



HAL
open science

Dialogue moléculaire dans l'établissement de la symbiose rhizobienne recherche de canaux ioniques participant aux signaux électriques et calciques dans le poil absorbant de *Medicago truncatula*

Julien Thouin

► **To cite this version:**

Julien Thouin. Dialogue moléculaire dans l'établissement de la symbiose rhizobienne recherche de canaux ioniques participant aux signaux électriques et calciques dans le poil absorbant de *Medicago truncatula*. Biochimie, Biologie Moléculaire. Montpellier SupAgro, 2018. Français. NNT : 2018NSAM0044 . tel-04729922

HAL Id: tel-04729922

<https://theses.hal.science/tel-04729922v1>

Submitted on 10 Oct 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 POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE MONTPELLIER SUPAGRO

En Biologie Intégrative, Diversité et Amélioration des Plantes

École doctorale GAIA – Biodiversité, Agriculture, Alimentation, Environnement, Terre, Eau
Portée par l'Université de Montpellier

Unité de recherche de Biochimie & Physiologie Moléculaires des Plantes (B&PMP)

Dialogue moléculaire dans l'établissement de la symbiose rhizobienne : recherche de canaux ioniques participant aux signaux électriques et calciques dans le poil absorbant de *Medicago truncatula*

Présentée par Julien THOUIN

Le 05 décembre 2018

Sous la direction de Hervé SENTENAC

Devant le jury composé de

M. Jean-Marie FRACHISSE, CR, CNRS, Gif-sur-Yvette

M. Christian MAZARS, DR, CNRS, Toulouse

Mme Valérie HOCHER, CR, IRD, Montpellier

M. Nicolas PAULY, MCF, Toulouse

M. Renaud BROUQUISSE, DR, INRA, Sophia Antipolis

M. Hervé SENTENAC, DR, INRA, Montpellier

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

Montpellier
SupAgro

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier infiniment tous les membres de l'équipe ELSA mais également TICER pour l'accueil reçu durant ces trois années de thèse.

Je remercie chaleureusement, Anne-Aliénor Véry pour la patience qu'elle m'a accordé pour me transmettre les procédures de manipulations de biologie moléculaire et d'électrophysiologie.

Un grand merci également à Hervé Sentenac qui m'a encadré, aidé, conseillé et accompagné avec beaucoup de bienveillance dans le travail que j'ai effectué tout au long de ma thèse.

Je remercie également Alain Gojon et l'ensemble du personnel de BPMP pour l'accueil que tous m'ont réservé.

Je souhaite également remercier Juliette, ma famille, mes amis... qui m'ont soutenu et aidé lors de ma thèse.

Abréviations :

ADN : acide désoxyribonucléique

BPMP : Biochimie & Physiologie Moléculaire des Plantes

bp : paire de base (base paire)

CDS : coding sequence

DO_x : densité optique pour la longueur d'onde x

Dpi : day post inoculation

E. coli : *Escherichia coli*

FNs : facteurs Nods

GFP : Green Fluorescent Protein

LB : Lysogeny Broth

PCR : Polymerase Chain Reaction

S. meliloti : *Sinorhizobium meliloti*

SOC : Super Optimal Broth

Str : Streptomycine

Tet : Tetracycline

TY : Yeast Extract-Tryptone

V : Volume

WT : Wild-Type

Sommaire :

Chapitre I : Introduction Bibliographique.....	1
I.1. La symbiose Légumineuse-Rhizobium	1
I.1.1. Intérêt écologique et agronomique.....	1
I.1.2. Le dialogue moléculaire entre les Rhizobia et les racines des légumineuses.....	2
I.1.3. Structure et production des Facteurs Nods, molécules clés de l'interaction Légumineuse-Rhizobium	3
I.2. Dialogue moléculaire prédominant à l'établissement de la symbiose rhizobienne : la signalisation précoce impliquant le poil absorbant	4
I.2.1. La perception des facteurs Nods	4
I.2.2. Les signalisations électrique et calcique induites par les facteurs Nods	5
I.3. Les canaux ioniques exprimés sur la membrane des poils absorbants de <i>Medicago truncatula</i>	7
I.3.1. Les canaux perméables à K ⁺	9
I.3.1.1. La famille Shaker	9
I.3.1.2. Les transporteurs de K ⁺ et/ou Na ⁺ de la famille HKT	13
I.3.2. Les canaux perméables à Ca ²⁺	16
I.3.2.1. La famille des GLR chez les plantes	16
I.3.2.2. La famille des CNGC	19
I.4. Les objectifs de mon travail de thèse	22
Chapitre II : Matériel et méthodes.....	24
II.1. Description du matériel biologique	24
II.1.1. Souches bactériennes et plasmides utilisés	24
II.1.2. Milieux et conditions de culture pour les bactéries	24
II.1.3. Matériel végétal	24
II.1.3.1. Germination des graines de <i>M. truncatula</i>	24
II.1.3.2. Culture <i>in vitro</i>	25
II.1.3.3. Culture sur sable et vermiculite	25
II.1.3.4. Culture sur terreau.....	26
II.1.3.5. Culture hydro-aéroponique	26
II.1.3.6. Inoculation des racines de <i>M. truncatula</i> par des rhizobia.....	26
II.1.3.7. Transformation des racines de <i>M. truncatula</i>	27
II.2. Analyses réalisées sur les plantes de <i>M. truncatula</i>	28
II.2.1. Identification et génotypage des lignées mutantes	28

II.2.2.	Mise en place des expériences de phénotypage de la nodulation.....	28
II.2.3.	Dosage par spectrométrie de la teneur des plantes en Na ⁺	29
II.2.4.	Observation du nombre de cordons d'infection	29
II.2.4.1.	Analyse histochimique de l'expression du gène rapporteur <i>LacZ</i>	29
II.2.4.2.	Observations microscopiques.....	29
II.2.5.	Observation de l'expression <i>in planta</i> de <i>MtSKOR</i>	30
II.2.5.1.	Analyse histochimique de l'expression du gène rapporteur <i>GUS</i>	30
II.2.5.2.	Observations microscopiques.....	30
II.3.	Techniques de biologie moléculaire	30
II.3.1.	Extraction d'ADN génomique	30
II.3.2.	Extraction d'ARN	30
II.3.3.	Rétro-transcription.....	31
II.3.4.	Analyse de l'expression de gènes par Q-RT-PCR	31
II.3.5.	Amplification des ADNc d'intérêt.....	32
II.3.6.	Ligation de l'ADNc avec un plasmide	32
II.3.7.	Transformation des bactéries électrocompétentes	32
II.3.8.	Criblage des bactéries transformées.....	33
II.3.9.	Minipréparations d'ADN plasmidique et séquençage.....	33
II.4.	Analyse électrophysiologique par empalement de racines	33
II.4.1.	Miniaturisation de la cuve contenant le segment de racine	33
II.4.2.	Enregistrements du potentiel de membrane	33
II.5.	Analyse électrophysiologique par expression hétérologue en ovocyte de Xénope.....	34
II.5.1.	Synthèse des ARNc des gènes canaux.....	34
II.5.2.	Expression dans l'ovocyte de Xénope	34
II.5.3.	Enregistrements électrophysiologiques	35

