.5 et Damas étaient bien conservées avec la souche *Fom*-GFP.



**Figure 17.- Colonisation d'une racine d'A17 par *Fom*-GFP à 3 dpi.** Coupe transversal d'une racine d'A17 dans l'agar 5% observée en microscopie à épifluorescence (400x). La figure montre la colonisation intercellulaire (tête de flèche vide) et intracellulaire (tête de flèche pleine) des premières couches de cellules du cortex par le champignon. PA = poil absorbant ; E = cellule d'épiderme ; CO = cellule de cortex.



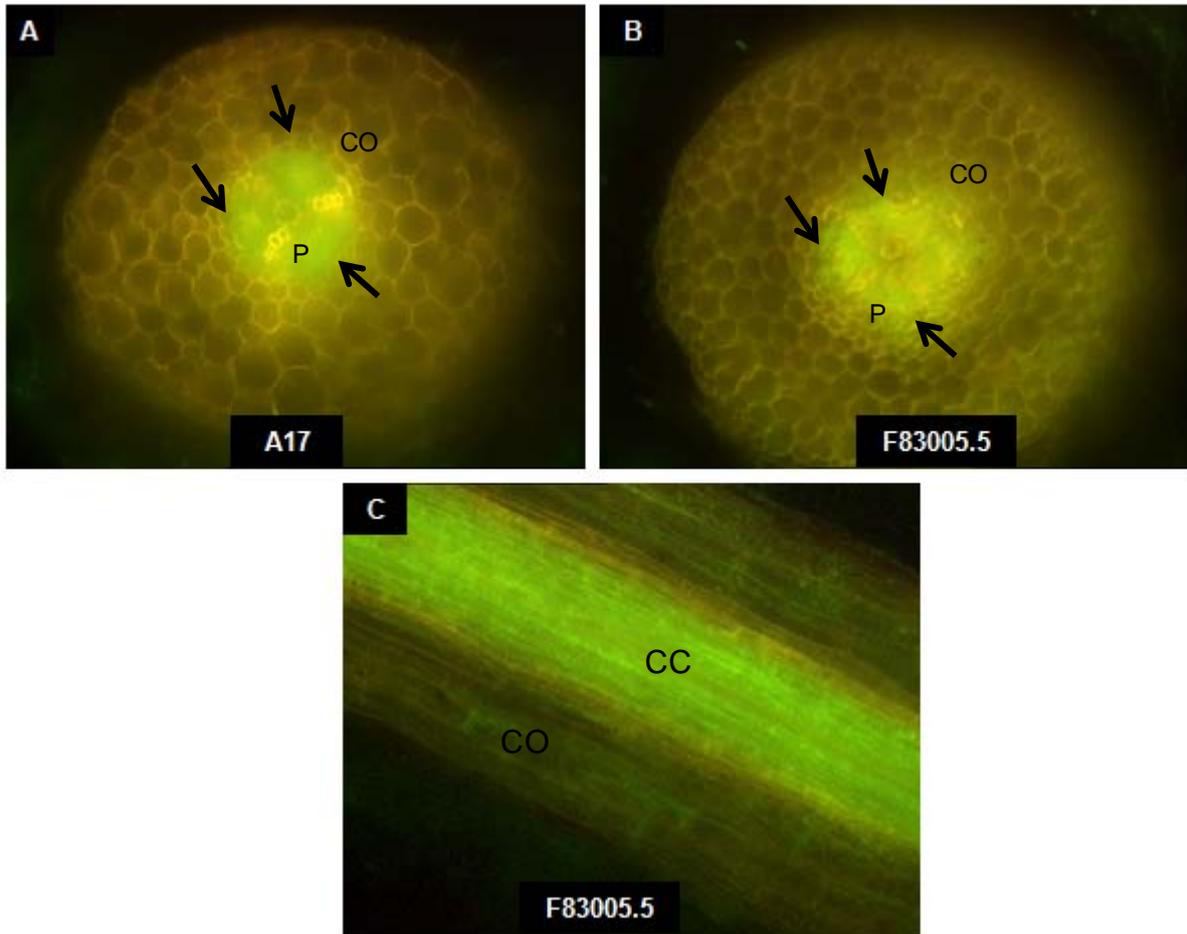
**Figure 18.- Colonisation du cortex des racines de A17 et F83005.5 par *Fom*-GFP à 7 dpi.** Coupes transversales de racines d'A17 (A) et F83005.5 (B) à 4 cm de l'apex et observées par microscopie à épifluorescence à 200x et 400x. Les cellules de l'endoderme montrent une autofluorescence rouge non détectée dans les zones plus près de l'apex. Les cellules des couches externe et interne du cortex sont colonisées par *Fom*-GFP; On détecte le mycélium fluorescent à l'intérieur des cellules (têtes de flèche pleine) et dans les espaces intercellulaires (têtes de flèche vide). EN = endoderme; les têtes de flèches pleines indiquent la colonisation intracellulaire par le champignon tandis que la tête de flèche vide indique la colonisation intercellulaire.

Les observations ont été réalisées à partir de deux jours après inoculation. On note des conidies germées à la surface de la racine, et des hyphes se développant à la surface de la racine et présentant souvent une croissance dans les creux entre les cellules épidermiques (**Figure 16 A, B**). La zone de poils absorbants a été le site préférentiel pour le développement initial du champignon, et aux étapes précoces de l'interaction la plupart des hyphes observés étaient entremêlés entre les poils. Aux étapes tardives, le mycélium a d'ailleurs couvert complètement la surface de la racine en formant une couche dense autour des racines (résultats non montrés). La pénétration des hyphes s'est produit directement sans la formation des structures spécialisées comme des appressoria, au long de la surface de la racine. La présence d'un hyphe dans un poil absorbant a été observée une fois (**Figure 16 C, D**), indiquant que la pénétration dans les poils absorbants était possible mais que ce n'était pas un mécanisme de pénétration fréquent.

Après 3 ou 4 jours, les hyphes ont été observés dans la première couche des cellules du cortex (**Figure 17**). La colonisation du cortex continuant, on note que les hyphes présentent une croissance inter- et intracellulaire, qui est à la fois centripétale vers le cylindre central et verticale au long de l'axe racinaire. La colonisation du cortex par le champignon était comparable dans des racines des lignées A17 et F83005.5. A 7 jours après inoculation, le champignon a colonisé le cortex entier et se rapproche du cylindre central (**Figure 18**). Après 9 à 10 jours le champignon a atteint le cylindre central et a colonisé les vaisseaux du xylème chez A17 et F83005.5 (**Figure 19**). Les sites d'émergence de racines secondaires constituaient des endroits de développement massifs de mycélium et probablement des points de pénétration préférentiels à ces stades plus tardifs (**Figure 20**).

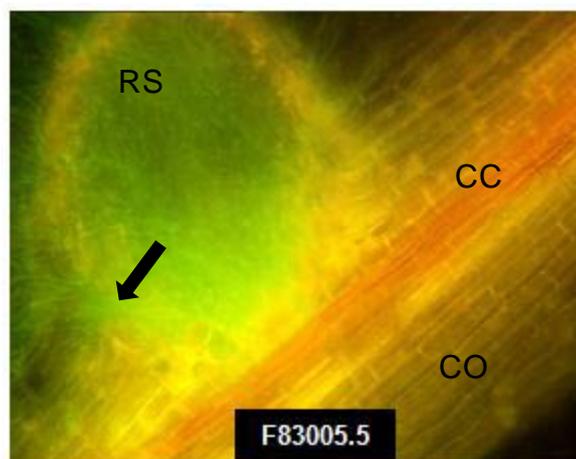
Quand on a comparé la colonisation de la racine dans des zones et des temps d'inoculation différentes, on a noté que l'apex n'était pas le premier site d'infection et que les zones à 1 et 2 cm sont celles colonisées le plus rapidement. Ces zones correspondent bien à la région des poils absorbants. La zone à 3 cm, plus éloignée de l'apex et dépourvu de poils, était colonisée moins vite. Ceci était observé chez les deux lignées A17 et F83005.5.

Les racines de la lignée A17 ont été observées sous microscope confocal à des étapes tardives, à partir de 10 jours après inoculation. Ces analyses ont permis de visualiser des

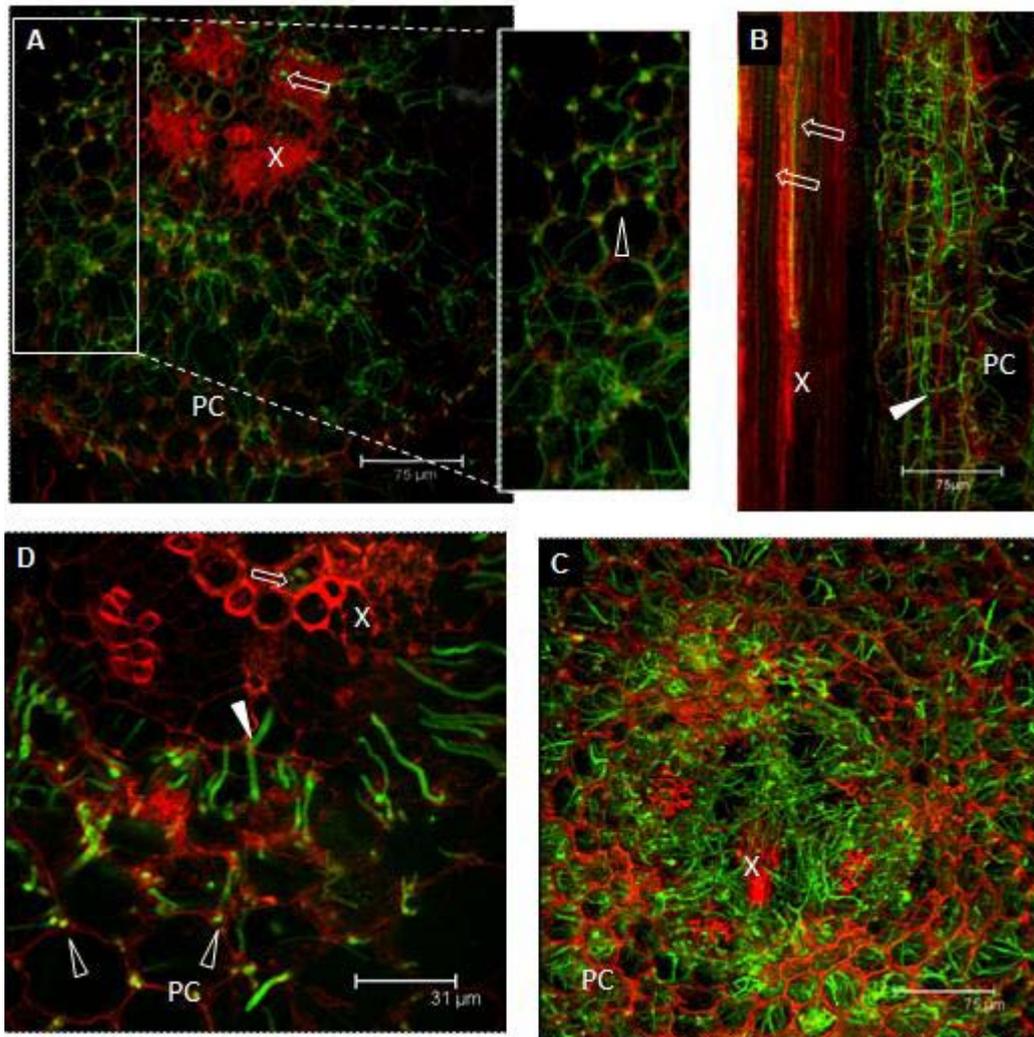


**Figure 19.-Colonisation du cylindre central de racines de *M. truncatula* par *Fom*-GFP.** Observation par microscope à épifluorescence (200x) d'une coupe transversale des inclusions de racines (zone B: environ 2 cm de l'apex) de A17 (A) et F83005.5 (B) à 11 dpi (flèches). On note la présence de *Fom*-GFP dans les cellules du cortex mais surtout dans le parenchyme du cylindre central, chez les deux lignées. (C) Colonisation du cortex et cylindre central chez F83005.5 (zone B, 12 dpi).

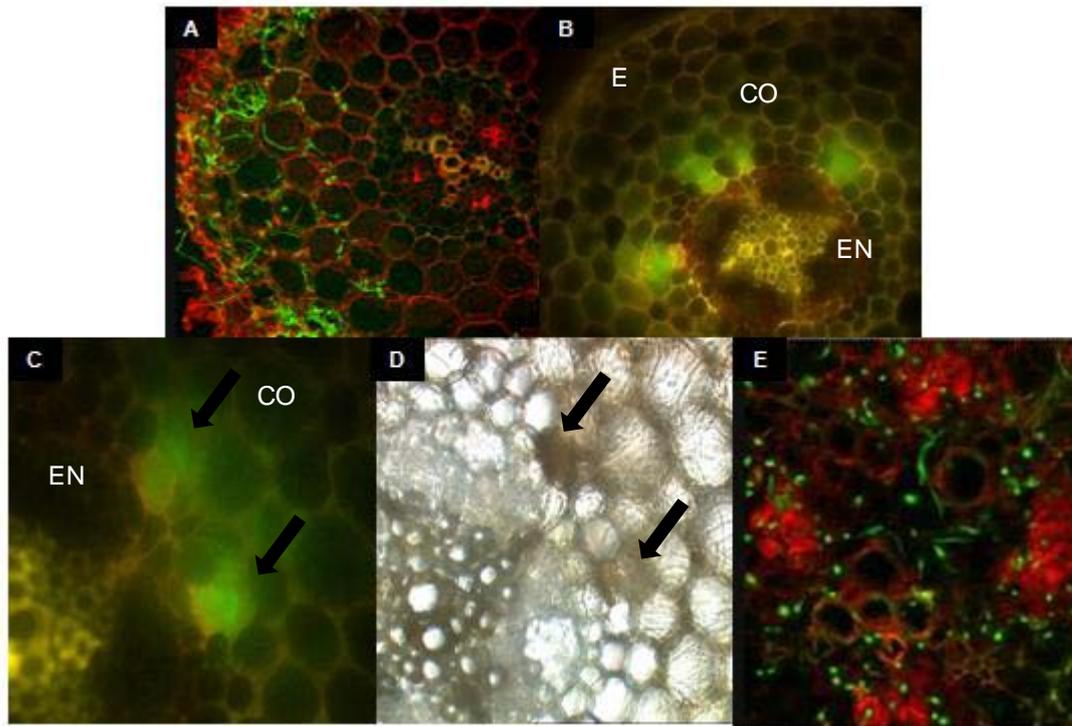
CO = Cotrex ; P = parenchyme.



**Figure 20.- Colonisation d'un point d'émergence d'une racine de F83005.5 inoculée avec *Fom*-GFP.** Colonisation d'une racine secondaire émergente dans la zone 3. (12 dpi), coupe transversale observé par microscope à épifluorescence. On note la pénétration des hyphes au site de craquellement entre racine primaire et secondaire (flèche).CC = Cylindre central ; CO = Cortex ; RS = racine secondaire



**Figure 21. Observation en microscopie confocale de la colonisation de la racine de *M. truncatula* par *Fom-GFP*.** Coupes transversales (A, C, D) et longitudinales (B) de racines incluses dans l'agarose, observées par microscopie confocale après coloration de la paroi cellulaire avec le rouge Congo. Les coupes ont été préparées à partir de racines inoculées d'A17 à 10 dpi (A, B), 11 dpi (C) et 17 dpi (D), zone B (environ 2 cm de l'apex). On note la croissance dans les cavités intercellulaires (têtes de flèche vides), à travers des parois cellulaires (têtes de flèche pleines) et à l'intérieur des vaisseaux du xylème (flèches vides). X = Xylème, PC = parenchyme cortical.

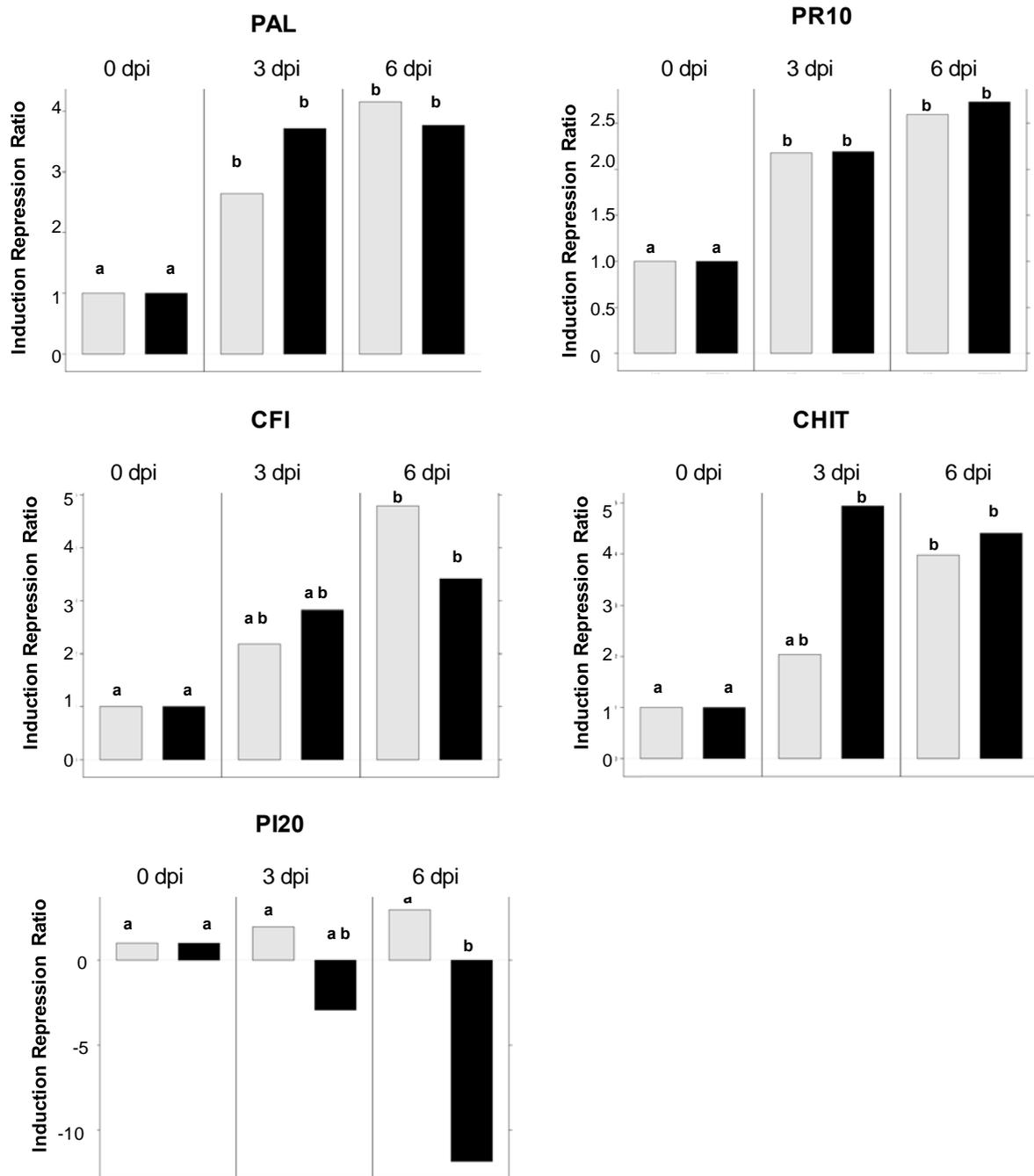


**Figure 22.- Observation de coupes transversales de racines de Damas incluses dans l'agar 5%. (A)** Colonisation du cortex à 10 dpi dans la racine à 1 cm (microscopie confocale). **(B)** Colonisation du cortex à 12 dpi dans la racine à 2 cm (microscopie à épifluorescence). Le champignon est arrivé à l'endoderme et semble s'accumuler dans les cellules du cortex en contact avec l'endoderme, les parois des cellules de l'endoderme ont une autofluorescence jaune accrue. **(C, D)** Colonisation du cortex à 12 dpi dans la zone à 3 cm . On note l'arrêt de la croissance des hyphes à la limite de l'endoderme ainsi que les cellules nécrosées. **(E)** Le champignon dans le stèle d'une racine de Damas à 2 cm, 12 dpi.

détails de la colonisation racinaire, lorsque le champignon envahit le cylindre central. On voit que la croissance inter et intracellulaire des hyphes est orientée dans deux directions: de l'extérieur vers le centre et verticalement au long de l'axe de la racine. La croissance intercellulaire est principalement observée au long de l'axe racinaire et dans les cavités entre les cellules du parenchyme cortical, et non chez les hyphes avec une croissance dirigée vers le centre de la racine (**Figure 21 A, B, C**). La croissance intracellulaire du champignon, en traversant les parois entre deux cellules, a été observée dans les deux orientations des hyphes ainsi que dans les vaisseaux conducteurs. A 17 dpi, la racine a été colonisée massivement sur son diamètre complet (**Figure 21 D**), et on observe une forte macération du cylindre central. Par contre les contours des cellules corticales sont bien conservés (**Figure 21 C**). Les plantes à ce stade ont un aspect mort.

Les racines de plantes de la population Damas ont été moins colonisées. Dans la majorité des racines à 10 et 12 dpi le champignon a été observé uniquement dans le cortex (**Figure 22 A**). Quand les hyphes sont proches de l'endoderme, il semble s'accumuler dans quelques cellules comme s'il ne pouvait plus avancer vers le cylindre central (**Figure 22 B, C**). Les parois des cellules de l'endoderme en contact avec ces hyphes ont montré une fluorescence jaune (**Figure 22 B, C**); quelques cellules ont apparu marron sous lumière blanche et semblaient nécrosées (**Figure 22 D**). Jusqu'à 17 jours après inoculation le champignon n'a pas été détecté dans le cylindre central de la racine sauf dans une plante (**Figure 22 E**): le champignon a été trouvé au centre de la stèle mais uniquement dans la zone à 2 cm de l'apex.

L'ensemble des observations microscopiques indiquent que la différence de sensibilité entre A17 et F83005 ne serait pas corrélée à une différence dans la colonisation racinaire. Par contre la tolérance chez les plantes de la population Damas pourrait être corrélée à une difficulté du champignon à pénétrer dans le cylindre central.



**Figure 23.- Expression de gènes de défense dans les racines de *M. truncatula* inoculées avec *Fom* 179.29.** L'expression des gènes a été évaluée par qRT-PCR pour les racines de A17 (barres blanches) et F83005.5 (barres noires). Les résultats montrent les facteurs d'induction ou de répression des plantes inoculées par rapport aux témoins à 0 dpi, 3dpi et 6 dpi. Les gènes testés sont ceux de la phénylalanine ammonia lyase (PAL), la PR protéine 10 (PR10), la chalcone flavanone isomérase (CFI), la chitinase (CHIT) et l'inhibiteur de protéase (PI20). L'expression à 0 dpi a été ajustée à 1. Les valeurs correspondent à 4 répétitions biologiques. L'analyse ANOVA a été réalisée avec le logiciel R 2.7.0. Les valeurs avec la même lettre ne sont pas significativement différents par rapport au temps 0 dpi ( $P < 0.05$ ).

#### **2.2.4. L'expression de gènes de défense est modifiée chez *M. truncatula* après inoculation avec *F. oxysporum* f.sp. *medicaginis***

Pour étudier des mécanismes de défense potentiellement mis en place dans les racines de plantes tolérantes et sensibles, nous nous sommes focalisées sur des gènes qui ont été induits pendant l'interaction de *M. truncatula* avec *R. solanacearum* dans des études préliminaires au laboratoire (résultats non publiés). Des jeunes plantules des lignées A17 et F83005.5 ont été inoculées en conditions hydroponiques comme lors des travaux décrits ci-dessus. Les racines ont été récoltées au moment de l'inoculation (t0) et à 3 et 6 dpi. Ces temps correspondent aux étapes dans lesquelles le champignon pénètre dans la première couche cellulaire et colonise le cortex, d'après les analyses microscopiques réalisées avec la souche *Fom*-GFP. Seule la moitié inférieure des racines a été utilisée pour extraire l'ARN puisque elle correspond à la zone préférentielle de fixation et pénétration du champignon (zone portant les poils absorbants). Après une étape de transcription réverse de l'ARN en ADNc, l'expression de gènes de défense a été analysée par qRT-PCR.

Les gènes de défense utilisés pour ce travail sont les gènes codant une PR-protéine (PR-10), les enzymes impliquées dans la synthèse de phytoalexines isoflavonoïdes (PAL, CFI), une chitinase, enzyme de dégradation de parois fongiques (CHIT) et une protéine inhibitrice de protéinases à sérine (PI 20) ainsi que le «gène de ménage» EF1- $\alpha$  comme  $\hat{o}$  ntrole interne. Ces différents gènes représentent des mécanismes de défense différents : PR-protéines, phytoalexines, enzymes et inhibiteurs de protéase. L'induction de l'expression du gène PR10 a été observé dans des feuilles de *M. truncatula* inoculées par *Colletotrichum trifolii* (Torregrosa *et al.*, 2004), ainsi qu'expression des gènes CHIT, PAL et CFI détecté en microarray suite à l'inoculation par *R. solanacearum* (M. F. Jardinaud et L. Gentzbittel, communication personnelle). Enfin une induction du gène de PI20 a été observée dans les racines de *M. truncatula* (A. Yamchi et L. Gentzbittel, communication personnelle).

Comme le montre la **Figure 23** l'expression de ces gènes suit des patrons différents. Une analyse statistique a été nécessaire pour dégager les effets significatifs, car il y avait de la variabilité entre les 4 répétitions biologiques. Le graphique montre les facteurs d'induction ou de répression entre racines inoculées et racines témoins traitées à l'eau.



Un groupe de 3 gènes (PAL, PR-10 et CFI) est induit significativement et avec des facteurs d'induction similaires chez les deux lignées. L'expression des gènes PAL et PR-10 a été induite à 3 dpi et est resté au même niveau à 6 dpi. L'expression du gène CFI a augmenté significativement seulement à 6 dpi. Cependant l'analyse statistique montre qu'à 3 dpi l'augmentation est presque significative. Les niveaux d'induction maximale pour ces 3 gènes sont modestes, entre 2,5 et 5 fois.

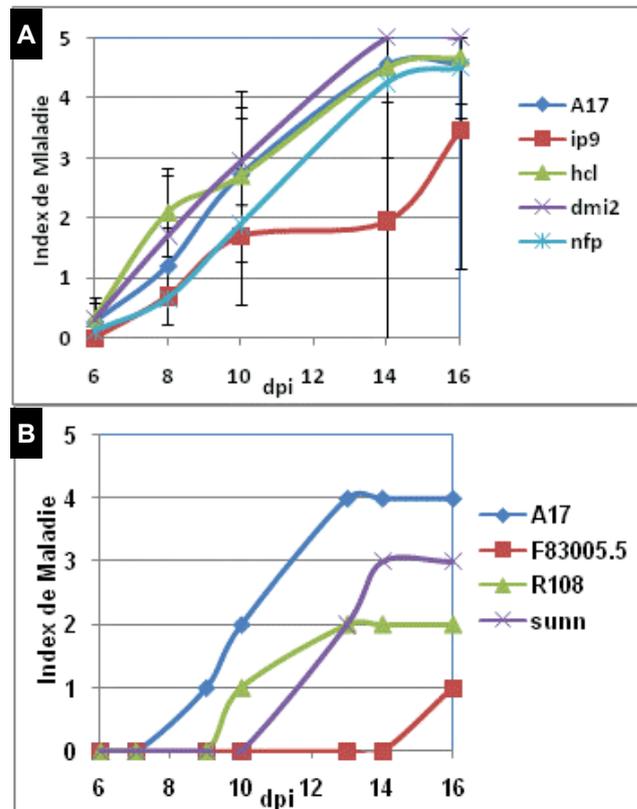
Le gène codant la chitinase a montré un motif d'expression différent chez les deux lignées. Son induction a été plus précoce chez F83005.5, avec un facteur d'induction fort (de 5) à 3 dpi; chez la lignée A17 son expression a été induite seulement à 6 dpi. A ce stade plus tardif le niveau d'induction est similaire chez F83005.5 et A17.

Enfin, un troisième patron d'expression a été montré pour le gène PI 20. On n'observe pas de changement significatif dans son niveau d'expression chez A17 mais il a été réprimé fortement chez F83005.5 à 6 dpi, avec un facteur de répression de 12 fois. Cette tendance est déjà visible à 3 dpi, même si l'effet n'est pas significatif.

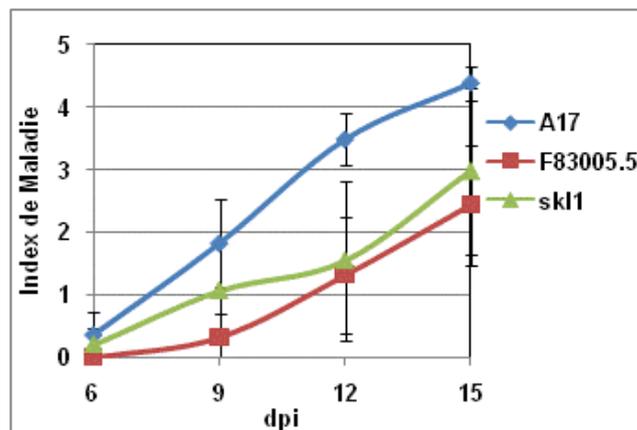
Cette première étude d'expression avec un numéro limité de gènes a montré que même si le patron de colonisation chez la lignée sensible et tolérante a été similaire, il existe une différence dans leurs réactions de défenses précoces pendant l'interaction.

#### **2.2.5. Des mutants de nodulation de *M. truncatula* sont modifiés dans leur sensibilité à *F. oxysporum* f.sp. *medicaginis***

Au laboratoire, un aspect des études sur l'interaction de *Medicago truncatula* avec *Ralstonia solanacearum* sont les effets croisés entre pathogénèse et symbiose avec le *Sinorhizobium meliloti*. Plusieurs mutants de nodulation sont disponibles dans un fond génétique A17 et sont étudiés dans des expériences avec la bactérie pathogène : *sickle* (insensible à l'éthylène, hypernodulant), *sun* (hypernodulant), *ip9* (courbure anormal des poils absorbants et déformation du cordon d'infection), *hcl* (hair curling - défaut dans la courbure des poils absorbants), *dmi2* (défaut dans une receptor like kinase impliquée dans la



**Figure 24.- Développement de symptômes chez des mutants de *M. truncatula* inocuées avec *Fom 179.29*.** Les graphiques montrent les indices de maladie après inoculation en culture hydroponique. **(A)** Lignées A17 et les mutants *ip9*, *hcl*, *dmi2* et *nfp* ; **(B)** Lignées A17, F83005.5, R108 et le mutant *sun*. Pour ces deux essais d'inoculation indépendantes, une répétition biologique a été faite avec **(A)** au moins 3 répétitions techniques (1 répétition technique = 1 pot avec 4 plantes) et **(B)** une répétition technique.



**Figure 25.- Développement de symptômes chez A17, F83005.5 et le mutant *skl1* inocuées avec *F. oxysporum f. sp. medicaginis*.** Les racines de plantes âgées de 4 jours ont été inocuées par une suspension de spores ( $10^6$  spores/mL, 30 min) et ont été ensuite transférées dans de l'eau en pots copro. Les résultats montrent les moyennes des indices de maladie et les écarts types de 6 répétitions biologiques.

perception/transduction des facteurs Nod) et *nfp* (Nod Factor Perception – défaut dans le récepteur des facteurs Nod). Après inoculation de ces mutants par la souche GMI1000 de *R. solanacearum*, des différences dans la sensibilité ont été observées, ce qui indique que maladie et symbiose partagent certains mécanismes de régulation (Jardinaud, résultats non publiés). Il était intéressant d'élargir cette étude à un autre agent pathogène, et les mutants ont été donc utilisés dans des essais d'inoculation avec la souche *Fom* 179.29. La méthode d'inoculation a été comme dans les chapitres précédents, en conditions hydroponiques dans de petits pots.

L'évolution des symptômes a été suivie chez les mutants et les lignées A17 et F83005.5 pendant 2 semaines, en utilisant l'échelle de notation de 0 à 5 déjà décrite. Les résultats ont été obtenus sur un petit nombre de plantes et ne montrent donc que des tendances. Comme illustré dans la **Figure 24**, les mutants *ip9*, *sun* et *skl* présentaient un retard dans l'apparition des symptômes, et les symptômes étaient moins importants à la fin de l'expérience que chez la lignée A17. Ils semblent donc plus tolérants au champignon. Les mutants *dmi2*, *hcl*, *nfp* n'ont pas présenté de différence avec la lignée A17. Seulement pour le mutant *skl* nous n'avons pas eu assez de graines pour réaliser plusieurs répétitions biologiques. Les résultats obtenus montrent que ce mutant était significativement moins sensible à *Fom* que la lignée mère A17 (**Figure 25**). En résumé, les inoculations des différents mutants confirment que certaines voies de régulation sont communes entre interactions symbiotiques et pathogènes, même si ce pathogène n'est pas une bactérie.

### 2.3. DISCUSSION

La culture de la luzerne cultivée *M. sativa* est affectée par des infections par *F. oxysporum* f.sp. *medicaginis*. Des variétés tolérantes ou résistantes ont été créées par les sélectionneurs (Hwang, 1992 ; Salter *et al.*,1994,). Cependant, les étapes de l'interaction et les réactions induites chez la plante sont peu étudiées chez cette espèce. Dans l'objectif de mieux comprendre les mécanismes de sensibilité et résistance à cette maladie, il est



intéressant d'utiliser la plante modèle *M. truncatula*. Tout d'abord il faut s'assurer que cette espèce est bien une plante hôte pour le champignon.

L'inoculation de *M. truncatula* dans un système hydroponique miniaturisé a montré induire les mêmes symptômes qu'aux champs, tels que la réduction de la croissance racinaire et la chlorose des feuilles suivies par un dessèchement et la mort des plantes. Notre système possède deux avantages il ne nécessite pas beaucoup d'espace dans les salles de culture, les racines peuvent être observées facilement et sont accessibles pour étudier leur colonisation sans blesser les tissus et l'expression des gènes.

Dans la plupart des études sur *F. oxysporum* et ses plantes hôtes respectives, le protocole d'inoculation comprend l'excision de l'extrémité des racines (Alves-Santos *et al.*, 1999, Altier *et al.*, 2000), permettant une entrée rapide des spores. Ceci est supposé imiter la situation dans le champ lorsque l'attaque du pathogène est favorisée par les blessures naturelles du système racinaire (Stutz *et al.*, 1985). Notre protocole de culture et d'inoculation des racines par *Fusarium oxysporum* f.sp. *medicaginis* permet l'induction des symptômes de maladie sans couper les racines. Même si nous ne pouvons pas exclure que des blessures microscopiques se sont produites pendant le transfert des plantes du milieu Fahraeus gélosé dans la suspension de spores et dans les pots en plastique de culture hydroponique, on peut dire que les conditions d'inoculation -culture hydroponique, concentration des spores et temps d'incubation – ne forcent pas une infection. En effet, une concentration de spores de  $10^6$  sp/mL et un temps d'incubation des racines dans la suspension des spores de 30 minutes sont tout à fait standard dans la littérature (Gao *et al.*, 1995; Alves-Santos *et al.*, 1999; Ficcadenti *et al.*, 2002). On peut donc conclure que *M. truncatula* est bien une plante hôte pour *Fusarium oxysporum* f.sp. *medicaginis*.

Parmi les lignées de *M. truncatula* testées, nous n'avons pas identifié une lignée complètement résistante, seule F83005.5 semblait avoir le meilleur degré de tolérance dans des essais préliminaires. De même c'est avec le couple A17 et F83005.5 que la plupart des analyses ont été ensuite réalisées. En utilisant une échelle de symptômes de 0 à 5, la sensibilité d'A17 et F83005.5 a été étudiée de façon quantitative. Ceci a permis de confirmer la tolérance de F83005.5 par rapport à la sensibilité d'A17. Il est à noter que ces deux lignées



présentent aussi des phénotypes contrastés dans des interactions avec d'autres agents pathogènes: *Ralstonia solanacearum* (Vailleau *et al.*, 2007), *Colletrotrichum trifolii* (Torregrosa *et al.*, 2004), *Aphanomyces euteiches* (Djébali *et al.*, 2009) et *Verticillium albo-atrum* (M. Rickauer, C. Ben, résultats non publiés). A17 et F83005.5 sont des lignées parentales d'un croisement (LR4) avec des lignées recombinantes en 8ème et 7ème génération et ont déjà été utilisées pour étudier les bases génétiques de la tolérance à *R. solanacearum* (Vailleau *et al.*, 2007), *C. trifolii* et *E. pisi* (Ameline-Torregrosa *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008) et *A. euteiches* (Djébali *et al.*, 2009). Cependant nos expériences avec *Fom* ont également mis en évidence des variations importantes dans la sensibilité des lignées, d'une inoculation à une autre, et aussi entre différents lots de graines, malgré le fait qu'il s'agisse de lignées fixées. De plus la tolérance à *Fom* chez F83005.5 était moins forte que celle vis-à-vis de *R. solanacearum*, la différence dans les notes de symptômes était de 1,8 comparée (**Figure 8**) à 4 sur les notes avec la bactérie (F. Vailleau, communication personnelle). Il a fallu donc réaliser un grand nombre de répétitions biologiques pour dégager des résultats fiables. Cette variabilité a ajouté de la lourdeur aux études et nous a fait abandonner l'idée d'analyser les bases génétiques de la tolérance chez F83005.5.

Une autre possibilité d'identifier une résistance envers *F. oxysporum* chez *M. truncatula* a été celle d'étudier des interactions entre la plante et des souches pathogènes d'autres plantes hôtes. En réponse aux différentes souches pour les 2 lignées, nous n'avons pas obtenu de différentiel plus fort qu'avec la souche *Fom* 179.29. On peut noter cependant qu'A17 n'a pas toujours été la lignée plus sensible. Pour certaines f.sp. par exemple *Foci* 1 (plante hôte pois chiche) et *Fol* 8 (plante hôte tomate) A17 était plus tolérante que F83005.5.

Une autre observation intéressante a été celle des formes spéciales de légumineuses qui n'étaient pas plus agressives que celles d'autres plantes. Les deux isolats non pathogènes *Fo* 47 et *Fo* 3 sont même parmi les plus agressifs. Les souches non pathogènes sont particulièrement étudiées pour leur utilité en biocontrôle du flétrissement et de la pourriture racinaire causés par *Fusarium*, majoritairement par compétition lorsque le champignon colonise la surface de la racine (Olivain et Alabouvette, 1999; Bolwerk *et al.*,



2005; Fravel *et al.*, 2003). Par exemple des préparations de *Fo 47* ont voulu être commercialisées sans succès aux USA sous le nom de Fusaclean pour la protection de cultures de tomate, basilique, cyclamen et œillet (Agrios, 2005). Cependant, les deux souches utilisées dans notre travail sont définies comme non pathogènes par rapport à la tomate et à un nombre limité de plantes sur lesquelles elles ont été inoculées, et il n'a pas été exclu qu'elles pourraient être pathogènes dans des espèces de plantes où elles n'ont pas été testées. Ce constat est valable également pour les *formae speciales* pathogènes (Fravel *et al.*, 2003; Recorbet *et al.*, 2003). Le fait que *M. truncatula* peut être une plante hôte supplémentaire à celles décrites dans la littérature pour les différents isolats utilisés, n'est donc pas une contradiction aux données publiées.

Les conditions de culture peuvent également avoir une influence sur les interactions entre plante et champignon pathogène. On peut cependant dire que nos conditions de culture hydroponique ont permis de reproduire la résistance et sensibilité de *M. truncatula* face aux pathogènes racinaires *R. solanacearum* et *Verticillium albo-atrum*, observées lors d'inoculations en substrat Jiffy ou en boîte de Petri sur milieu Fahraeus gélosé (Vailleau *et al.*, 2007; C. Ben et M. Rickauer, résultats non publiés). De plus, des études en conditions similaires ont été décrites chez la tomate avec *Fol*, ou chez le lin avec *Fo 47* et une souche pathogène de *F. oxysporum* (Olivain et Alabouvette, 1999; Olivain *et al.*, 2003). Tout ceci suggère que les conditions de culture hydroponique n'ont pas eu d'effet sur la capacité de résistance générale de la plante ni sur la biologie du champignon. L'ensemble de nos résultats suggère donc que *M. truncatula* est bien un hôte permissif pour *F. oxysporum*, la plante est infectée par *Fom* et par d'autres *formae speciales* de *Fusarium* inféodées à des hôtes différents.

Dû à l'importance économique du flétrissement vasculaire et de la pourriture racinaire chez la tomate, les différentes étapes d'infection de la tomate par *Fol* et *Forl* ont été bien caractérisées, notamment par des études microscopiques détaillées (Olivain et Alabouvette, 1999; Di Pietro *et al.*, 2001; Lagopodi *et al.*, 2002). Chez les légumineuses, ces étapes sont moins étudiées (Kraft, 1994). Dans un premier temps nous avons été intéressés de savoir si la colonisation de la racine chez *M. truncatula* était similaire à ce qui a été décrit



chez la tomate. Ceci nous a amené à utiliser une souche de *Fom* exprimant le gène marqueur GFP dans des expériences d'inoculation de la lignée sensible A17. Avec un nombre d'échantillons moins important, nous avons ensuite étudié la colonisation de la lignée tolérante F83005.5 et de plantes d'une population tolérante (Damas).