Chapitre III : Analyse du rôle du canal sortant potassique de la famille Shaker MtSKOR

exprimé sur la membrane du poil absorbant de *Medicago truncatula* 37

III.1.	Introduction.....	37
III.2.	Résultats.....	38
III.2.1.	Lignée NF9352 et mutation <i>mtskor-1</i>	38
III.2.1.1.	Méthodologie de l'analyse du potentiel de membrane des cellules périphériques de la racine de <i>Medicago truncatula</i>	38
III.2.1.2.	Analyse de la vitesse initiale de repolarisation du mutant <i>mtskor</i>	40
III.2.1.3.	Analyse du nombre de cordons d'infection	40
III.2.1.4.	Analyse du nombre de nodules	40

III.2.1.5.	Analyse de l'efficacité de fixation du nodule	43
III.2.2.	Lignée NF21235 et mutation <i>mtskor-2</i>	43
III.2.2.1.	Validation de l'inactivation du gène <i>MtSKOR</i>	44
III.2.2.2.	Analyse du nombre de nodules	44
III.3.	Discussion	45
Chapitre IV : Analyse de la famille HKT de <i>Medicago truncatula</i>		52
IV.1.	Introduction.....	52
IV.2.	Material and methods.....	53
IV.2.1.	Plant material and experimental conditions for MtHKT expression analysis.....	53
IV.2.2.	Determination of Na ⁺ contents.....	54
IV.2.3.	Cloning of <i>Medicago truncatula</i> HKTs cDNA	54
IV.2.4.	Analysis of gene expression by real-time PCR.....	54
IV.2.5.	Expression in <i>Xenopus laevis</i> oocytes and two-electrode voltage-clamp analysis.....	55
IV.2.6.	Multiple alignment and phylogenetic analysis.....	56
IV.3.	Results	56
IV.3.1.	Identification and phylogenetic analysis of <i>M. truncatula</i> HKT transporters.....	56
IV.3.2.	MtHKT conductances upon expression in oocytes.....	57
IV.3.3.	MtHKT are preferentially permeable to Na ⁺ when compared to K ⁺ and Li ⁺	58
IV.3.4.	Expression of <i>MtHKT</i> genes under different biotic and abiotic conditions	59
IV.4.	Discussion	60
Chapitre V : Canaux CNGC susceptibles de jouer un rôle dans la signalisation calcique précoce déclenchée par les facteurs Nods : sélection et première analyse de leurs rôles par génétique inverse		65
V.1.	Introduction.....	65
V.2.	Résultats	67
V.2.1.	Analyse de la famille CNGC de <i>Medicago truncatula</i>	67
V.2.2.	Choix de canaux CNGC candidats.....	67
V.2.3.	Génotypage des lignées mutantes <i>mtcngc</i> candidates	70
V.2.3.1.	Identification de lignées mutantes dans la collection de la Noble Foundation	70
V.2.4.	Validation de l'inactivation des gènes CNGC candidats	71
V.2.4.1.	Validation de l'inactivation du gène <i>MtCNGC 1b</i>	71
V.2.4.2.	Validation de l'inactivation du gène <i>MtCNGC 1a</i>	71
V.2.4.3.	Validation de l'inactivation du gène <i>MtCNGC 1b</i>	71

V.2.5.	Analyse du nombre de nodules chez les lignées mutantes <i>mtcngc</i> lors de leur interaction symbiotique avec les bactéries fixatrices d'azote <i>Sinorhizobium meliloti</i>	72
V.2.5.1.	<i>MtCNGC 1b</i> , lignée NF17083 et mutation <i>mt17083</i>	73
V.2.5.2.	Gène <i>MtCNGC 1a</i> , lignées NF9524 et NF7899, et mutations <i>mt9524</i> et <i>mt7899</i>	73
V.2.5.3.	Gène <i>MtCNGC 1b</i> , lignées NF4050 et mutation <i>mt4050</i>	73
V.3.	Discussion	74
Chapitre VI : Des canaux CNGC localisés sur la membrane nucléaire sont impliqués dans les oscillations calciques périnucléaires déclenchées par la perception des facteurs Nods		78
Conclusion générale et perspectives		87
Référence Bibliographique		93

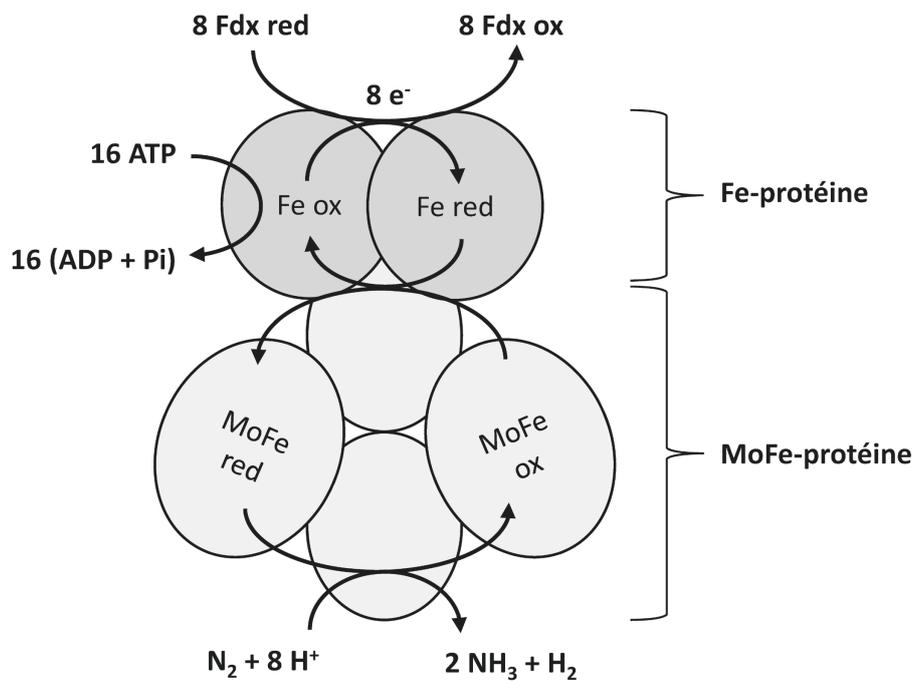


Figure I.1 : Réduction de l'azote moléculaire en ammoniac par la nitrogénase.