La colonisation de la racine de *M. truncatula* par *Fom*-GFP a débuté par la germination des conidies et la croissance des hyphes à la surface racinaire, suivie par la pénétration dans l'épiderme sans la formation des structures spécialisées. Cette étape ressemble à ce qui est décrit avec d'autres *formae speciales* (Olivain et Alabouvette, 1999; Lagopodi *et al.*, 2002). Il a été rapporté que *Fol* pénètre dans les poils absorbants des racines chez la tomate (Olivain et Alabouvette, 1999) et notre observation confirme ce mode d'infection même s'il n'est pas d'une grande importance dans l'interaction *M. truncatula* - *Fom*. Après la pénétration, *Fom*-GFP a colonisé d'abord le cortex et ensuite le cylindre central, avec une croissance inter- et intracellulaire des hyphes. Il est intéressant de noter que la croissance intercellulaire paraît surtout associée à une orientation des hyphes au long de l'axe de la racine, tandis que la croissance intracellulaire était plutôt associée à une orientation centripétale. Au stade final de la maladie on observe un envahissement complet de l'ensemble des tissus de la racine. A cet égard, le mode de colonisation est plutôt différent de ce qui a été décrit généralement pour les maladies de flétrissement induites par *F. oxysporum* f. sp., où la croissance fongique est limitée aux vaisseaux du xylème après que le cortex soit traversé de façon très dirigée par des hyphes avançant entre les cellules (Di Pietro *et al.*, 2003; Agrios, 2005). Le patron de colonisation observé chez *M. truncatula* ressemble plutôt à la colonisation du cortex avec croissance mycélienne intracellulaire observée seulement occasionnellement chez la tomate inoculée par *Fol*, et qui était associée à une macération sévère du cortex et du cylindre central (Olivain et Alabouvette, 1999). Mais contrairement à ce travail, nos observations ont montré qu'à l'exception du parenchyme dans le cylindre central aux stades finaux, les structures des tissus ont été bien préservées dans les racines colonisées. La forme des cellules est restée régulière et l'adhésion entre les cellules ne paraît pas affectée, indiquant que les parois cellulaires n'ont pas été fortement dégradées. *F. oxysporum* est connu pour produire une grande quantité d'enzymes dégradant



la paroi végétale *in vitro* et *in planta* (Di Pietro *et al.*, 2003), mais au moins dans le cortex de la racine de *M. truncatula* il ne semble pas en produire. Ceci pourrait être corrélé au fait que la croissance intercellulaire de *Fom* a été observée principalement dans les méats intercellulaires, ne nécessitant pas la dégradation de polymères pectiques. En résumé, la colonisation des racines de *M. truncatula* par *Fom* a suivi un patron qui montre des similarités mais aussi des différences avec la croissance de *F. oxysporum* dans d'autres plantes hôtes décrites dans la littérature.

En comparant la colonisation de la racine des lignées A17 et F83005.5 au cours du temps, nous n'avons pas constaté des différences significatives. Le champignon a envahi le cylindre central de la lignée tolérante avec la même vitesse que chez la lignée sensible. Contrairement donc au mécanisme de résistance à *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* décrit chez la tomate (Gao *et al.*, 1995), la tolérance à *Fom* chez F83005.5 n'est pas associée à une exclusion du champignon du cylindre central. Cependant on ne peut pas généraliser qu'un tel mécanisme n'existe pas chez *M. truncatula*. Les observations réalisées chez les plantes de la population Damas ont montré que dans la plupart des plantes le champignon est resté confiné au cortex. Puisqu'il s'agit d'une population et non d'une lignée fixée, la seule exception où des hyphes sont présents dans le cylindre central n'est pas contradictoire. Un mécanisme de résistance similaire à celui de la tomate pourrait donc bien exister chez Damas. Il faudrait fixer une lignée et répéter ces expériences pour confirmer ou réfuter cette hypothèse.

A notre connaissance, la présente étude décrit pour la première fois l'interaction entre *M. truncatula* et *Fom*. Nos observations microscopiques ont montré que la colonisation de *M. truncatula* par *Fom*-GFP présente des caractéristiques atypiques de la maladie de flétrissement causée par *F. oxysporum*, notamment que la colonisation n'a pas été limitée aux vaisseaux du xylème. On peut imaginer que les particularités des cellules de racines de *M. truncatula* sont responsables de ce patron et que peut-être ce patron atypique est liée à la nature permissive de la plante.

L'inoculation avec *Fom* a modifié l'expression de gènes liés à la défense dans les racines de *M. truncatula*. Des gènes encodant PAL, PR-10 et CFI ont été induits de façon



similaire chez A17 et F83005.5, et le gène de la chitinase a été induit dans les deux lignées mais plus tôt dans la lignée tolérante F83005.5. PAL et CFI sont des enzymes de la voie des phénylpropanoïdes, amenant à la synthèse d'une large variété de composés tels que la lignine, les coumarines et les phytoalexines antimicrobiennes flavanones (Dixon *et al.*, 2002). Leur induction ainsi que l'induction du PR-10 pourraient être partie de la réponse de défense basale dans les plantes susceptibles et tolérantes.

Dans la littérature il existe des rapports de l'expression des membres de la famille PR-10 en réponse aux attaques de pathogènes. Pendant les interactions compatible et incompatible de *M. trunctula* avec *Aphanomyces euteiches*, un groupe de protéines PR-10 a été même plus fortement induit dans les racines de la lignée sensible: F83005.5 en comparaison avec la lignée tolérante F83005.9 (Colditz *et al.*, 2005).

Pendant l'interaction de *M. trunctula* avec *Phytophthora medicaginis*, l'expression du gène PR-10 a été induit chez les lignées sensible et moyennement tolérante mais pas chez la lignée résistante (D'Souza, 2009). L'expression de PR-10 chez la luzerne a été induite par l'inoculation mais n'a pas été corrélée avec la résistance à *Colletotrichum trifolii* (Truesdell et Dickman, 1997). Le silencing de 6 membres de la famille PR-10 chez *M. trunctula* a augmenté la tolérance vers *A. euteiches* (Colditz *et al.*, 2007). Il a été proposé que ce phénotype a une relation avec l'induction antagoniste de PR-5b chez les lignées silenciées. Le rôle biologique exact des protéines PR-10 n'est pas encore bien compris et il est nécessaire de faire des études supplémentaires sont nécessaires pour découvrir sa fonction dans la défense des plantes.

Les gènes liés à la biosynthèse de flavonoïdes ont été induits transitoirement dans les racines de *M. trunctula* 3 jours après inoculation avec le champignon nécrotrophique *Phymatotrichopsis omnivora*, et il a été proposé que la défense basale a été ensuite supprimée par le pathogène (Uppalapati *et al.*, 2009). L'induction du gène de CHIT a été aussi rapportée pour les racines inoculées avec *P. omnivora*, et son induction plus tôt dans les racines inoculées de F83005.5 avec *Fom* pourraient représenter des réactions qui contribuent à la tolérance. Même si l'envahissement par *Fom* n'a pas été arrêté dans la racine de la lignée tolérante, la dégradation de la chitine dans sa paroi cellulaire pourrait



affaiblir le pathogène et interférer avec son agressivité. Les analyses réalisées dans notre travail constituent des travaux préliminaires avec seulement 3 temps de cinétique (t0, 3dpi et 6 dpi) et il faut être prudent en interprétant les résultats. Une cinétique plus précise et plus longue serait nécessaire pour pouvoir confirmer ces hypothèses. L'expression de l'inhibiteur de protéase PI20 a été régulé spécifiquement chez la lignée tolérante où elle a été fortement supprimée en réponse à l'inoculation. Les inhibiteurs de protéase sont connus pour être induits par des blessures, la libération d'éliciteurs endogènes et des attaques d'agents pathogènes (Koiwa *et al.*, 1997), et il a été observé que le PI20 est induit dans les racines de *M. truncatula* par l'inoculation avec *R. solanacearum* (A. Yamchi, résultats non publiés). Donc, la réponse contrastant à *Fom* indique que dans le même organe des différences nettes pourraient exister entre les mécanismes de défense contre différents pathogènes. Les résultats obtenus dans cette étude à petite échelle montrent que des réponses précoces dans l'expression des gènes de défense sont régulées de façon différente chez la lignée tolérante et sensible, ce qui encourage à continuer à plus grande échelle pour comprendre les mécanismes qui impliquent la tolérance à ce pathogène.

Un thème stratégique dans les activités de recherche du laboratoire concerne l'étude des mécanismes de régulation croisés dans des cas d'interactions pathogènes et symbiotiques. Notamment l'interaction de *M. truncatula* avec la bactérie *R. solanacearum* est comparée avec la symbiose avec *Sinorhizobium meliloti*, par l'utilisation de mutants de nodulation et leur inoculation par la bactérie pathogène. Ce type d'analyse a été entamé également avec *Fom*, même si on peut penser que l'interaction avec un champignon diffère de celle avec une bactérie. Par manque de graines ces travaux ne sont pas allés très loin, mais dans le cas du mutant *sickle* des répétitions biologiques ont pu être réalisées permettant d'obtenir des résultats fiables. Il apparaît que *sickle* est moins sensible qu'A17, même s'il n'arrive pas au niveau de tolérance de F83005.5. Ceci est bien en accord avec les résultats obtenus au laboratoire sur l'interaction avec *R. solanacearum*: dans ce cas le mutant est également devenu résistant comparé à la lignée mère A17. Le mutant *sickle* est insensible à l'éthylène et présente un phénotype hypernodulant (Penmetsa et Cook, 1997). Le gène muté est un orthologue du gène *EIN2* d'*Arabidopsis thaliana* codant un transporteur



de métal impliqué dans la perception de l'éthylène (Penmetsa *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2005). *EIN2* exerce une régulation négative non seulement sur l'interaction symbiotique avec *S. meliloti* mais aussi avec le champignon mycorhizien *Glomus versiforme* et *G. intraradices*. Par contre, dans des essais d'inoculation avec des pathogènes racinaires *Phytophthora medicaginis* et *Rhizoctonia solani*, le mutant *sickle* est plus sensible, indiquant une régulation positive de la résistance par l'éthylène, comme cela a été reporté dans *A. thaliana* (Penmetsa *et al.*, 2008; van Loon *et al.*, 2006). Il faut noter que le rôle de l'éthylène peut varier entre positif et négatif en fonction de la plante hôte et l'agent pathogène (van Loon *et al.*, 2006). Les résultats obtenus au laboratoire avec *R. solanacearum* et *Fom* indiquent un rôle de régulation négative de résistance ou de défense basale par l'éthylène chez *M. truncatula* vis-a-vis de ces deux agents pathogènes. Ils confirment aussi qu'il y a des voies de régulation en commun entre interactions pathogènes et symbiotiques. Il est donc fortement intéressant de répéter les expériences avec les autres mutants dès que nous aurons produit des graines. La souche *Fom*-GFP pourra être ensuite utilisée pour analyser le patron de colonisation dans des mutants avec sensibilité modifiée.

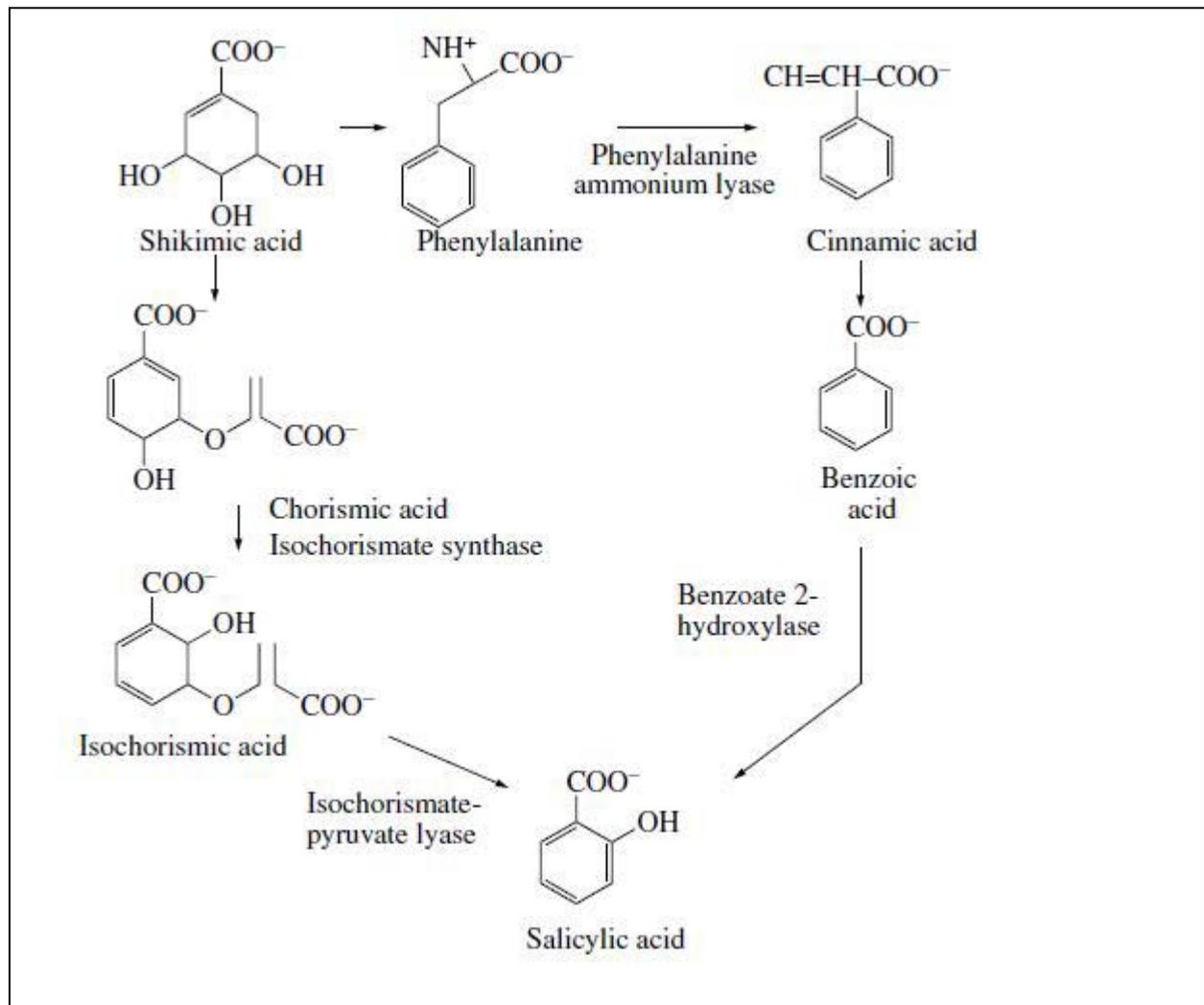


Figure 26.- Voie de biosynthèse de l'acide salicylique proposé chez *Arabidopsis* (Vasyukova et Ozeretskoykaya , 2007).

## 3. L'ACIDE SALICYLIQUE

### 3.1. INTRODUCTION

#### 3.1.1. Structure et synthèse

L'acide salicylique (SA) est une molécule omniprésente de signalisation et impliqué dans beaucoup de phénomènes physiologiques des plantes (Raskin, 1992b), parmi lesquels l'activation de réponses de défense de la plante envers des attaques par des champignons, bactéries ou virus a trouvé une attention particulière.

La découverte de l'acide salicylique date de 1828 quand Johann Buchner a isolé avec succès une petite quantité de salicyline, le glucoside d'alcool salicylique, à partir de l'écorce de saule. Le nom de SA vient du nom latin *Salix* de cet arbre et a été donné à cet ingrédient actif du saule par Raffaele Piria en 1838. La première production commerciale du SA synthétique a débutée en 1874 en Allemagne. Son dérivé acétylé (acide acétylsalicylique) a été introduit sous le nom commercial d'aspirine par l'entreprise Bayer en 1898 et est rapidement devenu le médicament le plus vendu dans le monde (Raskin, 1992b). Chimiquement, le SA appartient à un groupe de composés phénoliques de plantes, qui possèdent un anneau aromatique avec un groupe hydroxyle ou ses dérivés fonctionnels. L'acide salicylique libre est une poudre cristalline qui fond à 157-159°C. Elle est modérément soluble dans l'eau mais hautement soluble dans des solvants polaires organiques.

Deux voies de biosynthèse du SA sont possibles chez les plantes d'après des travaux publiés. La première suivrait la voie des phénylpropanoïdes, avec l'acide cinnamique comme le produit initial (**Figure 26**). L'acide cinnamique est formé à partir de la phénylalanine par l'enzyme phénylalanine ammonia lyase (PAL, EC 4.3.1.5), et était ensuite transformé en acide benzoïque. L'étape finale de la biosynthèse était l'hydroxylation du benzoate par l'enzyme benzoate 2-hydroxylase (BAH).

Une voie alternative de synthèse existe chez les bactéries et dans les chloroplastes de plantes. Cette voie implique les enzymes isochorismate synthase (EC 5.4.99.6) et isochorismate pyruvate lyase qui catalysent les deux étapes de synthèse à partir de l'acide chorismique (Vasyukova et Ozeretskoykaya, 2007). La première enzyme catalyse la



conversion de chorismate à isochorismate, et la deuxième la conversion de ce dernier en SA (Figure 26).

L'accumulation de SA en réponse au stress implique à la fois sa biosynthèse et sa libération à partir de composés conjugués. Les teneurs en SA augmentent de façon transitoire. La diminution de SA libre suite au pic d'augmentation peut être due à la formation de 2-O- $\beta$ -D-glucoside, la formation d'esters glucosides, la formation de méthyl salicylate volatile et la dégradation de SA (Vasyukova et Ozeretskoykaya 2007). Le SA appliqué de manière exogène semble être transporté depuis les sites de son application initiale vers d'autres tissus de la plante pour y induire une réponse à distance (Raskin, 1992b).

### 3.1.2. Rôle physiologique

Le SA a été identifié dans 36 plantes qui appartiennent à des groupes taxonomiques divers. Chez le riz, le soja et l'orge le niveau d'acide salicylique est d'environ 1 mg/g de matière fraîche. La partie florale de sept espèces et les feuilles de vingt-sept espèces thermogéniques ont montré une grande variation dans les niveaux de SA (Raskin *et al.* 1990).

Le SA exerce un rôle dans des phénomènes physiologiques comme la photosynthèse, la floraison, la perméabilité de la membrane, la production de chaleur, la croissance et développement des plantes, et les interactions plantes - pathogènes (Hayat *et al.*, 2007, Raskin, 1992a). Il a été impliqué notamment dans le phénomène de SAR où une plante devient résistante vis-à-vis d'un grand nombre d'agents pathogènes différents suite à une attaque locale par un microorganisme avirulent. L'application exogène de SA peut protéger les plantes contre certains pathogènes et activer l'expression d'un groupe de gènes associés à la défense comme les gènes des protéines PRs lesquelles sont aussi induites dans les plantes infectées (van Loon, 1997).



Dans une revue récente (Vasyukova et Ozeretskovskaya, 2007) l'implication du SA dans l'immunité des plantes est liée à 3 fonctions:

1.- Le SA est une molécule mobile capable d'intervenir dans la chaîne de perception, amplification et transmission de l'information quand une cellule de la plante est attaquée par un agent pathogène; ceci mène à l'expression de gènes de défense responsables de la protection structurale et fonctionnelle (Vasyukova *et al.*, 1999). Le SA migre dans les vaisseaux de la plante, et confère une immunité à distance aux tissus de la plante dans la SAR (Raskin, 1992a, Chen *et al.*, 1993, Vernooij *et al.*, 1994). Dans des tissus de plantes infectées ou traitées avec un éliciteur les niveaux de SA augmentent localement ou à distance (de l'ordre d'une magnitude ou plus). Un traitement avec le SA peut induire les protéines PR localement et systématiquement. Tout ceci indique que le SA est impliqué dans la régulation de l'immunité induite de la plante.

2.- Le SA est impliqué (avec le peroxyde d'hydrogène, oxyde de nitrogène et d'autres composés) dans la fonction de plusieurs systèmes signal, et les unifie vers un réseau d'interactions régulatrices. Les catalases, ascorbate peroxydases, aconitases et certaines MAP kinases (SIPK) sont considérés comme des récepteurs du SA (Farmer *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1998; Cao et Dong, 1998; Mikolajczyk *et al.*, 2000). Il semble que le mécanisme d'action du SA soit déterminé par sa capacité de lier des enzymes, ce qui mène à la formation de radicaux phénol impliqués dans la peroxydation des lipides. Les produits de la peroxydation de lipides pourraient activer l'expression de gènes de défense (Farmer *et al.*, 1998).

3.- La capacité du SA d'inhiber l'activité de la catalase (enzyme qui détoxifie le peroxyde d'hydrogène) mène à une augmentation des taux de peroxyde d'hydrogène *in vivo* et induit un choc oxydatif aux sites de l'attaque par le pathogène ou du traitement avec un éliciteur (Chen et Klessig, 1991; Panina *et al.*, 2004; Ruffer *et al.*, 1995). Des similarités structurales entre SA et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sont à la base de la liaison et inhibition de la catalase par le SA. Il faut noter cependant que ces corrélations ne sont pas vraies pour tous les pathosystèmes.

Comme mentionné dans le chapitre précédent, il existe des analogues ou dérivés naturels et artificiels du SA dont certains sont capables de stimuler ou induire des réponses

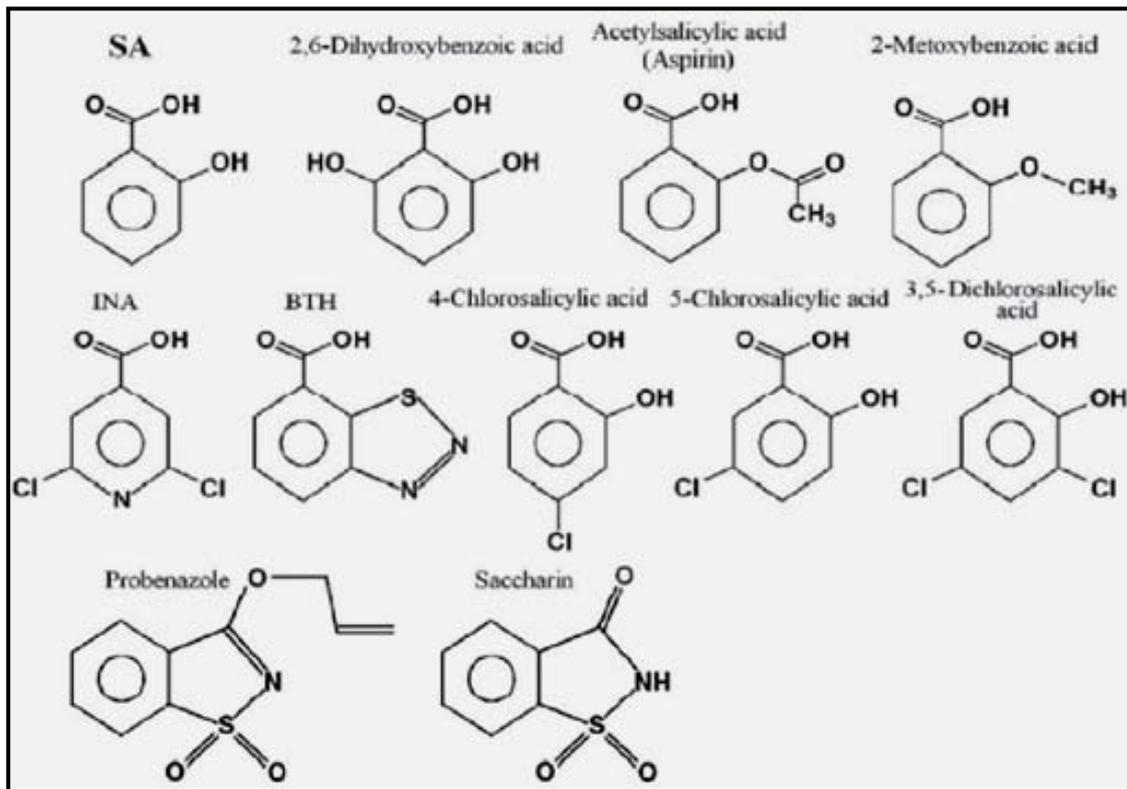


Figure 27.- Analogues actifs de l'acide salicylique (SA) (Kawano et Furuichi, 2007).

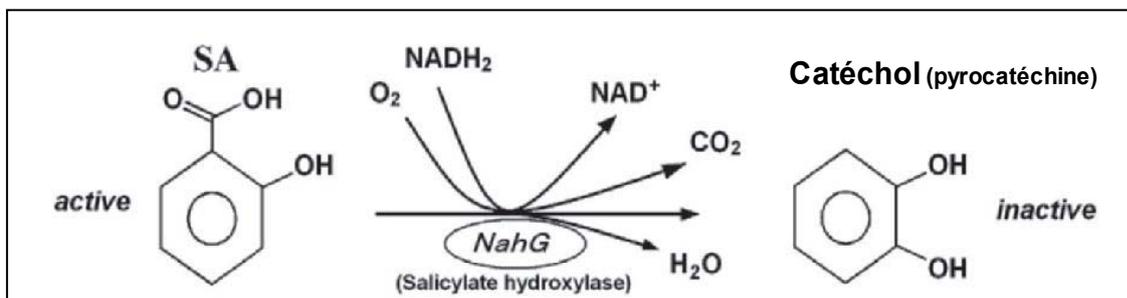


Figure 28.- Réaction catalysée par la salicylate hydroxylase (Hayat et Ahmad, 2007).

de défense chez les plantes. Parmi ces analogues on trouve l'aspirine, l'acide méthoxybenzoïque, l'acide 2,6-dihydroxybenzoïque (DHBA), l'INA et le BTH (**Figure 27**).

Le SA, l'aspirine et l'acide méthoxybenzoïque sont également actifs dans l'inhibition de la catalase, la génération de superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ), et l'induction de flux de  $Ca^{2+}$  dans le cytosol dans des suspensions de cultures cellulaires de tabac (Kawano *et al.*, 1998) et le 2,6-DHBA induit l'acide salicylique 3-O-glucosyltransferase (SAGT) dans les feuilles du tabac (Kawano *et al.*, 2004).

### 3.1.3 Etudes avec des plantes NahG et mutantes affectées dans la voie SA

Grace aux travaux réalisés avec des plantes de tabac transgéniques exprimant le gène NahG (et produisant l'enzyme bactérienne salicylate hydroxylase) il a été possible de mettre en évidence la participation du SA dans la transduction de signal chez les plantes soumises au stress biotique (Delaney *et al.* 1994).

L'enzyme salicylate hydroxylase est codée par le gène bactérien NahG isolé de *Pseudomonas putida*. Elle catalyse la conversion du SA libre en catéchol inactif (**Figure 28**) et les plantes exprimant ce gène sont affectées dans leur capacité d'accumuler le SA. De ce fait elles sont également affectées dans leur capacité à résister à certains agents pathogènes.

De nombreuses expériences ont été réalisées avec des plantes transgéniques exprimant ce gène : Tabac, *Arabidopsis thaliana*, tomate, pomme de terre et colza pour nommer quelques exemples sont diminués dans leur capacité de se défendre contre différents agents pathogènes tels le VMT, *Botrytis cinerea*, *Phytophthora infestans* et *Pseudomonas syringae*, respectivement (Vernooij *et al.* 1994; Audenaert *et al.*, 2002; Halim *et al.*, 2007; Potlakayala *et al.*, 2007).

Plusieurs mutants déficients dans la réponse à l'infection du pathogène ont été isolés chez *Arabidopsis*. Ces mutants n'accumulent pas le SA lors de l'infection avec des pathogènes virulents ou avirulents et par conséquent ils sont plus sensibles à la infection du pathogène. Quelques exemples de ces mutants sont *eds1* (Enhanced Disease Susceptibility



1), *pad4* (Phytoalexin Deficient 4), *eds5* (aussi connu comme *sid1*) et *ics1* (Isochorismate Synthase; auparavant connu comme *sid2* ou *eds16*).

Les plantes mutantes *eds1* et *pad4* sont déficientes dans la réponse basale et induite contre plusieurs pathogènes virulents et avirulents (Feys *et al.*, 2001).

La protéine ICS1 code pour l'enzyme isochorismate synthase 1 qui catalyse la synthèse de SA à partir de chorismate (Wildermuth *et al.*, 2001).

Grâce aux mutants il a été montré que le SA est synthétisé par les voies impliquant l'ICS1 et la PAL. La voie d'ICS1 synthétise le SA pendant la SAR tandis que la voie de PAL synthétise le SA (**Figure 26**) quand il y a une défense locale et une formation de lésion autour du site d'infection (Ferrari *et al.*, 2003).

#### **3.1.4. SA chez les légumineuses (symbiose et pathogénie)**

Des recherches pour comprendre les mécanismes de reconnaissance qui font que la plante reconnaît le microorganisme envahisseur comme un symbiote bénéfique et non pathogène ont été réalisées. On pense que dans leur interaction les champignons mycorhiziens arbusculaires et Rhizobia n'activent pas la réponse de défense chez la plante hôte ou bien qu'ils possèdent des mécanismes pour supprimer la défense de la plante hôte dans une interaction compatible.

Martinez-Abarca *et al.* (1998) ont observé que quand ils inoculaient les racines de luzerne avec une souche incompatible de *Rhizobium* ou avec une souche mutante NOD bloquée dans la synthèse de lipo chito-oligosaccharides, il y avait une accumulation d'acide salicylique dans les racines. Par contre, dans les plantes inoculées par une souche de *Rhizobium meliloti* sauvage (compatible) il n'y avait pas d'accumulation de SA.

Ils ont également réalisé des prétraitements de racines avec le SA avant l'inoculation par le facteur NOD purifié ou par la souche compatible de *Rhizobium*. Leurs résultats ont indiqué une inhibition significative dans la formation de primordia de nodules et une

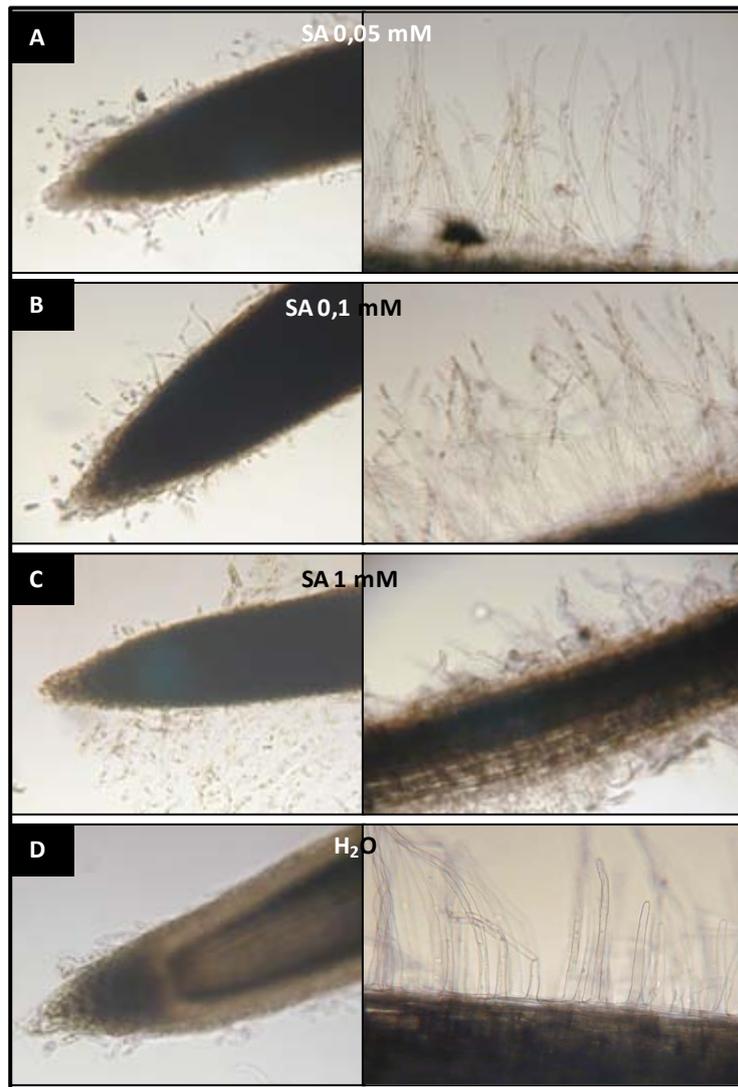


réduction du nombre de nodules émergents respectivement. Ces travaux ont indiqué que le facteur Nod de *Rhizobium* était impliqué dans l'inhibition de la défense arbitré par le SA.

Des études faites par Blilou *et al.* (1999) où il y avait une interaction du pois mutant *sym30* et du *Rhizobium leguminosarum* sauvage compatible ont montré une augmentation de la quantité de SA contenu chez le pois.

D'autres études ont révélé des effets nocifs du SA sur les Rhizobia. Il a été observé que l'application exogène de SA ( $\geq 0.1$  mM) inhibait la croissance et l'expression des gènes de nodulation chez les Rhizobia (Mabood et Smith, 2007). Donc l'application exogène de SA peut interrompre le processus de signalisation de la bactérie à la plante, une des étapes les plus importantes pour le début de la symbiose.

Van Spronsen *et al.* (2003) ont observé que l'application de SA (0.1 mM) inhibait complètement la formation de nodules indéterminés chez le pois, la luzerne et le trèfle blanc.



**Figure 29.- Aspect des racines de *M. truncatula* traitées avec l'acide salicylique.** Les racines de A17 ont été traitées avec différentes concentrations d'acide salicylique pendant 8h puis observé sur une lame de microscopie (x 40). **(A)** 0.05 mM, **(B)** 0.1 mM et **(C)** 1 mM et comparées avec le témoin H<sub>2</sub>O. **(D)** Incubées dans le l'eau.

## 3.2. RÉSULTATS

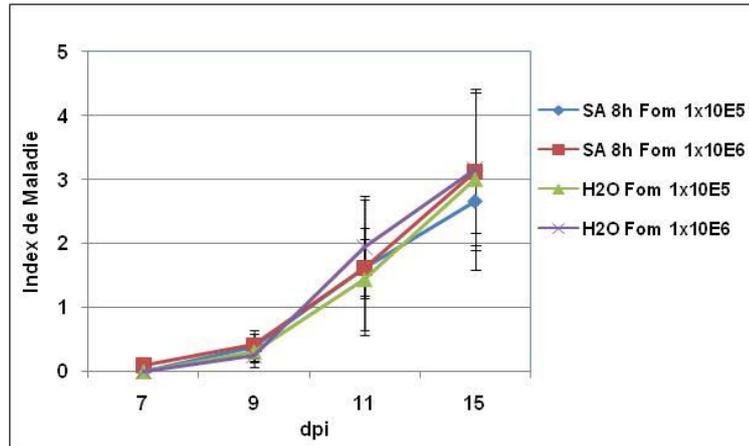
### 3.2.1. Effets d'un traitement par l'acide salicylique sur la sensibilité à deux agents pathogènes racinaires : *Fusarium oxysporum f.sp. medicaginis* et *Ralstonia solanacearum*

Pour étudier le rôle de l'acide salicylique (SA) dans la défense, des racines des plantes de *M. truncatula* ont été traitées avec cette molécule avant leur inoculation avec des microorganismes pathogènes. Afin de connaître à quelle concentration devaient être traitées les racines des plantes, plusieurs concentrations de SA ont été testées : 0.05 mM, 0.1 mM et 1 mM. Les traitements duraient 8 h et ensuite les racines ont été observées au microscope.

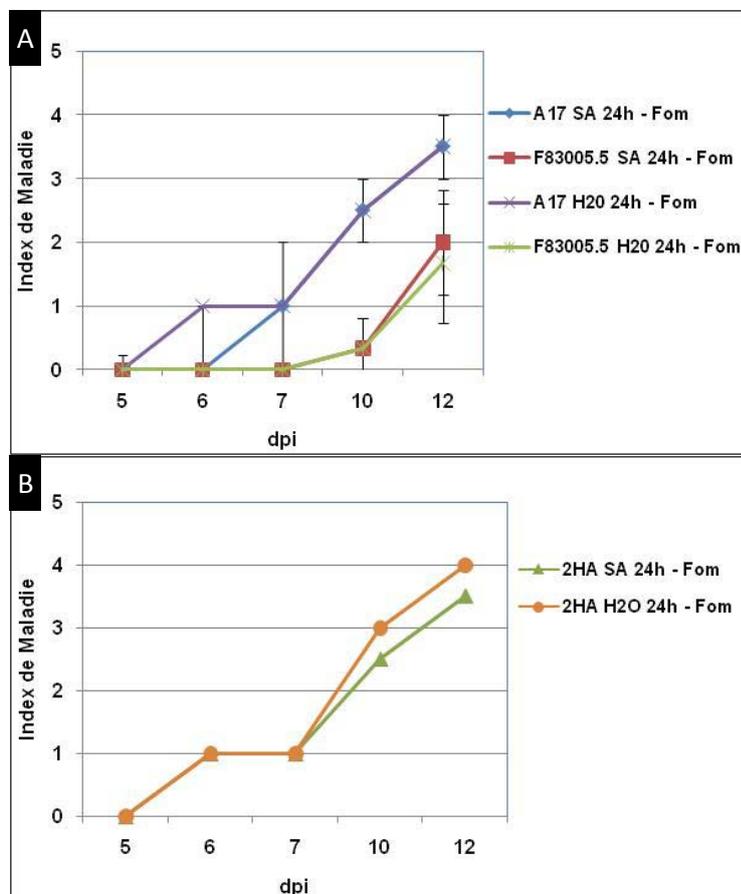
Cette expérience a permis de constater que la racine était très sensible au SA, puisque des observations au microscope ont montré que les poils absorbants des racines ont été déformés à fur et mesure que la concentration augmentait (**Figure 29**). La concentration de 1 mM était très agressive puisque les poils étaient complètement effondrés et déformés. Les deux concentrations plus faibles (0.05 mM et 0.1 mM) ont été mieux tolérées et ont été retenues pour faire des prétraitements de racines avant de les inoculer avec des microorganismes pathogènes. L'effet du SA exogène sur la sensibilité vis-à-vis de *F. oxysporum medicaginis* (*Fom* 179.29) et *Ralstonia solanacearum* (*Rs* GMI1000) a été ainsi étudié.

#### 3.2.1.1. Effet sur l'interaction *M. truncatula* – *F. oxysporum f.sp. medicaginis*

Dans le cas du champignon, les conditions suivantes ont été testées. Dans un premier essai des plantules des lignées A17 et F83005.5 ont été incubées pendant 8 h dans une solution de SA 0.05 mM, puis les racines ont été rincées et inoculées avec deux concentrations de spores de *Fom* ( $1 \times 10^5$  et  $1 \times 10^6$ ). Ensuite les plantes ont été mises dans des pots remplis d'eau comme déjà décrit, et les symptômes ont été notés sur une échelle de 1 à 5 (**Figure 9**). Les moyennes des indices de maladie montrent qu'il n'existait pas une différence significative entre les plantes prétraitées avec de l'eau et les plantes prétraitées 8 h avec SA 0.05 mM à aucune des concentrations en spores testées (**Figure 30**). Dans une



**Figure 30.- Développement de la maladie chez A17 inoculées par *Fom* 179.29, après prétraitement de racines avec SA 0.05 mM pendant 8h.** Les racines d'A17 ont été incubées dans du SA 0.05 mM pendant 8 h et inoculées ensuite avec deux concentrations de spores de *Fom* 179.29 ( $10^5$  et  $10^6$  sp/mL) pendant 30 min avant d'être transférées en pot copro. Les valeurs sont les moyennes des indices de maladie de 2 répétitions biologiques (3 répétitions techniques chacune) avec les écarts types.



**Figure 31.- Développement de symptômes chez A17, F83005.5 et 2HA inoculées par *Fom* 179.29, après prétraitement avec SA 0.05 mM pendant 24 h.** Les racines des lignées A17, F83005.5 et 2HA ont été prétraitées avec SA 0.05 mM pendant 24 h et inoculées par *Fom* 179.29 (pendant 30 min) avant d'être transférées en pots copro. Les valeurs sont les moyennes de 2 à 3 répétitions techniques dans une seule répétition biologique, avec les écarts types.

deuxième expérience le temps de traitement a été prolongé à 24 h, et 3 lignées de *M. truncatula* (A17, F83005.5 et 2HA) ont été analysées.

Les résultats illustrés dans la **Figure 31** montrent que le traitement des racines pendant 24h avec SA à 0.05 mM n'a pas conféré une protection vis-à-vis de *Fom*.

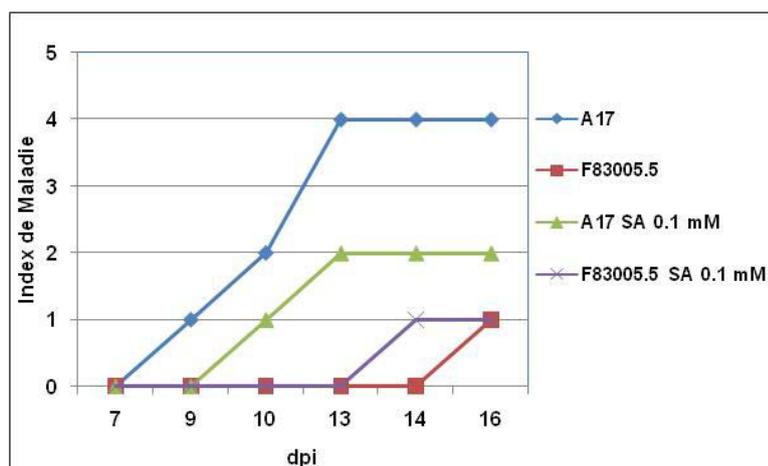
En plus du trempage de racines dans une solution de SA, des germinations de *M. truncatula* ont été cultivées sur milieu Fahraeus gélosé contenant 0,1 mM SA pendant 4 jours avant d'être inoculées par les spores de *Fom*. Les lignées A17 et F83005.5 ont été testées et les résultats montrent que l'indice de maladie est plus faible quand la lignée F83005.5 était prétraitée avec SA avant l'inoculation par *Fom* (**Figure 32**). Ces résultats indiquent que le SA exogène peut avoir un rôle dans la défense de F83005.5 vis-à-vis de *F. oxysporum medicaginis*.

### **3.2.1.2. Effet sur l'interaction *M. truncatula* – *R. solanacearum***

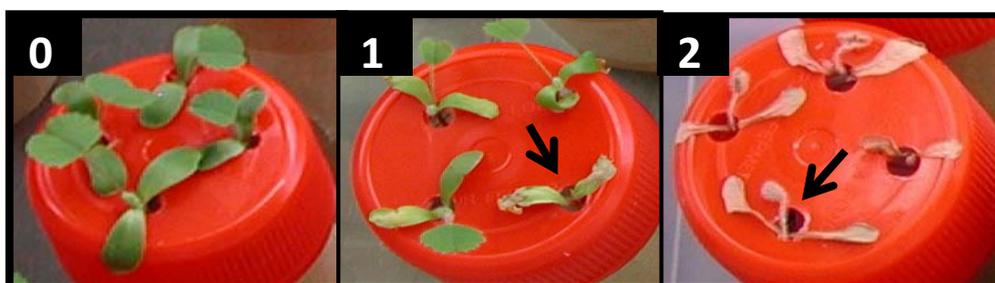
*Ralstonia solanacearum* (*R.s.*) est une bactérie pathogène du sol responsable du flétrissement bactérien chez un grand nombre de plantes. Les travaux réalisés au laboratoire ont montré que la souche GMI1000 était pathogène chez *Medicago truncatula*, et que la lignée A17 est sensible tandis que la lignée F83005.5 est tolérante vis-à-vis de cette souche (Vailleau *et al.*, 2007). Cette différence dans la sensibilité est observée lors d'inoculation de plantes en substrat Jiffy, en boîte de Petri ou en conditions hydroponiques. Des expériences similaires à celles avec *Fom* en conditions hydroponiques ont été réalisées avec ce pathogène bactérien.