La nitrogénase est un complexe enzymatique formé par deux métallopoteines : la Fe-poteine et la MoFe-poteine. Le flux d'électrons est orienté de haut en bas. Le principal donneur d'électron est la ferrédoxine (Fdx), qui réduit la Fe-poteine. La Fe-poteine réduite transfère les électrons à la MoFe-poteine qui catalyse la réduction du diazote (N₂) en ammoniac (NH₃) avec production d'hydrogène (H₂). D'après Drain (2015).

Chapitre I : Introduction Bibliographique

I.1. La symbiose Légumineuse-Rhizobium

Seuls certains procaryotes appelés diazotrophes ont la capacité de fixer le diazote gazeux grâce à une métalloenzyme, la nitrogénase (Figure I.1). Certains de ces organismes, des bactéries de la famille des Rhizobiacées (*Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*), possèdent la capacité d'établir des symbioses endophytiques avec les plantes de la famille des Fabacées, également nommée légumineuses (pois, haricot, luzerne, lupin, soja...). Cette symbiose induit la formation de nodosités qui se forment sur les racines de la plante hôte (et dans certains cas sur la tige). Ce nouvel organe est le siège de la fixation biologique de l'azote. L'azote atmosphérique (N_2) est transformé en ammoniac (NH_3) grâce au complexe protéique de la nitrogénase (Figure I.1). La nitrogénase est formée de deux métalloprotéines, la Fe-protéine et la MoFe-protéine, respectivement constituées de 2 et 4 sous-unités. L'enzyme est codée par les gènes *nif* (Ruvkun et Ausubel, 1980; Smith, 2002). Pour protéger la nitrogénase qui est très sensible à l'oxygène, la pression partielle de l'oxygène dans le nodule est contrôlée à une valeur faible. Cela implique en particulier une séquestration de l'oxygène par des leghémoglobines (hémoprotéines de structure proche de l'hémoglobine) (Ott *et al.*, 2005).

I.1.1. Intérêt écologique et agronomique

L'azote est un constituant essentiel des biomolécules, en particulier des acides aminés et des acides nucléiques. Dans le sol, les racines prélèvent ce macroélément essentiellement sous forme de nitrate (NO_3^-) et d'ammonium (NH_4^+). En absence de fertilisation, la disponibilité de ces deux ions est souvent insuffisante et constitue très généralement l'un des facteurs les plus limitants de la croissance végétale et de la production de biomasse. La grande majorité de l'azote terrestre est présente dans l'atmosphère sous forme de diazote (N_2 , 79% de l'air).

La symbiose fixatrice d'azote entre les légumineuses et les Rhizobiacées constitue un processus écologique majeur. Elle représente une part non négligeable de l'azote fixé

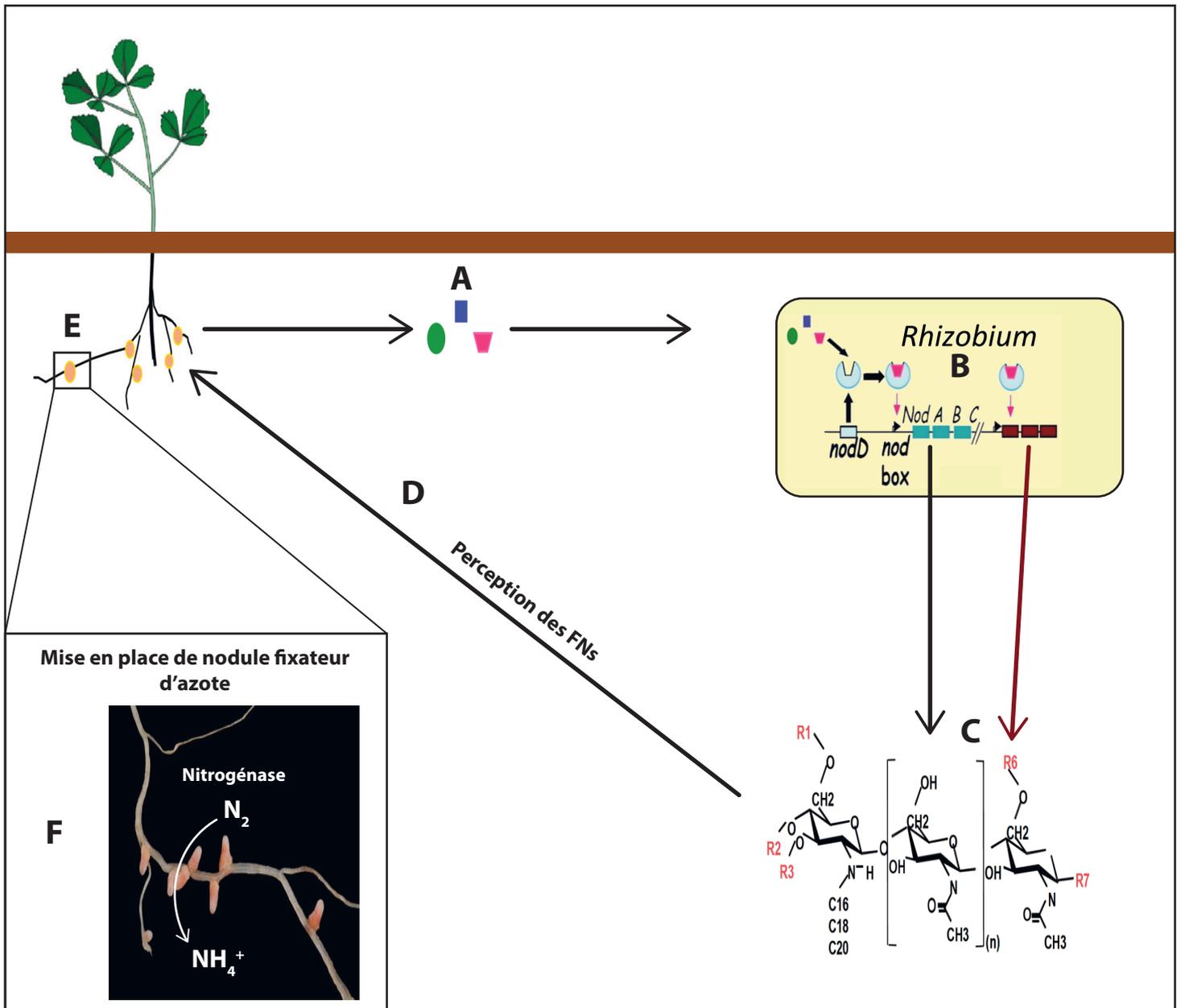


Figure I.2 : Représentation schématique du dialogue moléculaire rhizobium-légumineuse.

A : Les racines de la plante sécrètent des flavonoïdes dans la rhizosphère. **B :** Les flavonoïdes sont perçus par les rhizobiums et activent la protéine NodD qui induit la transcription des gènes *nod*. **C :** Les gènes *nod* permettent la production et l'excrétion des facteurs Nod (FNs). Les gènes *nods* dits « communs » sont responsables de la synthèse du squelette de base du Facteur Nod (noir). Les gènes *nod* spécifiques permettent le greffage de décorations variées et spécifiques (rouge ; R1-R7) d'espèces rhizobiennes sur ce squelette (Cf. Figure I.4). **D :** Les Facteurs Nods sont perçus par la plante au niveau de l'épiderme racinaire, ce qui déclenche une cascade de signalisation (**E**) induisant les réponses physiologiques et d'organogénèse nodulaire (**F**).

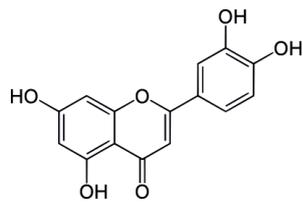
D'après Limpens *et al.* (2003).

annuellement (*i.e.*, environ 60 Mt) (Zahran, 1999; Graham et Vance, 2003). Pour comparaison, l'utilisation d'engrais chimique pour améliorer la nutrition azotée dans l'agriculture représente plus de 90 millions de tonnes par an et dans le monde (Vance, 2001). Ces fertilisants chimiques ont un coût environnemental important. Leur production et utilisation nécessitent en effet l'utilisation d'énergies fossiles en grande quantité, ce qui a un impact sur l'augmentation de CO₂ dans l'atmosphère et donc sur l'effet de serre. L'impact délétère au niveau environnemental de ces engrais chimiques est également dû au fait qu'une partie importante de l'azote épandu, estimée à environ 50%, n'est pas absorbée mais lessivée. Ce phénomène provoque une pollution des sols, des nappes phréatiques et des cours d'eau en générant un excès de NO₃⁻ (Vance, 2001) conduisant à une eutrophisation du milieu. De plus, l'utilisation du nitrate par des bactéries dénitrifiantes provoque la production d'oxyde d'azote, qui est un gaz à effet de serre qui contribue à la destruction de la couche d'ozone.

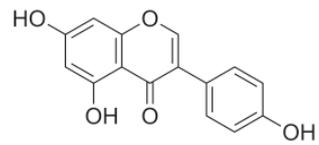
La famille des légumineuses est cultivée pour l'alimentation humaine et animale (haricot, pois, pois chiche, soja, arachide, luzerne, trèfle...). Ces espèces sont riches en protéines et produisent 35% des protéines végétales consommées dans le monde. Dans l'alimentation humaine, ce sont principalement les graines qui sont consommées, car elles sont particulièrement riches en protéines. Les légumineuses produisent aussi des composés secondaires qui ont un effet bénéfique sur la santé, notamment en protégeant des cancers humains (Stark et Madar, 2002). Une consommation régulière de légumineuses est associée à une réduction du risque de maladies cardiovasculaires, de l'appareil digestif, ainsi que d'obésité (Schultze et Kondorosi, 1998).

1.1.2. Le dialogue moléculaire entre les Rhizobia et les racines des légumineuses

Chaque rhizobium peut s'associer avec un panel spécifique de légumineuses, qui constituent ce que l'on appelle son spectre d'hôtes. Cette capacité d'interaction spécifique nécessite donc une série de mécanismes de reconnaissance entre les deux partenaires (Limpen et Bisseling, 2003), appelée dialogue moléculaire. Ce dialogue implique tout d'abord la sécrétion par les plantes de flavonoïdes dans la rhizosphère (Figure I.3), qui attirent le rhizobium compatible vers la racine (Figure I.2 A). Dans la bactérie, ces flavonoïdes (Figure I.3) sont reconnus par le facteur de transcription Nod D qui est organisé en multimères. Il a pour cible les motifs « *nod box* » présents en amont des gènes *nod* de la



Lutéoline (*M. truncatula*)



Génistéine (*G. max*)

Figure I.3 : Principaux flavonoïdes excrétés dans la Rhizosphère par *Medicago truncatula* et *Glycine max*.

La lutéoline et la génistéine sont des dérivés phénoliques de la famille des flavonoïdes capables d'induire la transcription des gènes de nodulation (*nod*) chez divers Rhizobia.

bactérie, ce qui induit leur expression (Figure I.2 B) (F. Fisher et Long, 1992; Long, 1996). Les gènes *nod* codent les enzymes nécessaires à la synthèse et à l'excrétion de molécules de signalisation dans le milieu par la bactérie. Ces molécules sont dérivées de lipochitoooligosaccharides et portent le nom de facteurs Nods (FNs) (Figure I.2 C). Après perception des facteurs Nods, la plante enclenche un processus d'organogénèse nodulaire et d'infection bactérienne.

I.1.3. Structure et production des Facteurs Nods, molécules clés de l'interaction Légumineuse-Rhizobium

Une dizaine de gènes *nod* peuvent être impliqués dans la synthèse des facteurs Nods chez les rhizobiums (Long, 1996). Il existe deux types de gènes *nod*, qualifiés de « communs » ou « spécifiques ». Les gènes *nodA*, *nodB* et *nodC* sont dits communs car ils sont retrouvés dans la grande majorité des rhizobiums. Ils permettent la synthèse du squelette de base, constitué de 3 à 5 résidus de N-acétyl-glucosamine et d'une chaîne lipidique sur le sucre terminal non réducteur (Figure I.4) ; la longueur et la saturation de cette chaîne pouvant varier selon l'espèce de rhizobiums. Les gènes *nod* dits spécifiques codent des enzymes qui greffent différents types de décorations (sulfate, acétate, méthyle...), sur le squelette de base. Ces différentes décorations sont spécifiques de chaque rhizobium (Figure I.4) et participent à la spécificité de reconnaissance par la plante hôte. Les gènes *nodE*, *F*, *G*, *H*, *L*, *P* et *Q* s (présents chez *Sinorhizobium meliloti*) sont « spécifiques ». Les gènes codant les protéines NodH, P et Q sont impliqués dans l'ajout du groupement sulfate (Roche *et al.*, 1991). La longueur et le degré de saturation de la chaîne d'acide gras sont déterminés par NodE et NodF (Demont *et al.*, 1993). NodL permet d'ajouter le groupement acétyle au premier sucre non réducteur (Ardourel, 1994). NodG pourrait être impliquée dans des modifications de la chaîne d'acide gras, puisqu'elle possède des homologues de séquence avec des réductases (F. Fisher et Long, 1992). Les gènes *nod* impliqués dans la synthèse des FNs chez *S. meliloti* sont localisés sur le méga-plasmide pSYMa (Rosenberg *et al.*, 1981) et organisés en opéron.