Les racines des lignées A17 et F83005.5 ont été prétraitées avec 0,05 mM SA pendant 24 h ou 48 h et ont été inoculées avec deux concentrations de bactéries ( $1 \times 10^7$  et  $1 \times 10^8$  CFU/mL). Les symptômes ont été suivis selon une échelle de 0 à 2 illustrée dans la **Figure 33**.

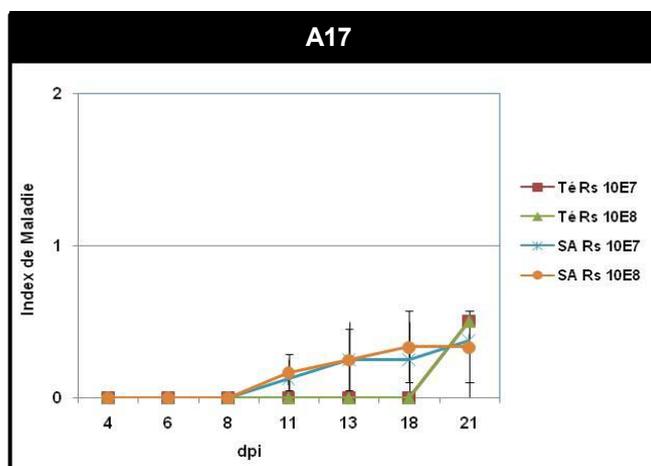
Dans une première expérience les racines intactes de la lignée A17 ont été prétraitées 24h par trempage avec SA et ensuite inoculées. Dans une autre série d'expériences les racines des plantes ont été coupées (1cm à partir de l'apex) pour



**Figure 32.- Développement de la maladie chez A17 et F83005.5 inoculées par *Fom* 179.29, après prétraitement avec SA 0.1 mM.** Les plantules de A17 et F83005.5 ont poussé sur un milieu Fahraeus gélosé pendant 4 jours additionné ou non de SA 0,1 mM. Ensuite, les racines de ces plantes ont été inoculées avec une suspension de spores de *Fom* 179.29 ( $10^6$  spores/mL, 30 min) avant d'être transférées dans de pots copro remplis d'eau. Une répétition biologique en hydroponique a été réalisé avec une répétition technique (1 répétition technique = 1 pot avec 4 plantes).



**Figure 33.- Index de maladie de 0 à 2 pour les inoculations en conditions hydroponiques de *M. truncatula* avec *R. solanacearum* GMI1000.** 0.- plante verte, 1.- plante chlorosée et flétrie, 2.- plante morte.



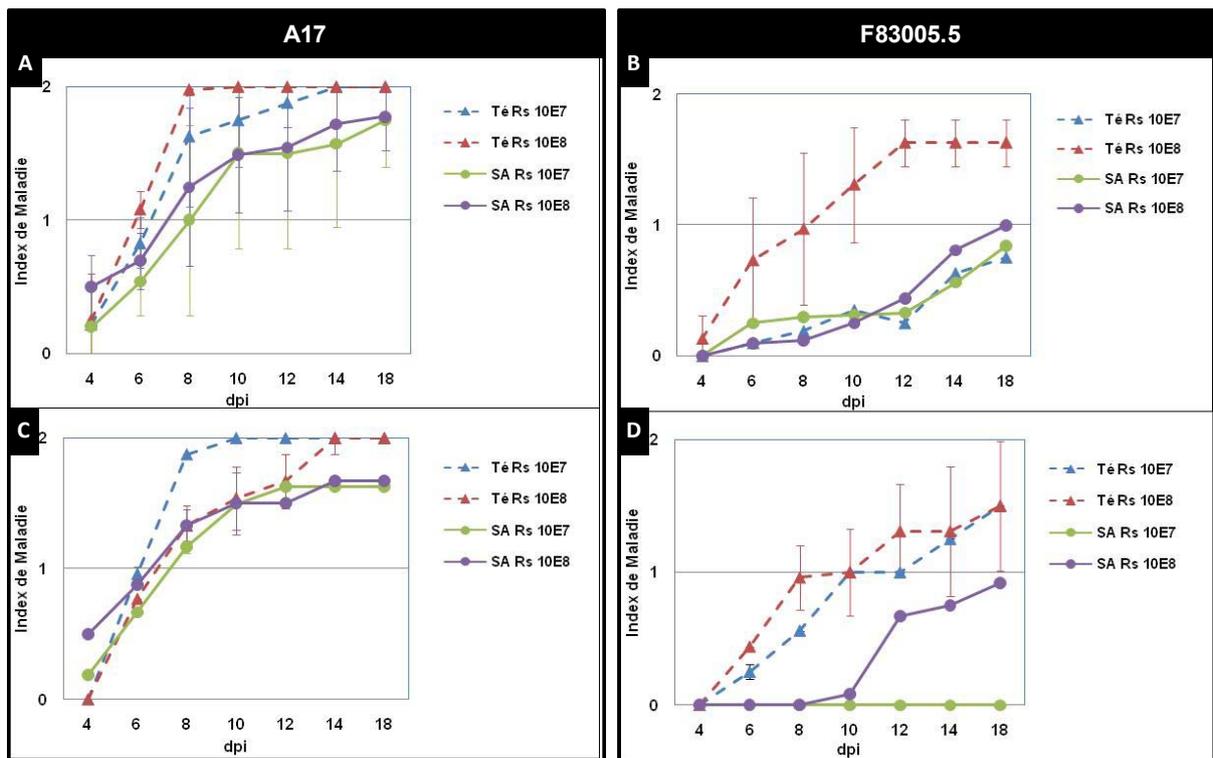
**Figure 34- Développement de la maladie chez A17 inoculée par *R. solanacearum*, après prétraitement de SA 0.05 mM pendant 24h .** Des racines de A17 (non coupées) ont été prétraitées avec de l'eau (témoins) ou l'acide salicylique 0.05 mM pendant 24 h et ont ensuite été inoculées avec deux concentrations ( $1 \times 10^7$  et  $1 \times 10^8$  CFU/mL) de *R. solanacearum*. Les valeurs sont les moyennes des indices de maladie de deux répétitions techniques dans une seule répétition biologique, avec les écarts types.

l'inoculation après avoir été prétraitées. Cette méthode est utilisée pour homogénéiser l'infection par *R.s* en substrat Jiffy et *in vitro* (Vailleau *et al.*, 2007). Comme montré dans la **Figure 34**, la maladie se déclenchait très lentement quand les racines inoculées étaient intactes, aucune plante n'était morte après 3 semaines. On n'observe pas d'effet significatif du prétraitement par le SA.

Par contre, les plantes dont les racines ont été coupées développaient la maladie rapidement et au bout de 6 dpi les plantes de la lignée A17 flétrissaient, à 8 dpi elles commençaient à mourir et à 14 dpi elles étaient mortes (**Figure 35 A, C**). Il n'y avait pas de différence significative par rapport à l'évolution des symptômes entre les concentrations bactériennes de  $1 \times 10^7$  et  $1 \times 10^8$  CFU/mL. Le prétraitement des racines avec le SA a conféré une faible protection face aux deux concentrations d'inoculum de *R.s*, car les indices de maladie étaient légèrement inférieures par rapport aux témoins prétraités à l'eau en fin de cinétique et l'évolution des symptômes était moins rapide, surtout dans le cas d'un prétraitement de 24 heures.

La lignée F83005.5 était tolérante dans nos conditions d'expérience, mais pas résistante, car un flétrissement a été observé à la fin de la cinétique (**Figure 35 B, D**). Les conditions de culture hydroponique ou l'incubation pendant 24 ou 48h préalablement à l'inoculation semblent influencer la résistance de cette lignée. De plus, la concentration de  $1 \times 10^8$  CFU/mL a été plus agressive chez cette lignée, avec une différence très significative par rapport à  $1 \times 10^7$  quand les racines étaient prétraitées à l'eau pendant 24 heures. Le prétraitement au SA pendant 24h a fait diminuer l'indice de maladie légèrement quand l'inoculum était de  $1 \times 10^7$ . Quand les plantes traitées avec cette molécule ont été inoculées avec  $1 \times 10^8$  CFU/mL de *R.s.*, la différence avec le témoin était très prononcée, indiquant un fort effet protecteur du SA. Cet effet protecteur vis-à-vis d'un inoculum à  $1 \times 10^8$  CFU/mL était observé pour des durées de prétraitement de 24h et 48h (**Figure 35 B, D**).

En résumé, ces résultats indiquent que le SA pourrait jouer un rôle dans la défense contre des agents pathogènes racinaires chez *M. truncatula*, qu'il s'agisse de bactéries ou de champignons. Ensemble, avec les données de la littérature, ils nous ont encouragé à réaliser



**Figure 35.-Développement de la maladie chez A17 et F83005.5 inocuées par *R. solanacearum*, après un prétraitement avec SA 0.05 mM pendant 24h ou 48h.** Un prétraitement des racines de plantes âgées de 4 jours avec de l'eau ou de l'acide salicylique à 0.05 mM a été réalisé pendant 24 h (A, B) et 48 h (C et D). Puis les racines ont été coupées (environ 1cm) et inocuées avec 2 concentrations différentes de *R. solanacearum* ( $10^7$  et  $10^8$  CFU/mL). Les lignes pointillées indiquent que le prétraitement a été effectué avec H<sub>2</sub>O tandis que les lignes continues indiquent prétraitement avec SA. (A, B) correspondent aux résultats obtenus après 24h de prétraitement chez A17 et F83005.5 respectivement. Des analyses statistiques réalisées avec le logiciel R ont indiqué qu'il n'y a pas de différence significative entre les plantes A17 prétraitées et témoins. À partir de 10 dpi on note une différence significative chez F83005.5 (P value = 0.08) prétraitée avec SA puis inocuée avec  $10^8$  CFU/mL de *R.s.* par rapport aux plantes témoins (prétraitées à l'eau) et inocuées avec la même concentration de bactéries. (C, D) correspondent aux résultats obtenus après 48h de prétraitement. Les valeurs représentent les moyennes des indices de maladie de 2 répétitions biologiques avec au moins 3 répétitions techniques et les écart types associés. L'analyse statistique sous R indique que chez A17 il n'y a pas une différence significative entre plantes prétraitées et témoins. En revanche chez F83005.5 les plantes prétraitées et non prétraitées montrent des différences significatives (P value = 0.06 à 18 dpi) après inoculation avec  $10^7$  et  $10^8$  CFU/mL de *R.s.*

un travail de longue haleine pour étudier le rôle de cette molécule signal, par une approche de transformation génétique qui fournira des plantes défectueuses dans cette voie.

### 3.2.2. Approche plantes transgéniques

#### 3.2.2.1. Transformation génétique de *M. truncatula* avec le gène *NahG*

Afin d'étudier le rôle de l'acide salicylique (SA) chez *Medicago truncatula* la transformation génétique avec le gène *NahG* a été initiée. Le vecteur utilisé pour ce travail est le même que celui décrit dans la littérature chez le tabac ou *Arabidopsis thaliana* (Gaffney *et al.*, 1993). La séquence codante y est sous contrôle d'un promoteur double 35S, et le marqueur de sélection est le gène *nptII* conférant une résistance à la kanamycine. Ce vecteur a été introduit dans la souche AGL-1 d'*Agrobacterium tumefaciens*.

Actuellement il existe deux méthodes de transformation et régénération de *M. truncatula*, l'une impliquant des explants foliaires et une étape d'embryogenèse somatique, et l'autre des axes cotylédonaire (ou demi-cotylédons) et une organogenèse directe. (Chabaud *et al.* 2003, Trinh *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 2004). Il faut noter que ces méthodes ont été mises au point avec seulement quelques génotypes. Il était intéressant pour nous de transformer les lignées A17 et F83005.5 de *M. truncatula* car elles présentent des phénotypes contrastés vis-à-vis de plusieurs agents pathogènes. Ainsi, A17 est sensible à *F. oxysporum medicaginis* et *Ralstonia solanacearum* et résistante à *Colletotrichum trifolii* (Torregrosa *et al.*, 2004) et *Aphanomyces euteiches* (Djébali *et al.* 2009); le comportement de F83005.5 est l'opposé dans toutes ces interactions.

Un très grand nombre de méthodes a été utilisé dans nos essais pour transformer ces deux lignées, mais sans succès. Dans un souci de préserver une trace des expériences et des points de blocage pour de futures tentatives, ils sont décrits dans ce chapitre intitulé «**Essais infructueux**». Cependant les efforts ont été récompensés avec la lignée 2HA, ces résultats sont décrits dans le chapitre «**Transformation**».

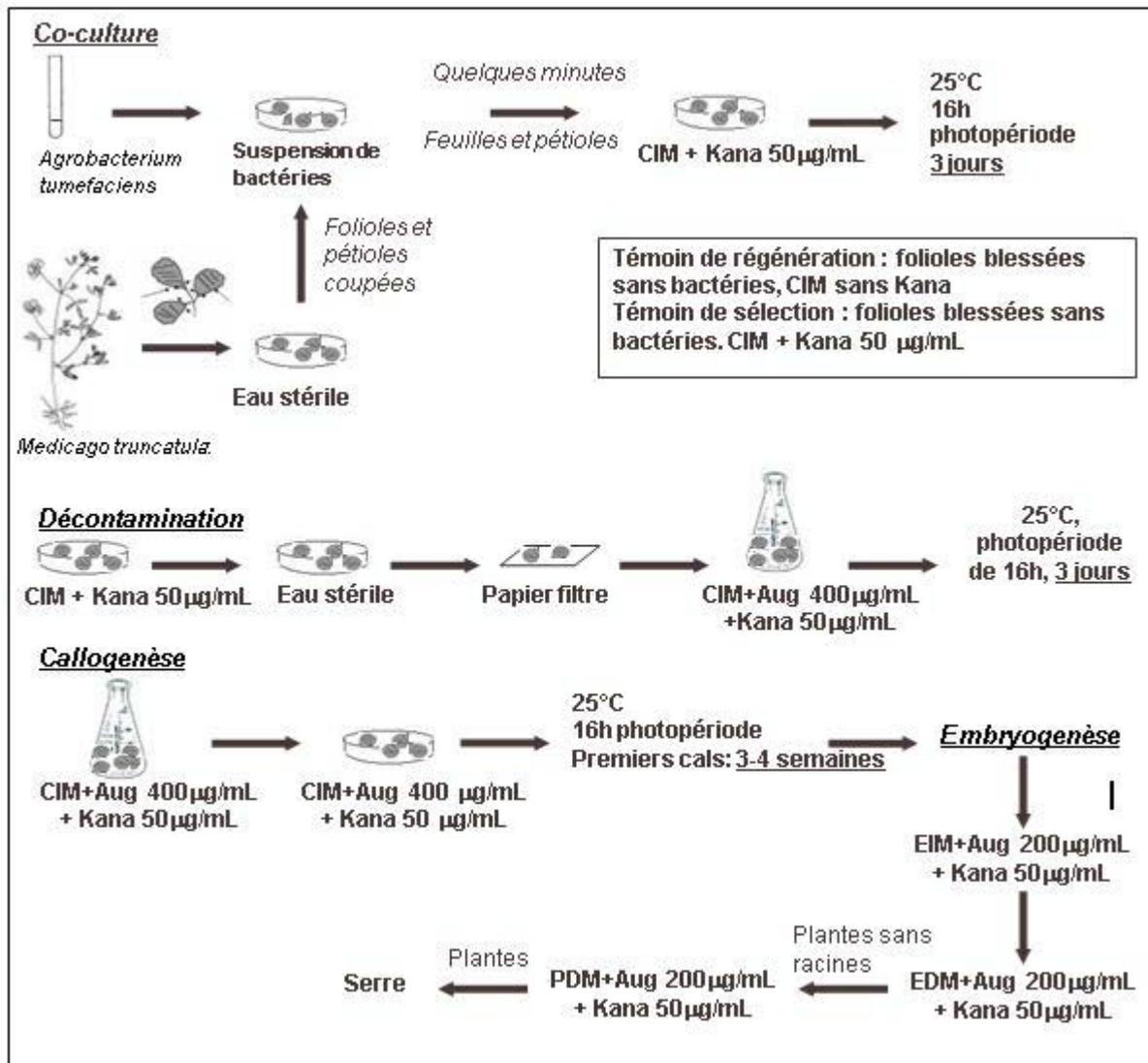


Figure 36.- Étapes de la transformation génétique de *M. truncatula* d'après Chabaud *et al.* (2003). CIM: Callus Induction Medium, EIM: Embryogenesis Induction Medium, EDM: Embryogenesis Development Medium, PDM: Plant Development Medium, Kana: kanamycine, Aug: augmentine.

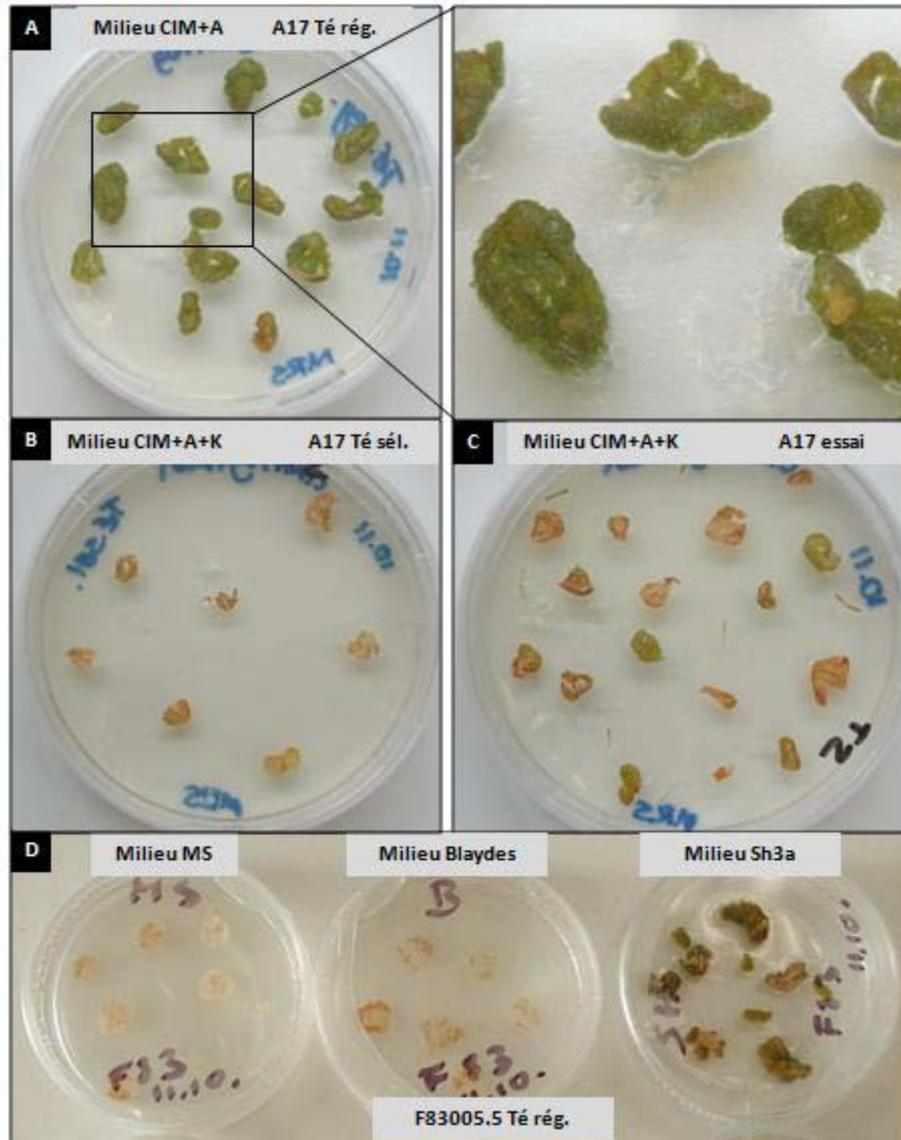
### 3.2.2.1.1. Essais infructueux

Dans un premier temps le protocole de transformation de feuilles de **Chabaud et al.** (2003) a été testé avec les deux lignées (schéma **Figure 36**). Avec ce protocole, les auteurs ont rapporté l'apparition de cals après 3 ou 4 semaines. Dans nos essais, la lignée F83005.5 n'a pas toléré les conditions et ses feuilles sont devenues marrons et se sont desséchées après 3 semaines. Les feuilles d'A17 sont restées vertes. Afin de trouver des conditions plus adaptées à F83005.5, le protocole de transformation a été répété pour les deux lignées mais le milieu de callogenèse de Chabaud (CIM) a été remplacé par trois autres milieux (milieu MS, Blaydes (Parrot et Bouton, 1990) et Sh3a (Trinh *et al.*, 1998) dans le cas de F83005.5 (**Figure 37**). Seulement sur le milieu Sh3a des cals ont été formés par le témoin de régénération. Cependant, aucune des deux lignées n'est arrivée à passer l'étape de la callogenèse, puisque même si elles arrivaient à former des cals, après ces cals devenaient marrons et mouraient.

Etant donné que l'embryogénèse somatique est dépendante du génotype (Nolan *et al.*, 1989; Wang *et al.* 1996) des protocoles de transformation sans étape d'embryogénèse somatique ont été testés.

La première de ces méthodes testées a été la transformation de demi-cotylédons décrite par **Zhou et al.**, (2004) avec les lignées A17 et F83005.5.

Dans cette méthode, les explants utilisés étaient les demi-cotylédons avec la moitié de l'axe embryonnaire. Ils étaient inoculés pendant 30 min avec *A. tumefaciens*, puis lavés avec de l'eau stérile et mis dans un milieu de co-culture pendant 5 jours. Ensuite les explants étaient lavés à l'eau, séchés sur un papier filtre, et mis dans un milieu de régénération avec augmentine. Dans cette étape déjà, (5j après mise en culture) les cotylédons de la lignée F83005.5 co-cultivés avec *A. tumefaciens* étaient jaunis tandis que le témoin de régénération restait encore vert tout comme les essais de transformation et le témoin de régénération de A17. Après 15 jours les cotylédons étaient transférés sur le milieu de sélection. Il a été observé que pendant ces 2 dernières étapes, les demicotylédons de F83005.5 (essais et témoin de régénération) sont devenus jaunes à marrons et mouraient. Donc la lignée F83005.5 a été éliminée, et l'expérience a continué avec la lignée A17. 1 mois



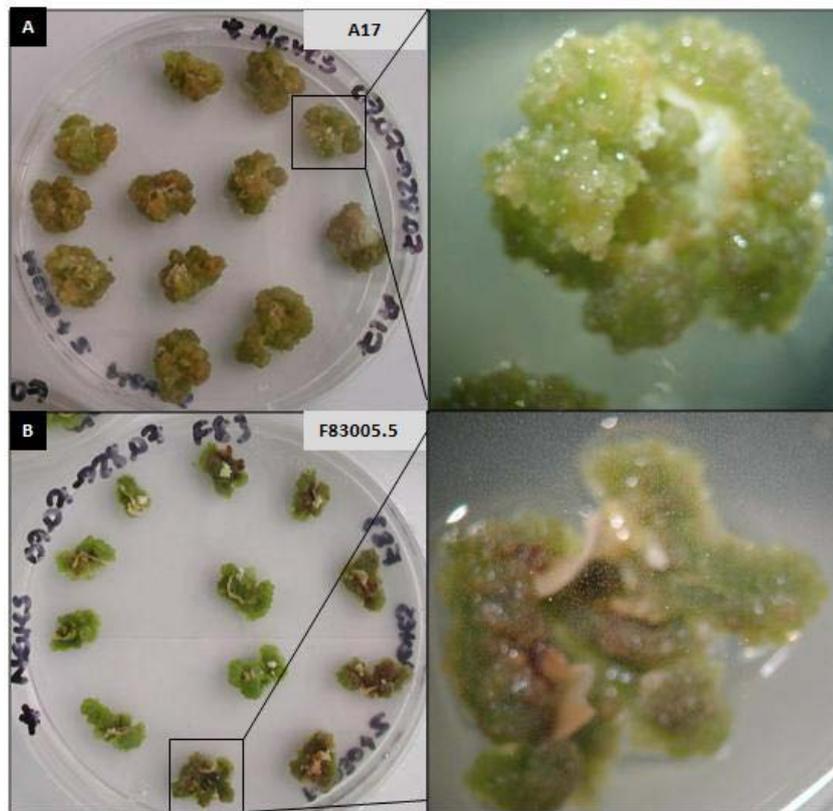
**Figure 37.-** Callogenèse de feuilles de A17 et F83005.5 sur différents milieux en suivant le protocole de Chabaud *et al.* (2003). **(A)** : Témoin de régénération de A17 sur le milieu CIM. Les folioles ont formé des cals verts. **(B)** Témoin de sélection de A17. Les folioles sont devenues marrons. **(C)** Essai de transformation de A17. Quelques folioles ont devenues marron et d'autres ont commencé à former des cals verts. **(D)** Les folioles de la lignée F83005.5 sur d'autres milieux: MS, Blaydes et Sh3a. Des cals ont été formés seulement sur milieu Sh3a après 4 semaines de la mise en culture.

après culture sur milieu sélectif renouvelé toutes les semaines, tous les demicotylédons d'A17 étaient marrons aussi et cette expérience a dû être terminée.

Afin de trouver des conditions permettant de transformer les lignées A17 et F83005.5, plusieurs autres protocoles ont été testés pour déterminer leur potentiel de régénération chez ces lignées. Ces méthodes reposaient soit sur une organogenèse indirecte soit sur embryogenèse somatique chez *Medicago truncatula* ou d'autres espèces du genre (Neves *et al.*, 1999; de Sousa *et al.*, 2004; Shao *et al.*, 2000; Deak *et al.*, 1986). La plupart de nos expériences décrites ci-dessous n'incluaient pas d'étape de transformation.

La publication de **Neves *et al.*** (1999) ne rapporte pas sur une transformation génétique mais une méthode d'embryogenèse somatique répétitive à partir des explants de feuilles blessées. Dans cette méthode, les explants sont mis dans un milieu d'induction gélosé avec une auxine (2,4 D) et une cytokinine (zéatine); environ 20 jours après, les premiers embryons sont repiqués sur un milieu de croissance sans les hormones. Ils restent sur ce milieu pendant environ 15 jours jusqu'à l'isolement des premiers embryons somatiques. Ensuite ces embryons sont transférés sur un milieu similaire au précédent mais avec un autre agent gélifiant. Dans ce milieu les embryons somatiques secondaires commencent à se différencier (apparition de formes globulaires, torpédo). Ces embryons sont repiqués successivement dans ce même milieu de culture jusqu'à la formation de pousses de plantes. Les taux reportés de régénération d'embryons à partir de cals étaient de 6, 21, 22 et 43% avec des plantes de *M. truncatula* Jemalong N1, M5, M9 et C7, respectivement.

Ce protocole a été appliqué aux témoins de régénération d'A17 et F83005.5, avec 36 explants pour chaque lignée. Chez A17, 12 explants ont été contaminés et ils ont dû être éliminés. 24 explants ont formé des cals dont 7 ont formé des embryons. Ce taux d'embryogenèse représente le 29%, chiffre proche de celles obtenues par Neves *et al.*, (1999) avec les géotypes M5 et M9 de Jemalong. Chez F83005.5, 14 explants ont été éliminés à cause d'une contamination, et le reste a généré uniquement de cals et non des embryons. Dans la suite tous les cals des deux lignées sont devenus marrons et sont morts. Les cals de F83005.5 mouraient plus rapidement que les cals d'A17. Même si les embryons

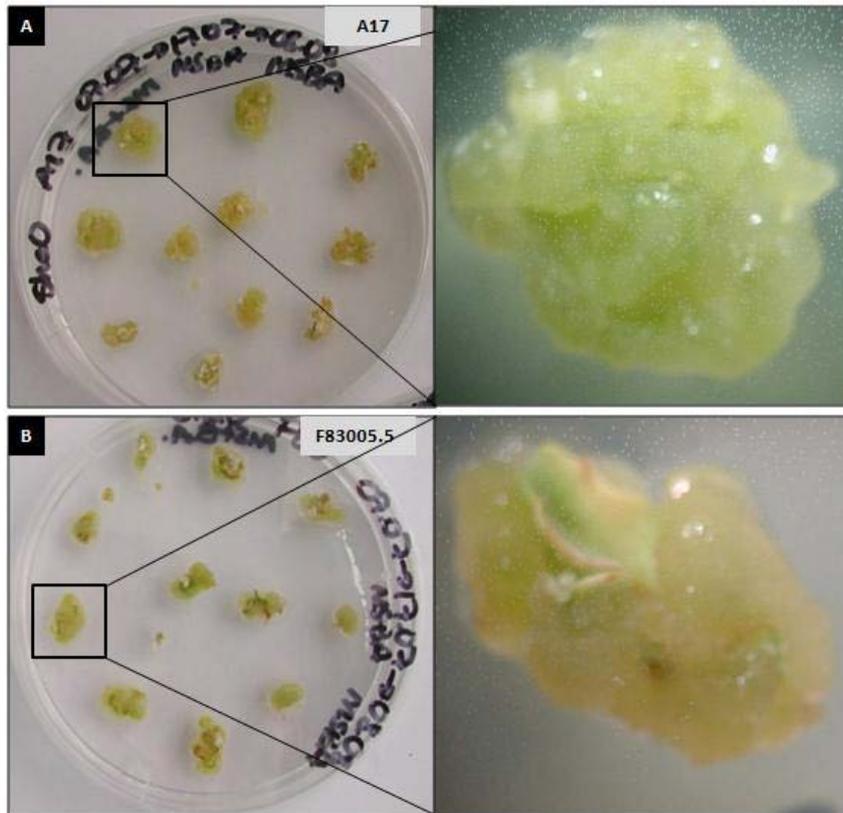


**Figure 38. - Cals de *M. truncatula* sur le milieu d'induction de callogenèse (Etape 1) selon le Protocole de Neves *et al.* (1998). Les cals des témoins de régénération de A17 (A) et F83005.5 (B) sont sur un milieu d'induction de cals somatiques primaires MS030+ zéatine où ils sont restés 20 jours après la mise en culture.**

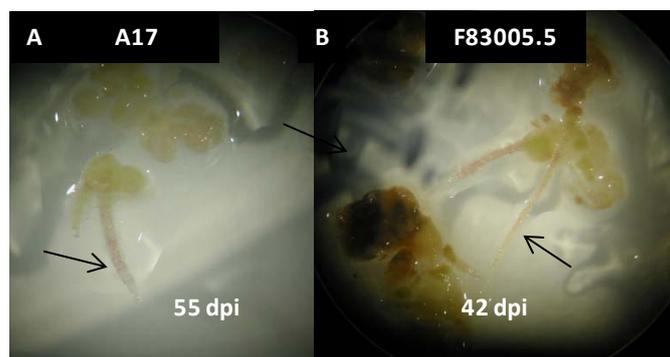
d'A17 semblaient prometteurs pour former des pousses, au bout de 6 semaines après le début de l'expérience 4 embryons devenaient jaunes et les 3 embryons encore verts suivaient un peu plus tard. Ainsi cette expérience n'a pas permis d'obtenir des embryons chez F83005.5, et ni de pousses à partir des embryons formés par la lignée A17, (**Figure 38**), et la méthode n'a donc pas été retenue pour poursuivre en essai de transformation génétique.

La méthode décrite par **de Sousa et al.**, (2004) consiste en 3 étapes. Les explants de feuilles blessées sont d'abord sur un milieu d'induction d'embryons avec une auxine (2,4 D) et cytokinine (zéatine), 5 jours après ils sont transférés dans un milieu sans hormone favorisant la prolifération des embryons et ils sont repiqués chaque semaine pendant 3 semaines. Finalement les embryons sont transférés sur un milieu de conversion des embryons qui permet de les isoler. Ces travaux publiés ont été réalisés avec *M. truncatula* Jemalong M9-10a et la souche *A. tumefaciens* EHA 105 et les résultats montrent un taux de callogenèse de 97-100%, avec 25-45% des cals générant des embryons. Quand ce protocole a été appliqué aux témoins de régénération des lignées A17 et F83005.5, parmi les 28 cals de A17 seulement 4 ont formé des embryons, et aucun embryon n'a été obtenu avec la lignée F83005.5. Malgré le fait que M9-10a est une lignée de Jemalong tout comme A17 le pourcentage d'embryons formé par A17 (14%) est très inférieur. Cette méthode n'a donc pas été retenue pour poursuivre en essai de transformation génétique.

Dans le protocole de transformation décrit par **Shao et al.** (2000), les explants étaient des feuilles blessées de *Medicago falcata*. Leurs résultats rapportent que 10-20% de cals ont formé des embryons et de ces embryons 50% ont formé des pousses. Ce protocole comprend 5 étapes. Pendant la 1<sup>ère</sup> étape, les explants sont dans un milieu avec des hormones (2,4- D et kinétine) pendant 3 jours, ensuite ils sont transférés dans ce même milieu contenant des antibiotiques de sélection pendant 7 jours (2<sup>ème</sup> étape). Après ce temps ils sont transférés dans un milieu similaire mais sans auxine pendant au moins 20 jours jusqu'à l'apparition de cals ou embryons (3<sup>ème</sup> étape) sur quoi ils sont repiqués dans le même milieu pour encore 15 jours. Dans la 4<sup>ème</sup> étape, les explants avec les embryons sont transférés sur un milieu plus riche en vitamines et macro et micro-éléments, mais sans



**Figure 39.-** Cals de *M. truncatula* sur le milieu MSBA pour la production des embryons selon le protocole de Shao *et al.* (2000) a 30 dpi. Cals des témoins de régénération de A17 (A) et F83005.5 (B); les photos ont été prises à 30 jours après la mise en culture des explants.



**Figure 40.-** Rhizogenèse sur cals de *M. truncatula* d'après le protocole de transformation génétique de Shao *et al.* (2000). Des explants de feuilles des lignées A17 et F83005.5 ont été utilisés pour faire des témoins de régénération en suivant le protocole de transformation de Shao *et al.* (2000). A 55 et 42 dpi les cals formés d'A17 et F83005.5 avaient avec un aspect mou et ont commencé à former des racines.

antibiotique et sans hormone. Dans ce milieu les embryons se développent complètement et une fois que les pousses se forment, elles sont repiquées dans un milieu de base sans hormone (étape 5) qui favorise la formation des plantules.

Quand ce protocole a été appliqué aux lignées A17 et F83005.5 les cals ont été formés dans la 3<sup>ème</sup> étape (31 jours après) et ils étaient verts clairs et avec un aspect mou (**Figure 39**). Cet aspect ne semblait pas être prometteur pour l'apparition des embryons. Une fois que ces cals ont été repiqués sur le milieu riche sans hormone (étape 4) les cals ont commencé à jaunir rapidement puis à devenir marron. Après 17 jours dans ce milieu, des petits embryons aussi mous ont donné origine à quelques racines qui sont devenues marrons quand elles ont été repiquées sur le milieu de l'étape finale, puis elles mouraient (**Figure 40**). Le bilan des résultats obtenus a été donc le suivant : de 60 explants d'A17, 100% ont généré des cals et sur ces cals il y avait des embryons difficiles à observer (consistance molle, il était douteux que ce soit vraiment des structures d'embryon). 15 cals-embryons ont formé des racines. Donc le pourcentage de formation de racines à partir de cals a été de 25%. Dans la suite l'ensemble des cals, embryons et racines sont morts sans avoir formé des parties aériennes et une plante. Pour F83005.5 55 explants ont été utilisés, dont 100% formaient des cals, et 5% de ces cals ont formé des pseudo-embryons avec des racines qui sont morts aussi dans la dernière étape. Cette méthode n'a donc pas été retenue pour poursuivre en essai de transformation génétique.

La 6<sup>ème</sup> méthode testée dans cette série d'expériences a été celle décrite par **Deak et al.** (1986). Dans ce protocole les explants sont des fragments de tiges, hypocotyles et pétioles de *Medicago varia*, qui développaient des cals dans 69.8% des cas. 41.3% des cals ont développé des plantes. Cette méthode consiste en 4 étapes dont 2 sont sur milieu solide et 2 sur milieu liquide. La 1<sup>ère</sup> étape est la co-culture qui consiste à incuber les fragments de 5-10 mm dans un milieu de culture avec des hormones (2,4D et BAP) et *Agrobacterium tumefaciens* pendant 3 jours. Ensuite les explants sont rincés avec de l'eau stérile, et transférés sur le même milieu de culture mais solide, avec des antibiotiques et sans la bactérie (étape 2). Ils y restent pendant environ 3 semaines jusqu'à l'apparition de tâches vertes qui grandissent. A ce moment les explants plus grands sont transférés dans un milieu



riche liquide avec des hormones (étape 3 et y restent jusqu' à l'apparition d'embryons qui se différencient en forme globulaire puis torpédos. L'étape finale consiste à transférer ces embryons bien développés sur un milieu solide avec une cytokinine (BAP) où ils restent 3-6 semaines jusqu'à obtenir une plante régénérée.

Ce protocole a été réalisé uniquement avec des témoins de régénération des lignées A17 et F83005.5. Le reste de ce protocole a été suivi comme décrit dans la publication, mais en fonction du temps de développement de chaque explant, les transferts dans des différents milieux ont été réalisés après des temps différents. Tous les 56 explants (14 tiges, 14 hypocotyles et 28 pétioles) d'A17 ont formé des cals, cependant en raison d'une contamination, 12 de ces cals ont été éliminés. De ces 44 cals, 5 cals de pétioles ont formé des embryons, ce qui correspond à environ 11% de taux d'embryogenèse. Ces embryons ont été formés au bout de 7 semaines dans la dernière étape (milieu solide avec BAP) mais malheureusement ils ne se sont pas développés pour former des plantes. Tous les embryons sont devenus marrons et étaient morts après 9 semaines. De la lignée F83005.5, 58 explants ont été utilisés et tous ont formé des cals. 12 cals ont du être éliminés aussi à cause d'une contamination. Parmi les 46 cals qui sont restés, aucun n'a formé des embryons. La plupart de ces cals sont restés verts jusqu'à 5 semaines après le début de l'expérience (fin de l'étape 2) puis ils commençaient à devenir marron.

En résumé avec le protocole de Deak il a été possible d'obtenir des embryons chez A17 mais pas avec F83005.5, et les embryons obtenus ne régénèrent pas de plantes. Cette méthode n'a donc pas été retenue pour poursuivre les essais de transformation génétique.

Un protocole de transformation décrit par **Crane et al.** (2006) utilise des morceaux de racines de la lignée de *M. truncatula* R108-1 connue pour sa grande capacité de régénération et d'embryogenèse somatique (Hoffman *et al.*, 1997). Dans cette publication 4 souches d'*Agrobacterium tumefaciens* ont été utilisées (AGL1, C58C1, EHA105 et LBA4404), la souche la plus efficace était EHA 105. Cette méthode consiste à incuber des fragments de racines de 1 cm avec la souche d'*A. tumefaciens* pendant 30 min. Ensuite ces explants sont transférés dans un milieu de co-culture solide avec les hormones 2,4D et BAP, en obscurité pendant 2 jours (étape 1). Dans l'étape 2, les racines sont transférées sur un milieu solide

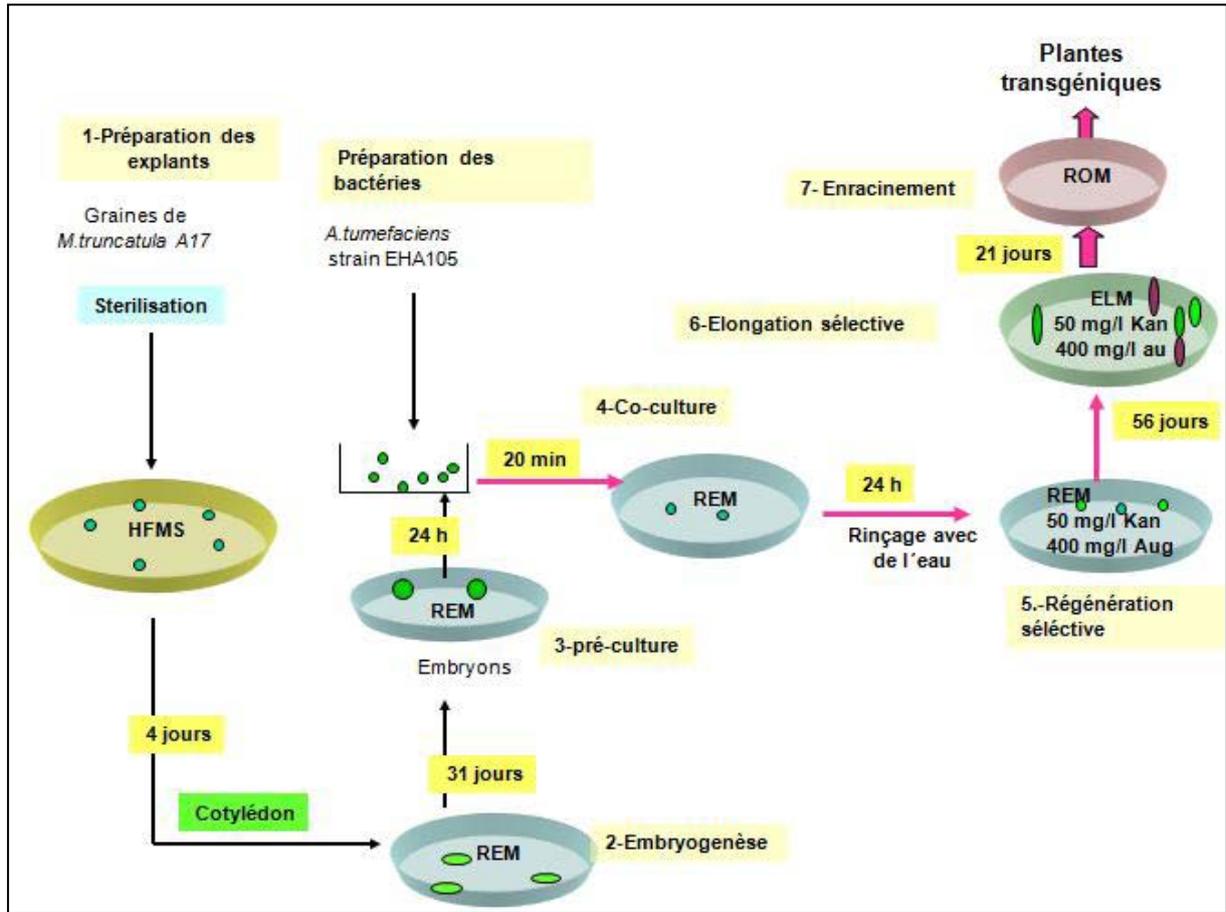


Figure 41.- Protocole de Transformation génétique de demi-cotylédons d'après Iantcheva *et al.* 2005. HFMS: Hormone-free MS, REM: Regeneration Medium, ELM: Elongation Medium, ROM: Rooting Medium.

avec un antibiotique (cefotaxime). 4 ou 5 semaines après les premiers cals résistants à l'antibiotique sont obtenus et transférés dans un milieu de régénération, où ils restent pendant 5-6 semaines jusqu'à l'obtention des pousses ou plantes. Leurs résultats indiquaient que 41.3% des cals ont formé des embryons.