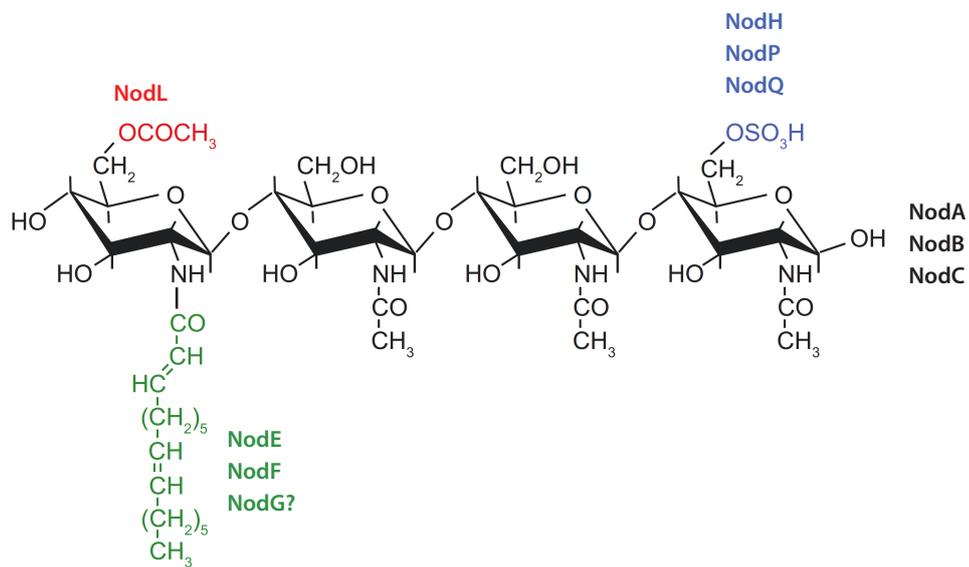


Figure I.4 : Structure des facteurs Nods.

Les facteurs Nods sont des lipochitooligosaccharides (LCO). Le squelette de base est formé d'une suite de 4 unités de N-acétyl-D-glucosamine réunies par des liaisons β(1 → 4) et dont la synthèse fait intervenir les protéines NodA, NodB et NodC. En fonction de l'espèce de Rhizobia, des résidus variés et spécifiques peuvent être ajoutés. Chez *S. meliloti*, la mise en place du groupe sulfate (en bleu) nécessite NodH, NodP et NodQ, et le groupe acétyle (en rouge) fait intervenir NodL. Concernant la chaîne d'acide gras (en vert), elle nécessite les protéines NodE et NodF pour être ajoutée au squelette de base. D'après Fisher and Long (1992) et Oldroyd et Downie (2004).

I.2. Dialogue moléculaire présidant à l'établissement de la symbiose rhizobienne : la signalisation précoce impliquant le poil absorbant

I.2.1. La perception des facteurs Nods

Les facteurs Nods (FNs) sont un des signaux clés dans la mise en place de l'interaction entre le partenaire bactérien et la plante hôte dans la plupart des symbioses fixatrices d'azote. Une mutation inhibant la perception des FNs par la plante hôte ou la production chez le partenaire bactérien entraîne une incapacité à initier et former cette interaction symbiotique (Dénarié *et al.*, 1996; Oldroyd et Downie, 2004).

L'application au niveau de la racine de facteurs Nods purifiés, même à de très faibles concentrations, induit les réponses de pré-infection observées lors d'une inoculation avec les bactéries. Moins d'une heure après l'application de FNs, les premières modifications morphologiques sont observables, se traduisant par un gonflement de l'extrémité du poil racinaire (Figure I.5 A). Ce premier effet est suivi de déformations (Figure I.5 A) et d'une réorientation de la croissance apicale du poil absorbant (Limpens et Bisseling, 2003). Ces modifications de la croissance du poil racinaire sont induites par des réarrangements du cytosquelette d'actine (Cárdenas *et al.*, 1998; De Ruijter *et al.*, 1998). Elles aboutissent à la formation d'une structure dite en « crosse de berger », dans laquelle les bactéries sont invaginées (Figure I.5 A et Figure I.6 A). C'est le point de départ de l'infection de la racine par les bactéries. Un cordon d'infection se forme à partir de ce point d'invagination des bactéries et se développe jusqu'aux couches du cortex interne de la racine. C'est dans cette couche cellulaire que les facteurs Nods induisent le processus de division cellulaire à l'origine de la formation du primordium nodulaire (Truchet *et al.*, 1991). Seuls les poils absorbants en élongation sont sensibles aux FNs (Miwa *et al.*, 2006) (Figure I.5 B et C). La structure des FNs semble être moins exigeante pour induire des déformations du poil absorbant et initier des divisions cellulaires dans le cortex que pour induire les processus ultérieurs de mise en place de la symbiose fixatrice d'azote. Chez *S. meliloti*, le double mutant *nodFnodL* est capable d'induire les déformations du poil absorbant ainsi que d'initier les divisions cellulaires dans le cortex, mais il est incapable de former des nodules (Ardourel, 1994; Catoira *et al.*, 2001). Ces observations suggèrent l'existence de deux types de récepteurs de FNs. Un récepteur de

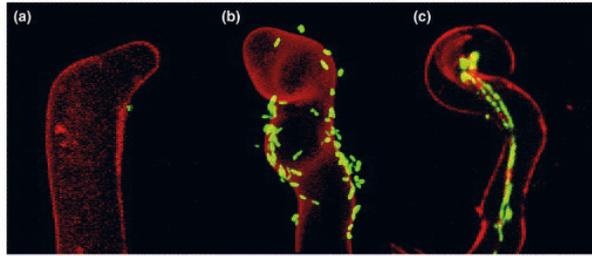
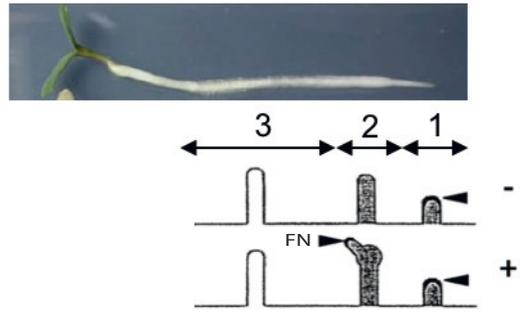
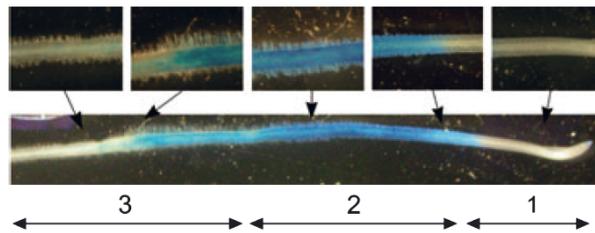
A**B****C**

Figure I.5 : Réponses morphologiques du poil absorbant en élévation lors des étapes précoces de la mise en place de l'interaction symbiotique avec les Rhizobia – seuls les poils absorbants en élévation sont sensibles.

A : Réponses morphologiques du poil absorbant de *Medicago truncatula* après inoculation par *S. meliloti*. Pour permettre une meilleure visualisation, la paroi cellulaire est colorée en rouge par de l'iodure de propidium et les bactéries utilisées ont été modifiées génétiquement afin de leur faire exprimer la protéine fluorescente GFP. (a) Le poil racinaire commence à se courber au contact de la bactérie. La direction de la croissance polarisée à l'apex du poil est modifiée. (b) Le poil racinaire est au contact de plusieurs bactéries qui ont induit divers changements de direction dans sa croissance polarisée. (c) Poil racinaire courbé en crosse de berger et contenant deux cordons d'infection. La réorientation de la croissance apicale du poil racinaire par les bactéries aboutit à la formation d'une structure dite en « crosse de berger ». La déformation en « crosse de berger » permet la « capture » de bactéries, qui forment alors une micro colonie. A partir de cette structure, les bactéries pénètrent dans le poil absorbant, avec la mise en place d'un cordon d'infection. D'après Limpens *et al.* (2003).

B : Seule la zone d'élévation des poils absorbants est sensible aux FNs. Photographie d'une racine de *M. truncatula* avec une représentation schématique de la déformation des poils absorbants induite par la perception des FNs. (1) Poils absorbants en formation, (2) poils absorbants en élévation et (3) poils absorbants mature. D'après Esseling *et al.* (2003).

C : Visualisation par fusion transcriptionnelle de la zone racinaire sensible aux FNs. Le gène *GUS* a été fusionné avec le promoteur du gène *ENOD11*, qui est un facteur de transcription impliqué dans la réponse précoce aux FNs. La coloration *GUS* est réalisée 7h après traitement des racines avec 10^{-9} M de FNs. D'après Miwa *et al.* (2006).

signalisation, dont l'activation ne nécessite pas que toutes les décorations spécifiques soient présentes sur les FNs, serait impliqué dans les réponses développementales du poil absorbant et les réponses corticales initiales (activation du cycle cellulaire). Un deuxième récepteur que l'on pourrait qualifier « d'entrée », beaucoup plus exigeant concernant la structure des FNs produits par la bactérie hôte, permettrait la mise en place de l'infection (Ardourel, 1994; Catoira *et al.*, 2001).

Les récepteurs de facteurs Nods identifiés à ce jour appartiennent à la famille des récepteurs LysM (Lysine Motif) (Figure I.6 B) : NFR1 (Nod Factor Receptor 1) chez *L. japonicus*, appelé LYK3 (LysM Receptor Kinase 3) chez *M. truncatula*, et NFR5 chez *L. japonicus*, appelé NFP (Nod Factor Perception) chez *M. truncatula* (Radutoiu *et al.*, 2007). NFR1 et NFR5 interagissent *in planta* sous forme d'un complexe hétéro-dimérique. Au niveau fonctionnel, le domaine kinase de NFR5 ne semble pas avoir d'activité, tandis que celui de NFR1, qui est essentiel dans la signalisation Nod, est capable d'autophosphorylation et de trans-phosphorylation, notamment de NFR5 (Madsen *et al.*, 2011), suggérant que ces récepteurs fonctionnent en hétéro-dimères. Des preuves ont été obtenues que ces récepteurs sont capables de lier directement les facteurs Nods (Broghammer *et al.*, 2012).

Le signal Nod perçu par les récepteurs membranaires est relayé jusqu'au noyau pour induire l'expression des gènes de nodulation selon des mécanismes qui restent encore mal connus. Cependant, il apparaît probable que la phosphorylation du complexe de récepteurs entraîne l'intervention de messagers secondaires qui conduisent rapidement à une dépolarisation de la membrane cellulaire, suivie d'une repolarisation. Cette signalisation électrique (*Cf.* ci-dessous) apparaît comme une des réponses très précoces du poil absorbant aux facteurs Nods. Des oscillations de la concentration de Ca^{2+} dans le cytoplasme au voisinage du noyau et dans le noyau lui-même (*Cf.* ci-dessous) jouent un rôle essentiel dans la transduction du signal Nod et la modification de l'expression génique, jusqu'au cortex racinaire profond (Figure I.6 B).

1.2.2. Les signalisations électrique et calcique induites par les facteurs Nods

Les mécanismes de transduction du signal de la perception des facteurs Nods jusqu'au noyau pour induire l'expression des gènes de nodulation sont des mécanismes qui restent encore flous.

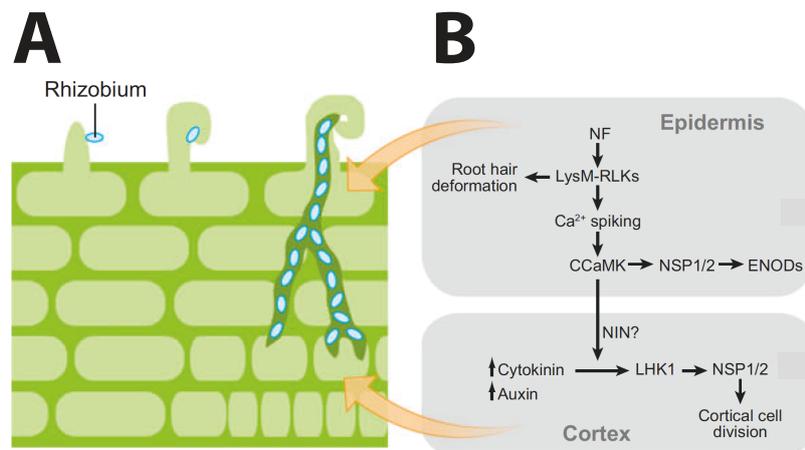


Figure I.6 : Schéma coordonné du développement racinaire et de la voie de signalisation symbiotique lors de la nodulation.

A : Représentation d'une coupe longitudinale de racine en interaction avec un Rhizobium. Ce dernier pénètre dans la racine en interagissant avec l'épiderme, plus précisément avec les poils racinaires. A partir des poils racinaires, il y a mise en place d'un cordon d'infection qui permet au Rhizobium de pénétrer jusqu'au cortex de la racine.