Des essais avec ce protocole de transformation ont été réalisés 2 fois (T1 et T2) en utilisant les lignées A17 et F83005.5, la souche AGL1-NahG et en ce qui concerne l'antibiotique, le cefotaxime a été remplacé par augmentine.

Dans l'essai T1, les témoins de régénération d'A17 et de F83005.5 ont été les seuls à former des cals, mais après 4 semaines ils sont devenus jaunes. Le témoin de régénération d'A17 qui avait 14 explants au début, a été le seul à former 1 plante (7%) après 5 mois. Les explants des essais de transformation et témoins de sélection sont restés marrons et sans gonfler (pas de formation de cals). Quand ce protocole a été répété une 2<sup>ème</sup> fois, les explants de la lignée F83005.5 ont été contaminés et ont dû être éliminés. Pour les explants d'A17 on observait le même résultat qu'avant, seul le témoin de régénération a produit des cals. Quelques explants des essais de transformation étaient un peu gonflés sur les bords, mais comme ce phénomène se voyait aussi avec le témoin de sélection ils n'étaient pas transformants.

Enfin un autre protocole de transformation et régénération par embryogénèse somatique directe et indépendante du génotype a été décrit par **lantcheva *et al.* (2005)**. Nous avons testé cette méthode uniquement avec la lignée A17 et utilisé la même souche d'*A. tumefaciens* (EHA105) que **lantcheva *et al.*, (2005)**.

Les étapes de ce protocole sont illustrées dans la **Figure 41**. Des graines de A17 ont été mises à germer sur un milieu nutritif sans hormones (HFMS) pendant 4 jours, ensuite les cotylédons ont été sectionnés et transférés sur le milieu REM contenant des phytohormones (notamment le thidiazurone comme cytokinine) pour induire l'embryogénèse. Des embryons apparaissent à partir de 10 jours et après 31 jours les amas d'embryons les plus développés ont été détachés des cotylédons et transférés sur milieu REM frais. 24 heures après, ces embryons ont été coupés en morceaux de 2-3 mm. Ces fragments d'amas ont été ensuite incubés pendant 20 min dans une suspension d'*A. tumefaciens* EHA105 contenant le



vecteur NahG avant d'être mis en co-culture sur milieu REM frais. Après 24 heures de co-culture, les bactéries ont poussé sur ces embryons encore verts et les entouraient avec des colonies de 5-10 mm. Les fragments d'embryons ont été rincés avec de l'eau stérile et transférés dans un milieu de régénération sélective (kanamycine 50µg/mL et augmentine 400 µg/mL). A partir de 8 jours sur milieu sélectif, les vieux embryons ont commencé à devenir marrons tandis que de nouveaux embryons verts se sont développés. Ceci a été observé dans l'essai de transformation et chez le témoin de sélection, mais la proportion d'embryons verts était très supérieure chez les essais de transformation. Les témoins de régénération sont restés bien verts. Ces observations indiquent que la concentration de 50 µg/mL de kanamycine n'était pas suffisamment forte pour une sélection totale, au moins en milieu gélosé. Pour augmenter l'efficacité de sélection, la moitié des embryons était lavée dans une solution de 50 µg/mL de kanamycine pendant 30 minutes, et remise sur milieu de sélection frais. Malheureusement cette étape a entraîné une contamination et tous les embryons lavés étaient morts 1 semaine après le traitement.

L'autre moitié des embryons est restée sur milieu de sélection pendant 56 jours. Ensuite les embryons ont été transférés sur un milieu d'élongation sélective où des pousses se développaient pour les essais de transformation et les témoins de régénération mais aussi pour les témoins de sélection. On constate que la pression de sélection n'a pas permis d'éliminer des faux positifs même si leur nombre était faible. Après 21 jours les pousses ont été transférées sur un milieu d'enracinement sélectif. Sur ce milieu tous les témoins de sélection mouraient au bout de 15 jours, mais un grand nombre d'essais de transformation aussi, ce qui indique que des faux positifs existaient parmi chez les essais de transformation. Des cals blancs et des petites structures qui ressemblaient à des racines commençaient à apparaître à partir de 2 semaines sur milieu d'enracinement sélectif, mais nous avons également constaté un phénomène de vitrification chez les pousses transgéniques et des témoins de régénération, indiquant que le milieu n'était pas adapté pour la lignée A17. Après comparaison de différents milieux d'enracinement décrits dans les manuels de culture in vitro, nous avons réduit la concentration de sucrose et ajouté une auxine. Comme gélifiant nous avons remplacé l'agar par le phytigel et omis la kanamycine du milieu. Cette



composition permettait la formation de racines, qui apparaissaient après 3 semaines sur ce milieu.

Dans cette expérience de transformation, qui a été réalisée avec un étudiant en stage de master, nous avons utilisé en tout 420 cotylédons, à partir desquels nous avons obtenu 207 pousses (encore sans racines) potentiellement transformées. Le témoin de régénération a développé 10 pousses et le témoin de sélection 38 pousses. Ces résultats ont montré que la sélection n'avait pas été suffisante. Les plantes régénérées placées dans un milieu de d'enracinement ont été testées par PCR pour connaître la présence ou absence du transgène. 4 essais de transformation, 1 du témoin de régénération et 1 du témoin de sélection ont été sacrifiées pour extraire leur ADN et réaliser une PCR avec les amorces NahG. Le gel d'électrophorèse des produits PCR montre une bande de la taille attendue pour 2 pousses transformées, et l'absence de bande d'ADN pour les 2 témoins et 2 des pousses « transformées » (résultats non montrés). Donc 2 parmi les 4 pousses transformées ont intégré le gène NahG, et 2 sont des faux positifs. Ceci indique que la sélection n'a pas été très efficace, malgré le fait que les témoins de sélection n'ont pas survécu sur le milieu d'enracinement sélectif.

À la fin de cette expérience, 44 plantes enracinées ont été régénérées dans des pots Magenta. Avant d'entamer l'étape d'acclimatation et multiplication en serre, elles ont toutes été analysées par PCR pour confirmer la présence du gène NahG. L'ADN a été extrait de 3 feuilles par plante et amplifié par PCR avec deux couples d'amorces spécifiques NahG. Ces analyses ont montré que l'ensemble des plantes ne contenait pas le gène NahG, aucun produit PCR n'a pu être observé. On peut émettre l'hypothèse que ces plantes sont soit de faux positifs qui ont échappé à la sélection lors de l'enracinement soit des plantes chimères avec une partie racinaire transformée. Aucune plante A17-NahG n'a donc été obtenue par cette méthode, malgré des résultats prometteurs au début.

Les résultats obtenus avec toutes les méthodes de transformation testées ont montré que la régénération de plantes et donc la transformation de *M. truncatula*, en particulier des lignées F83005.5 et A17, était un travail de longue haleine et nécessitait encore beaucoup de mises au point.



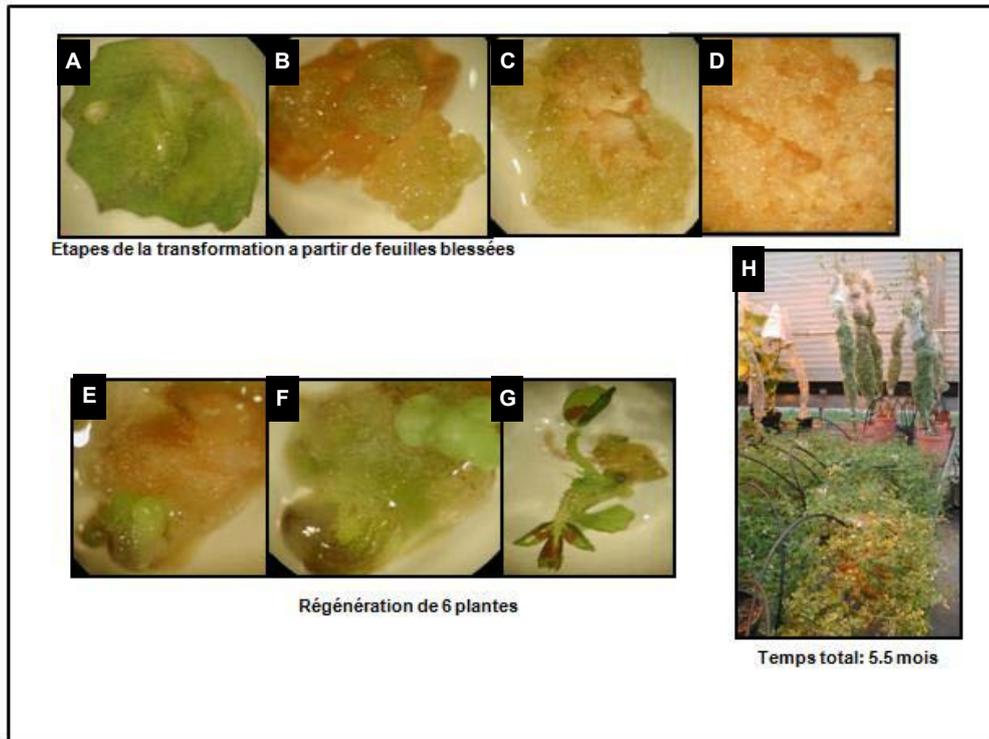
### 3.2.2.1.2. Transformation

La méthode décrite par *Chabaud et al.* (2003) a été reprise et nous avons initié de nouveaux essais de transformation, cette fois-ci avec la lignée embryogène 2HA. Cette lignée est une dérivée d'A17 avec une grande capacité de régénération (*Rose et al.* 1999). Elle a été décrite avoir une capacité 500 fois plus élevée que *M. truncatula* Jemalong pour régénérer des plantes en culture par embryogenèse somatique (*Imin et al.*, 2005). En utilisant cette lignée et la souche AGL1, nous avons réussi à transformer avec le gène *NahG*.

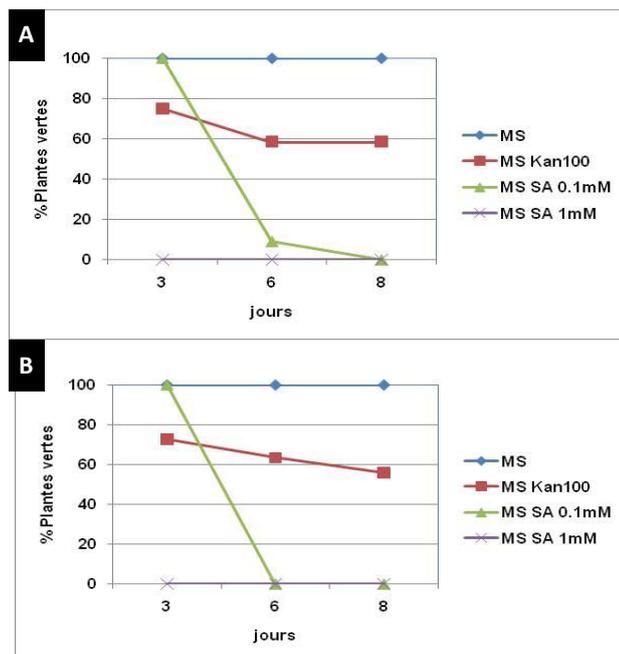
Il s'est avéré que plusieurs paramètres qui n'étaient pas soulignés dans la publication étaient primordiaux pour une réussite de transformation. Par rapport au protocole original nous avons utilisé des in-vitro plantes de 2 semaines et non de 3 semaines comme décrit dans la publication, car il était important de prendre des plantes jeunes et des feuilles jeunes. Les plantes et explants sont sensibles à certains composants des milieux : il faut un agar de bonne qualité (bacto-agar) et une caséine acide à teneur faible en sels.

Le protocole de Chabaud (schéma **Figure 36**) a consisté dans une 1<sup>ère</sup> étape à inoculer les explants de feuilles blessées avec AGL1-NahG pendant quelques minutes et ensuite à les mettre dans un milieu de co-culture pendant 3 jours. Ensuite les explants étaient transférés dans un milieu liquide avec des antibiotiques et incubés pendant 3 jours. Après cette étape de lavage les explants, sont transférés sur un milieu de callogenèse (CIM) sélectif avec des antibiotiques. Après 2 à 3 semaines sur ce milieu, le témoin de régénération a formé des cals verts, qui ont été transférés sur le milieu d'induction de l'embryogénèse (EIM). Les essais de transformation de 2HA (explants co-cultivés avec AGL1-NahG) ont donné lieu à la formation de cals verts ; 1 à 2 semaines plus tard que le témoin; ils ont été transférés également sur le milieu EIM. Sur le milieu EIM les cals verts ont commencé à former des petits embryons verts. Le temps pour développer les embryons a été très variable.

Le témoin de régénération a formé des embryons après 3-4 semaines sur le milieu EIM ; ils étaient ensuite repiqués sur un milieu de culture (EDM) favorisant le développement de l'embryon en pousses foliaires. Ainsi le témoin de régénération a formé la première plante avec de feuilles et sans racine après 3 semaines sur EDM. Ces plantes ont été transférées sur un autre milieu (PDM) pour favoriser la croissance de racines, où elles



**Figure 42.-Etapes de transformation de la lignée 2HA avec le gène NahG.** L'explant de feuille blessé (A) après avoir été mis en contact avec AGL1-NahG commence à développer des cals verts (B), ensuite ils deviennent marrons clairs (C, D), puis les premiers embryons commencent à apparaître (E). Ces embryons commencent à se développer (F), jusqu'à la formation de feuilles et puis de tiges (G). Les plantes ayant un développement racinaire suffisant sont transférées à la serre et entourées d'un filet pour la production de graines (H).



**Figure 43.- Essai de sélection des plantes 2HAwt et 2HA-NahG sur kanamycine et SA.** Les germinations de 2HA wt (A) et 2HA-NahG n°4 (B) ont été repiquées sur milieu MS seul ou contenant de la kanamycine à 100 mg/mL (Kan100), 0.1 mM SA ou 1 mM SA, dans de pots Magenta. La couleur des feuilles a été observé pendant 8 jours et les % des plantes vertes calculées. Les valeurs montrent la moyenne de 14 plantes dans 1 répétition biologique.

sont restées au moins 2 mois pour avoir assez de racines et ainsi pouvoir les transférer dans des pots avec du terreau. Cette phase était très délicate et il y avait beaucoup de pertes, puisque les plantes devaient résister au changement de conditions. Donc avant de les transférer il était important de faire une sauvegarde par bouturage *in vitro*. La première plante ainsi obtenue du témoin de régénération a mis au total 4 mois et demi pour pouvoir être transférée dans la serre (**Figure 42**).

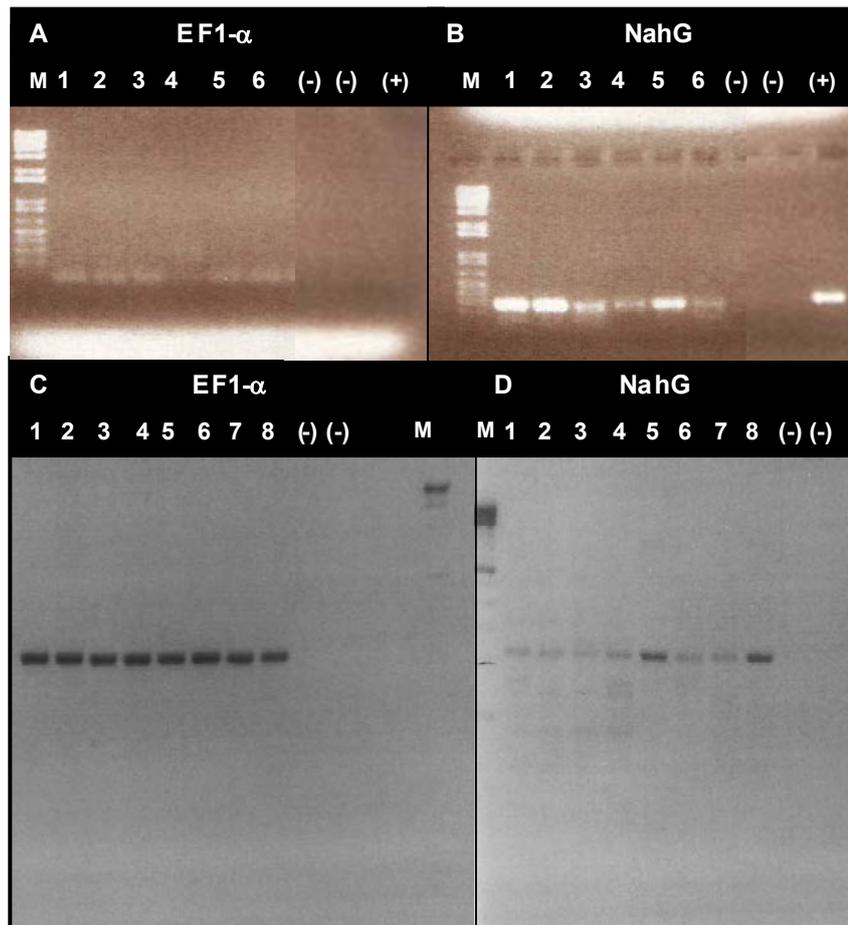
En ce qui concerne les essais de transformation le temps d'obtention des plantes a été très variable mais au moins 4 semaines supplémentaires par rapport au témoin de régénération. Donc Il a fallu au minimum 5 mois jusqu'au transfert de plantes transgéniques dans la serre. Six plantes indépendantes 2HA-NahG ont été obtenues, en ayant un pourcentage de transformation de 12.5%. Cependant une de ces plantes n'a jamais formé de racine et après quelques mois de bouturages *in-vitro* successifs elle a été éliminée.

Les 5 plantes régénérées ont été nommées **T0**. Elles ont été multipliées par bouturage afin d'obtenir un plus grand nombre de graines. L'aspect de plantes transgéniques 2HA-NahG était identique à celui des plantes sauvages (2HAwt): la forme de feuilles, la macule au centre des folioles, elles ont fleuri en même temps, et la forme des gousses était similaire.

De ce premier essai de transformation réussi, et à partir des 5 plantes nommées 2HA-NahG 2, 3, 4, 5 et 6 et multipliés par bouturage, nous avons obtenu 24, 10, 115, 52 et 90 gousses respectivement. Le témoin de régénération (2HA sans NahG) a produit 128 gousses.

Afin de sélectionner les plantes transgéniques à partir des graines obtenues, nous avons testé des milieux contenant de la kanamycine et/ou de l'acide salicylique.

Des essais ont été réalisés avec les plantes T1 germées de ces graines et des plantes 2HA sauvage, en repiquant les germinations dans de pots magenta contenant les milieux suivants : MS, MS + kanamycine 100µg/mL, MS+ SA 0.1mM et MS+SA 1mM (**Figure 43**). On a noté des plantes vertes : la kanamycine n'a pas été assez stringente et de plus les témoins ont présenté le même pourcentage que les plantes transgéniques. Ces faits sont en accord avec la communication orale de Chabaud. Quant au SA dans le milieu, il s'est révélé très



**Figure 44. Vérification sur gel d'agarose (1.5%) de l'expression du transgène NahG.** L'ARN de feuilles et racines de plantes 2HA-NahG et 2HAwt ont été extraits puis utilisés pour réaliser une réaction de RT. À partir de l'ADNc obtenu, une PCR et analyse en gel d'agarose ont été réalisés. Les gels **(A)** et **(C)** montrent des bandes obtenues avec les amorces EF1a, tandis que **(B)** et **(D)** les amorces NahG.

**(A, B)** Produits de PCR après 35 cycles. Les puits 1,2,3,4,5 et 6 correspondent à l'ADNc de feuilles de plantes 2HA-NahG n° 1, 2, 3, 4, 5, 6 de la génération T0. Les puits (-) sont les témoins négatifs (H<sub>2</sub>O de la RT et H<sub>2</sub>O de la PCR) et le puits (+) est le témoin positif (plasmide pure NahG).

**(C, D)** Produits PCR après 30 cycles à partir de l'ADN de racines ou feuilles de plantes 2HA-NahG de la génération T2. Puit n°1 : racines 5B/5A, puit n°2: racines 3dE/3dD, puit n°3: racines 4.2A/4.2B, puit n°4: racines 4A, puit n°5: feuilles 4A, puit n°6: racines 6.7C/6.7E, puit n°7: racines 2.1D/2.1G et puit n°8: feuilles 3dc/3dF. Les puits (-) sont les témoins négatifs (H<sub>2</sub>O de la RT et H<sub>2</sub>O de la PCR).

M= marqueur de taille 100pb **(A, B, C)** ou 1kb d'Invitrogen **(D)**.

toxique pour les plantes et les plantes transgéniques n'ont pas résisté mieux que les témoins sauvages. En conséquence, pour connaître la nature de ces plantes il a été nécessaire de les analyser une par une par PCR avec des amorces spécifiques du transgène.

Pour connaître la ségrégation des plantes T2 (la présence du gène NahG), des graines de plantes T1 ont été mises à multiplier et les plantes ont été analysées par PCR avec des amorces spécifiques NahG. Le pourcentage de plantes positives pour le gène NahG a été le suivant: 83% de 2HA-NahG n°2 (11 plantes sur 13), 86% de 2HA-NahG n°3 (6 plantes sur 7), 74% de 2HA-NahG n°4 (31 plantes sur 42), 72% de 2HA-NahG n°5 (41 plantes sur 57) et 68% de 2HA-NahG n°6 (44 plantes sur 65).

Ces résultats sont proches d'une ségrégation mendélienne 3 : 1 et indiquent la présence d'une seule insertion du gène NahG.

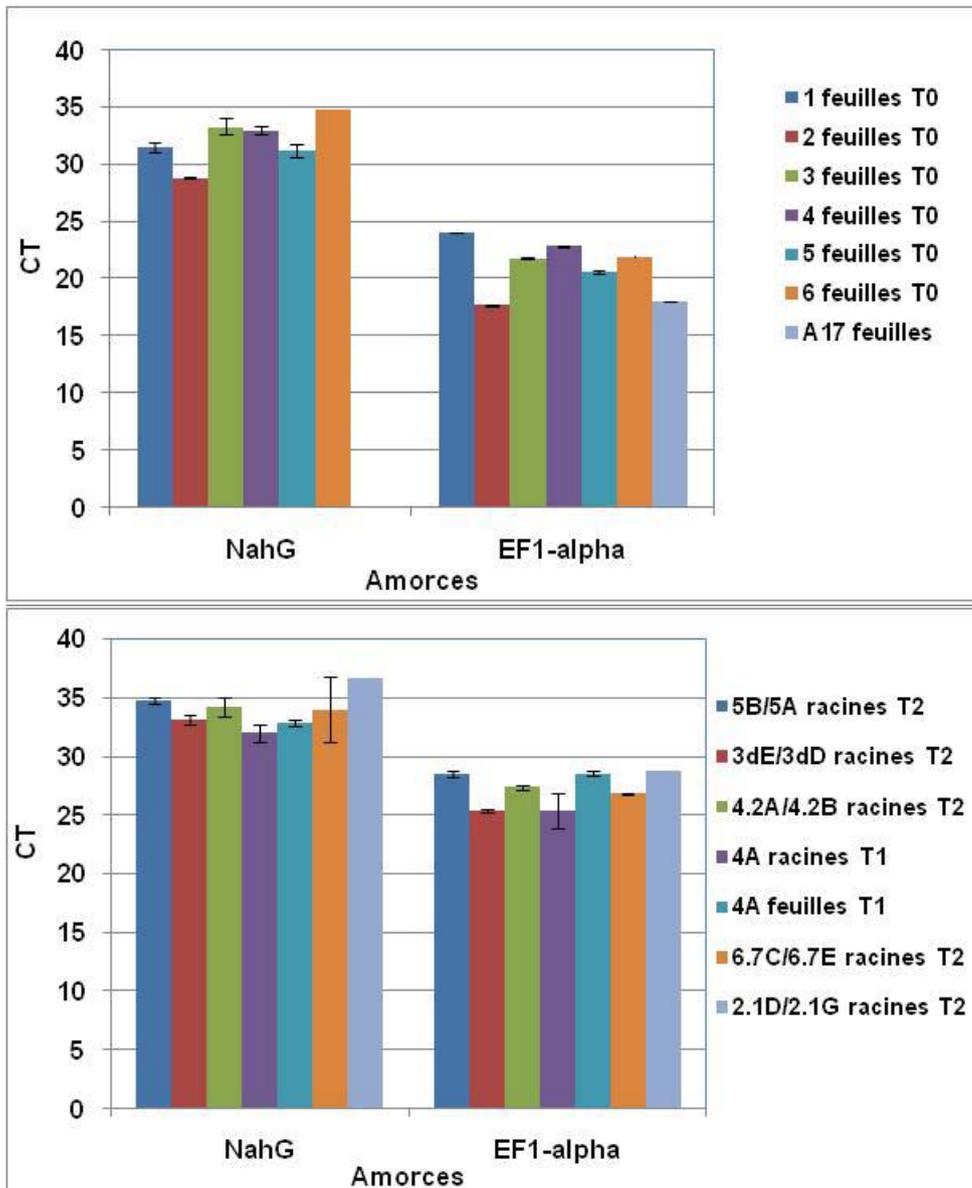
Les plantes multipliées dans la serre ont été vérifiées par PCR et les graines des plantes positives ont été resemées. Au cours de la croissance de ces dernières plantes, 2 de leurs feuilles ont été récoltées pour vérifier par PCR la présence du transgène. Par cette procédure et par l'analyse de ségrégation, nous avons obtenu deux lignées homozygotes après 3 générations d'autofécondation. Ces lignées ont été nommées 2HA-NahG 3d9 et 2HA-NahG 5.7.

Une deuxième expérience suivant le même protocole a été réalisée 8 mois après la transformation réussie, avec 2HA et le vecteur NahG ainsi qu'un vecteur vide (pBi101.3). Le phénotype des plantes transgéniques régénérées 2HA-NahG et 2HA-pBi101.23 était de nouveau similaire à celui de la plante sauvage 2HA. 16 transformantes 2HA-NahG ont été obtenues et 7 transformantes 2HA-pBi 101.3, les taux de transformation ont été de 15 et 9% respectivement. Des plantes ont été amenées à la génération T2 vers la fin de ce travail de thèse et n'ont pas pu être analysées.

Encouragés par ce succès, des essais de régénération ont été tentés avec des plantes de la population « Damas », en vue d'une transformation stable. Cette population d'origine syrienne, est résistante vis-à-vis de *Fom* et *R.s.* (Chapitre 1). Dans cette expérience réalisée seulement avec les témoins de régénération, 6 conditions différentes ont été testées: 3



milieux différents de callogenèse, décrits dans les travaux de Trihn *et al.* (1998), Chabaud *et al.* (2003), et Neves *et al.* (1999), avec des conditions de lumière et obscurité. Tous les



**Figure 45.- Expression du gène NahG dans des plantes transgéniques évaluée par qRT-PCR.** De l'ADNc de feuilles de différentes plantes de génération T0 a été amplifié par qRT-PCR avec des amorces spécifiques de NahG, et EF1-a comme témoin interne. L'histogramme montre les valeurs moyennes de Ct obtenus avec 3 répétitions techniques d'une seule expérience biologique.

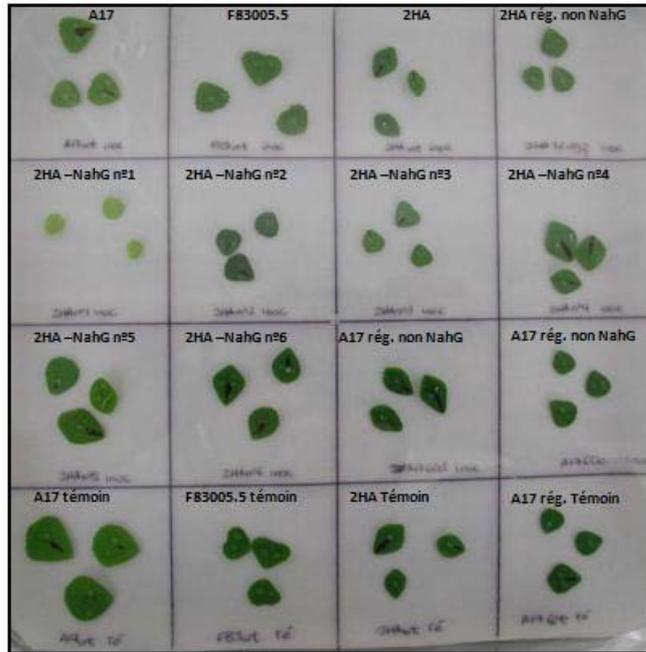
explants ont développé des cals assez grands dans les différentes conditions au bout du 4 semaines. Ils ont été ensuite transférés sur milieu inducteur d'embryons en conditions de lumière. Quatre mois après, les cals n'ont formé aucun embryon. Ces résultats ont confirmé nos observations antérieures; parmi les 4 lignées de *M. truncatula* testées, seulement 2HA se transforment facilement.

### **3.2.2.2. Caractérisation de leur phénotype**

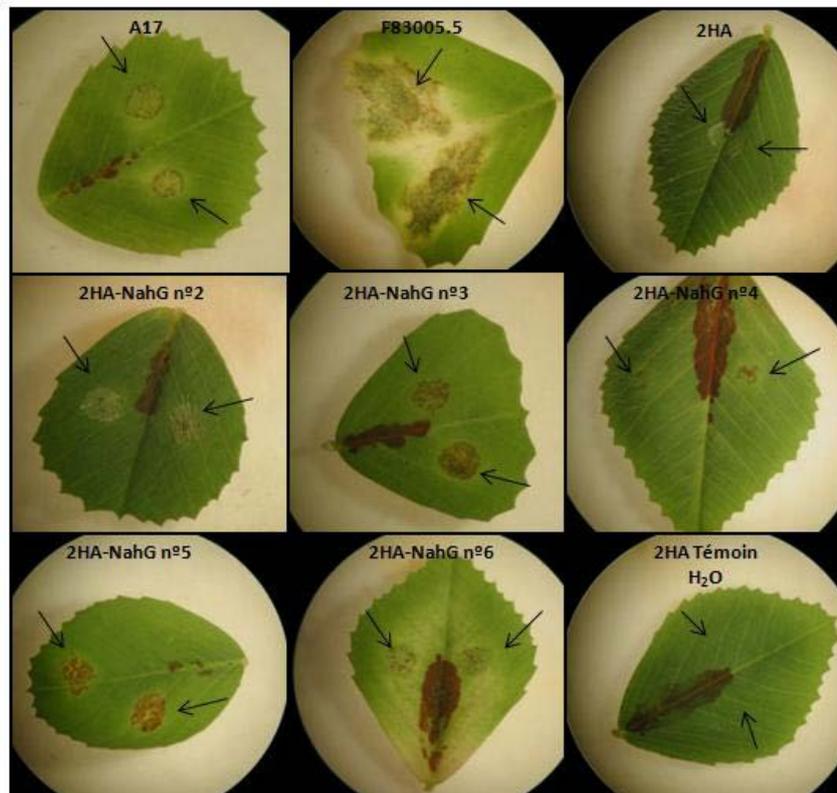
#### **3.2.2.2.1. Expression de la transgénèse**

Afin de vérifier l'expression du gène NahG dans les plantes transgéniques, l'ARN a été extrait d'abord à partir de feuilles de plantes 2HA-NahG T0 et de plantes sauvages, suivi d'une réaction de transcriptase reverse (RT) pour obtenir d'ADNc, et d'une PCR de 35 cycles avec des amorces NahG et du facteur d'élongation EF1- $\alpha$  comme témoin. Les produits PCR ont été déposés sur un gel d'agarose. L'observation du gel a montré une bande de taille attendue chez les plantes transgéniques, confirmant l'expression du gène (**Figure 44 A, B**). Quand des ARN de racines et feuilles étaient soumis à la même analyse avec un nombre de cycles variables, aucune bande NahG n'était visible jusqu'à 25 cycles de PCR. Après 30 cycles, on voit la bande correspondant à NahG ; elle était plus épaisse et intense dans les échantillons de feuilles que dans les racines (**Figure 44 C, D**). La conclusion est que l'expression du gène NahG était plus forte dans les feuilles que dans les racines.

Une qRT-PCR a été réalisée pour quantifier l'expression du gène NahG dans des plantes transformées de génération T0, T1 et T2. Comme montrée dans la **Figure 45**, l'expression du gène NahG est moins forte que l'expression du gène EF1- $\alpha$  dans les feuilles chez T0 et T2.



**Figure 46.- Dispositif expérimental de l'inoculation de feuilles détachées de *M. truncatula* par *Colletotrichum trifolii*.** Les folioles de feuilles détachées des lignées sauvages (A17, F83005.5 et 2HA) et transgéniques (2HA-NahG) ont été inoculées avec 2 gouttes d'une suspension de  $1 \times 10^6$  spores/mL de *C. trifolii* et incubées en salle de culture in vitro, dans une grande boîte avec du papier filtre humide.



**Figure 47.- Symptômes sur feuilles détachées de *M. truncatula* inoculées par *C. trifolii*.** Des folioles de feuilles détachées de plantes 2HA-NahG T0 et de plantes sauvages A17, F83005.5 et 2HA ont été inoculées avec 2 gouttes d'une solution de  $1 \times 10^6$  spores/mL. Les symptômes ont été observés à l'œil nu, puis au microscope. La Figure montre les symptômes visibles à l'œil nu à 10 dpi.

#### 3.2.2.2.2. Réponse à des microorganismes

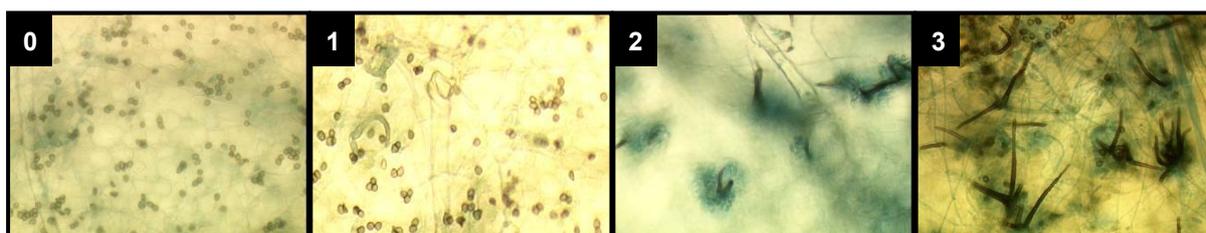
Afin d'évaluer le rôle de l'acide salicylique dans les interactions entre *M. truncatula* et les microorganismes, nous avons réalisé des inoculations avec des microorganismes pathogènes et symbiotiques. La lignée A17 de *M. truncatula* est résistante vis-à-vis de deux des microorganismes pathogènes (*Colletotrichum trifolii* et *Verticillium albo-atrum*) et sensible à deux autres (*Fusarium oxysporum* et *Ralstonia solanacearum*). La lignée 2HA a un comportement similaire. De plus, A17 est colonisé par le champignon mycorhizien *Glomus intraradices*. Une première série d'inoculation avec *C. trifolii* a été réalisée avec les plantes T0, les autres expériences ont été faites plus tard avec des plantes de génération T2 supposées homozygotes d'après leur ségrégation en T3 où la présence ou absence du gène NahG a été évalué par analyse PCR.

##### 3.2.2.2.2.1. *Colletotrichum trifolii*

*Colletotrichum trifolii* (*C.t.*) est un champignon pathogène de la luzerne qui provoque l'anthracnose de la luzerne. Il est hémibiotrophe avec une phase biotrophe courte avant de former des hyphes infectieux secondaires. Il a été rapporté que la lignée A17 était résistante à la race 1 de *C.t.* tandis que F83005.5 était sensible, à la fois en essais d'inoculation de plantes entières ou sur feuilles détachées (Torregrosa *et al.*, 2004).

Des essais d'infection avec cette souche ont été réalisés sur des feuilles détachées de plantes transgéniques 2HA-NahG de la première génération avant leur transfert en serre. Des feuilles détachées des lignées transgéniques (2HA-NahG) et des lignées sauvages (A17, F83005.5 et 2HA) ont été inoculées avec 2 gouttes d'une suspension de  $1 \times 10^6$  spores/mL de *C.t.* et incubées dans une boîte en plastique transparent pendant 2 semaines au phytotron (**Figure 46**). Des observations des feuilles ont été faites à l'œil nu et au microscope après une coloration du mycélium par le bleu de lactophenol.

La **Figure 47** montre une des expériences à 10 dpi. Les feuilles de F83005.5 développent une chlorose autour du site d'inoculation et on voit des nombreux point noirs,



**Figure 48.- Index d'attaque par *Colletotrichum trifolii* chez *M. truncatula*.** Les feuilles inoculées ont été décolorées dans du chloroforme-éthanol (3:1) puis colorées avec du bleu d'aniline dans du lactophéno. L'échelle de maladie basée sur l'observation des structures fongiques est la suivante: **0** =Présence de conidies et appressoria. **1** = Présence d'appressoria et hyphes à la surface de la feuille. **2** = Présence d'hyphes et de quelques acervules. **3** = Présence d'hyphes et de nombreux acervules. Selon cet index de maladie, une plante est résistante ou tolérante quand elle présente les symptômes 0 ou 1. Par contre si elle présente de symptômes 2 ou 3 elle est considérée comme sensible.

**Tableau 5.- Symptômes observés sur feuilles détachées de *M. truncatula* inoculées par *C. trifolii* (Expérience de 2007).** Les symptômes ont été poursuivis à 7, 10 et 15 dpi selon l'index de maladie de 0 à 3. Plantes A17, F83005.5, 2HA et 2HA-NahG T0 (n°2-n°6). La note de maladie de chaque cellule du tableau correspondent à la moyenne obtenue de 2 répétitions techniques (1 répétition technique = 1 feuille avec 3 folioles répété 2 fois) dans 1 répétition biologique. Chaque ligne représente une répétition biologique

Rép. Biol.	sauvages			2HA-NahG T0					
	dpi	A17wt	F83wt	2HAwt	n°2	n°3	n°4	n°5	n°6
7	1	2	0	0	0	0	0	0	0
7	0.5	1.5	1	0	0.5		1		
<b>Moyenne</b>	<b>0.75</b>	<b>1.75</b>	<b>0.5</b>	<b>0</b>	<b>0.25</b>	<b>0</b>	<b>0.5</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
10	1	2.5	0	0	0	0	0	0	0
10	1	1.5	1.5	1.4	1.2	1.66	1	1	1
10	1.25	1.8		1.66	1.1	1.2	1.16	1	1
10	1	3	1		1		1		
<b>Moyenne</b>	<b>1.06</b>	<b>2.20</b>	<b>0.83</b>	<b>1.02</b>	<b>0.83</b>	<b>0.95</b>	<b>0.79</b>	<b>0.67</b>	<b>0.67</b>
15	1	3	1		1		1		
<b>Moyenne</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>1</b>		<b>1</b>		<b>1</b>		

**Tableau 6.- Symptômes observés sur feuilles détachées de *M. truncatula* inoculées par *C. trifolii* (Expérience de 2009).** Les symptômes ont été poursuivis à 7, 10 et 15 dpi selon l'index de maladie de 0 à 3. Plantes A17, F83005.5, 2HA et 2HA-NahG homozygotes (3d9 et 5.7). La note de maladie de chaque cellule du tableau correspond à la moyenne obtenue de 2 répétitions techniques (1 répétition technique = 1 feuille avec 3 folioles répété 2 fois) dans 1 répétition biologique. Chaque ligne correspond à une répétition biologique.

Rép. Biol.	sauvages			2HA-NahG Homozygotes	
	dpi	A17wt	F83wt	3d9	5.7
7	0	1.5	1	0	1
7	1	2	1	1	1
<b>Moyenne</b>	<b>0.50</b>	<b>1.75</b>	<b>1</b>	<b>0.5</b>	<b>1</b>
10	1	3	1	1	1
10	1	3	1	1	1
<b>Moyenne</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
15	1	3	1	1	1
<b>Moyenne</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>

la lignée est bien sensible à *C. trifolii*. Les autres lignées ne présentent pas de symptômes et sont donc résistantes (la chlorose visible sur la foliole de la plante NahG-6 ne part pas du site d'inoculation et n'est pas considéré comme un symptôme de maladie). Pour noter les symptômes de façon quantitative sous la loupe binoculaire une échelle de 0 à 3 a été établie qui va de l'observation des appressoriums et conidies jusqu'à la formation de structures de reproduction, les acervules (**Figure 48**).

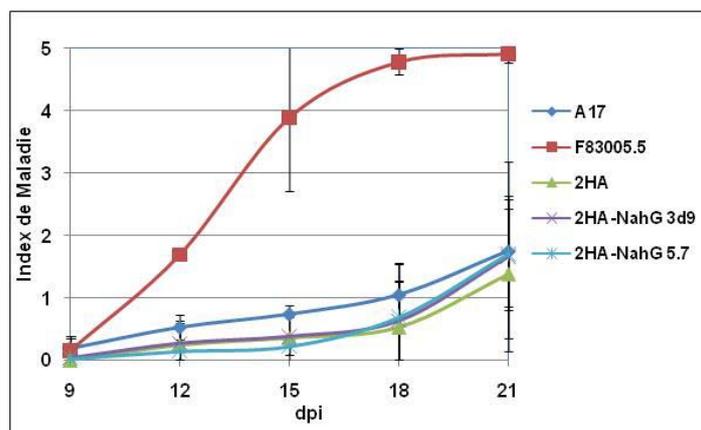
Les **Tableaux 5** et **6** montrent les résultats obtenus de plusieurs répétitions biologiques d'inoculation sur de feuilles de plantes T0 et T2 homozygotes respectivement. 2HA se comporte alors comme A17 ce qui est en accord avec le fait qu'elle est dérivée de celle-ci. De nombreuses acervules avec soies sont observées chez F83005.5, tandis qu'aucune structure de reproduction a été observée chez A17 et 2HA ainsi que chez les 5 plantes transgéniques. Les plantes transgéniques ne montrent donc pas de sensibilité accrue par rapport à la lignée sauvage. Ceci suggère que la résistance de 2HA contre *C. trifolii* n'implique pas une régulation par la voie de l'acide salicylique.

Des essais d'inoculation similaires ont été réalisés avec une autre espèce de *Colletotrichum*, *C. higginsianum*. Cette espèce infecte *Arabidopsis thaliana* mais pas *M. truncatula*. La résistance de type non-hôte pourrait être régulée différemment, et il était donc intéressant de tester les plantes transgéniques dans cette interaction.

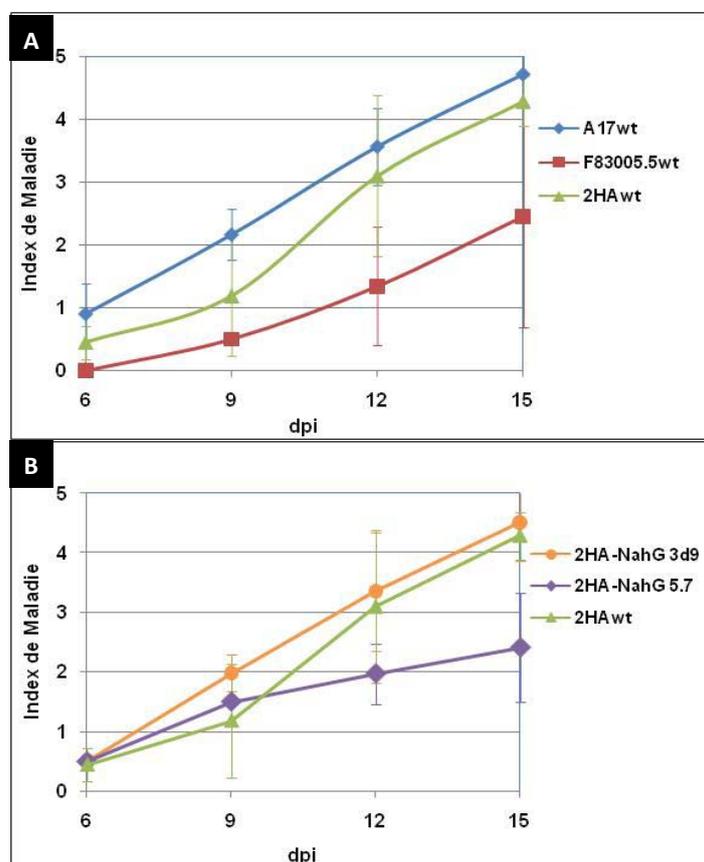
Les résultats obtenus (non montrés) sont identiques à ceux avec *C.t.* à l'exception de F83005.5. Toutes les lignées testées (2HA-NahG, 2HA, A17 et F83005.5) ont été résistantes à *C. higginsianum*. Donc la souche de *Colletotrichum* est bien spécifique à son hôte, dans ce cas *Arabidopsis thaliana* et comme attendu elle n'a pas infecté *M. truncatula*. La voie de l'acide salicylique ne semble pas intervenir dans cette résistance.

#### **3.2.2.2.2. *Verticillium albo-atrum***

*Verticillium albo-atrum* (*V.a.a.*) est un champignon pathogène du sol de la classe de Deuteromycètes (Fungi imperfecti, sans stade sexué connu). Ses hôtes les plus importants



**Figure 49.- Développement de la maladie chez *M. truncatula* inoculée par *Verticillium albo atrum* (*V.a.a*).** Les racines (coupées environ 1 cm) des lignées sauvages A17, F83005.5 et 2HA et des lignées transgéniques homozygotes 2HA-NahG n° 3d9 et 5.7 ont été inoculées avec  $1 \times 10^6$  spores/mL de *V.a.a*. pendant 30 min et mises ensuite dans des pots copro remplis d'eau. Les symptômes foliaires ont été notés sur une échelle de 0 à 5 (montrée en Figure 7). Ces résultats correspondent à la moyenne des indices de maladie de 3 répétitions biologiques (au moins 3 répétitions techniques chacune), avec écarts types.



**Figure 50.- Développement de la maladie chez *M. truncatula* inoculée par *Fom 179.29*.** Des racines de A17, F83005.5, 2HA et 2HA-NahG (3d9 et 5.7) ont été inoculées pendant 30 min par  $1 \times 10^6$  spores/mL de *Fom 179.29*. **(A)** Évolution des symptômes des lignées sauvages 2HA, A17 et F83005.5. **(B)** Évolution des symptômes des plantes transgéniques 3d9 et 5.7 et de la lignée 2HA sauvage. Les valeurs sont les moyennes de 2 répétitions biologiques (au moins 3 répétitions techniques chacune), avec les écarts types. L'analyse statistique avec le logiciel R a indiqué qu'à 12 dpi la lignée 5.7- NahG est moins sensible que 2HA ( $P$  value = 0.01), tandis que 3d9-NahG n'est pas significativement différente de la lignée sauvage.

sont le houblon, la luzerne et le coton (Clarkson et Heale, 1985; Jimenez-Diaz, 1986). Ce microorganisme colonise les racines de la plante et est responsable de la maladie du flétrissement vasculaire. Des expériences au laboratoire ont montré que les lignées A17 ainsi que 2HA étaient résistantes, F83005.5 est sensible à ce champignon (résultats non publiés).

Il était intéressant de savoir si la résistance à *Vaa* impliquait la voie du SA. Des expériences d'inoculation des racines des lignées transgéniques (2HA-NahG) et plantes sauvages (2HA, A17 et F83005.5) de *M. truncatula* ont été donc réalisées aussi avec *Vaa*.

La méthode d'inoculation était identique à celle utilisée pour *F. oxysporum* (décrite dans le 2<sup>e</sup> Chapitre), avec une modification : les racines de plantes étaient coupées 1 cm à partir de l'apex avant d'être trempées dans la suspension de spores afin d'accélérer l'infection. Les symptômes ont été suivis à partir du 9<sup>e</sup> jour après inoculation jusqu'à 21 dpi, ce qui correspond au moment où les lignées sensibles commençaient à mourir. L'index de maladie a été le même qu'avec *F. oxysporum* (**Figure 9**) et va de 0 (plante verte) à 5 (plante morte).

Les inoculations ont été faites en 3 répétitions biologiques. Les résultats obtenus (**Figure 49**) montrent que F83005.5 a été sensible, tandis que les lignées A17 et 2HA ont été résistantes. Les plantes transgéniques homozygotes 2HA-NahG (3d9 et 5.7) ont également été résistantes, ce qui indique que l'acide salicylique n'est pas impliqué dans la résistance contre *Vaa*.

#### 3.2.2.2.3. *Fusarium oxysporum* f.sp. *medicaginis*

*Fusarium oxysporum* est un champignon qui provoque le flétrissement vasculaire, la pourriture des racines et du collet et la pourriture de semis chez la luzerne. Nous avons montré que *Fusarium oxysporum* f.sp. *medicaginis* infecte *M. truncatula*, et que la lignée A17 était sensible et F83005.5 tolérante.

Des racines de lignées sauvages A17, F83005.5 et 2HA ainsi que des transgéniques homozygotes 2HA-NahG 3d9 et 5.7 ont été inoculées comme décrit dans le chapitre 1 en

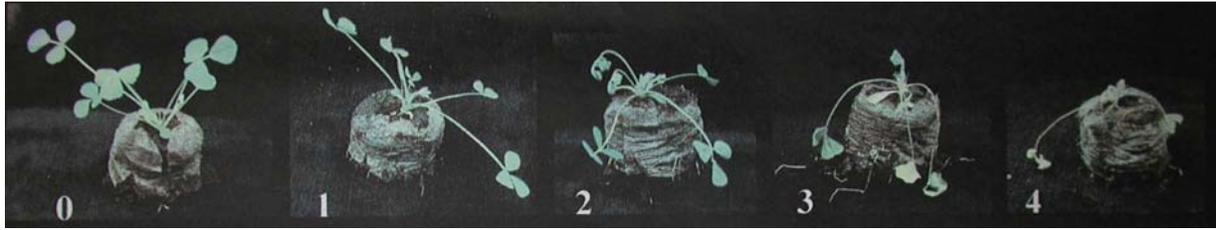


conditions hydroponiques. Les symptômes ont été notés à partir de 6 dpi avec l'index de maladie de 0 à 5 illustrés dans la **Figure 9**. Deux répétitions biologiques ont été réalisées. Les résultats obtenus sont comparés avec la courbe de moyennes de toutes les inoculations faites avec A17 et F83005.5. On constate que 2HA est bien sensible à *Fom*, mais présente une sensibilité plus faible qu'A17 (**Figure 50 A**).

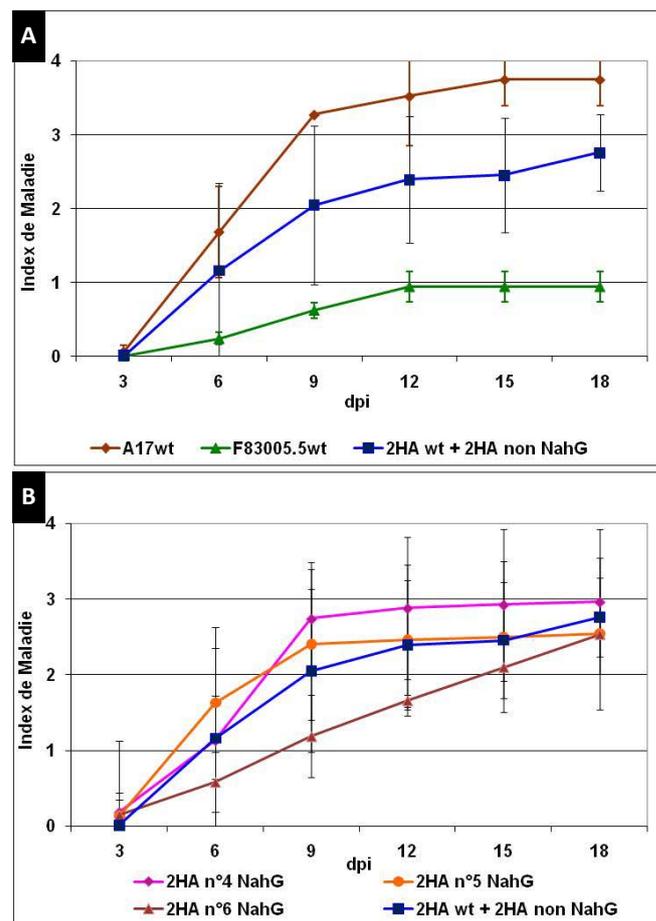
Les résultats montrent qu'à partir de 12 dpi il y a une différence entre les 2 plantes transgéniques 2HA-NahG par rapport la lignée sauvage 2HA (**Figure 50 B**). La lignée 2HA-NahG 3d9 montre la même sensibilité que la lignée sauvage tandis que 2HA-NahG 5.7 se comporte tolérante comme F83005.5. En effet la maladie se développe seulement jusqu'à la chlorose de sa 1<sup>ère</sup> feuille (note 3) et il n'y a pas de plantes nécrosées ou mortes.

Ces résultats sont difficiles à interpréter parce qu'il y a de résultats contradictoires avec les lignées 5.7 et 3d9 testées. Les résultats avec la lignée 3d9 pourraient indiquer que le SA n'a pas de rôle dans la sensibilité ou défense basale dans la lignée sensible, par contre les résultats avec la lignée 5.7 pourraient indiquer le contraire. Dans les deux cas on peut proposer que le SA intervient dans la sensibilité au champignon. Il est possible que pour une de deux lignées nous ayons un effet de position de l'insertion qui interfère, mais on ne peut pas savoir dans quelle lignée.

Une autre possibilité serait que le lot des graines d'une des lignées transgéniques a souffert des conditions de culture ou de stockage ce qui a pu affecter leur comportement. En effet, la production et récolte des gousses se sont déroulées sur une longue période et certaines plantes ont du subi une attaque de mildiou dans la serre. Mais là aussi on ne sait pas quelle lignée aurait souffert plus que l'autre. Cette expérience n'a donc pas permis de conclure sur le rôle de l'acide salicylique dans l'interaction avec *Fom*.



**Figure 51.- Echelle de symptômes utilisée pour les inoculations de *M. truncatula* avec *R. solanacearum* en pots Jiffy. 0= Aucun symptôme, 1= Les feuilles commencent à se recroqueviller sur elles-mêmes, 2= Feuilles recroquevillées et affaissement des pétioles, la plante est encore verte, 3= Quasiment tous les pétioles sont affaiblis, les feuilles se dessèchent et chlorosent (jaunissement des tissus), 4= Plantes complètement chlorosées et desséchées: mort de la plante.**



**Figure 52.- Développement de la maladie chez *M. truncatula* inoculée par *Ralstonia solanacearum* GMI 1000. Les racines des plantes sauvages A17, F83005.5 et 2HA et transgéniques 2HA-NahG n°4, n°5 et n°6 cultivées en jiffy (4 jours) ont été coupées (environ 1 cm) et inoculées 30 min par  $1 \times 10^8$  CFU/mL de *R. solanacearum*. (A) Symptômes chez les plantes qui n'ont pas l'insertion NahG et les plantes sauvages. (B) Symptômes chez les plantes transgéniques 2HA-NahG, 2HA non NahG et la plante sauvage 2HA. Les résultats représentent les moyennes de 2 répétitions biologiques avec plusieurs répétitions techniques, avec les écarts types.**

Les résultats obtenus avec 2HA-NahG n°5 ont été très variables malgré les répétitions et ils n'ont pas été exploités avec le logiciel R car cette lignée ne semble pas être fixée. On ne peut pas dégager une différence significative entre les lignées transgéniques et la lignée sauvage.

#### 3.2.2.2.4. *Ralstonia solanacearum* GMI 1000

Pour compléter les études décrites sur les effets de protection de la lignée A17 par un traitement avec du SA, il était intéressant de savoir si les plantes transgéniques 2HA-NahG étaient plus sensibles à l'infection avec *R.s.* GMI1000.

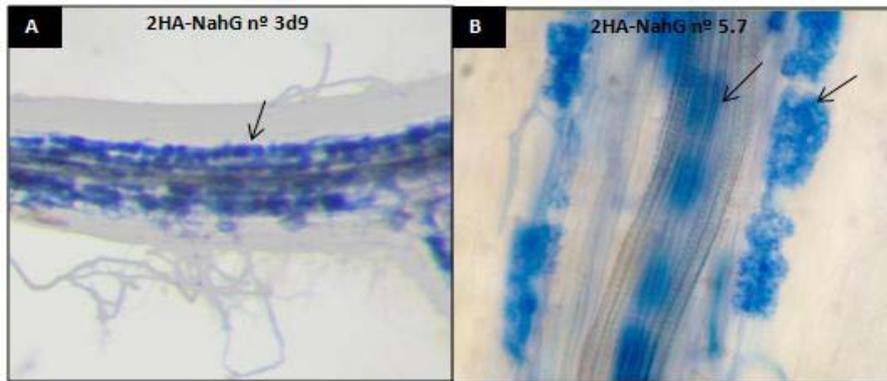
Pour cela, des inoculations en jiffy (tourbe commerciale) ont été effectuées avec les plantes transgéniques 2HA-NahG n°4, n°5 et n°6 de génération T1, et les plantes sauvages A17, F83005.5 et 2HA. Pour déterminer si les plantes 2HA-NahG possèdent le transgène, des extractions d'ADN et vérifications par PCR ont été faites à la fin de l'expérience. Les plantes qui ne possédaient pas le transgène ont été considérées comme des témoins négatifs.

Les méthodes d'inoculation et du suivi des symptômes par un index de 1 à 4 (**Figure 51**) étaient ceux décrits par Vaillau *et al.* (2007).

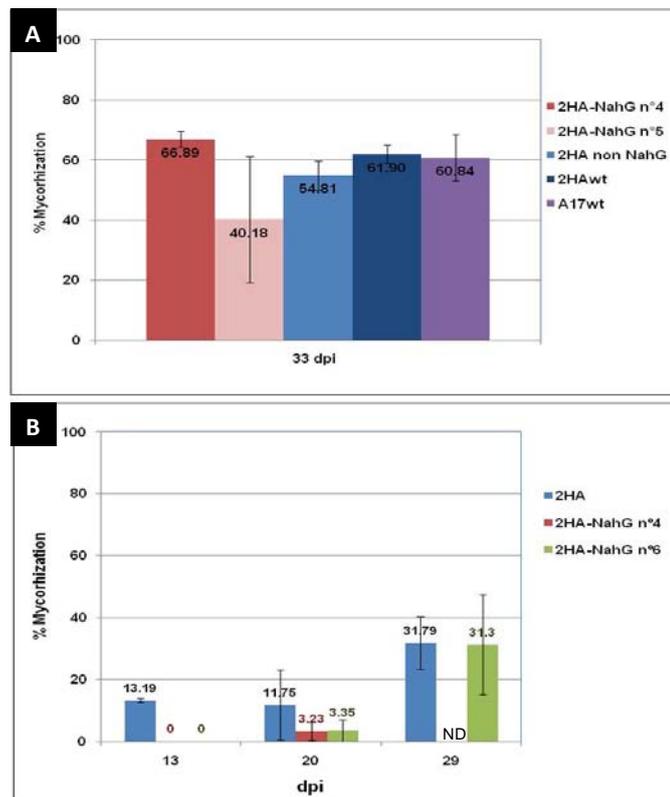
Les résultats obtenus sont illustrés dans la **Figure 52**. On voit que la lignée 2HA est sensible à *R.s.*, mais moins que la lignée A17. Les plantes 2HA-NahG n°5 ont eu le même phénotype que le témoin (plantes non NahG et 2HA sauvages), mais les plantes transgéniques 2HA-NahG n°4 et n°6 ont eu un comportement différent. Les plantes 2HA-NahG n°4 étaient légèrement plus sensibles que le témoin et celles de n°6 plus tolérantes avec une évolution des symptômes retardée. Cependant à 18 dpi les 3 lignées transgéniques et les témoins arrivent à la même note de maladie. Comme le montrent les barres d'erreur il y avait de la variabilité dans les réponses des plantes et il est pour l'instant difficile de conclure.

#### 3.2.2.2.5. *Glomus intraradices*

*Glomus intraradices* est un champignon endomycorhizien qui colonise le système racinaire des plantes pour y former une association symbiotique (mycorhize). Les champignons endomycorhiziens permettent à la plante de mieux absorber l'eau et les éléments nutritifs présents (spécialement le phosphore, le manganèse, le cuivre et le zinc) et de réduire l'incidence des maladies racinaires. En échange la plante fournit au champignon



**Figure 53.- Observation à la loupe binoculaire de racines de *M. truncatula* inoculées avec *G. intraradices* et colorées à l'encre.** Des racines récoltées à différents temps ont été colorées à l'encre de Shaeffer et observées à la loupe et au microscope pour réaliser le comptage de la mycorhization. **(A)** Une racine mycorhizée (flèches) de la plante transgénique 2HA-NahG n° 3d9, à 29 dpi (40x) ; **(B)** Arbuscules (flèches) dans une racine mycorhizée de la plante transgénique 2HA-NahG n° 5.7, 29 dpi (400x).



**Figure 54.- Mycorrhization des lignées sauvages et transgéniques de *M. truncatula* par *Glomus intraradices*.** L'inoculation a été réalisé en repiquant les plantules dans des pots contenant du substrat mélangé à des spores de *G. intraradices* (2 plantes/pot; 1333 spores/pot). Des plantes de génération T1 ont été utilisées. Aux temps indiqués, les racines ont été récoltées et colorées à l'encre pour détecter les structures mycorhiziennes. Le pourcentage de mycorhization a été déterminé par la méthode de Brundett *et al.* (1996). **(A)** Plantes inoculées au stade de germination. Les valeurs représentent les moyennes d'au moins 3 répétitions techniques dans 1 répétition biologique, avec les écarts types. L'analyse statistique avec R a indiqué que 2HA-NahG n°5 est significativement différente de 2HA-NahG n°4 (P value= 0.001), A17 (P value= 0.003), 2HAwt (P value= 0.03) et 2HA non NahG (P value= 0.06).

**(B)** Plantes inoculées à l'âge de 4 jours. Les valeurs représentent les moyennes d'au moins 3 répétitions techniques dans 1 répétition biologique, avec les écarts types. L'analyse statistique avec R a indiqué qu'il n'y a pas de différence significative entre les différentes lignées au même temps.

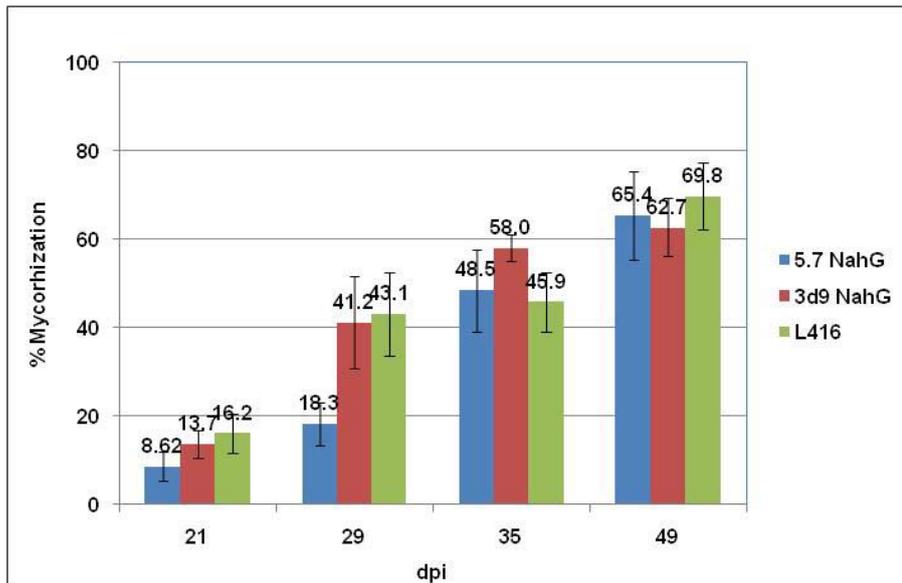
des sucres et d'autres éléments nécessaires à son développement. Chez le tabac il a été décrit que le SA pouvait ralentir l'établissement de la symbiose mycorhizienne (Herrera-Medina *et al.* 2003).

En complément aux études avec les microorganismes pathogènes décrites ci-dessus, les plantes transgéniques ont été analysées dans des essais d'inoculation avec *Glomus intraradices*. Deux expériences ont été réalisées. Une première avec des plantes des lignées 2HA, 2HA-NahG n°4, 2HA-NahG n°5 et 2HA-NahG n°6 de génération T1, qui étaient vérifiées à la fin de l'expérience par PCR comme décrit ci-dessus. Dans une deuxième expérience nous avons utilisé des plantes transgéniques des lignées 2HA-NahG n°3d9 et 2HA-NahG n°5.7 de génération T2 supposées homozygotes.

Pour suivre la mycorhization, les racines ont été récoltées à différents temps après l'inoculation, pesées et colorées en suivant un protocole de coloration avec l'encre Schaeffer (Vierheilig *et al.* 1998). Les structures du champignon colorées en bleu ont été observées au microscope, et le comptage de zones colorées ou non a permis de calculer le pourcentage de racine mycorhizée. La **Figure 53** montre la coloration de mycorhizes chez les plantes transgéniques.

Les résultats de la 1<sup>ère</sup> expérience avec les lignées transgéniques 2HA-NahG n° 5 et n°4 et la récolte des racines à 33 jours montre que la mycorhization chez les plantes 2HA-NahG n° 4 était similaire à celle des témoins, tandis que les plantes 2HA-NahG n° 5 avaient une mycorhization réduite (**Figure 54 A**).

Dans une deuxième expérience on observe que 2HA mycorhize plus rapidement que les lignées transgéniques 2HA-NahG n° 4 et n° 6 à 13 dpi, et à 20 dpi les plantes transgéniques commencent à développer des mycorhizes (environ 3%). Malheureusement à 29 dpi on ne disposait pas de plantes 2HA-NahG n°4 pour compter leur mycorhization, donc on a pu uniquement compter la mycorhization chez les plantes 2HA et 2HA-NahG n°6 et on a observé que la mycorhization était environ 31 % dans les deux cas (**Figure 54 B**). Cependant il y avait beaucoup de variabilité entre les plantes individuelles comme montrent les barres d'erreur.



**Figure 55.- Mycorrhization de plantes transgéniques de *M. truncatula* avec *Glomus intraradices*.** Des plantes âgées de 4 jours ont été repiquées dans des pots avec un substrat commercial contenant les spores de *G. intraradices* (1 plante/pot; 1020 spores/pot). Les plantes utilisées sont les lignées transgéniques 5.7 et 3d9 et la lignée L416 contenant le gène GUS sous contrôle du promoteur enod11. La figure montre le pourcentage de mycorrhization obtenu après 21, 29, 35 et 49 jours. Les valeurs sont les moyennes de 10 répétitions techniques d'une seule répétition biologique, avec les écarts types. L'analyse statistique avec le logiciel R a indiqué une différence significative à 29 dpi dans la mycorrhization de 5.7-NahG qui mycorrhize moins par rapport à L416 (P value =  $2.7 \times 10^{-10}$ ), et à 3d9-NahG (P value =  $5.2 \times 10^{-9}$ ), tandis qu'il n'y existe pas une différence significative entre 3d9 et L416. À 35 dpi, 3d9-NahG mycorrhize plus que 5.7-NahG (P value= 0.01) et L416 (P value= 0.01), tandis qu'il n'y existe pas une différence significative dans la mycorrhization entre 5.7-NahG et L416.

Donc, la grande variabilité dans ces deux expériences ne permet pas d'affirmer un effet du transgène. Une comparaison entre les lignées A17 et 2HA montre le même degré de mycorhization pour les deux.

La **Figure 55** montre les résultats de la deuxième expérience qui a été réalisée avec des plantes différentes et dans des conditions légèrement différentes. Le témoin dans cette expérience est la lignée transgénique L416 (A17 avec pMtENOD11-GUS). Les racines des plantes ont été récoltées à 21, 29, 35 et 49 jours après inoculation et colorées pour le comptage de % de mycorhization. Les résultats montrent qu'à 29 dpi il y a une différence nette entre la 2HA-NahG 5.7 (18%) et les lignées transgéniques 2HA-NahG-3d9 et L416 (environ 42%). A des temps plus tardifs (35 et 49 dpi) cette différence s'estompait.

Avec beaucoup de précaution on pourrait suggérer que la lignée a été affectée dans la mycorhization, car les résultats de l'expérience 1 (**Figure 54 A**) et 2 (**Figure 55**) ont la même tendance, sur des plantes de deux générations successives. Néanmoins on ne peut pas expliquer pourquoi cet effet serait limité à une lignée. Il semble pourtant se dégager que s'il y a un effet, il est à l'inverse de ce que l'on attendait d'après les données de la littérature, et qu'il ne se manifeste que pendant les étapes précoces de la mycorhization.

#### 3.2.3.2.2. Dosage de l'acide salicylique

Une trentaine de graines des 5 lignées de plantes transgéniques de la génération T1 ont été envoyées au laboratoire du Dr. A. Mithoefer à l'Institut Max Planck de Biochimie de Jena (Allemagne) afin de déterminer les niveaux de l'acide salicylique dans ces plantes et ainsi valider notre approche d'introduction du gène NahG pour diminuer l'accumulation de ce composé. Les plantes 2HA-NahG et 2HAwt ont été cultivées et extraites et le SA a été dosé par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse comme décrit par Leitner *et al.* (2008).

Les résultats de ce dosage ont montré que les niveaux d'acide salicylique étaient très faibles chez la lignée sauvage et chez les transgéniques et qu'il n'était pas possible de



détecter une différence significative. Leurs expériences d'infestation par des pucerons n'ont pas induit une production du SA en réponse à cette attaque, ni chez les témoins ni chez les plantes transgéniques. Ces essais n'ont donc pas permis de conclure sur l'impact du transgène sur la production de l'acide salicylique. Il faudra donc trouver des conditions qui entraîneront une augmentation forte dans les teneurs en SA afin de pouvoir détecter des différences dans les plantes transgéniques.

En raison de problèmes techniques, un dosage par HPLC à l'UMR 5546 n'a pas pu être réalisé et à ce jour nous ne pouvons donc pas conclure. Cependant il faut rappeler ici que l'expression du gène NahG a été vérifiée par des analyses de RT-PCR.

### **3.3. DISCUSSION**

Ce deuxième chapitre de thèse se focalise sur le rôle de l'acide salicylique (SA) dans les interactions de la plante avec différents agents pathogènes et symbiotiques.

Comme il a été décrit auparavant, chez les plantes, le SA joue un rôle essentiel dans l'activation de résistance à la maladie qui est fréquemment associée à la réponse hypersensible (Dangl *et al.*, 1996; Greenberg, 1997).

Dans les interactions plante-pathogène, le SA peut être un activateur de défenses et ces concentrations endogènes peuvent augmenter considérablement (Yalpani *et al.*, 1991; Malamy *et al.*, 1990). Il existe aussi des travaux où l'application exogène de cette molécule, de ses dérivés ou de ses analogues à la plante (Sticher *et al.*, 1997; Morris *et al.*, 1998; Grolach *et al.*, 1996; Potlakayala *et al.*, 2007) déclenche l'activation de défenses de la plante contre le pathogène. Dans ce travail, divers types d'expériences avec différents génotypes de la plante modèle *M. truncatula* ont été testés. Cette partie a été la première partie réalisée.

**Tableau 7.-Comparaison de toutes les méthodes de transformation utilisées avec le pourcentage de formation de cals et d'embryons décrit par leurs auteurs.**

Protocole	Plante	Explant	<i>A. tumefaciens</i> plus efficace	Observations
<b>Chabaud et al., 2003</b>	<i>M. truncatula</i> 2HA	Feuilles blessées	AGL-1	Embryogenèse somatique. 25% de cals forment des embryons
<b>Crane et al., 2006</b>	<i>M. truncatula</i> R108-1	Racines coupées 1 cm	EHA-105	Embryogenèse et organogenèse somatique. 41.35% de cals forment des embryons
<b>Deak et al., 1986</b>	<i>M. varia</i>	Tiges, hypocotyles et pétioles	AGL1 et EHA 105	Embryogenèse somatique. 69.8% de formation de cals et 41.3% de formation de plantules
<b>Iantcheva et al., 2005</b>	<i>M. truncatula</i> R108-1	Cotylédons et pétioles	LBA 4404	Embryogenèse somatique directe. 9% d'efficacité de transformation
<b>Neves et al., 1998</b>	<i>M. truncatula</i> Jemalong N1, M5, M9 et C7	Feuilles blessées	Non*	Embryogenèse somatique répétitive. 6, 21, 211 et 43% de cals formant des embryons
<b>Shao et al., 2000</b>	<i>M. falcata</i>	Feuilles blessées	LBA 4404	Embryogenèse somatique directe. 10-20% de cals forment des embryons. 50% d'embryons forment des plantules
<b>de Sousa et al., 2000</b>	<i>M. truncatula</i> Jemalong M9-10a	Feuilles blessées	EHA 105	Embryogenèse somatique. 97-100% de cals dont 25-45% génèrent des embryons
<b>Zhou et al., 2004</b>	<i>M. truncatula</i> A17	Demi-cotylédons	AGL-1 et EHA 105	Organogenèse à partir du nœud du cotylédon. 15% d'explants résistants à l'antibiotique et 45% de ces explants résistants génèrent des plantules.

\* Protocole sans utilisation d'*A. tumefaciens* car le protocole est uniquement pour l'induction et maintenance répétitive d'embryogenèse somatique de *M. truncatula*.

Mandal *et al.* (2009) ont observé que le prétraitement racinaire ou foliaire avec 200  $\mu\text{M}$  de SA chez la tomate avant l'inoculation avec *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Fol) induisait les gènes codant la phénylalanine ammonia lyase et la peroxydase 5.9 et 4.7 fois plus que chez les plantes témoins. De plus, à 7 dpi ils ont détecté par HPLC des concentrations endogènes de SA 10 fois supérieures chez les plantes prétraitées par rapport aux témoins. Par ailleurs, chez ces mêmes plantes, le niveau de SA endogène dans les feuilles a augmenté 8.7 fois.

Nous avons observé que le SA exogène a un effet toxique sur les racines des lignées Jemalong A17 et F83005.5 de *M. truncatula*; il détériore les poils absorbants et inhibe la croissance racinaire à partir de concentrations supérieures à 0,1 mM.

Le prétraitement des racines avec 0.05 mM SA a conféré une certaine protection vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* f.sp. *medicaginis* (Fom 179.29) et *Ralstonia solanacearum* GMI1000, mais pas dans toutes les conditions. Il faudrait réaliser davantage d'expériences en testant des durées de traitement et des concentrations d'inoculum différentes pour confirmer le rôle protecteur du SA.

Plusieurs essais d'inoculation sont décrits dans la littérature. Ils indiquent que le SA exogène appliqué sur certaines plantes confère un degré de protection supérieur vis-à-vis de plusieurs types de pathogènes, mais les conditions de culture, les variétés de plantes et le type de pathogène sont différents de nos pathosystèmes étudiés ici. De plus il existe de rapports d'étude dans la littérature démontrant que le degré de réponse du SA peut varier en fonction de l'espèce végétale concernée.

Les essais de transformation stable en testant 8 protocoles différentes (**Tableau 7**) ont montré que les lignées A17 et F83005.5 sont difficiles à transformer. Pour A17 nous avons montré qu'il était possible de régénérer des plantes en suivant une méthode d'embryogenèse directe sur demi-cotylédons, mais elle doit être mise au point pour obtenir des plantes transgéniques, car nous avons obtenu que des faux positifs. Si ceci est dû à la régénération de plantes chimères, on peut penser que la phase de développement d'embryons secondaires, transformés n'était pas suffisante. Pour éviter ce phénomène on propose de raccourcir l'étape de préculture sur milieu REM pendant laquelle les premiers



embryons se forment, et de rallonger l'étape d'embryogenèse après la co-culture avec les bactéries. On peut espérer obtenir davantage d'embryons secondaires et tertiaires après insertion de la cassette de transformation et augmenter les chances de régénérer des plantes complètement transgéniques.

La lignée F83005.5 sera plus difficile à transformer, tous nos essais ont montré qu'elle réagissait de manière très sensible à la présence de bactéries et aux conditions de culture, en nécrosant ou/et produisant des composés marrons qui diffusent dans le milieu. Hormis le criblage sur d'autres milieux et des mesures de protection contre le stress, comme incuber les explants à l'obscurité ou ajouter du charbon actif dans le milieu pour absorber des composés toxiques, nous n'avons pas de pistes plus ciblées à proposer.

L'obtention de plantes transgéniques de la lignée 2HA a permis de réaliser des études sur le comportement de ces plantes vis-à-vis de différents microorganismes.

2HA est une lignée embryogène dérivée d'A17. Nous avons constaté qu'elle était proche mais ne présentait pas un comportement identique à A17 dans les différentes interactions. Dans les interactions avec les 4 microorganismes pathogènes (*C.t.*, *R.s.*, *Fom*, *Vaa*) elle était toujours plus résistante ou moins sensible qu'A17. C'est seulement vis-à-vis du champignon symbiotique *G. intraradices* que nous avons observé une mycorhization identique entre A17 et 2HA.

D'après les données de la littérature le SA exerce une fonction de régulation positive dans l'induction des mécanismes de défense. Les plantes NahG et mutants comme le mutant *sid* chez *A. thaliana* affectées dans la voie de régulation SA ont perdu leur capacité à résister à certains microorganismes pathogènes (Gaffney *et al.*, 1993; Halim *et al.*, 2007) et n'expriment plus de gènes PR1 ni l'induction d'autres gènes de défense.

Halim *et al.* (2007) ont réalisé des études d'inoculation foliaire de plantes de pomme de terre NahG et sauvages par *Phytophthora infestans*. Ils ont observé que malgré la taille des lésions dans les feuilles n'était pas significativement différente, la croissance du phytopathogène a été meilleure chez les plantes NahG. Ils ont observé aussi que la



sensibilité de plantes NahG était corrélée à une réduction dans la formation de callose et de l'expression de gènes précoces.

Pour connaître les niveaux d'acide salicylique présents dans les plantes NahG après l'infection avec *P. infestans*, les concentrations de SA et du glycoside d'acide salicylique (SAG) chez les plantes sauvages non traitées ont été déterminées. Ces plantes avaient respectivement environ 0.1 et 1 µg/g de poids frais de SA et SAG, par contre, après l'infection les niveaux de SA et SAG ont doublé dans ces plantes, tandis que les plantes NahG ont été incapables d'accumuler ces composés.

A condition que les plantes 2HA-NahG produisent une salicylate hydroxylase active et sont donc vraiment affectées dans l'accumulation du SA (ce qui reste encore à démontrer), il était attendu que les plantes 2HA-NahG seront affectées dans leurs défenses vis-à-vis des microorganismes auxquels elles étaient confrontées. Nous n'avons pas pu constater un tel effet. Dans les interactions avec *Colletotrichum* spp. et *Vaa* où 2HA était résistante, les plantes transgéniques ont montré la même résistance que la lignée sauvage.

Des rapports similaires existent dans la littérature, Achuo *et al.*, (2002) ont observé à travers des expériences avec des plantes de tabac et tomate NahG et sauvages que le SA n'était pas impliqué dans la défense contre *Oidium neolycopersici* et non plus dans la défense du tabac vis-à-vis de *Botrytis cinerea*. Cependant ils ont observé une induction de résistance contre *B. cinerea* après traitement au BTS, analogue du SA et pas chez le tabac. Ils en ont conclu que le SA ne déclenchait pas les mêmes réponses de défense.

Dans l'interprétation des résultats il faut aussi tenir compte du fait que le produit de dégradation du SA, le catéchol, peut avoir des effets négatifs sur la plante. Par exemple un rapport de van Wees et Glazebrook, (2003) révèle que chez *Arabidopsis* après l'inoculation de plantes mutantes dans la signalisation du SA et de plantes NahG par *Pseudomonas syringae* f. sp. *phaeseolicola*, l'absence du SA n'était pas impliqué dans la sensibilité de la plante sinon la production de catéchol qui amène une production inappropriée de peroxyde de hydrogène.



Quand Chen *et al.* (2007) ont évalué la toxicité de composés phénoliques sur *Escherichia coli*, ils ont observé que le catéchol était toxique avec un IC50 de 323.5 µg/mL. D'autres composés comme l'hydroquinone a eu une toxicité modérée avec un IC50 de 1196 µg/mL et le résorcinol a été le moins toxique avec un IC50 of 2113 µg/mL.

Dans les interactions avec *R.s.* et *Fom*, où 2HA était sensible, nous avons observé une légère perte de sensibilité pour une lignée, mais ce n'était pas la même dans ces deux interactions. Les résultats de ces analyses sont difficiles à interpréter, car d'une part les expériences étaient limitées par la disponibilité de graines et les plantes utilisées n'étaient pas de la même génération.

Dans l'interaction symbiotique de plantes transgéniques avec *G. intraradices*, les plantes transgéniques soit similaires à la lignée sauvage soit présentait une légère diminution de la mycorhization. Là encore, la variabilité de la réponse des plantes demande davantage des répétitions biologiques pour affirmer ces résultats. On peut tant de même dire qu'une diminution était surprenante. Dans la littérature il a été rapporté que des plantes NahG étaient plus facilement colonisées par des microorganismes symbiotiques. Ainsi, le tabac NahG était plus mycorhizé par *G. intraradices* et *G. mossae* (Herrera-Medina *et al.*, 2003) et le lotier NahG formait plus de nodules avec *Rhizobium* (Stacey *et al.*, 2006). De même lors de la symbiose entre *G. mossae* et le pois, les niveaux de SA augmentaient lors de la mycorhization, étaient plus élevés chez un mutants résistant au champignon symbiotique (Blilou *et al.*, 1999).

A ce jour nous ne pouvons pas exclure un effet de position de l'insertion de la cassette NahG dans les plantes 2HA-NahG. Même si notre analyse de ségrégation de la génération T2 a indiqué la présence d'une seule insertion chez les plantes transgéniques, le nombre des insertions doit encore être confirmé par analyse Southern.

Une hypothèse qui pourrait expliquer le manque d'effet du transgène sur la réponse aux agents pathogènes serait que les plantes régénérées des plantes dégradent peu le SA, ce qui pourrait être possible dans le cas où le SA avait un rôle important lors de la régénération.



Chez le peuplier, il a été observé que les feuilles de plantes transgéniques NahG avaient le même niveau de SA que les sauvages (Morse *et al.*,2007). Quand le profil métabolique a été analysé, il a été constaté que la production constitutive des niveaux de SA chez le peuplier était beaucoup plus élevée que chez d'autres plantes.

Malheureusement, ces résultats n'ont pas pu être comparés avec nos plantes, étant donné que des analyses faites sur HPLC par Mithoefer (Allemagne) ont indiqué que les concentrations de SA chez 2HA sauvage et 2HA-NahG étaient tellement faibles que des différences n'étaient pas détectables.

Il est donc important et prioritaire de déterminer le niveau du SA dans nos plantes. D'autres lignées NahG ont été obtenues en fin de la thèse et devront être analysées.