B : Etapes majeures de la voie de signalisation symbiotique. La perception des facteurs Nods (FNs) par le récepteur de type LysM-RLKs (récepteur Like Kinase avec motif lysine) induit des signaux calciques « oscillants » (« spiking ») à la fois dans le cytoplasme périnucléaire et le noyau. Ces variations de la concentration de Ca²⁺ sont perçues par la CCaMK (protéine kinase calcium/calmoduline dépendante). La transmission du signal via cette kinase conduit à l'activation des gènes *ENOD* (gènes de nodulation précoces) et à des réponses corticales. Dans le cortex, l'augmentation des concentrations d'auxine et de cytokinine conduit à la mise en place d'un primordium nodulaire.

D'après Oldroyd *et al.* (2008).

Comme indiqué ci-dessus, la phosphorylation du complexe de récepteurs permet l'intervention de messagers secondaires qui vont aboutir à la génération d'un signal électrique (Figure I.7 A). Ce signal électrique peut être décomposé en une phase de dépolarisation de la membrane cellulaire suivie d'une phase de repolarisation. L'analyse des flux ioniques, à l'aide d'électrodes spécifiques extracellulaires positionnées au voisinage immédiat de poils absorbants, a conduit aux hypothèses suivantes : la phase de dépolarisation résulterait d'une activation de canaux calciques permettant un influx de Ca^{2+} (Figure I.7 B). Celui-ci conduirait à (ou s'associerait à) une inhibition des ATPases pompes à protons (Figure I.7 B) puis à l'activation de canaux anioniques permettant un efflux d'anions, accentuant et prolongeant la dépolarisation de la membrane (Figure I.7 B). Cette dépolarisation de la membrane provoquerait en retour l'activation de canaux potassiques, permettant un efflux de K^+ (Figure I.7 B) et ainsi la repolarisation de la membrane, mettant fin à la phase de dépolarisation (Felle *et al.*, 1995, 1996, 1998; Felle et Hepler, 1997; Kurkdjian *et al.*, 2000). Ce modèle est présenté dans la Figure I.7 C. Bien que ces phénomènes soient décrits depuis plus de 10 ans, les acteurs moléculaires de ces étapes précoces de la transduction du signal Nod sont à ce jour encore inconnus. ***Mon travail de thèse a pour objectif de participer à l'identification de ces acteurs.***

La suite des événements de transduction du signal Nod est localisée dans le cytoplasme au voisinage du noyau et dans le noyau lui-même. Elle prend la forme d'oscillation de la concentration de Ca^{2+} (Figure I.8) (Ehrhardt *et al.*, 1996; Capoen *et al.*, 2011). Les acteurs moléculaires responsables de ces oscillations calciques observées au niveau du noyau sont progressivement identifiés. Des canaux cationiques présents sur la membrane nucléaire sont nécessaires pour l'induction des oscillations de Ca^{2+} : ce sont DMI1 chez *M. truncatula* (Ané *et al.*, 2004) ou CASTOR et POLLUX chez *L. japonicus* (Imaizumi-Anraku *et al.*, 2004; Miwa *et al.*, 2006). Le canal CASTOR présente une perméabilité à Ca^{2+} faible par rapport à K^+ (Charpentier *et al.*, 2008). Ces canaux CASTOR et POLLUX semblent nécessaires pour la régulation de l'équilibre des charges de l'enveloppe nucléaire en réponse au flux de Ca^{2+} , mais dont ils ne sont pas directement responsables (Charpentier *et al.*, 2008). Une récente étude a permis l'identification de canaux CNGC (Cyclic Nucleotide-Gated Channels ; Cf. ci-dessous) impliqués dans les flux de Ca^{2+} nucléaire chez *M. truncatula* (Charpentier *et al.*, 2016). MtCNGC15a, MtCNGC15b et MtCNGC15c sont des canaux perméables à Ca^{2+} .

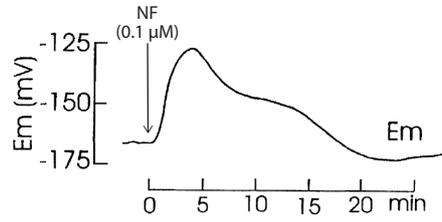
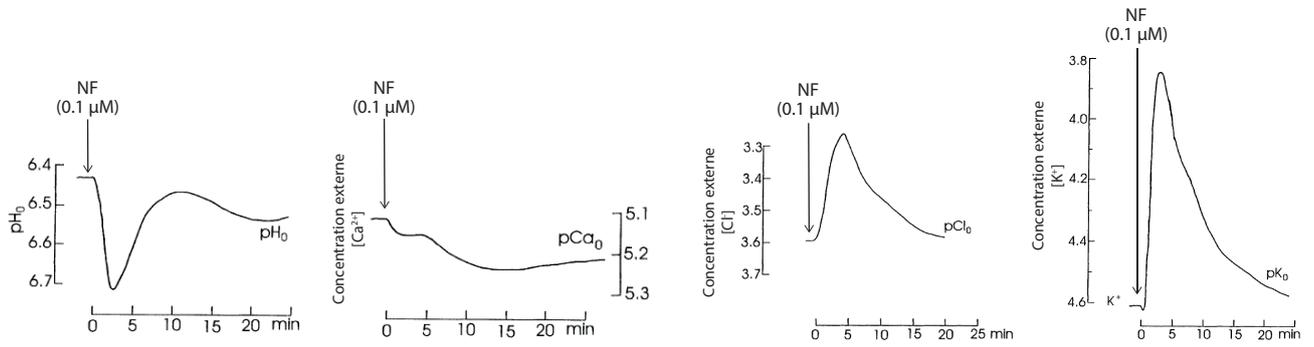
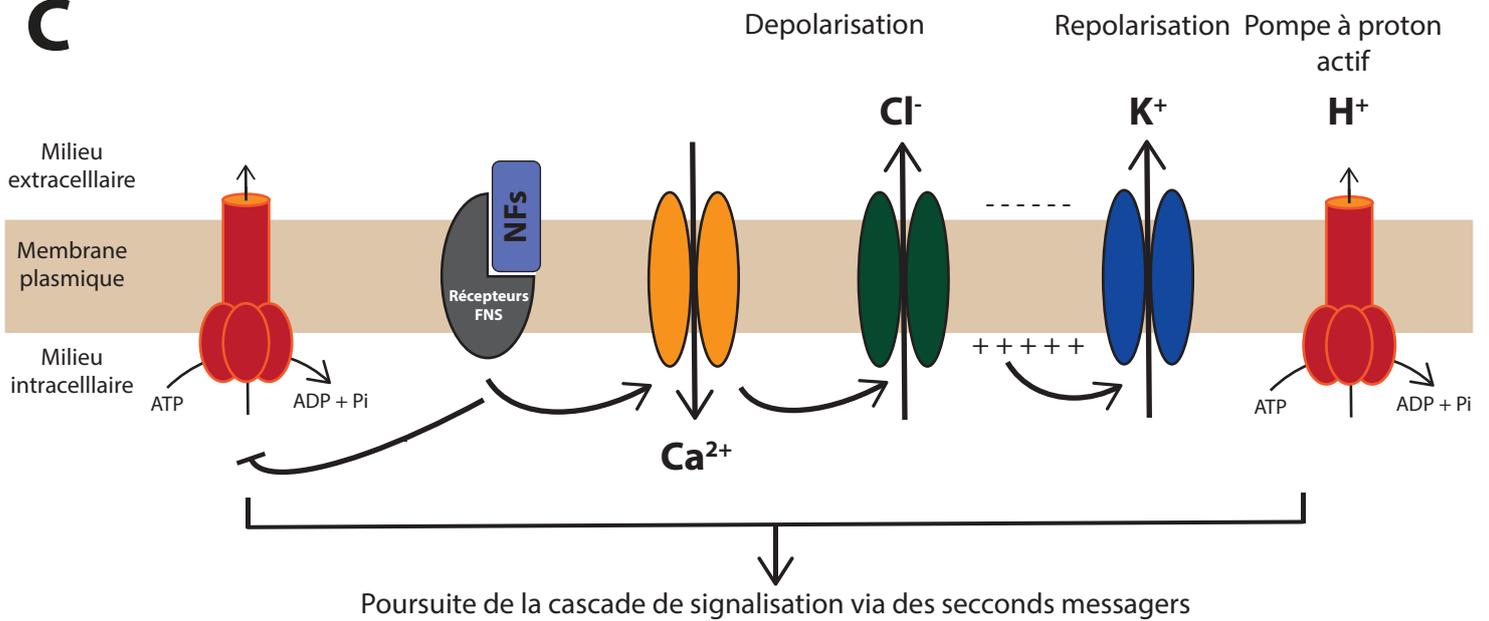
A**B****C**