## 4. CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Nos expériences d'inoculation montrent que *Medicago truncatula* est une plante permissive à *Fusarium oxysporum*. Les lignées A17 et F83005.5 de *M.t.* ont présenté une discrimination en symptômes mais pas en colonisation racinaire. Ces résultats ne peuvent pas être comparés avec d'autres pathosystèmes, puisqu'il y existe très peu d'études à l'exception de la tomate (Lagopodi *et al.*, 2002) sur une caractérisation approfondie de la colonisation racinaire par *Fusarium*. Cependant on peut émettre l'hypothèse que dans le cas de la lignée tolérante F83005.5, aux étapes précoces il y a eu une probablement une induction de gènes de défense parmi lesquels nos études ont montré l'induction de chitinase à 3 dpi. A ce sujet il sera intéressant de réaliser plus d'études transcriptomiques avec d'autres gènes impliqués dans la défense comme la  $\beta$  1,3-glucanase ou la peroxydase pour observer s'il existe une expression différentielle de ces gènes chez la lignée tolérante par rapport à la lignée sensible.

La transformation génétique de *M. truncatula* n'a pas été réussie avec les lignées A17 et F83005.5 cependant elle a été possible avec la lignée 2HA. Malgré l'existence d'une méthode rapide de transformation génétique de racines chez *M. truncatula* (Boisson-Dernier *et al.*, 2001), ce protocole n'a pas été réalisé parce qu'il possédait beaucoup de désavantages comme l'insertion non homogène du transgène avec le risque de pas avoir le transgène et la production de racines chimériques (Stacey *et al.*, 2006). Pour nous l'intérêt était d'obtenir une transformation génétique stable, possédant plusieurs avantages comme l'insertion homogène du transgène et la conservation de plantes transgéniques. Ainsi, comme la plante entière est transformée, le champ d'expérimentation est plus large et des bio essais avec les racines et les feuilles de ces plantes transgéniques ont pu être réalisés pour étudier le rôle de SA.

Nos plantes transgéniques 2HA-NahG n'ont pas montré une différence nette par rapport aux plantes sauvages, donc le rôle de SA n'a pas pu être étudié de façon approfondie dans le temps imparti. Si ces problèmes sont dûs à une dégradation insuffisante de SA ou à des effets secondaires du catéchol, il est possible de se servir d'approches complémentaires à nos plantes NahG, comme l'utilisation de mutants qui bloquent la voie de biosynthèse de SA ou de sa signalisation.



Une approche peut être le TILLING (Targeted Induced Local Lesions in Genomes) sur *M. truncatula* (Perry *et al.*, 2005; le Signor *et al.*, 2009), sur des populations mutées par EMS ou par rayonnement gamma. On peut cibler par exemple des gènes de *M. truncatula* homologues à de gènes caractérisés chez *Arabidopsis*, comme les orthologues de SID2 et EDS5 (avant nommé SID1) qui codent pour une isochorismate synthétase impliquée dans la biosynthèse de SA et un transporteur de composés phénoliques à travers de la membrane du chloroplaste respectivement. Il faut noter que le chloroplaste semble jouer un rôle très important dans la biosynthèse et signalisation de SA (Shah, 2003). Les plantes ainsi obtenues auront plusieurs mutations ponctuelles et peuvent être triées à l'aide de techniques de biologie moléculaire ou en observant leur phénotype. Cependant le désavantage de cette méthode est qu'il est long, il faudrait attendre plusieurs générations de plantes de *M. truncatula* pour obtenir une génération pure avec une seule mutation d'intérêt dans un gène.

Une autre méthode est le criblage de collection de mutants par phénotypage, par exemple en observant la germination et croissance de ces plantes dans un milieu sélectif avec SA. L'avantage d'un criblage par phénotype est qui permet d'élargir à des gènes jusque là inconnus, impliqués potentiellement dans la signalisation ou biosynthèse de SA. Par exemple le criblage de mutants de *M. truncatula* obtenus par rayonnements gamma (Sagan *et al.*, 1995) a permis l'identification des gènes DMI1, DMI3 et SUNN (Endre *et al.*, 2002, Lévy *et al.*, 2004, Schnabel *et al.*, 2005) impliqués dans la symbiose.

Il existe aussi la mutagenèse insertionnelle par le retrotransposon *Tnt1* où il peut y avoir de 4 à 40 insertions par plante transgénique qui sont stables, indépendantes génétiquement et qui peuvent être séparées par recombinaison (d'Erfurth *et al.*, 2003). Cette technique permet d'identifier rapidement le gène muté chez une plante sélectionnée par son phénotype.

Une autre approche est de bloquer la biosynthèse de SA par l'application de l'inhibiteur de l'activité de la phénylalanine ammonia lyase: l'acide 2 phosphorique amino-indane (Zon et Amrhein, 1992).



Finalement, si nos plantes transgéniques NahG sont vraiment affectées dans l'accumulation de SA, on pourra les croiser avec d'autres lignées, comme la lignée tolérante F83005.5. Ainsi on obtiendra des plantes F83005.5-NahG et on pourra analyser si le SA est impliqué dans la tolérance de cette lignée contre les pathogènes testés (*Fom*, *R.s.* et *V.a.a.*). Une autre possibilité sera un croisement avec des mutants dans d'autres voies de signalisation comme par exemple *sk1* (mutant de la voie de l'éthylène) pour obtenir de double mutants.

Malgré les résultats non concluants dans le cadre de cette thèse sur le rôle de l'acide salicylique par l'approche de transformation, il reste encore beaucoup de possibilités pour étudier l'implication de cette voie dans l'interaction de *M. truncatula* avec des microorganismes.

Tableau 8.- Milieu de culture Fahraeus pour *Medicago truncatula* (Fahraeus 1957).

<b>Macroéléments</b>			
Produit	Formule	MW (g/mol)	[mM]
Chlorure de Calcium	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	142.02	898
Sulfate de Magnésium heptahydrate	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	246.00	488
Phosphate de Potassium dihydrogène	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136.09	735
Disodium hydrogène-phosphate di-hydrate	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	177.99	421
Citrate d'ammonium fer (III)	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> FeNH <sub>3</sub>	16.5-18.5% fer	0.5%

Le

<b>Microéléments</b>			
Produit	Formule	MW (g/mol)	[mM]
Chlorure de Manganèse	MnCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	197.91	0.01
Sulfate de cuivre	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	249.68	4.01
Chlorure de Zinc	ZnCl	136.28	7.34
Acide Orthoborique	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	61.83	16.17
Sodium Molybdate	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	241.95	4.13

pH est ajusté à 7.5 avant autoclavage (120°C pendant 20 min)

Pour le milieu solide: ajouter 15g/litre d'agar (Bacto-agar Difco).

Pour le milieu liquide, une solution stérile de CaCl<sub>2</sub> est ajoutée après l'autoclavage.

Tableau 9 .- Composition des milieux de culture de *Colletotrichum trifolii*.

<b>A) Milieu de culture ANM</b>		<b>B) Milieu de culture Bannerot</b>	
Extrait de malt	2 g	Glucose	2.8 g
Bactopeptone	0.1 g	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.3 g
Glucose	2.0 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.7 g
Agar	2.0 g	Peptone pancréatique	2.0 g
H <sub>2</sub> O qsp	1 L	Extrait de levure	10 mg
		Agar	20 g
		H <sub>2</sub> O qsp	1 L

## 5. MATÉRIELS ET MÉTHODES

### 5.1. MATÉRIEL BIOLOGIQUE ET CULTURE

#### 5.1.1. *Medicago truncatula*

La lignée 2HA de *Medicago truncatula* a été obtenue auprès du Dr. Mireille Chabaud (INRA, Toulouse). Les semis de « Damas » proviennent d'une population naturelle de Damascus en Syrie.

DZA 315.16 et DZA 45.5 sont des lignées pures issues de populations algériennes.

Toutes les lignées ont été multipliées dans nos serres.

La scarification chimique des graines de *M. truncatula* a été effectuée par un bain d'acide sulfurique pendant 7 min, suivi d'un rinçage à l'eau distillée stérile. Dans le cas d'une germination en condition axénique, elles sont stérilisées à un bain d'eau de Javel à 12°C pendant 1min 30 sec puis rincées plusieurs fois. Elles sont ensuite mises à imbiber 1 heure dans le dernier rinçage. Une fois gonflées, elles sont déposées sur du milieu agar-eau (7g/L) et incubées à 4°C pendant 3 jours puis à 14°C pendant 24 heures.

Après l'incubation, les graines germées sont repiquées sur milieu Fahraeus (**Tableau 8**) couvert avec un papier (pour empêcher que les racines s'attachent au milieu) et placées en boîtes de Petri carrées, elles sont ensuite incubées en salle de culture à 25°C avec une photopériode de 16h jour, pendant 4 jours.

#### 5.1.2. Microorganismes

##### 5.1.2.1. *Colletotrichum trifolii*

La souche de *Colletotrichum trifolii* (*C.t.*) race 1 a été fournie par le Pr. B. Dumas (UMR CNRS-UPS 5546). Cette souche est maintenue sur un milieu ANM (**Tableau 9 A**) à 23°C à l'obscurité pour favoriser sa croissance.

Pour favoriser la sporulation, une suspension de spores de *C.t.* est repiquées en fiole de Roux contenant du milieu Bannerot (Bannerot, 1965, **Tableau 9 B**) dans les mêmes



conditions. Les spores produites après 2 semaines sont récoltées dans de l'eau stérile et servent à préparer un inoculum ou bien conservées dans du glycérol 50% à -80°C.



A fin de préparer l'inoculum, les spores sont comptées sous un microscope à l'aide d'une cellule de Malassez. Puis, la concentration est ajustée à  $1 \times 10^6$  spores/mL à l'aide d'une solution de Tween à 0.01%.

#### **5.1.2.2. *Fusarium oxysporum***

La souche 179.29 de *Fusarium oxysporum* f.sp. *medicaginis* (*Fom*) a été fournie par le «Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS)» (Utrecht, Pays Bas). Les souches *F. oxysporum* f.sp. *raphani* (*For* 2), f.sp. *melonis* (*Fomel* 24 et *Fomel* 15), f.sp. *lycopersici* (*Fol* 8), f.sp. *ciceris* (*Foci* 1), f.sp. *lisi* (*Fopi* 1), f.sp. *lini* (*Foln* 3) et les souches non pathogènes *Fusarium oxysporum* *Fo47* et *Fo3* ont été fournies par le Dr. C. Steinberg et Dr. N. Gautheron, INRA Dijon, France. *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli* (*Fop* sp6) a été fournie par Dr. J.M. Diaz-Minguez, Universidad de Salamanca, Espagne, et *Fom* 605 and 606 par Dr. A.S. Alizivatos, Benaki Phytopathological Institute, Grèce.

Toutes les souches ont été cultivées dans du milieu PDA à 24°C avec une photopériode de 12 heures. Les suspensions de spores ont été obtenues par resuspension de boîtes de Petri de la souche dans l'eau distillé stérile et stockées dans du glycérol 25% à – 80°C.

#### **5.1.2.3. *Verticillium albo-atrum***

Le champignon *Verticillium albo-atrum* est conservé au laboratoire dans les mêmes conditions que *Fom* avec un protocole de régénération identique. Cependant, pour optimiser le développement de *V.a.a.*, la culture est stockée à 20°C à l'obscurité pendant 2 semaines avant l'inoculation des plantes.

Tableau 10 .- Composition du milieu de culture f de *Ralstonia solanacearum*

<b>A) Milieu f-TTC/Glucose pour culture solide</b>	<b>Préparation pour 1 L</b>
Peptone	10 g
Acide casamino	1 g
Extrait de levure	1 g
Agar bacteriologique	15 g
TTC (tetrazodium Chloride à 1% dans l'éthanol)	5 mL
Glucose (20%)	25 mL
<b>B) Milieu f-TTC/Glucose pour culture liquide</b>	<b>Préparation pour 1 L</b>
Peptone	10 g
Acide casamino	1 g
Extrait de levure	1 g

#### **5.1.2.4. *Ralstonia solanacearum***

La souche de *Ralstonia solanacearum* GMI 1000 a été cultivée sur milieu  $\phi$ -TTC/glucose solide (**Tableau 10**) pendant 4 jours à 28°C et à l'obscurité. La souche est repiquée sur milieu  $\phi$  liquide avec glucose et mise en agitation à 200 rpm à l'obscurité à 28°C toute une nuit. Le lendemain la densité optique à 280 nm (D.O.<sub>280</sub>) est mesurée pour ajuster ensuite la concentration de bactéries à 10<sup>8</sup> et 10<sup>7</sup> cfu/ml, en calculant qu'une DO de 1 = 1 x10<sup>9</sup> bactéries/mL.

#### **5.1.2.5. *Glomus intraradices***

La souche DAOM 197198 de *G. intraradices* a été fournie par le Pr. C. Roux (UMR 5546, Toulouse). Cette souche est cultivée *in vitro* sur une boîte de Petri compartimentée contenant du milieu M (Bécard et Fortin, 1988) et en présence de racines de carotte, essentielles au développement du champignon et à la production des spores. Les spores sont obtenues à partir d'une culture de *G.i.* âgée de 3 mois dans des conditions d'obscurité et à 25°C.

## **5.2. BIOESSAIS**

### **5.2.1. Inoculations avec *Colletotrichum trifolii***

De jeunes feuilles trifoliées avec 3 folioles de *M. truncatula* ont été prélevées +a partir de plantes âgées de 4 à 6 semaines et mises en boîte de Petri carrées contenant deux couches de papier filtre humide (**Figure 46**). Ensuite 2 gouttes d'une suspension de tween 0.01% avec 10<sup>6</sup> spores/mL de *C.t.* a été déposée dans chaque feuille. La boîte est parafilmée et mise dans une salle de culture à 24°C avec une photopériode de 16 h. La boîte a été



couverte avec deux couches de papier sopalin pendant 4 jours dû que les feuilles devenaient blanches par l'intensité de la lumière.

De manière périodique de l'eau stérile est ajoutée pour maintenir une humidité saturante tout au long du processus infectieux.

### **5.2.2. Inoculations avec *Fusarium oxysporum***

Les suspensions de microconidies ont été obtenues comme précédemment décrit dans 5.1.2.2. et la concentration a été ajustée à  $10^6$  spores/mL.

Après 4 jours de culture dans du milieu Fahraeus, les racines de *M. truncatula* sont trempées pendant 30 min dans la suspension de spores et ensuite transférées dans des pots copro contenant de l'eau (**Figure 8**), six jours après l'eau est remplacée par solution nutritive de Fahraeus. Pour préserver les racines à l'abri de la lumière, les pots sont entourés du papier Kraft.

Six jours après, l'eau est remplacée par une solution nutritive de Fahraeus avec source azotée (Fahraeus, 1957).

Ces cultures hydroponiques sont placées en une chambre de culture à 25°C avec une photopériode de 16h et une intensité de lumière de  $70 \mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Les symptômes des parties aériennes de ces plantes sont observés à l'aide d'une échelle présentée dans la **Figure 9**.

### **5.2.3. Inoculations avec *Verticillium albo-atrum***

Le protocole d'inoculation des plantes par *V.a.a.* est le même qu'avec *Fom* (paragraphe 5.2.2.) sauf que les racines sont coupées à environ 1 cm de l'apex racinaire.

### **5.2.4. Inoculations avec *Ralstonia solanacearum***

Pour les inoculations de plantes en pots copro, les plantes de *Medicago truncatula* sont cultivées comme il a été décrit dans le paragraphe 5.1.1., puis les racines sont coupées à

Tableau 11.- Composition de la solution de Long Ashton Low Phosphate (7,5 µM final).

<b>Macroéléments (10x)</b>	Pour 1 L
KNO <sub>3</sub>	7,5 g
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , 4H <sub>2</sub> O	9,5 g
Na H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O (MW= 138 g/mol)	20.7 mg
MgSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O	5.0 g
<b>Microéléments (1000x)</b>	Pour 1 L
MnSO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O	1.7 g
CuSO <sub>4</sub> , 5 H <sub>2</sub> O	0.25 g
ZnSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O	0.3 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3 g
NaCl	5 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> , 4 H <sub>2</sub> O	0.09 g
<b>Na Fe-EDTA (100x) pour 1L</b>	2.2g
<b>Pour 1 L de Long Ashton</b>	
<b>Macroéléments</b>	100 mL
<b>Microéléments</b>	1 mL
<b>Fe EDTA</b>	10 mL

Tableau 12.- Composition des solutions stock et des milieux de culture utilisés dans la transformation de feuilles de *Medicago truncatula* (Chaubaud *et al.*, 2003).

<b>Macroéléments 20x</b>	<b>UM</b>	<b>P4</b>	<b>SH</b>
KNO <sub>3</sub>	19 g	18.75 g	25 g
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	16.5 g	6 g	
MgSO <sub>4</sub> ,7H <sub>2</sub> O	3.7 g	2.25 g	4 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.7 g	1.31 g	-
CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	4.4 g	3 g	2 g
KCl	-	2.25 g	-
NH <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	-	3 g
Qsp avec H <sub>2</sub> O UHQ	500 mL	500 mL	500 mL
<b>Microéléments 100X</b>	<b>UM</b>	<b>P4</b>	<b>SH</b>
MnSO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O	680 mg	500 mg	500 mg
ZnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	430 mg	100 mg	50 mg
KI	41.5 mg	37.5 mg	50 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	310 mg	150 mg	250 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O	12.5 mg	12.5 mg	5 mg
CuSO <sub>4</sub> , 5H <sub>2</sub> O	1.25 mg	1.25 mg	10 mg
CoCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	1.25 mg	1.25 mg	5 mg
Qsp avec H <sub>2</sub> O UHQ	500 mL	500 mL	500 mL
<b>Vitamines 100x</b>	<b>UM</b>	<b>P4</b>	<b>SH</b>
acide nicotinique	250 mg	50 mg	250 mg
pyridoxine	500 mg	50 mg	25 mg
thiamine	500 mg	500 mg	250 mg
glycine	100 mg	-	-
Myo-inositol	5 g	5 g	
Qsp avec H <sub>2</sub> O UHQ	500 mL	500 mL	500 mL

environ 1 cm et trempées dans une solution de  $10^7$  ou  $10^8$  CFU de *R.s.* GMI 1000 pendant 30 min. Les plantes sont ensuite transférées dans des pots copro remplis de l'eau dans les mêmes conditions que décrites dans le paragraphe **5.2.2.**

En ce qui concerne les inoculations dans la tourbe commerciale Jiffy, les plantules de *M.t.* sont repiquées directement sur de Jiffy après germination. Après 10 jours de culture les racines des plantes sont coupées à environ 1 cm en coupant la base des Jiffy. Les Jiffy sont trempés dans une suspension de  $10^7$  ou  $10^8$  CFU de *R.s.* GMI1000 pendant 30 min et déposés dans des plateaux remplis de terreau dans une salle de culture avec une photopériode de 16h à 28°C.

#### **5.2.5. Inoculations avec *Glomus intraradices***

Pour la préparation de l'inoculum de *Glomus intraradices*, le substrat commercial Damolin type III R de la société « Oil & Chemicals Absorbent» a été rincé et mélangé avec les spores de *G.i.* fournies par le Dr. C. Roux (UMR 5546, France), soit directement avec une boîte de Petri contenant le milieu de culture avec des racines de carottes et les spores de *G.i.* (Bécard et Fortin, 1988), soit avec une suspension de spores de *G.i.*. Les plantes de *M. t* soit germées sur agar-eau soit cultivées en milieu Fahraeus (conditions définies en **5.1.1.**) ont été transférées dans des pots d'une contenance de 1 L remplis avec le substrat inoculé avec *G.i.*

Deux conditions différentes ont été testées dans les inoculations avec une plante ou deux plantes repiquées dans chaque pot, et une concentration finale de 1020 spores ou 1333 spores respectivement.

Les pots des plantes sont transférés en miniserres et arrosés tous les 2 jours avec 50 mL d'eau et 2 fois par semaine avec un milieu nutritif Long Ashton (**Tableau 11**).

Suite du Tableau 12.- Composition des solutions stock et des milieux de culture utilisés dans la transformation de feuilles de *M. truncatula* (Chabaud *et al.*, 2003).

Pour 1 L	CIM		EIM		EDM		PDM		SHb10	
macroéléments 20 X	UM	50 ml	UM	50 ml	P4	50 ml	SH	50 ml	SH	50 ml
microéléments 100 X	UM	10 ml	UM	10 ml	P4	10 ml	SH	10 ml	SH	10 ml
vitamines 100 X	UM	10 ml	UM	10 ml	P4	10 ml	SH	10 ml	SH	10 ml
FeEDTA stock solution		10 ml		10 ml		3.3 ml		5.5 ml		5.5 ml
myo inositol		-		-				1 g		1 g
hydrolysate de caséine		2 g		2 g		250 mg				
bacto-trypton		250 mg		-						
2-4 D stock		2,5 ml		-						
saccharose		30 g		30 g		30 g		10 g		10 g
MES 1M pH 5.8		3 ml		3 ml						
pH		5.8		5.8		5.8		5.8		5.8
agar-agar		6 g		6 g		-		-		6 g
phytagel		-		-		2 g		2 g		-
ajouter après autoclavage :										
zéatine stock		5 ml		2.5 ml		-		-		-
IAB stock		-		-		-		0.5 ml		-

Tableau 13.- Composition du milieu de culture TY pour *Agrobacterium tumefaciens*.

Milieu TY	Préparation pour 1 L
<b>Bacto-tryptone</b>	5 g
<b>Extrait de levure</b>	3 g
<b>pH 7.2</b>	
<b>Agar-agar</b>	15 g
<b>CaCl<sub>2</sub> [6mM]<sub>finale</sub> ajouté après autoclavage</b>	

## 5.3. MÉTHODES DE TRANSFORMATION GÉNÉTIQUE

### 5.3.1. *Medicago truncatula*

#### 5.3.1.1. Protocole de transformation de feuilles de Chabaud et al. (2003)

Des graines de la lignée 2HA de *M. truncatula* ont été scarifiées, incubées et germées comme décrit dans le paragraphe 5.1.1 puis les plantes sont transférées en pots Magenta remplis avec 60 mL de milieu Shb10 (**Tableau 12**) à raison de cinq plantules par pot. Les pots sont déposés dans une salle de culture à 25°C avec une photopériode de 16 h pendant 15 jours.

Pour la préparation de la culture d'*Agrobacterium tumefaciens* AGL1-NahG, la souche a été étalée à partir de glycérol stock sur milieu TY sélectif solide (rifampicine 20 mg/L, ampicilline 50 mg/L+ kanamycine 50 mg/L) (**Tableau 13**). Après une incubation de 48 heures à 28°C. Une colonie est prélevée et cultivé dans de 20 mL TY liquide sélectif (rif20, amp50+ kana50) pendant 24h à 28°C sous agitation. La culture bactérienne est centrifugée 10 min à 5000 g. Le surnageant éliminé, et le culot est resuspendu dans 10 mL d'eau stérile. La D.O.<sub>600</sub> a été mesurée avec un aliquot pour ajuster la D.O. de la suspension bactérienne à 0.1.

Co-culture : 2 ou 3 feuilles de plantes âgées de 15 jours sont prélevées et chaque foliole est blessée cinq fois par un scalpel. Puis les folioles sont incubés pendant quelques minutes dans une suspension de 10<sup>6</sup> bactéries d'*Agrobacterium tumefaciens* AGL1-NahG et déposés avec la surface supérieure en contact avec le milieu solide d'induction à la callogenèse CIM en présence de kanamycine 50 µg/mL (**Tableau 12**). Parallèlement un témoin de sélection et un témoin de régénération sont réalisés avec des folioles trempées dans l'eau et déposées sur un milieu CIM avec ou sans kanamycine 50 µg/mL.

Lavage : après 3 jours dans une salle de culture à 25°C avec une photopériode de 16h, les folioles sont rincés avec de l'eau, séchés sur du papier filtre stérile et incubées en milieu liquide contenant 25 mL du milieu d'induction à la callogenèse CIM + kanamycine 50 µg/mL et d'augmentine 400 µg/mL. Les folioles témoins de sélection et de régénération ont été transférés dans du milieu CIM + kanamycine 50 µg/mL et CIM respectivement. Toutes les

Tableau 14.- Composition de solutions stock pour la préparation du milieu Sh3a (Trinh *et al.*, 1998)

<b>N6 major (pour 1 L)</b>	
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (dissoudre complètement)	1.85 g
KNO <sub>3</sub>	28.30 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4.63 g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	1.66 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4.00 g
H <sub>2</sub> O	Qsp 1L
<b>SH minor</b>	<b>Pour 100 mL</b>
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	1 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	500 mg
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	100 mg
KI	100 mg
NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	10 mg
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	20 mg (CuSO <sub>4</sub> =12.8 mg)
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	10 mg
H <sub>2</sub> O	Qsp 100 mL
<b>SH vitamines</b>	<b>Pour 100 mL</b>
Acide nicotinique	500 mg
Thiamine.Hcl (vitamine B1)	500 mg
Pyridoxine.Hcl (vitamine B6)	500 mg
H <sub>2</sub> O	Qsp 100 mL
<b>SH3a (SHMab dans Trinh <i>et al.</i>, 1998)</b>	
N6 major	100 mL
SH minor	1 mL
SH vitamins	1 mL
EDFS	20 mL (solution stock)
Myo-inositol	100 mg
Sucrose	30 g
2-4 D	4 mg
BAP	0.5 mg
pH 5.8	
H <sub>2</sub> O	Qsp 1 L
Phytigel	3 g

folioles sont placées pendant 3 jours dans une salle de culture à 25 °C avec une agitation de 200 rpm et une photopériode de 16 h.

Callogenèse : les folioles sont récupérés dans du milieu CIM liquide, séchés sur papier filtre stérile et transférés en milieu solide d'induction à la callogenèse CIM avec de la kanamycine 50 µg/mL et de l'augmentine 400 µg/mL. Les témoins de régénération et de sélection sont transférés dans un milieu CIM et CIM + kanamycine 50 µg/mL respectivement.

Les folioles des différents essais (transformation et témoin) de régénération sont maintenus dans le milieu de callogenèse pendant au moins 4 semaines jusqu'à l'apparition des cals. A la fin de cette période les témoins de sélection sont éliminés dû à l'absence de formation des cals.

Des cals obtenus de ces explants sont prélevés et transférés sur un milieu EIM + augmentine 200 µg/mL + kanamycine 50 µg/mL. Les explants issus du témoin de régénération sont transférés sur milieu EIM + kanamycine 50 µg/mL (**Tableau 12**). Les embryons formés (stade globulaire jusqu'au stade torpédo) sont cultivés sur milieu EDM + augmentine 200 µg/mL + kanamycine 50 µg/mL et les témoins de régénération dans du milieu EDM.

Les jeunes pousses de plantes issues des essais de transformation sont transférées dans un milieu pour favoriser le développement de la plante et la formation de racines : PDM + augmentine 200 µg/mL + kanamycine 50 µg/mL (**Tableau 12**). Les pousses de plantes du témoin de régénération ont été transférés dans un milieu PDM sans antibiotique.

Une fois les plantes bien développées et ayant beaucoup de racines, elles sont repiquées dans des pots remplis avec du terreau et cultivées en miniserre dans une salle de culture à 26°C avec une photopériode de 16h. Après une semaine d'acclimatation, les plantes sont transférées à la serre.

Pour certains essais, le milieu CIM a été remplacé par les milieux de culture MS (Murashige et Skoog, Sigma) Blaydes (Parrott et Bouton, 1990) et sh3a (Trinh *et al.*, 1998). La composition du milieu sh3a est décrite dans le **Tableau 14**.

**Tableau 15.-Composition des milieux pour la transformation de cotylédons de *M. truncatula* (Iantcheva et al., 2005)**

Milieu	Composition
<b>Hormone-free MS HFMS</b>	Sels MS + 10 g/l agar + 30 g/l saccharose pH=5.8
<b>Régénération medium REM</b>	Sels MS + vitamines morel + 3% saccharose + phytigel 0.25%+0.5 mg/L TDZ pH=5.8
<b>Elongation medium ELM</b>	MS1 + vitamines morel + 3% saccharose + 0.25% phytagel + 0.05mg/L BAP + 250 mg/L hydrolysate de caséine pH=5.8
<b>Rooting medium ROM</b>	Sels MS + vitamines morel + 3% saccharose + phytigel 0.25% + IBA 0.1 mg/L ou 0.5 mg/L.

**Tableau 16 .-Composition du tampon d'extraction d'ADN (Ané et al., 2004)**

Tampon d'extraction	Pour 100 mL
<b>CTAB (Hexadecyl Trimethyl-Ammonium Bromide)</b>	2 g
<b>Tris-HCl 1M pH8</b>	10 mL
<b>NaCl 5M</b>	28 mL
<b>EDTA 0.5M pH8</b>	4 mL
<b>0.5mL betamercaptoéthanol (après autoclavage du tampon)</b>	

### 5.3.1.2. Autres protocoles de transformation

D'autres protocoles de transformation ont été réalisés à partir des divers types d'explants. Le **Tableau 15** montre la composition des milieux utilisés dans le protocole décrit par Iantcheva *et al.* (2005). Les schémas montrés en **Annexes 1-6** reprennent les caractéristiques principales de différentes méthodes décrites par Zhou *et al.* (2004), Neves *et al.* (1998), de Sousa *et al.* (2004), Shao *et al.* 2000, Deak *et al.* (1986) et Crane *et al.* (2006) respectivement. Le **Tableau 7** montre une comparaison avec les principales caractéristiques de chaque protocole de transformation utilisé.

## 5.4. MÉTHODES DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

### 5.4.1. Extractions d'ADN de *M. truncatula*

Les extractions d'ADN de *M. truncatula* ont été réalisées selon la méthode d'Ané *et al.* (2004). Les échantillons de matériel frais (3 feuilles trifoliées) sont préalablement mis à sécher à 65°C dans un tube eppendorf de 2 mL contenant 5 billes #8.

Des feuilles ainsi séchées sont réduites en poudre en utilisant un broyeur mécanique (Retsch MM300, 1minute 30 secondes à 30 pulses par seconde) puis 1 mL de tampon d'extraction (**Tableau 16**) est ajouté. Les échantillons sont incubés 20 min dans un bain-marie à 65°C. Ensuite 600 µL de chloroforme sont ajoutés et les échantillons sont agités vigoureusement à la main pendant 15min à température ambiante. Les échantillons sont centrifugés 10min à vitesse maximal (V max, environ 10,000g) puis la phase supérieure aqueuse est prélevée et déposée dans 1 nouveau tube (eppendorf de 1.5 mL) contenant 600 µL d'isopropanol à température ambiante. Les échantillons sont centrifugés 20 secondes à Vmax RT (20 sec sont comptés après avoir atteint la V max) et le surnageant jeté. Le lavage du culot est réalisé par 500 µL d'éthanol 70% RT suivi d'une 2<sup>ème</sup> centrifugation 10min V



max. Le surnageant est éliminé par pipetage. Enfin, les culots sont séchés sous la hotte pendant 5 à 6 min à RT et resuspendus dans 50 µL d'eau distillée stérile.

#### **5.4.2. Extractions d'ARN**

Les régions de la partie pilifère de 16 racines sont récoltées à 0, 3 et 6 dpi respectivement et stockées à – 80 °C jusqu' à leur utilisation. L'ARN total des racines a été extrait avec le kit SV Total RNA Isolation System kit (Promega) selon les recommandations du fournisseur. La concentration d'ARN a été déterminée avec le Spectrophotomètre NanoDrop (Thermo Scientific).

#### **5.4.3. Transformation de bactéries**

##### ***5.4.3.1. Préparation de cellules compétentes***

Les cellules compétentes ont été préparées avec le protocole suivant : une culture d'*Agrobacterium tumefaciens* a été incubée dans 30 mL de milieu TY contenant 30 µL de streptomycine pendant 12 h à 28°C sous agitation à 200 rpm. Ensuite, la D.O<sub>600nm</sub> est ajustée à D.O<sub>600nm</sub> de 0.5 avec du milieu TY avec streptomycine pour obtenir un volume final de 30 mL. Une 2<sup>ème</sup> incubation est effectuée pendant 2h à 28°C et 200 rpm dans un tube Falcon de 100 mL. La D.O<sub>600nm</sub> est mesurée suivie d'une centrifugation 15 min à 4000 rpm à 4°C. Le surnageant (SN) est éliminé et 15 mL de H<sub>2</sub>O UHQ sont ajoutés. La centrifugation et l'élimination de SN sont répétés 3 fois. Après la dernière centrifugation, 19.5 mL de glycérol 10% sont ajoutés et ensuite le tube est centrifugé 15 min à 4000 rpm à 4°C. Le S.N. est éliminé et les bactéries compétentes sont conservées à -80°C jusqu'à l'électroporation.

Tableau 17.-Composition du master-mix pour la PCR et conditions de température.

Master Mix de PCR		Préparation pour 1 réaction
Buffer 10x		2.50µL
MgCl <sub>2</sub> 50mM		0.75µL
dNTPmix 1.25mM		4.00µL
Amorce forward 10µM		1.00µL
Amorce reverse 10µM		1.00µL
H <sub>2</sub> O UHQ		13.55µL
Taq polymerase		0.20µL
ADN ou témoin positif ou témoin négatif		2.00 µL

Conditions	Temps	
94°C	4 min	
94°C	30 sec	
52 °C	30 sec	38 x
72°C	30 sec	
72°C	6 min	

Tableau 18 .- Amorces utilisées pour la PCR et qRT-PCR.

ID	Gènes	Amorces
TC94219	Protéine liée à la pathogenèse, <b>PR10</b>	F: 5´-CAGTGGAGAAGATCTCCTTTGAGTCT-3´ R: 5´-GCTTTGCAATGGATCCTCCAT-3´
TC106842	Chitinase, <b>CHIT</b>	F: 5´-AAGAGGACAGGATGGAAGAGTG-3´ R: 5´-TAGCTAGGTGTCATGGAGTTG-3´
TC113890	Phénylalanine ammonia lyase, <b>PAL</b>	F: 5´-TCGGCGGTGAGACACTTACC-3´ R: 5´-ACACCACTATCATGGGAAGCAA-3´
TC140281	Chalcone flavanone isomérase, <b>CFI</b>	F: 5´-CCCAGCGGTGGTTACATCTC-3´ R: 5´-CTGCGCCACCGAGGAA-3´
TC121286	Inhibiteur de protéase, <b>PI20</b>	F: 5´-CACACAATACACACAGCAAATACAGTAA-3´ R: 5´-GCCCAAATCAGACGAGGTATGT-3´
TC67846	Facteur d'élongation, <b>EF1-α</b>	F: 5´-ATGAACCACCCTGGACAGAT-3´ R: 5´-GTCCAAGAGGAGGATATTCAGC-3´
70F 337R	Salicylate hydroxylase <b>NahG</b>	70F: 5´-CTGGAAGTCTGCCGCTACTC-3´ 337R: 5´-ACTAGGGCGTCGATGAAATC-3´
Accession du BAC: CR940308	Microsatellite <b>1149</b>	F: 5´-AAGGCCGCTTGTATATGTTA-3´ R: 5´-GGCGTAAATGCTAGAGTTGT-3´

F=Forward, R=Reverse

#### **5.4.3.2. Électroporation**

L'électroporation a été réalisée selon le protocole suivant : 40 µL de suspension de bactéries d'*Agrobacterium* compétente et 2 µL du plasmide (NahG ou pBi 101.3) ont été ajoutés dans une cuve d'électroporation en quartz préalablement refroidie 5 min dans de la glace. Les paramètres de l'électroporateur sont les suivants: 25 µFarad, 400ohms (pour *Agrobacterium*), 1.5 kv. Puis 800 µL de milieu TY sont ajoutés et les échantillons sont incubés 45 min à 200 rpm à 28°C. À l'aide de billes le milieu de culture est étalé sur le milieu sélectif solide TY avec streptomycine et kanamycine. Après incubation 48h à 28°C, les colonies sont repiquées et ensemencées dans une tube contenant 2 mL de milieu TY plus streptomycine et kanamycine et cultivées 72h à 200 rpm à 28°C.

#### **5.4.4. PCR**

Les amplifications par PCR ont été réalisées avec un kit Taq DNA polymerase (Invitrogen Life Technologies) et effectués dans un thermocycleur geneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). Le volume final de réaction est de 25 µL et la composition est détaillée dans le **Tableau 17**. Pour vérifier la présence du transgène NahG chez les plantes 2HA, les amorces NahG sont utilisées ainsi que le microsatellite 1149 (**Tableau 18**) comme témoin positif d'amplification PCR.

#### **5.4.5. q RT-PCR**

La qualité des ARN extraits (5.4.2.) a été vérifiée par une puce Agilent (Bioanalyzer 2100). L'ADNc a été synthétisé à partir de 1 µg d'ARN et avec le kit ImPromII™ Reverse Transcription System (Promega) en utilisant un amorce NahG ou l'oligo dT pour les plantes 2HA-NahG et sauvages respectivement.

Les amorces utilisées dans les essais de qRT-PCR sont décrites dans le **Tableau 18**.

La qRT-PCR a été réalisée à l'aide d'ABI PRISM® 7900HT (Applied Biosystems). Deux répétitions techniques ont été effectuées pour chaque gène dans un volume total de 10 µl contenant 5µl de SYBR green, 1 ng d'ADNc et 5µM de chaque primer, en suivant les



conditions de PCR suivantes: 50°C pendant 2 min, 95°C pendant 10 min, et 40 cycles à 95°C pendant 15 sec et 60°C pendant 1min. Les données ont été analysées avec le logiciel SDS 2.2.2 et les niveaux relatifs d'expression de gènes ont été déterminés en suivant la méthode  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  où  $\Delta Ct = \text{valeur Ct du gène d'étude} - \text{valeur Ct du gène de référence interne EF1-}\alpha$ , et  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ de l'échantillon inoculé} - \Delta Ct \text{ de l'échantillon témoin-inoculée}$  (Livak et Schmittgen, 2001).

## **5.5. MÉTHODES D'OBSERVATION**

### **5.5.1. Microscopie des folioles inoculées par *C.t.***

Les folioles de *M. truncatula* inoculées par *C.t.* (5.2.1.) ont été prélevées à 7, 10 et 15 dpi pour être d'abord observées à l'œil nu et ensuite décolorées avec une solution d'éthanol/chloroforme (3:1) pendant au moins 24 h. Les folioles translucides ont été colorées avec bleu de lactophénol (Fluka Analytical) pendant quelques minutes et rincés avec d'eau distillée. Les folioles ont été montées entre lames et lamelles avec une goutte d'eau distillée et observées au microscope visible avec grossissement x400.

### **5.5.2. Microscopie des racines inoculées avec *Fom*-GFP**

Les racines ont été coupées dans des fragments de 1cm à partir de l'apex. Ces fragments sont inclus dans de l'agarose (low melting) à 5%. À l'aide d'un vibratome (Leica VT 1000S) des sections de racines de 90 à 400  $\mu\text{m}$  d'épaisseur ont été obtenues. Ces coupes placées dans une lamelle avec de l'eau distillé ont été ensuite observées en microscopie visible. Pour des observations au microscope confocal, ces échantillons ont été colorés avec du Rouge Congo (0.05%, w/v) pendant 10 secondes.

Les observations faites avec le microscope d'inversion (DMIRBE, Leica, Rueil-Malmaison, France) ont été faites sous champ brillant et sous fluorescence. Ce microscope



est équipé avec une illumination d'épifluorescence (filtre d'excitation, BP 450-490nm, filtre de suppression LP 515) et avec une camera CCD (colour Coolview, Photonic Science, Robertsbridge, UK). Les images analysées par le logiciel Image Analysis (Image Pro-Plus, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

Les images de microscopie confocale sont obtenues avec un système spécial de scan laser confocal spectral (SP2 SE, Leica, Germany) équipé avec un microscope upright (DM 6000, Leica, Allemagne). Les observations ont été réalisées en utilisant les objectifs 10× (HC PL Fluotar, N.A. 0.3) et 40× (HCX PL APO, N.A. 0.8) (pour échantillons secs ou en immersion avec de l'eau). Le rayonnement de 488 nm d'un laser argon a été utilisé pour détecter l'émission de la fluorescence GFP ayant un spectre d'émission dans la gamme 490 et 540 nm.

### **5.5.3. Observation de la mycorhization sur racines**

#### ***5.5.3.1.-Coloration à l'encre***

La coloration des mycorhizes a été réalisée en suivant le protocole de Vierheilig *et al.* (1998). Le principe de ce protocole repose sur le blanchiment des tissus à la potasse, suivi d'une coloration des parois fongiques avant l'observation au microscope.

Lors des blanchiments des tissus, les racines sont traitées à la potasse KOH 10 % à chaud permettant d'obtenir que les parois cellulaires. Puis, les racines ont été placées dans un bain marie à 95 °C (début d'ébullition) pendant 5 à 15 minutes selon diamètre des racines jusqu'à décoloration complète. Ensuite les racines ont été rincées à l'eau distillée pendant 5-10 minutes pour éliminer la potasse.

Ensuite, les racines sont placées dans des micro-tubes contenant une solution composée à 95 % de vinaigre blanc et 5% d'encre noire (Shaeffer) étaient chauffées à 95 °C pendant 5 minutes.

En cas de coloration prononcée, les racines sont rincées avec une solution aqueuse à 5 % de vinaigre blanc plusieurs fois jusqu'à disparition totale de trace de colorant.

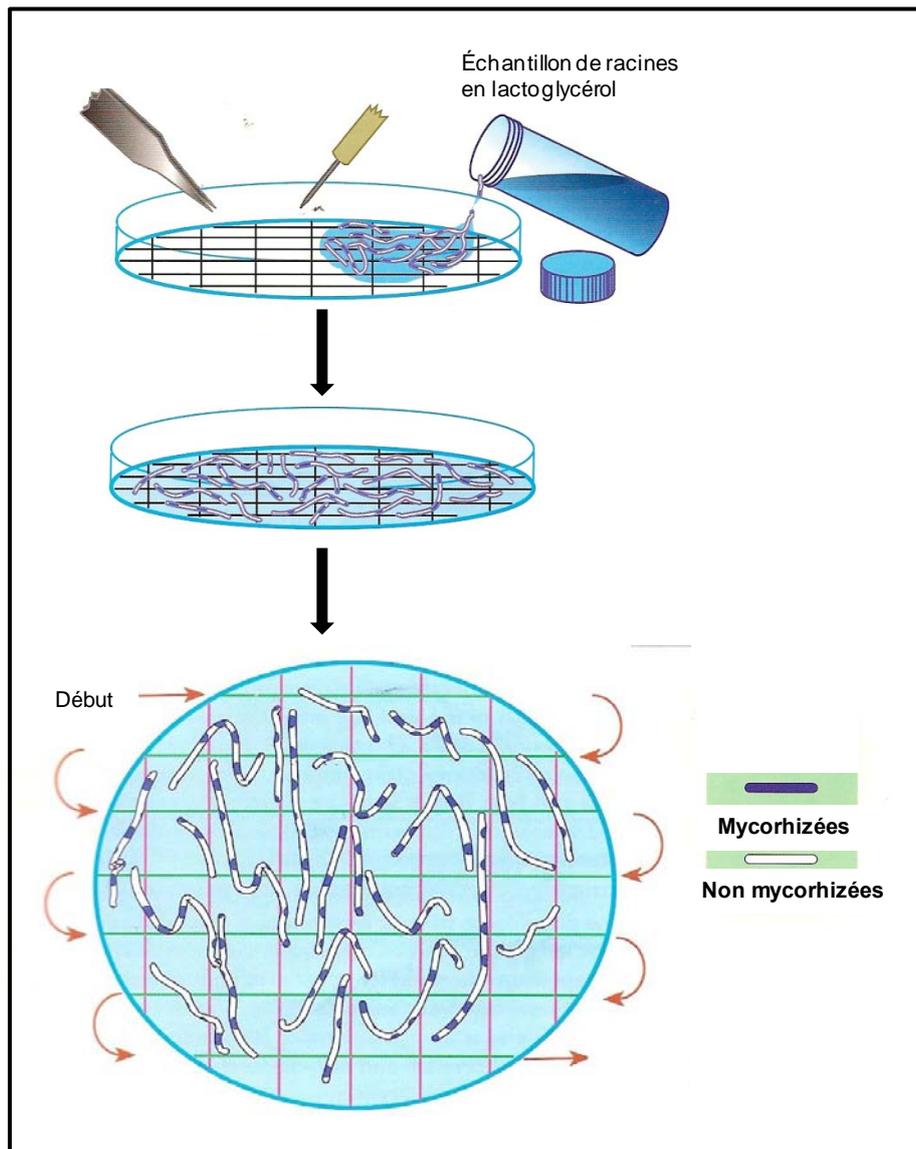


Figure 56.- Schéma du protocole du comptage de mycorhizes (Brundett *et al.*, 1996 ).

Les racines sont ensuite conservées dans de l'acide lactique 1% -glycérol 50/50 v/v jusqu'à l'observation dans la journée qui suit la coloration. Les racines sont montées entre lame et observées au microscope visible.

#### **5.5.3.2. Détermination du taux de mycorhization**

Pour compter la mycorhization des racines de *G. intraradices*, la méthode d'intersection de grille de Brundett *et al.* (1996) a été utilisée.

Cette méthode consiste à disperser les racines colorées et nettoyées sur une boîte de Petri grillée. Ensuite le nombre de racines présentes sur les lignes horizontales est compté en incluant le nombre de racines mycorhizées (**Figure 56**) de façon de calculer le pourcentage de mycorhization. La même opération était répétée pour les lignes verticales.



## 6. RÉFÉRENCES

- Abeles, F.B., Morgan, P.W., Saltveit, Jr M.E. (1992). Ethylene in plant biology, 2nd edn. San Diego: Academic Press.
- Achuo, A.E., Audenaert, K., Meziane, H., Höfte, M. (2002). The SA-dependent defense pathway is active against different pathogens in tomato and tobacco. *Meded Rijksuniv Gent Fak Landbouwkd Toegep Biol Wet*, 67:149-57.
- Adam, D. (2000). Now for the hard ones. *Nature*, 408:792-793.
- Agrios, G.N., (2005). Plant Pathology. 5<sup>th</sup> ed. Elsevier Academic Press, USA UK.
- Aimé, S., Cordier, C., Alabouvette, C., Olivain, C. (2008). Comparative analysis of PR gene expression in tomato inoculated with virulent *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* the biocontrol strain *F. oxysporum* Fo 47. *Physiological Molecular Plant Pathology*, 73: 9–15.
- Alabouvette, C. (1986) *Fusarium* wilt suppressive soils from the Chateaufort region – review of a 10 year study. *Agronomie* 6, 273–284.
- Altier, N.A., Ehlke, N.J., Rebuffo, M. (2000). Divergent selection for resistance to *Fusarium* root rot in birdsfoot trefoil. *Crop Science*, 40: 670–675.
- Alves-Santos, F. M., Benito, E. P., Eslava, A. P., Díaz-Mínguez, J.M. (1999). Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* strains from common bean fields in Spain. *Applied Environmental Microbiology*, 65: 3335-3340.
- Alves-Santos, F.M., Ramos, B, Garcia-Sanchez, M.A., Eslava, A.P., Diaz-Minguez, J.M. (2002). A DNA based procedure for in planta detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. *Phytopathology*, 92:237–244.
- Ameline-Torregrosa, C., Cazaux, M., Danesh, D., Chardon, F., Cannon, S.B., Esquerré-Tugayé, M.T., Dumas, B., Young, N.D., Samac, D.A., Huguet, T., Jacquet, C. (2008). Genetic dissection of resistance to anthracnose powdery mildew in *Medicago truncatula*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21: 61-9.
- Ané, J.-M., Kiss, G.B., Riely, B.K., Penmetsa, R.V., Oldroyd, G.E.D. *et al.* (2004). *Medicago truncatula* DMI1 required for bacterial and fungal symbioses in legumes. *Science*, 303: 1364-1367.
- Armstrong, G. M., Armstrong, J. K. (1965). Further studies on the pathogenicity of three forms of *Fusarium oxysporum* causing wilt on alfalfa. *Plant Disease Reports*, 49: 412-416.
- Armstrong, G.M., Armstrong, J.K., (1981). *Formae speciales* and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt diseases. In *Fusarium: diseases, biology, and taxonomy*. (Eds. Nelson, P.E., TAT, Cook, R.J.), Pennsylvania State University Press, 391–399.
- Antonopoulos, D.F. (2003). First report of fusarium wilt of alfalfa in Greece. *Plant Disease*, 87: 751.



Ariss, J.J. (2003). Pathological factors affecting persistence in alfalfa with emphasis on diseases incited by *Fusarium* and *Colletotrichum* species. Dissertation PhD, Ohio State University, USA.

Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M.R., Chiu, W.-L., Gómez- Gómez, L., Boller, T., Ausubel, F.M. Sheen, J. (2002). MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity. *Nature*, 415: 977–983.

Audenaert, K., De Meyer, G., Höfte, M. (2002). Abscisic acid determines basal susceptibility of tomato to *Botrytis cinerea* and suppresses salicylic acid dependent signaling mechanisms. *Plant Physiology*, 128:491-501.

Bannerot, H. (1965). Résultats de l'infection d'une collection de haricots par six races physiologiques d'antracnose. *Annales de l'Amélioration des Plantes*, 15 : 201-222.

Barker, D.G., Bianchi, S., Blondon, F., Datteé, Y., Duc, G. *et al.*, (1990). *Medicago truncatula*, a model plant for studying the molecular genetics of the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Plant Molecular Biology Reporter*, 8: 40-49.

Bécard, G., Fortin, J. A. (1988). Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytologist*, 108: 211–218.

Beckers, G.J.M., Spoel, S.H. (2006). Fine-tuning plant defence signalling: salicylate versus jasmonate. *Plant Biology*, 8: 1–10.

Beckman, C.H., Roberts, E.M. (1995). On the nature genetic basis for resistance tolerance of fungal wilt diseases. *Advances in Botanical Research*, 21: 35-77.

Benhamou, N., Garand, C., Goulet, A. (2002). Ability of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strain Fo47 to induce resistance against *Pythium ultimum* infection in cucumber. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 4044–4060.

Bennett, M.D., Leitch, I.J. (1995). Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Annals of Botany*, 76: 113-176.

Besserer, A., Puech-Pages, V., Kiefer, P., Gomez-Roldan V., Jauneau A., *et al.*, (2006). Strigolactones stimulate arbuscular mycorrhizal fungi by activating mitochondria. *PLoS Biology*, 4: 1239-1247.

Bent, A.F., Innes, R.W., Ecker, J.R., Staskawicz, B.J. (1992). Disease development in ethylene-insensitive *Arabidopsis thaliana* infected with virulent and avirulent *Pseudomonas* and *Xanthomonas* pathogens. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 5:372-378.

Blilou, I., Ocampo, J. A., Garcia-Garrido, J. M. (1999). Resistance of pea roots to endomycorrhizal fungus or *Rhizobium* correlates with enhanced levels of endogenous salicylic acid. *Journal of Experimental Botany*, 50: 1663-1668.

Bird, DMcK. (2004). Signaling between nematodes and plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 7, 372-376.

Buee, M., Rossignol, M., Jauneau, A., Ranjeva, R., Becard, G. (2000). The pre-symbiotic growth of arbuscular mycorrhizal fungi is induced by a branching factor partially purified from plant root exudates. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13: 693-698.



Boisson-Dernier, A., Chabaud, M., Garcia F., Bécard, G., Rosenberg, C., Barker, D.G. (2001). *Agrobacterium rhizogenes*-Transformed Roots of *Medicago truncatula* for the Study of Nitrogen-Fixing and Endomycorrhizal Symbiotic Associations. *Molecular Plant-Microbe interactions*, 6: 695-700.

Bolton, M.D. (2009). Current Review: Primary Metabolism Plant Defense - Fuel for the Fire. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22:487-497.

Bolwerk, A., Lagopodi, A. L., Wijfjes, A. H., Lamers, G. E., Chin, A. W. T., Lugtenberg, B. J. J., Bloemberg, G. V. (2003). Interactions in the tomato rhizosphere of two *Pseudomonas* biocontrol strains with the phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 16: 983-993.

Bolwerk, A., Lagopodi, A.L., Lugtenberg, B.J.J., Bloemberg, G.V. (2005). visualization of interactions between a pathogenic a beneficial *Fusarium* strain during biocontrol of tomato foot root rot (2005). *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18: 710-721.

Brundrett, M., B., Bougher, N., Dell, B., Grove, T., Malajczuk, N. (1996). Working with mycorrhizas in Forestry and Agriculture. Australian Centre for International Agricultural Research, 183.

Cachinero, J.M., Hervás, A., Jiménez-Díaz, R.M., Tena, M. (2002). Plant defence reactions against *Fusarium* wilt in chickpea induced by incompatible race 0 of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* and nonhost isolates of *F. oxysporum*. *Plant Pathology*, 51: 765–776.

Cai, G., Gale, L.R., Schneider, R.W., Kistler, H.C., Davis, R.M., Elias, K. S., Miyao, E.M. (2003). Origin of Race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* at a single site in California. *Phytopathology*, 1014-1022.

Cameron, R.K., Dixon, R.A., Lamb, C.J. (1994). Biologically induced systemic acquired resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 5:715–725.

Cao, H., X. Li, X. Dong. (1998). Generation of broad-spectrum disease resistance by overexpression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance. *Proceedings of Natural Academy of Sciences USA*, 95:6531-6536.

Chabaud, M., C. Venard, Defaux-Petras, A., Bécard, G., Barker, D.G. (2002). Targeted inoculation of *Medicago truncatula* in vitro root cultures reveals MtENOD11 expression during early stages of infection by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 156: 265-273.

Chabaud, M., Carvalho-Niebel, F. ,Barker, D.G. (2003). Efficient transformation of *Medicago truncatula* cv. *Jemalong* the hypervirulent *Agrobacterium tumefaciens* strain AGL1. *Plant Cell Reports*, 22:46–51.

Chen, Z., Klessig, D.F. (1991). Identification of a soluble salicylic acid binding protein that may function in signal transduction in the plant disease resistance response. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences USA*, 88: 8179–8183.

Chen, Z., Silva, H., Klessig, D.F. (1993). Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science*, 262(5141):1883-1886.



Chen, Y.F., Etheridge, N., Schaller, E. (2005). Ethylene signal transduction. *Annals of Botany*, 95: 901–915.

Chen, H., Yao, J., Wang, Y., Tian, L., Wang, F., Djak, A., Choi, M.M., Bramanti, E. (2007). A microcalorimetric method for studying the toxic effect of different diphenol species on the growth of *Escherichia coli*. *Journal of Environmental Science and Health. Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 42:613-20.

Chisholm, S. T., Coaker, G., Day, B., Staskawicz, B. J. (2006). Review: Host-microbe interactions: Shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, 124:803-814.

Clarkson, J.M., J.B. Heale (1985). Pathogenicity colonization studies on wild-type auxotrophic isolates for *Verticillium albo-atrum* from hop. *Plant Pathology*, 34: 119-128.

Colditz, F., Braun, H.P., Jacquet, C., Niehaus, K., Krajinski, F. (2005). Proteomic profiling unravels insights into the molecular background underlying increased *Aphanomyces euteiches* tolerance of *Medicago truncatula*. *Plant Molecular Biology*, 59:387-406.

Colditz, F., Niehaus, K., Krajinski, F. (2007). Silencing of PR-10 like proteins in *Medicago truncatula* results in an antagonistic induction of other PR proteins and in increased tolerance upon infection with the oomycete *Aphanomyces euteiches*. *Planta*, 226 : 57-71.

Cook, D., Dreyer, D., Bonnet, D., Howell, M., Nony, E., Venbosh, K. (1995). Transient induction of a peroxidase gene in *Medicago truncatula* precedes infection by *Rhizobium meliloti*. *Plant Cell*, 7: 43-55.

Cook, D.R., VenBosch, K., de Bruijn, F.J., Huguet, T.(1997). Model legumes get the nod. *The Plant Cell*, 9: 275-281.

Crane, C., Wright, E., Dixon, R.A., and Wang, Z.-Y. (2006). Transgenic *Medicago truncatula* plants obtained from *Agrobacterium tumefaciens*-transformed roots and *Agrobacterium rhizogenes*-transformed hairy roots. *Planta*, 223:1344-1354.

Crawford, E.J., A.W.H. Lake, K.G. Boyce. (1989). Breeding annual *Medicago* species for semiarid conditions in southern Australia. *Advances in Agronomy*, 42:399–437.

Creelman, R.A., Mullet, J.E. (1997). Biosynthesis and action of jasmonate in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48:355-381.

Dangl, J.L., Dietrich, R.A. Richberg, M.H. (1996). Death don't have no mercy: cell death programs in plant–microbe interactions. *Plant Cell*, 8: 1793–1807.

Dangl, J.L., Jones, J.D.G. (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*, 411: 826–833.

Dangl, J.L., Jones, J.D.G. (2006). Review Article: Plant pathogens integrated defence responses to infection. *Nature*, 411: 826-833.

de Faria, S.M., Lewis, G.P., Sprent, J.I., Sutherl, J.M. (1989). Occurrence of nodulation in the leguminosae. *New Phytologist*, 111: 607–619.

Deak, M., G.B. Kiss, C. Koncz, D. Dudits (1986). Transformation of *Medicago* by *Agrobacterium* mediated transfer. *Plant Cell Reports*, 5:97-100.



Dekkers, L. C., Mulders, I. H. M., Phoelich, C. C., Chin-A-Woeng, T. F. C., Wijfjes, A. H. M., Lugtenberg B. J. J. (2000). The sss colonization gene of the tomato–*Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* WCS365 can improve colonization of other wild-type *Pseudomonas* spp. bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13:1177-1183.

Delaney, T.P., Uknes, S., Vernooij, B., Friedrich, L., Weymann, K., Negrotto, D., Gaffney, T., Gutrella, M., Kessmann, H., Ward, E., Ryals, J. (1994). A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science* 266: 1247-1250.

Dempsey, D.M.A., Shah, J., Klessig, D.F. (1999). Salicylic acid and disease resistance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 18: 547-575.

d'Erfurth, I., Cosson, V., Eschstruth, A., Lucas, H., Kondorosi, A., Ratet, P. (2003) Efficient transposition of the Tnt1 tobacco retrotransposon in the model legume *Medicago truncatula*. *Plant Journal*, 34: 95-106.

D'Souza, N.K. (2009). Pathosystem development, characterization and genetic dissection of the soil pathogen *Phytophthora medicaginis* and the model legume *Medicago truncatula*: a view to application of disease resistance in susceptible legume species. PhD dissertation, Murdoch University, Perth, Australia, 330.

De Sousa A., S., Duque, A.S.R.L.A., Santos, D.M.M.F.d., Feveireiro, M.P.S. (2004). An efficient transformation method to regenerate a high number of transgenic plants using a new embryogenic line of *Medicago truncatula* cv. Jemalong. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 78: 123-131.

de Wit, P. J. G. M. (2007). Visions & Reflections (Minireview): How plants recognize pathogens defend themselves. *Cellular Molecular Life Sciences*, 64:2726-32.

Di Pietro, A., Garcia-Maceira, F.I., Meglecz, E., Roncero, M.I.G. (2001). A MAP kinase of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* is essential for root penetration pathogenesis. *Molecular Microbiology*, 39: 1140–1152.

Di Pietro, A., Madrid, M.P., Caracuel, Z., Delgado-Jarana, J., Roncero, M.I.G. (2003). *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus *Molecular Plant Pathology*, 4: 315-325.

Diener, A.C., Ausubel, F.M. (2005). Resistance to *Fusarium oxysporum* a dominant Arabidopsis disease-resistance gene, is not race-specific. *Genetics* 171: 305-321.

Dixon, R.A., Achnine, L., Kota, P., Liu, C., Reddy, M.S.S., Wang, L. (2002). The phenylpropanoid pathway plant defence – a genomics perspective. *Molecular Plant Pathology*, 3: 371-390.

Djéballi, N., Jauneau, A., Ameline-Torregrosa, C., Chardon, Jaulneau, V., Mathé, C., Bottin, A., Cazaux, M., Pilet-Nayel, M.L., Baranger, A., Aouani, E., Esquerré-Tugayé, M.T., Dumas, B., Huguet, T., Jacquet, C. (2009). Partial resistance of *Medicago truncatula* to *Aphanomyces euteiches* is associated with protection of the root stele is controlled by a major QTL rich in proteasome-related genes. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 22: 1043-1055.



Ecker, J.R. (1995). The ethylene signal transduction pathway in plants. *Science*, 268: 667–675.

Ebel, J., Cosio, E.G. (1994). Elicitors of plant defense responses. *International Review of Cytology*: 148, 1-36.

Ellwood, S.R., Parker, K., Oliver, R.P. (2001). Disease resistance diversity to fungal necrotrophs in *Medicago truncatula*. In: 4th workshop on *Medicago truncatula*.

Ellwood S, Kamphuis L, D'Souza N, Nair RM, Oliver RP. (2004). Resistance to fungal necrotrophs in *Medicago truncatula*. In: Proceedings of the 5th European Grain Legumes Conference, 343.

Ellwood, S., Lichtenzveig, J., Pfaff, T., Kamphuis, L., D'Souza, N., Williams, A., Oliver, R.P. (2005a). Resistance to fungal necrotrophs in *Medicago truncatula*. In: Proceedings of the 2nd International Medicago workshop, 24.

Ellwood, S., Lichtenzveig, J., Pfaff, T., Kamphuis, L., D'Souza, N., Williams, A., Oliver, R.P. (2005b). Resistance to fungal necrotrophs in *Medicago truncatula*. In: Model Legume Congress 2005, 100.

Ellwood, S.R., Kamphuis, L.G., Oliver, R.P. (2006). Identification of sources of resistance to *Phoma medicaginis* isolates in *Medicago truncatula* SARDI core collection accessions, and multigene differentiation of isolates. *Phytopathology*, 96: 1330-1336.

Endre, G., Kereszt, A., Kevel, Z., Mihacea, S., Kalo, P., Kiss, G. (2002). A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature*, 417: 962-966.

Fahraeus, G. (1957). The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass technique. *Journal of General Microbiology*, 16: 374-381.

Farmer, E.E., Ryan, C.A. (1992). Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase-inhibitors. *Plant Cell*, 4: 129–134.

Farmer, E.E., Weber, H., Vollenweider, S., (1998). Fatty acid signaling in Arabidopsis. *Planta*, 206: 167–174.

Felix, G., Duran, J.D., Volko, S., Boller, T. (1999). Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant Journal*, 18: 265–276.

Ferrari, S., Plotnikova, J. M., De Lorenzo, G., Ausubel, F. M. (2003). Arabidopsis local resistance to *Botrytis cinerea* involves salicylic acid and camalexin and requires EDS4 and PAD2, but not SID2, EDS5 or PAD4. *Plant Journal*, 35: 193-205.

Feys, B.J., Moisan, L.J., Newman, M.A., Parker, J.E. (2001). Direct interaction between the Arabidopsis disease resistance signaling proteins, EDS1 and PAD4. *The Embo Journal*, 20: 5400-5411.

Ficcadenti, N., Sestili, S., Annibali, S., Campanelli, G., Belisario, A., Maccaroni, M., Corazza, L. (2002). Resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* Race 1,2 in Muskmelon Lines. *Plant Disease*, 86:897-900.

Flor, H. H. (1971). Current status for the gene-for-gene concept. *Annual Reviews of Phytopathology*. 9:275-296.



Fravel, D., Olivain, C., Alabouvette, C. (2003). *Fusarium oxysporum* its biocontrol. *New Phytologist*, 157: 493–502.

Fravel, D.R. (2005). Commercialization and implementation of biocontrol. *Annual Review of Phytopathology*, 43: 337-359.

Fritig, B., T. Heitz, M. Legr, (1998). Antimicrobial proteins in induced plant defense. *Current Opinion in Immunology*, 10: 16–22.

Frugoli, J., Harris, J. (2001). *Medicago truncatula* on the move, *Plant Cell*, 13: 458-463.

Fuchs, J. G., Moenne-Loccoz, Y., Defago, G. (1997). Nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strain Fo47 induces resistance to *Fusarium* wilt in tomato. *Plant Disease*, 81:492–496.

Gaffney, T., Friedrich, L., Vernooij, B., Negrotto, D., Nye, G., Uknes, S., Ward, E., Kessmann, H., Ryals, J. (1993). Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science* 261: 754-756.

Gao, H., Beckman, C.H., Mueller, W.C. (1995). The rate of vascular colonisation as a measure of the genotypic interaction between various cultivars of tomato various *formae* or races of *Fusarium oxysporum*. *Physiological Molecular Plant Pathology*, 46:29-43.

Geffroy, V., Sevignac, M., DeOliveira, J.C.F., Fouilloux, G., Skroch, P., Thoquet, P., Gepts, P., Langin, T., Dron, M. (2000). Inheritance of partial resistance against *Colletotrichum lindemuthianum* in *Phaseolus vulgaris* and co-localization of quantitative trait loci with genes involved in specific resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13: 287–296.

Genre, A. Chabaud, M., Timmers, T., Bonfante, P., Barker, D.G. (2005). Arbuscular mycorrhizal fungi elicit a novel intracellular apparatus in *Medicago truncatula* root epidermal cells before infection. *Plant Cell*, 17: 3489-99.

Gianinazzi-Pearson, V. (1996). Plant cell responses to arbuscular mycorrhiza fungi: Getting to the roots of the symbiosis. *Plant Cell*, 8: 1871-83

Glazebrook, J. (2001). Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis*. *Current Opinion in Plant Biology*, 4:301–308.

Glazebrook, J., Chen, W., Estes, B., Chang, H.S., Nawrath, C., Métraux, J.P., Zhu, T., Katagiri, F. (2003). Topology of the network integrating salicylate and jasmonate signal transduction derived from global expression phenotyping. *Plant Journal*, 34:217–228.

Glazebrook, J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 43:205–227.

Göhre, V., Robatzek, S. (2008). Breaking the barriers: Microbial effector molecules subvert plant immunity. *Annual Review of Phytopathology*, 46:189-215.

Gómez-Gómez, L., Felix, G., Boller, T. (1999). A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 18: 277–284.

Gorlach, J., Volrath, S., Knauf-Beiter, G., Hengy, G., Beckhove, U., Kogel, K.-H., Oostendorp, M., Staub, T., Ward, E., Kessmann, H., Ryals, J. (1996). Benzothiadiazole, a novel



class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *Plant Cell*, 8: 629-643.

Graham, J.H., Froshiser, F.I., Stuteville, D.L., Erwin, D.C. (1979). A compendium of alfalfa diseases. St. Paul, MN: American Phytopathological Society.

Greenberg, J.T. (1997). Programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48:525–545.

Gueldener, U., Mannhaupt, G., Muensterkoetter, M., Haase, D., Oesterheld, M., Stuempflen, V., Mewes, H.W., Adam, G. (2006). FGDB: a comprehensive fungal genome resource on the plant pathogen *Fusarium graminearum*. *Nucleic Acids Res.*, 34, Database issue.

Gupta, V., Willits, M.G., Glazebrook, J. (2000). *Arabidopsis thaliana* EDS4 contributes to salicylic acid (SA)-dependent expression of defense responses: evidence for inhibition of jasmonic acid signaling by SA. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 13: 503–511

Haglund, W.A., Kraft, J.M. (2001). Fusarium wilt. In " Compendium of Pea Diseases Pests", (Eds. Kraft, J.M., Pflieger, F.L.) American Phytopathological Society Press, St. Paul, USA,13.

Haglund, W.A. (2001). Fusarium Wilt. In : Compendium of pea diseases pests. (Eds. Kraft J.M. Pflieger F.L.), APS Press USA, 14-16.

Halila, I., Cobos, M.J., Rubio, J., Millán, T., Kharrat, M., Marrakchi, M., J. Gil (2008). Tagging mapping a second resistance gene for *Fusarium* wilt race 0 in chickpea. *European Journal of Plant Pathology*, 124:87-92.

Halim, V., Eschen-Lippold, L., Altmann, S., Birschwilks, M., Scheel, D., Rosahl, S. (2007). Salicylic acid is important for basal defense of *Solanum tuberosum* against *Phytophthora infestans*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20: 1346-1352.

Hammond-Kosack, K.E., Jones, J.D.G. (1997). Plant disease resistance genes. *Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology*, 48: 575–607.

Harrison, M.J., Dixon, R.A. (1994). Spatial patterns of expression of flavonoid/isoflavonoid pathway genes during interactions between roots of *Medicago truncatula* and the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Plant Journal*, 6: 9-20.

Harrison, M.J. (2000). Molecular Genetics of Model Legumes. *Trends in Plant Science*, 10: 414-415.

Harrison, M.J., Dewbre, G.R., Liu, J. (2002). A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. *The Plant Cell*, 14, 2413--2429.

Hawkins, L. K., Dane, F., Kubisiak, T. L., Rhodes, B. B., Jarret, R. L. (2001). Linkage mapping in a watermelon population segregating for Fusarium wilt resistance. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 126:344-350.

Hayat S., Ali, B., Ahmad, A. (2007). Salicylic acid: biosynthesis, metabolism physiological role in plants. Hayat A. Ahmad (eds.), *Salicylic Acid – A Plant Hormone*, 1–14.



Hayward, A. C. (1991). Biology epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology* 29:65-87.

Heath, M. C. (2000). Non-host resistance nonspecific plant defenses. *Current Opinion of Plant Biology*, 3 :315-319.

Herrera Medina, M.J., Gagnon, H., Piché, Y., Ocampo, J.A., García Garrido, J.M. y Vierheilig, H. (2003). Root colonization by arbuscular mycorrhizal fungi is affected by the salicylic acid content of the plant. *Plant Science*, 164: 993-998.

Hoffmann, B., Trinh, T.H., Leung, J., Kondorosi, A., Kondorosi, E. (1997). A new *Medicago truncatula* line with superior in vitro regeneration, transformation, symbiotic properties isolated through cell culture selection. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 10:307–315.

Huang, C.C., Lindhout, P. (1997). Screening for resistance in wild *Lycopersicon* species to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 1 and race 2. *Euphytica*, 93: 145–153.

Huang, H. C., Acharya S. N., Erickson, R. S. (2000). Etiology of alfalfa blossom blight caused by *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. *Plant Pathology*, 9:11-16.

Hwang, S.F. (1992). Screening of alfalfa cultivars for resistance to *Fusarium* wilt in northeastern Alberta. *Canadian Plant Disease Survey*, 72:1.

Hulbert, S.H., Webb, C.A., Smith, S.M., Q., S. (2001). Resistance gene complexes: evolution utilization. *Annual Review of Phytopathology*, 39 : 285-312.

Iantcheva A., Vlahova M., Atanassov A. (2005). Genetic Transformation of *Medicago truncatula* using system for direct somatic embryogenesis promoted by TDZ. *Biotechnol. & Biotechnol.*, 50-56.

Imin, N., Nizamidin, M., Daniher, M., Nolan K.E., Rose R.J., Rolfe B.G. (2005). Proteomic Analysis of Somatic Embryogenesis in *Medicago truncatula*. Explant Cultures Grown under 6-Benzylaminopurine 1-Naphthaleneacetic Acid Treatments. *Plant Physiology*, 137:1250–1260.

Isayenkov S, Mrosk C, Stenzel I, Strack D, Hause B. (2005). Suppression of allene oxide cyclase in hairy roots of *Medicago truncatula* reduces jasmonate levels and the degree of mycorrhization with *Glomus intraradices*. *Plant Physiology*, 139:1401–1410.

Jarvis, W. R., Shoemaker, R. A. (1978). Taxonomic status of *Fusarium oxysporum* causing foot root rot of tomato. *Phytopathology*, 68, 1679-1680.

Javot, H, Penmetsa, R.V., Terzaghi, N., Cook, D.R., Harrison, M.J. (2007). A *Medicago truncatula* transporter indispensable for the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 104, 1720-1725.

Jimenez-Diaz, R.M. (1986). Lack of systemic colonization of alfalfa plants after inoculation of uninjured leaves with conidia of *Verticillium albo-atrum* *Plant Disease*, 70: 509-515.

Jones, J.D.G., Dangl, J.L. (2006). Reviews: The plant immune system. *Nature*, 444 : 323-329.



Kamoun, S. (2001). Nonhost resistance to Phytophthora: novel prospects for a classical problem. *Current Opinion in Plant Biology*, 4, 295-300.

Katan, T., Shlevin, E., Katan, J. (1997). Sporulation of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* on stem surfaces of tomato plants aerial dissemination of inoculum. *Phytopathology*, 87: 712–719.

Kawano, T., Sahashi, N., Takahashi, K., Uozumi, N., Muto, S. (1998). Salicylic acid induces extracellular generation of superoxide followed by an increase in cytosolic calcium ion in tobacco suspension culture: The earliest events in salicylic acid signal transduction. *Plant Cell Physiology*, 39: 721-730.

Kawano, T., Tanaka, S., Kadono, T., Muto, S. (2004). Salicylic acid glucoside acts as a slow inducer of oxidative burst in tobacco suspension culture. *Z. Naturforsch*, 59: 684-692.

Keen, N.T. (1990). Gene-for-gene complimentary in plant-pathogen interactions. *Annual Review of Genetics*, 24: 447-463.

Kemen, E., Hahn, M., Mendgen, K., Struck, C. (2005). Different resistance mechanisms of *Medicago truncatula* ecotypes against the rust fungus *Uromyces striatus*. *Phytopathology*, 95:153-157.

Klingler, J., Creasy, R., Gao, L., Nair, R.M., Calix, A.S., Jacob, H.S., Edwards, O.R., Singh, K.B.(2005). Aphid resistance in *Medicago truncatula* involves antixenosis and phloem-specific, inducible antibiosis and maps to a single locus flanked by NBS-LRR resistance gene analogs. *Plant Physiology*, 137:1445-1455.

Klein, K. K., Correll, J. C. (2001). Vegetative compatibility group diversity in *Fusarium*. In: *Fusarium: Paul E. Nelson Memorial Symposium*. (Eds. Summerell, B.A, Leslie, J.F., Backhouse, D., Bryden, W.L., Burgess, L. W.), APS Press. St. Paul, MN.

Knoester, M., Pieterse, C.M.J., Bol, J.F., van Loon, L.C. (1999). Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by rhizobacteria requires ethylene-dependent signaling at the site of application. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12:720–727.

Koiwa, H., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M. (1997). Regulation of protease inhibitors in plant defense. *Trends in Plant Science*, 2: 379-384.

Koornneef, A., Pieterse, C.M.J. (2008). Cross-talk in defense signaling. *Plant Physiology*, 146: 839–844.

Kraft, J.M. (1994). *Fusarium* wilt of peas (a review). *Agronomie*, 14, 561-567.

Kunkel, B.N., Brooks D.M. (2002).Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Current Opinion in Plant Biology*, 5: 325–331.

Lagopodi, A.L., Ram, A.F.J., Lamers, G.E.M., Punt, P.J., Van den Hondel, C.A.M.J.J., Lugtenberg, B.J.J., Bloemberg, G.V. (2002). Novel Aspects of Tomato Root Colonization Infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* Revealed by Confocal Laser Scanning Microscopic Analysis Using the Green Fluorescent Protein as a Marker. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15: 172-179.



Lamb, C.J., Lawton, M.A., Dron, M., Dixon, R.A. (1989). Signals transduction mechanisms for activation of plant defenses against microbial attack. *Cell*, 56: 215–224.

Leitner, M., Kaiser, R., Rasmussen, M.O., Driguez, H., Boland, W., Mithöfer, A. (2008). Microbial oligosaccharides differentially induce volatiles and signaling components in *Medicago truncatula*. *Phytochemistry*, 69: 2029-2040.

Lepoivre P., (2003). Phytopathologie: bases moléculaires de biologiques des pathosystemes et fondement des strategies de lutte. De Boeck & Presses Agronomiques de Gembloux (Eds.), Brussels, Belgium, 149-167.

Le Signor, C., Savoie, V., Aubert G., Verdier, J., Nicolas, M., Pagny, G., Moussy, F., Sanchez, M., Baker, D., Clarke, J., Thompson, R. (2009). Optimizing TILLING populations for reverse genetics in *Medicago truncatula*. *Plant Biotechnology Journal*, 7: 430-441.

Legendre, L., Heinstejn, F., Low, P. (1992). Evidence for participation of GTP-binding proteins in elicitation of rapid oxidative burst in cultured soybean cells. *Journal of Biological Chemistry*, 267 :20140-20147.

Lévy J., Bres J., Geurts R., Chalhoub B., Kulikova O., Duc G., Journet E.P., Ané J.M., Lauber E., Bisseling T., Dénarié J., Rosenberg C., Debelle F., (2004). A Putative Ca<sup>2+</sup> and calmodulin-dependent protein kinase required for bacterial and fungal symbioses. *Science* 303: 1361-1364.

Li, L., Li, C., Howe, G.A. (2001). Genetic analysis of wound signaling in tomato. Evidence for a dual role of jasmonic acid in defense female fertility. *Plant Physiology*, 127:1414-1417.

Livak, K.J., Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔCT</sup> method. *Methods*, 25: 402–408.

Loake, G., Grant, M. (2007). Salicylic acid in plant defence—the players and protagonists. *Current Opinion in Plant Biology*, 10: 466–472.

Luderer, R., De Kock, M.J.D., Dees, R.H.L., De Wit, P.J.G.M., Joosten, M.H.A.J. (2002). Functional analysis of cysteine residues of ECP elicitor proteins of the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum*. *Molecular Plant Pathology*, 3: 91 – 95.

Mabood, F., Smith, D. (2007). The role of salicylates in *Rhizobium*-legume symbiosis and abiotic stresses in higher plants. In *Salicylic Acid – A Plant Hormone* (Eds. Hayat, S. and Ahmad, A.), Springer, 151–162.

MacHardy, W.E. Beckman, C.H. (1981). Vascular wilt Fusaria: infection pathogenesis. In *Fusarium: Diseases, Biology Taxonomy* (Eds. P.E. Nelson, T.A. Toussoun R.J. Cook), The Pennsylvania State University Press, University Park, 365-390.

Malamy, J., Carr, J.P., Klessig, D.F., Raskin, I. (1990). Salicylic acid a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science* 250: 1002-1004.

Mandal, S., Mallick, N., Mitra, A. (2009). Salicylic acid-induced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in tomato. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47:642-9.



Mansfield, J.W. (1983). Antimicrobial compounds. In *Biochemical Plant Pathology*, J.A. Callow, (Eds. Chichester, UK: John Wiley Sons), 237-265.

Martin, G. B. (1999). Functional analysis of plant disease genes their downstream effectors. *Current Opinion in Plant Biology*, 2: 273–279.

Martin, G.B., Bogdanove, A.J., Sessa, G. (2003). Understanding the functions of plant disease resistance proteins. *Annual Review of Plant Biology*, 54 : 23-61.

Martínez-Abarca, F., Herrera-Cervera, J.A., Bueno, P., Sanjuan, J., Bisseling, T., Olivares, J. (1998). Involvement of salicylic acid in the establishment of the *Rhizobium meliloti*-alfalfa symbiosis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11: 153–155.

Mathesius, U. (2003). Conservation and divergence of signalling pathways between roots and soil microbes: the *Rhizobium*-legume symbiosis compared to the development of lateral roots, mycorrhizal interactions and nematode-induced galls. *Plant Soil*, 255: 105–119.

Mattoo, A.K., Suttle, J.C., eds. (1991). The plant hormone ethylene. Boca Raton, FA: CRC Press, Inc.

Mauch-Mani, B., Métraux J.P. (1998). Salicylic Acid Systemic Acquired Resistance to Pathogen Attack. *Annals of Botany*, 82: 535-540.

McDowell, J. M., J. L. Dangl, (2000). Signal transduction in the plant immune response. *Trends in Biochemical Science*, 25: 79–82.

McDowell, J. M. Simon, S. (2008). Molecular Diversity at the Plant-Pathogen Interface. *Developmental Comparative Immunology* 32: 736-44.

Mes, J.J., van Doorn, A.A., Wijbrandi, J., Simons, G., Cornelissen, B.J.C., and Haring, M.A. (2000). Expression of the *Fusarium* resistance gene I-2 colocalizes with the site of fungal containment. *Plant Journal*, 23: 183–193.

Métraux, J.P., Signer, H., Ryals, J., Ward, E., Wyss-Benz, M., Gaudin, J., Raschdorf, K., Schmid, E., Blum, W., Inverardi, B. (1990). Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science*, 250: 1004-1006.

Michielse, C.B., Rep, M. (2009). Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant Pathology*, 10 (3): 311-324.

Mikolajczyk, M., Awotunde, O. S., Muszynska, G. *et al.*,(2000). Osmotic stress induces rapid activation of a salicylic acid-induced protein kinase a homolog of protein kinase ASK1 in tobacco cell. *Plant Cell*, 12:165–178.

Morandi, D., Prado, E., Sagan, M., Duc, G. (2005). Characterisation of new symbiotic *Medicago truncatula* (Gaertn.) mutants, and phenotypic or genotypic complementary information on previously described mutants. *Mycorrhiza* 15: 283-9

Morris, S. W., Vernooij, B., Titatarn, S., Starrett, M., Thomas, S., Wiltse, C. C., Frederiksen, R. A., Bhandhufalck, A., Hulbert, S., and Uknes, S. (1998). Induced resistance responses in maize. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 7:643-658.



Morse, A.M., Tschaplinski, T.J., Dervinis, C., Pijut, P.M., Schmelz, E.A., Day, W., Davis, J.M. (2007). Salicylate and catechol levels are maintained in nahG transgenic poplar. *Phytochemistry*, 68: 2043–2052.

Eric A. Schmelz d, Wendy Day a, John M. Davis Mylona, P., Pawlowski, K., Bisseling, T. (1995). Symbiotic nitrogen fixation. *Plant Cell*, 7 : 869–885.

Nelson, P. E. (1981). Life cycle and epidemiology of *Fusarium oxysporum*. In: Fungal Wilt Diseases of Plants, (Eds M. E. Mace, A. A. Bell and C. H. Beckman), Academic Press, New York, USA, 51-80.

Nelson, P.E., Toussoun T.A., Marasas, W.F.O. (1983). *Fusarium* species. An illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University Press, 193.

Neves L.O., Duque S.R.L., Almeida J.S., Fevereiro P.S. (1999). Repetitive somatic embryogenesis in *Medicago truncatula* ssp. Narbonensis and *M. truncatula* Gaertn cv. Jemalong. *Plant Cell Reports*, 18: 398-405.

Nolan, K.E., Rose R.J., Gorst, J.R. (1989). Regeneration of *Medicago truncatula* from tissue culture: increased somatic embryogenesis using explants from regenerated plants. *Plant Cell Reports*, 8:278–281.

Norman-Setterblad, C., Vidal, S., Palva, E.T. (2000). Interacting signal pathways control defense gene expression in Arabidopsis in response to cell wall-degrading enzymes from *Erwinia carotovora*. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 13:430-438.

Noselli, S., Perrimon, N. (2000). Signal transduction. Are there close encounters between signaling pathways?. *Science*, 290: 68–69.

Nürnbergger, T. (1999). Signal perception in plant pathogen defense. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 55:167–182.

Nürnbergger, T., Brunner, F., Kemmerling, B. Piater, L. (2004). Innate immunity in plants animals: striking similarities obvious differences. *Immunological Reviews*. 198, 249–266.

Nyamsuren, O., Colditz, F., Rosendahl, S., Tamasloukht M.B., Bekel, T., Meyer, F., Kuester, H., Franken, P., Krajinski, F. (2003). Transcriptional profiling of *Medicago truncatula* roots after infection with *Aphanomyces euteiches* (oomycota) identifies novel genes upregulated during this pathogenic interaction. *Physiological Molecular Plant Pathology*, 63, 17–26.

Oláh, B., Brière, C., Bécard, G., Dénarié, J., Gough, C. (2005). Nod factors and a diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi stimulate lateral root formation in *Medicago truncatula* via the DMI1/DMI2 signalling pathway. *Plant Journal*, 44: 195-207.

Olivain, C., Alabouvette, C. (1999). Process of tomato colonization by a pathogenic strain of *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici*. *New Phytologist*, 141, 497-510.

Olivain, C., Trouvelot, S., Binet, M.L., Cordier, C., Pugin, A., Alabouvette, C. (2003). Colonization of flax roots early physiological responses of flax cells inoculated with pathogenic nonpathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. *Applied Environmental Microbiology*, 69, 5453–5462.



Osbourn, A.E. (1996). Saponins and plant defence-A soap story. *Trends in Plant Science*, 1: 4-9.

Panina, Y. S., Gerasimova, N.G., Chalenko, G.I., Vasyukova, N.I., Ozeretskovskaya, O.L. (2004). Salicylic Acid and Phenylalanine Ammonia-Lyase in Potato Plants Infected with the Causal Agent of Late Blight. *Russian Journal of Plant Physiology*, 52: 511–515.

Paran, I., Zamir, D. (2003). Quantitative traits in plants: beyond the QTL. *Trends in Genetics*, 19: 303-306.

Parniske, M. (2004). Molecular genetics of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology*, 7: 414-421.

Parrott, W.A., Bouton, J.H. (1990). Aluminum tolerance in alfalfa as expressed in tissue culture. *Crop Science*, 30:387–389.

Pegg, G.F. (1981) . Biochemistry and physiology of pathogenesis . In Fungal Wilt Diseases of Plants (Eds. Mace, M.E., Bel, I A.A., Beckman, C.H.), New York : Academic Press, 193-253.

Peña-Cortés, H., Albrecht, T., Prat, S., Weiler, E.W., Willmitzer, L. (1993). Aspirin prevents wound-induced gene expression in tomato leaves by blocking jasmonic acid biosynthesis. *Planta*, 191: 123–128.

R.V. Penmetsa, R.V., Uribe, P., Anderson, J., Lichtenzweig, J., Gish, J.C., Nam, Y.W., Engstrom, E., Xu, K., Sckisel, G., Pereira, M., Baek, J.M., López-Meyer, M., Long, S.R., Harrison, M.J., Singh, K.B., Kiss, G.B., Cook, D.R. (2008). The *Medicago truncatula* ortholog of Arabidopsis EIN2, sickle, is a negative regulator of symbiotic and pathogenic microbial associations. *Plant Journal*, 55: 580–595.

Perry, J.A., Welham, T.J., Cheminant, S., Parniske, M., Wang, T. (2005). TILLING in Lotus. In Lotus japonicus Handbook. (Eds. Márquez, A.J., Stougaard, J., Udvardi, M.K., Parniske, M., Spaink, H.P., Saalbach, G., Webb, J., Chiurazzi, M.), Springer, Dordrecht, Netherlands, 197-210.

Pieterse, C.M.J., van Wees, S.C.M., Hoffl, E., van Pelt, J.A., van Loon, L.C. (1996). Systemic resistance in Arabidopsis induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation pathogenesis-related gene expression. *Plant Cell* 8:1225–1237.

Pieterse, C.M.J., van Wees, S.C.M., van Pelt, J.A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, H., Weisbeek, P.J., van Loon, L.C. (1998). A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in Arabidopsis. *Plant Cell*, 10:1571–1580.

Pieterse, C. M. J., Ton, J., van loon, L. C. (2001). Cross-talk between plant defenses signaling pathways: boost or burden. *Ag. Biotech.Net*, 3: 1- 8.

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

Pilet-Nayel, M.L., Prospéri, J.M., Hamon, C., Lesné, A., Lecointe, R., Le Goff, I., Hervé, M., Deniot, G., Delale, M., Huguet, T., Jacquet, C., Baranger, A. (2009). AER1, a major gene conferring resistance to *Aphanomyces euteiches* in *Medicago truncatula*. *Phytopathology*, 99, 203-208.



Pontier, D., Balague C., Roby D. (1998). "The hypersensitive response. A programmed cell death associated with plant resistance". *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie*, 321: 721–34.

Potlakayala, S.D., Reed, D.W., Covello, P.S., Fobert, P.R. (2007). Systemic Acquired Resistance in Canola Is Linked with Pathogenesis- Related Gene Expression and Requires Salicylic Acid. *Phytopathology*, 97:794-802.

Raskin, I., Skubatz, H., Tang, W., Meeuse, B. J. D., (1990). Salicylic acid levels in thermogenic nonthermogenic plants. *Annals of Botany*, 66: 376-383.

Raskin, I., (1992a). Role of salicylic acid in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 43: 439-463.

Raskin, I. Salicylate, a new plant hormone. (1992b). *Plant Physiology*, 99: 799-803.

Recorbet, G., steinberg,C., Olivain, C., Edel, V., Trouvelot, S., Dumas-Gaudot, E.,Gianinazzi, S., Alabouvette, C. (2003). Wanted: pathogenesis-related marker molecules for *Fusarium oxysporum*. *New Phytologist*, 159: 73-92.

Rep, M., van der Does, H.C., Meijer, M., van Wijk, R., Houterman, P.M., Dekker, H.L., de Koster, C.G., Cornelissen, B.J.C. (2004). A small, cysteine-rich protein secreted by *Fusarium oxysporum* during colonization of xylem vessels is required for I-3-mediated resistance in tomato. *Molecular Microbiology*, 53 :1373-1383.

Reymond, P., E. E. Farmer, (1998). Jasmonate salicylate as global signals for defense gene expression. *Current Opinion in Plant Biology*, 1: 404–411.

Roncero, M.I.G., Hera, C., Ruiz-Rubio, M., García Maceira, F.I., Madrid, M.P., Caracuel, Z., Calero, F., Delgado-Jarana, J., Roldán-Rodríguez, R., Martínez-Rocha, A.L., Velasco, C., Roa, J., Martín-Urdiroz, M., Córdoba, D., Di Pietro, A. (2003). *Fusarium* as a model for studying virulence in soilborne plant pathogens. *Physiological Molecular Plant Pathology*, 62: 87–98.

Rose, R. J., Nolan, K. E., Bicego, L. (1999). The development of the highly regenerable seed line Jemalong 2HA for transformation of *Medicago truncatula*: Implications for regenerability via somatic embryogenesis. *Journal of plant physiology*, 155 (6):788-791.

Rüffer, M., Steipe, B., Zenk, M.H.(1995). Evidence against specific binding of salicylic acid to plant catalase. *FEBS Letters*, 18;377(2):175–180.

Ryals, J.A., Neuenschwander, U.H., Willits, M.G., Molina, A., Steiner, H-Y, Hunt, M.D. (1996). Systemic acquired resistance. *Plant Cell*, 8: 1809-1819.

Sagan, M., Morandi, D., Tarengi, E., Duc, G. (1995). Selection of nodulation and mycorrhizal mutants in the model plant *Medicago truncatula* (Gaertn) after {gamma}-ray mutagenesis. *Plant Science*, 111:63-71.

Salter, R., Miller-Garvin, J.E., Viands, D.R. (1994). Breeding for Resistance to Alfalfa Root Rot Caused by *Fusarium* Species. *Crop Science*, 34:1213-1217.

Salvi, S., R. Tuberosa, (2005). To clone or not to clone plant QTLs: present and future challenges. *Trends in Plant Science*, 10: 297–304.



Salzer, P., Bonanomi, A., Beyer, K., Vögeli-Lange, R., Aeschbacher, R.A., Lange, J., Wiemken, A., Kim, D., Cook, D.R., Boller, T. (2000). Differential expression of eight chitinase genes in *Medicago truncatula* roots during mycorrhiza formation, nodulation, and pathogen infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13:763–777.

Sax, K. (1923). The association of size differences with seed coat pattern and pigmentation in *Phaseolus vulgaris*. *Genetics*, 8:552-560.

Schaller, F. (2001). Enzymes of the biosynthesis of octadecanoid-derived signalling molecules. *Journal of Experimental Botany*, 354: 11-23.

Shao C. Y., E. Russinova, A. Iantcheva, A. Atanassov, A. McCormac, D. F. Chen, M. C. Elliott, A. Slater (2000). Rapid transformation and regeneration of alfalfa (*Medicago falcata* L.) via direct somatic embryogenesis. *Plant Growth Regulation*, 31: 155–166.

Sharma, K.D., Chen, W., Muehlbauer, F.J. (2005). Genetics of chickpea resistance to five races of *Fusarium* wilt and a concise set of race differentials for *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Plant Disease*, 89:385-390.

Schippers, B., van Eck, W.H. (1981). Formation survival of chlamydospores in *Fusarium*. In *Fusarium* diseases, Biology Taxonomy (Eds. Nelson, P.E., Toussoun, T.A., Cook, R.J.), The Pennsylvania State University Press, University Park London.250-260.

Schenk, P.M., Kazan, Wilson, K.I., Anderson, J.P., Richmond, T., Somerville, S.C., Manners, J.M. (2000). Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences USA*, 97:11655–11660.

Schneider, K.A., Grafton, K.F., Kelly, J.D. (2001). QTL Analysis of Resistance to *Fusarium* Root Rot in Bean. *Crop Science*, 41: 535–542.

Schnabel, E., Journet, E.P, Carvalho-Niebel, F., Duc, G., Frugoli, J. (2005). The *Medicago truncatula* SUNN gene encodes a CLV1-like leucine-rich repeat receptor kinase that regulates nodule number and root length. *Plant Molecular Biology*, 58: 809-822.

Schultze M, Kondorosi A. (1998). Regulation of symbiotic root nodule development. *Annual Review of Genetics*, 32:33–57.

Seifert, K.A. (2001). *Fusarium* anamorphic generic concepts. In: *Fusarium*. (Eds. Summerell B.A., Leslie J.F., Backhouse D., Bryden W.L. , Burgess L.W), APS Press St. Paul, USA.

Shah, J., Kachroo, P., Klessig, D. (1999). The *Arabidopsis* ssi1 mutation restores PR gene expression in SA-Insensitive (npr1) plants and renders PDF1.2 (Defensin) gene expression SA dependent. *Plant Cell*, 11:191-206.

Shah J., Klessig D.F. (1999). Salicylic acid: signal perception and transduction. In: Hooykaas P.J.J., Hall M.A., Libbenga K.R., eds. Biochemistry and molecular biology of plant hormones. Amsterdam: Elsevier Science Publications, 513-541.

Shah, J. (2003). The salicylic acid loop in plant defense. *Current Opinion in Plant Biology*, 6: 365-371.



Shibuya, N., Minami, E. (2001). Oligosaccharide signalling for defence responses in plant. *Physiological Molecular Plant Pathology*, 59: 223-233.

Simons, G., Groenendijk, J., Wijbri, J., Reijans, M., Groenen, J., Diergaarde, P., Van der Lee, T., Bleeker, M., Onstenk, J., de Both, M., Haring, M., Mes, J., Cornelissen, B., Zabeau, M., Vos, P. (1998). Dissection of the *Fusarium* I2Gene Cluster in Tomato Reveals Six Homologs One Active Gene Copy. *Plant Cell*, 10: 1055-1068.

Simons, M., van der Bij, A. J., Brand, I., de Weger, L. A., Wijffelman, C. A. et Lugtenberg, B. J. J. (1996). Gnotobiotic system for studying rhizosphere colonization by plant-growth promoting *Pseudomonas* bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 7:600-607.

Smith, I.M., J. Dunez, D.H. Phillips, R.A. Lelliott, S.A. Archer, eds. (1988). European hbook of plant diseases. Blackwell Scientific Publications: Oxford, 583.

Snyder, W.C., Hansen H.N. (1940). The species concept in *Fusarium*. *American Journal of Botany*, 27:64-67.

Snyder, W.C., Smith, S.H. (1981). Current status, In Fungal wilt diseases of plants, (Eds. Mace, M.E., Bell, A.A., Beckman, C.H.), Academic Press, Inc. USA. 25-50.

Somssich, I., K. Hahlbrock, (1998). Pathogen defense in plants - a paradigm of biological complexity. *Trends Plant Science*: 3, 86–90.

Spaink, H.P. (2000). Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annual Review of Mycobiology*, 54:257-288.

Spoel, S.H., Koornneef, A., Claessens, S.M.C., Korzelius, J.P., van Pelt, J.A., Mueller, M.J., Buchala, A.J., Metraux, J., Brown, R., Kazan, K. *et al.* (2003). NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *Plant Cell*, 15: 760–770.

Spoel, S.H., Dong, X. (2008). Making sense of hormone crosstalk during plant immune responses. *Cell Host Microbe*, 3: 348–351.

Stacey, G., Libault, M., Brechenmacher, L., Wan, J., May, G.D. (2006). Genetics and functional genomics of legume nodulation. *Current Opinion in Plant Biology*, 9: 110–121.

Stewart S., Hodge S., Mansfield J., Prospero J.M., Huguet T., Ben C., Gentzbittel L., Powell G. (2009). The RAP1 gene confers extreme resistance to the pea aphid in *Medicago truncatula* without engaging the hypersensitive reaction. MPMI, accepted.

Sticher, L., Mauch-Mani, B., Métraux, J.P. (1997). Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 35:235–270.

Stover, R.H. (1970). Banana root diseases caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, *Pseudomonas solanacearum*, *Radopholus similis*: A comparative study of life cycles in relation to control. In Root diseases soil-borne pathogens, (Eds. Toussoun, T.A., Bega, R.B., Nelson, P.E.), University California Press, 197-200.



Stutz, J.C., Leath, K.T., Kendall, W.A. (1985). Wound-related modifications of penetration, development, root rot by *Fusarium roseum* in forage legumes. *Phytopathology*, 75, 920-924.

Stuteville, D. L., Erwin, D. C., eds. (1990). Compendium of Alfalfa Diseases, 2nd ed. American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN.

Thomma, B.P., Eggermont, K., Tierens, K.F., Broekaert, W.F. (1999). Requirement of functional ethylene-insensitive 2 gene for efficient resistance of Arabidopsis to infection by *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology*, 121:1093-1102.

Thrane, U. (2001) Developments in the taxonomy of *Fusarium* species based on secondary metabolites. In : *Fusarium*. (Eds. Summerell B.A., Leslie J.F., Backhouse D., Bryden W.L. , Burgess L.W.), APS Press St. Paul, USA.

Torregrosa, C., Cluzet, S., Fournier, J., Huguet, T., Gamas, P., Prospero, J.M., Esquerré-Tugayé, M.T. Dumas, B., Jacquet, C. (2004). Cytological, genetic molecular analysis to characterise compatible incompatible interactions between *Medicago truncatula* *Colletotrichum trifolii*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17: 909-920.

Trinh, T.H., Ratet, P., Kondorosi, E., Dur, P., Kamaté, K., Bauer, P., Kondorosi, A. (1998). Rapid efficient transformation of diploid *Medicago truncatula* *Medicago sativa* ssp. *falcata* lines improved in somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports*, 17: 345-355.

Truesdell, G.M., Dickman, M.B. (1997). Isolation of pathogen/stress-inducible cDNAs from alfalfa by mRNA differential display. *Plant Molecular Biology*, 33: 737-743.

Turner, J.G., Ellis, C., Devoto, A. (2002). The jasmonate signal pathway. *Plant Cell*, 14: S153-S164.

Udvardi, M.K. (2001) Legume models strut their stuff. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 14: 6-9.

Uknes, S., Mauch-Mani, B., Moyer, M., Potter, S., Williams, S., Dincher, S., Chler, D., Slusarenko, A., Ward, E., Ryals, J. (1992). Acquired resistance in Arabidopsis. *Plant Cell* 4:645-656.

Uppalapati, S. R., Marek, S.M., Hee-Kyung, L., Nakashima, J., Tang, Y., Sledge, M.K., Dixon, R.A. & Mysore, K.S. (2009). In the interaction of *Medicago truncatula* with *Phymatotrichopsis omnivora*, global gene expression profiling reveals a role for jasmonic acid, ethylene the flavonoid pathway. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 22 : 7-17.

Vailleau, F., Sartorel, E., Jardinaud, M.F., Chardon, F., Genin, S., Huguet, T., *et al.*, (2007). Characterization of the interaction between the bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum* the model legume plant *Medicago truncatula*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20:159-67.

Van den Ackerveken, G. F. J. M., van Kan, J. A. L., de Wit, P. J. G. M. (1992). Molecular analysis of the avirulence gene *avr9* of the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum* fully supports the gene-for-gene hypothesis. *Plant Journal*, 2: 359-366.



VanEtten, H.D., Mansfield, J.W., Bailey, J.A., Farmer, E.E. (1994). Letter to the editor. Two classes of plant antibiotics: Phytoalexins versus "phytoanticipins." *Plant Cell* 6, 1191-1192.

van Loon, L.C. (1997). Induced resistance in plants the role of pathogenesis-related proteins. *European Journal of Plant Pathology*, 103: 753-765.

van Loon, L. C., Rep, M., Pieterse, C. M. (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology*, 44:135-162.

van Spronsen, P. C., Tak, T., Rood, A. M. M., van Brussel, A. A. N., Kijne, J. W., Boot, K. J. M. (2003). Salicylic acid inhibits indeterminate-type nodulation but not determinant type nodulation. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16: 83-91.

van Wees, S.C.M., Glazebrook J. (2003). Loss of non-host resistance of Arabidopsis NahG to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* is due to degradation products of salicylic acid. *The Plant Journal*, 33: 733-742.

Vasyukova, N.I., Gerasimova, N.G., Ozeretskovskaya O.L. (1999). *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* 35: 557-563.

Vasyukova, N.I., Ozeretskovskaya, O.L. (2007). Induced Plant Resistance and Salicylic Acid: A Review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 43: 367-373.

Vernooij, B., Friedrich, L., Morse, A., Reist, R., Kolditz-Jawhar R, Ward, E., Uknes, S., Kessmann, H., Ryals, J. (1994). Salicylic acid is not the translocated signal responsible for inducing systemic acquired resistance but is required in signal transduction. *Plant Cell*, 6: 959-965.

Vierheilig H., Alt-Hug M., Streitwolf-Engel R., Mäder P., Wiemken A. (1998a). Studies on the attractational effect of root exudates on hyphal growth of an arbuscular mycorrhizal fungus in a soil compartment-membrane system. *Plant Soil*, 203: 137-144.

Vierheilig, H., B. Bago, C. Albrecht, M. J. Poulin and Y. Piché (1998b). Flavonoids and arbuscular mycorrhizal fungi. in Flavonoids in the living systems. J. Manthey and B. Buslig. New York, Plenum Publication Corp: 9-33.

Wang, J.H., Rose, R.J., Donaldson, B.I. (1996). Agrobacterium mediated transformation expression of foreign genes in *Medicago truncatula*. *Australian Journal of Plant Physiology*, 23:265-270.

Wang, K.L., Li, H., Ecker, J.R. (2002). Ethylene biosynthesis and signaling networks. *Plant Cell*, 14:131-151.

Ward, E.R., Uknes, S.J., Williams, S.C., Dincher, S.S., Wiederhold D.L., Alexer, D.C., Ahl-Goy, P., Métraux, J.P., Ryals, J.A. (1991). Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell* 3:1085-1094.

Weber, H., Vick, B.A., Farmer, E.E. (1997). Dinor-oxo-phytodienoic acid: A new hexadecanoid signal in the jasmonate family. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences USA*, 94: 10473-10478.



Weimer, J.L. (1928). A wilt disease of alfalfa caused by *Fusarium oxysporum* var . *medicaginis* , *Journal of Agricultural Research*, 7: 419-433.

Weerasinghe, R.R., Bird, D.M., Allen, N.S. (2005). Root-knot nematodes and bacterial Nod factors elicit common signal transduction events in *Lotus japonicus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 102, 3147-3152.

Wildermuth, M.C., Dewdney, J., Wu, G., Ausubel, F.M. (2001). Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature*, 414: 562-565.

Yang, S.F., Hoffman, N.E. (1984). Ethylene biosynthesis and its regulation in higher-plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* : 35, 155–189.

Yang, S., Gao, M., Xu, C., Gao, J., Deshpande, S., Lin, S., Roe, B.A., Zhu, H. (2008). Alfalfa benefits from *Medicago truncatula*: The RCT1 gene from *M. truncatula* confers broad-spectrum resistance to anthracnose in alfalfa. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 105: 12164-12169.

Yalpani, N., Silverman, P., Wilson, T.M.A., Kleier, D.A., Raskin, I. (1991). Salicylic acid is a systemic signal and an inducer of pathogenesis-related proteins in virus-infected tobacco. *Plant Cell*, 3: 809–818.

Yano, M., Sasaki, T. (1997). Genetic and molecular dissection of quantitative traits in rice. *Plant Molecular Biology*, 35: 145-153.

Zon, J., Amrhein, N. (1992). Inhibitors of phenylalanine ammonia-lyase: 2-aminoindan-2-phosphonic acid and related compounds. *Liebigs Annalen der Chemie* 6: 625-628.

Yoshikawa, M., Yamaoka, N., Takeuchi, Y. (1993) .Elicitors: Their significance and primary modes of action in the induction of plant defense reactions. *Plant Cell Physiology*, 34:1163-1173.

Young, N.D. (1996). QTL mapping and quantitative disease resistance in plants. *Annual Review of Phytopathology*, 34: 479-501.

Young, N.D., Mudge J, Ellis T.H.N. (2003). Legume genomes: more than peas in a pod. *Current Opinion in Plant Biology*, 6: 199-204.

Zhang, S., Du, H., Klessig, D.F. (1998). Activation of the tobacco SIP kinase by both a cell wall-derived carbohydrate elicitor purified proteinaceous elicitors from *Phytophthora* spp. *Plant Cell*, 3:435–450

Zhao, J., Davis, L.C., Verpoorte, R. (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 23: 283-333.

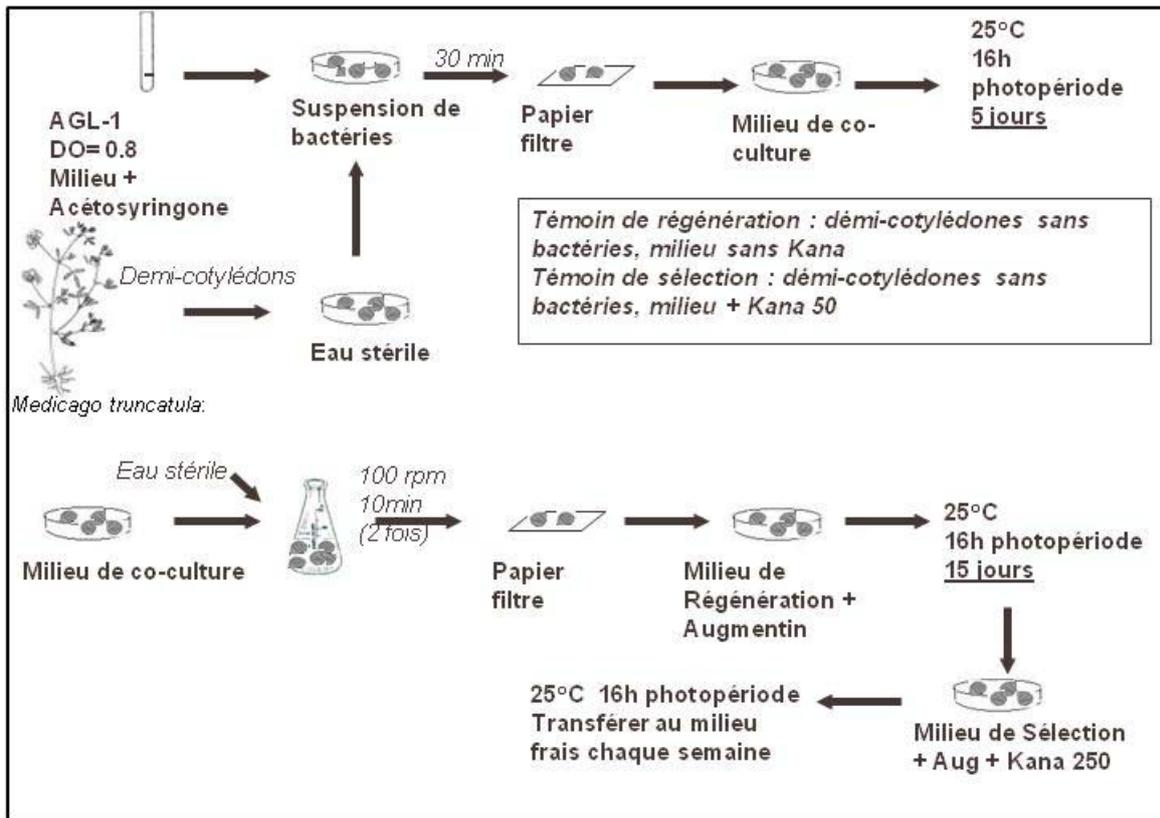
Zhou, X., Mahesh, B., Chrasekharan, H., Timothy, C.H. (2004). High rooting frequency functional analysis of GUS GFP expression in transgenic *Medicago truncatula* A17. *New Phytologist*, 162: 3 813-822.

Zipfel, C. (2009). Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Current Opinion in Immunology*, 20:10–16.

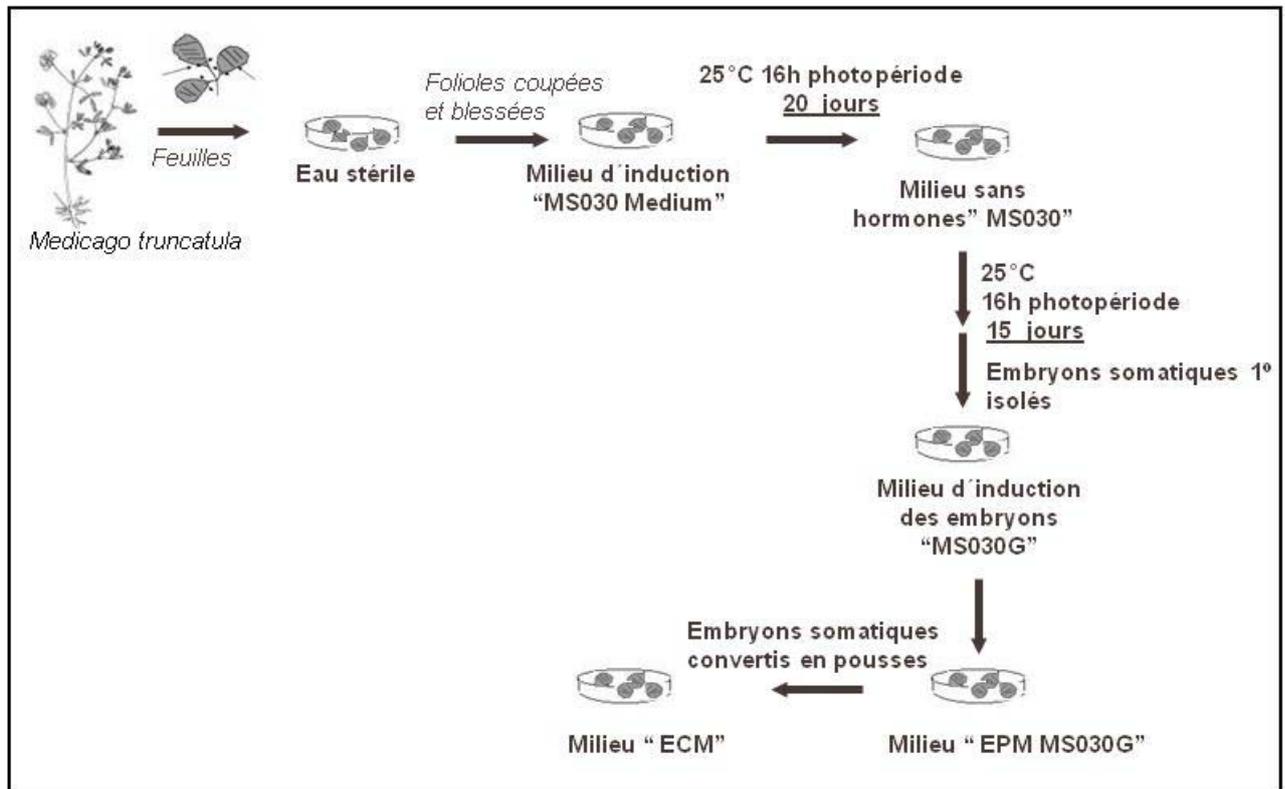


## 7. ANNEXES

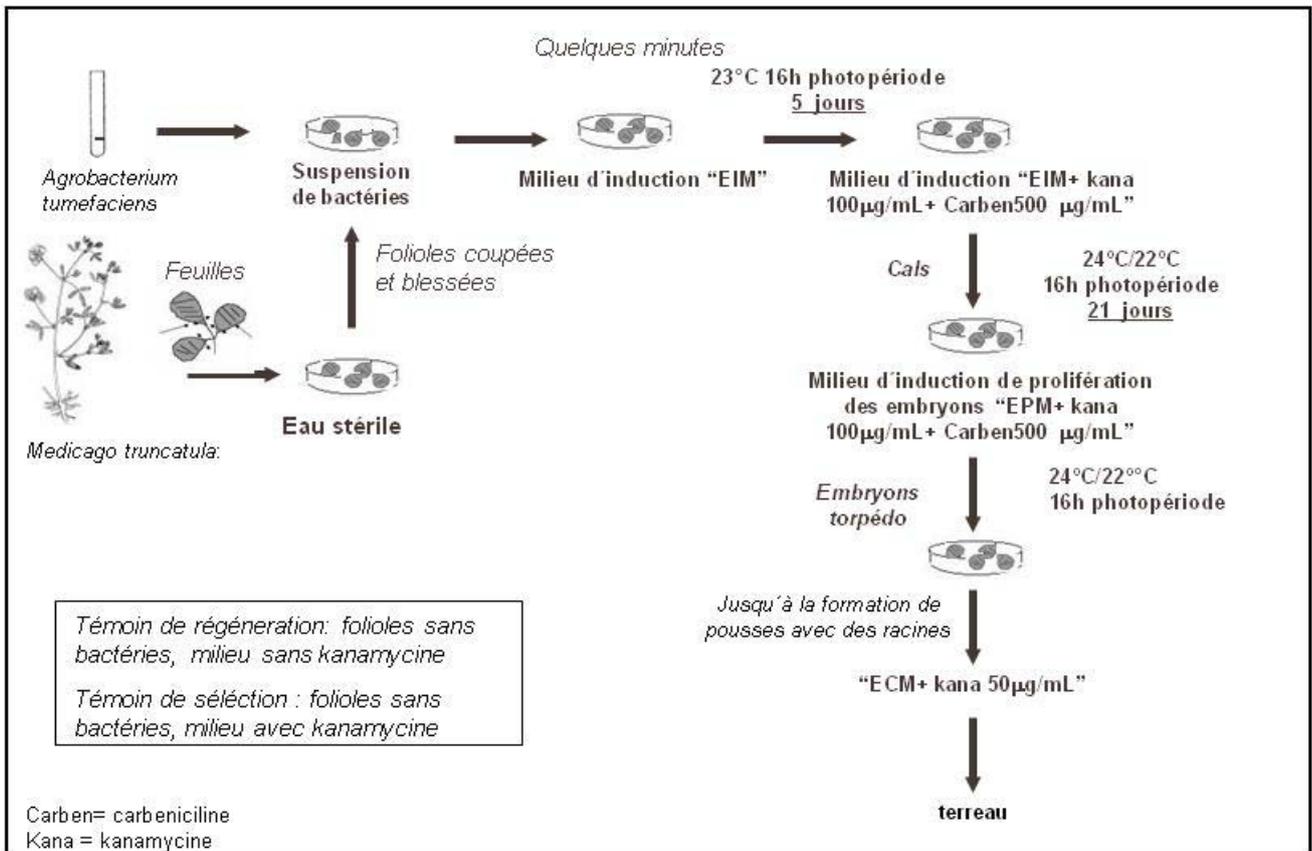




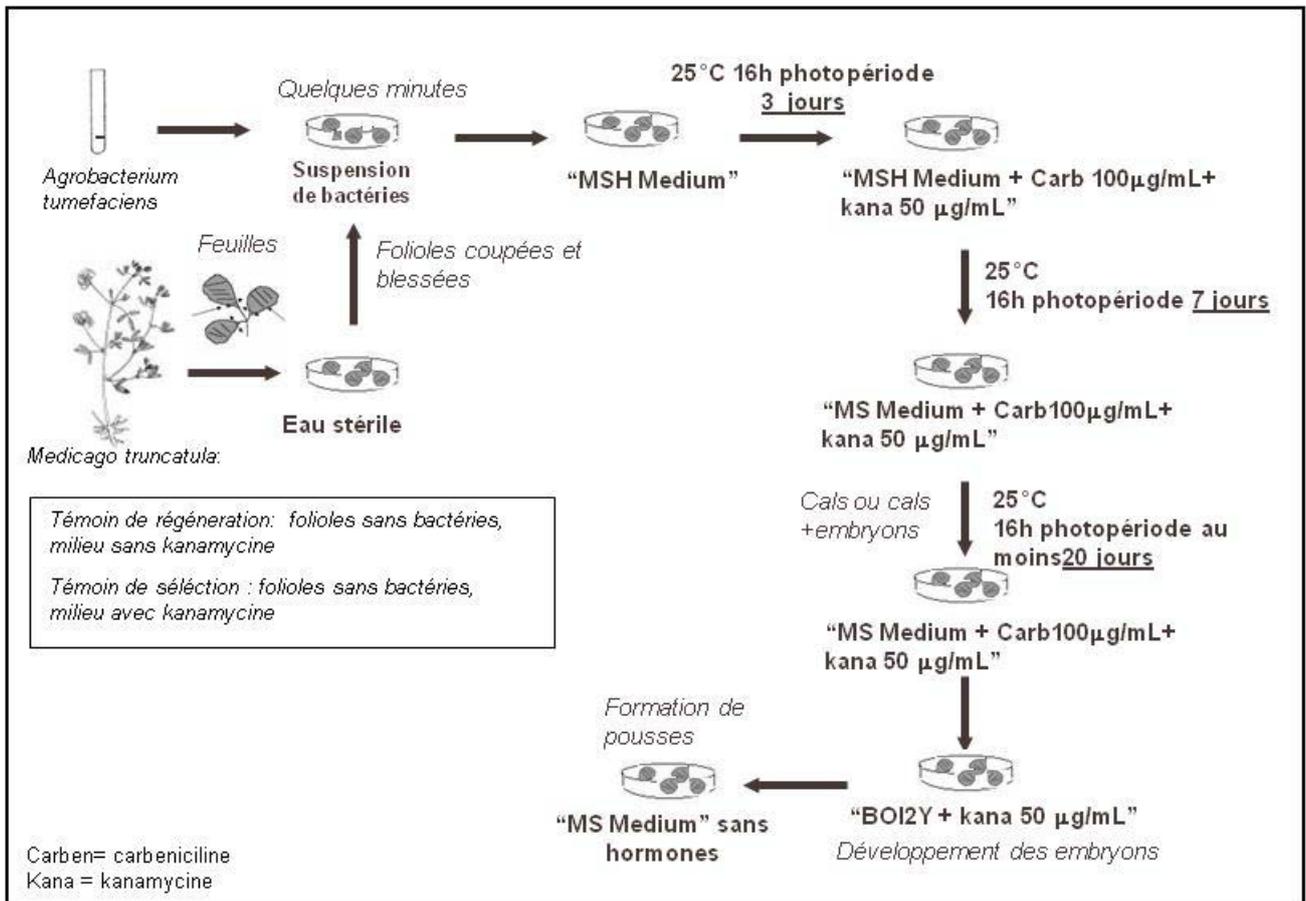
Annexe 1.- Schéma du protocole de transformation de demi-cotylédons de *M. truncatula* (d'après Zhou *et al.*, 2004).



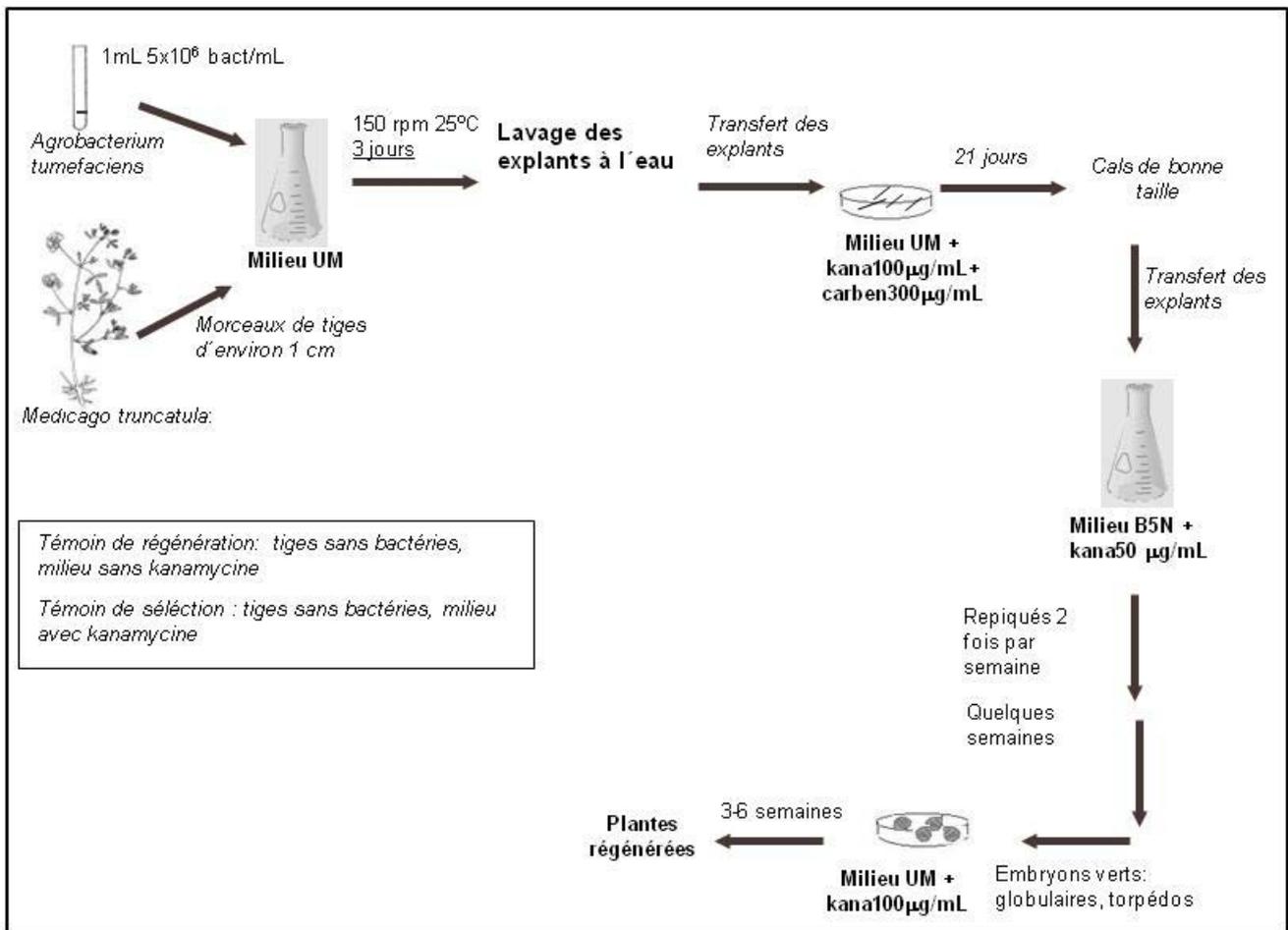
Annexe 2.- Schéma du protocole d'embryogenèse à partir de feuilles de *M. truncatula* (d'après Neves *et al.*, 1998).



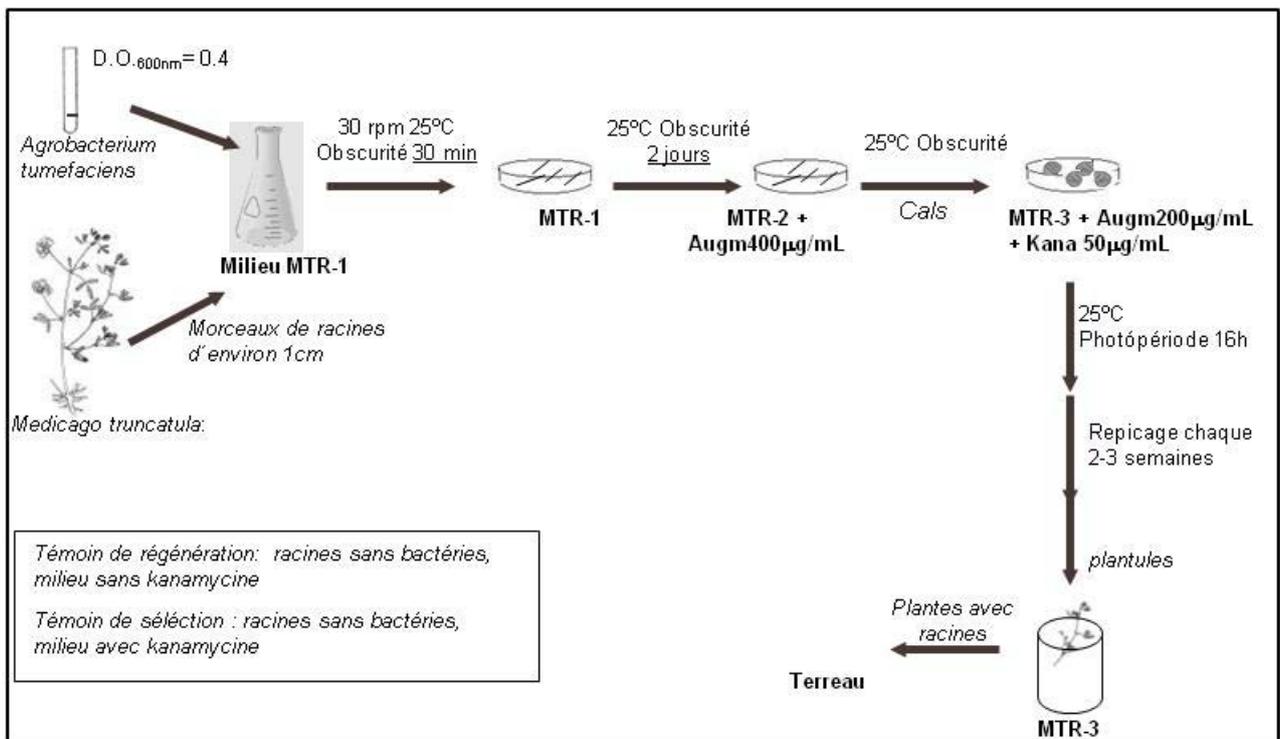
Annexe 3.- Schéma du protocole de transformation à partir de feuilles de *M. truncatula* (de Sousa *et al.*, 2004).



Annexe 4.- Schéma du protocole de transformation à partir de feuilles de *M. falcata* (d'après Shao *et al.*, 2000).



Annexe 5.- Schéma du protocole de transformation à partir de tiges de *M. truncatula* (d'après Deak et al., 1986).



Annexe 6.- Schéma du protocole de transformation à partir de racines de *M. truncatula* (d'après Crane *et al.*, 2006).