Figure I.7 : Signalisation calcique et électrique lors des étapes précoces de la mise en place de l'interaction symbiotique avec les Rhizobium.

A : Réponse du potentiel membranaire de la racine de *M. sativa* à un traitement par des FNs 0,1 μM . L'enregistrement illustre la dépolarisation rapide (se produisant en quelques minutes), forte et transitoire (disparaissant après une dizaine de minutes) du potentiel membranaire.

B : Cinétiques des variations des concentrations externes en H^+ , Ca^{2+} , Cl^- et K^+ à proximité d'une racine de *M. sativa* traitée avec une solution contenant 0,1 μM de FNs. Les concentrations sont exprimées en logarithme de base 10 (pH, pCa^{2+} , pCl^- et pK^+). Les mesures sont faites avec des électrodes spécifiques miniaturisées, qui sont placées dans la couche de liquide non agitée au voisinage immédiat de la racine. Les enregistrements montrent que le traitement par les FNs se traduit chronologiquement par une alcalinisation "locale" (i.e., dans la couche non agitée) de la solution, une diminution "locale" transitoire de la concentration de Ca^{2+} (témoignant d'un influx de cet ion dans les cellules racinaires en regard de l'électrode), une augmentation transitoire de la concentration "locale" de Cl^- (témoignant d'un efflux de cet anion depuis les cellules en regard), et une augmentation transitoire la concentration « locale » de K^+ (témoignant d'un efflux de cet ion).

C : Modèle interprétatif des mécanismes à l'origine des flux ioniques responsables du processus de signalisation électrique et calcique précoce aboutissant à la colonisation du poil racinaire. Les facteurs Nods sont perçus par des récepteurs de type LysM-RLKs (Récepteur Like Kinase avec motif lysine; Lyk3/NFP chez *M. truncatula*). L'activation de ce complexe hétéro-dimérique aboutit à la dépolarisation de la membrane plasmique du poil racinaire. Dans le modèle proposé, cette dépolarisation résulte probablement d'une inhibition des ATPases excrétrices de H^+ de la membrane plasmique et d'une activation de canaux calciques, suivie d'une activation de canaux anioniques. La dépolarisation membranaire finit par activer des canaux potassiques « sortants », permettant un efflux de K^+ qui repolarise la membrane. L'influx de calcium permet une transduction du signal Nod jusqu'au noyau et l'activation des gènes ENOD pour « early nodulation genes ».

D'après Felle *et al.*, (1999).

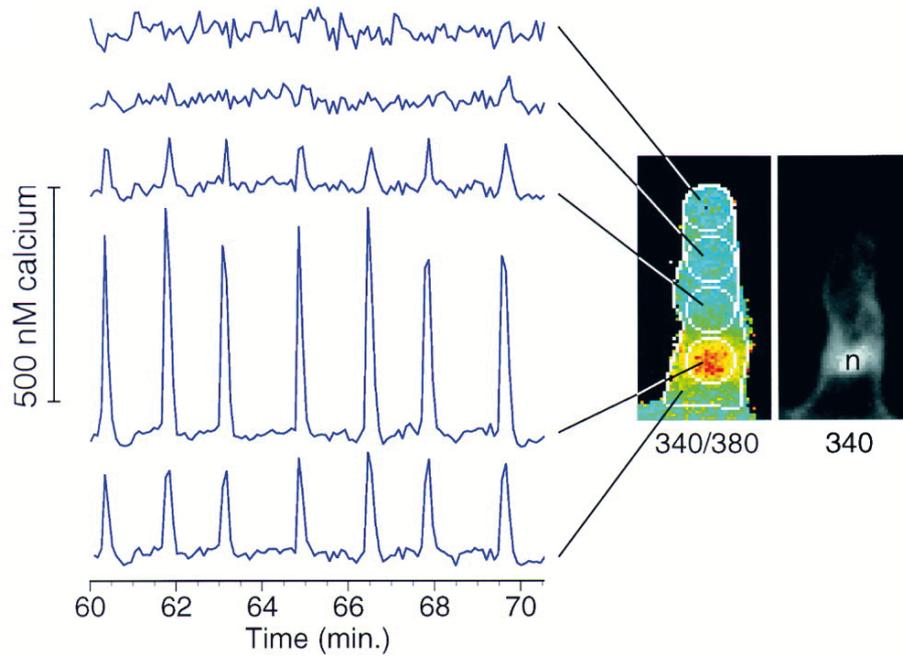


Figure I.8 : Oscillations de calcium au niveau du noyau dans le poil absorbant de *M. sativa*.

Observation d'un poil absorbant après perception de facteurs Nods. Le poil absorbant est traité avec la sonde fluorescente Fura-2-dextran pour quantifier la répartition spatiale du Ca^{2+} . Les oscillations calciques se concentrent au voisinage du noyau du poil absorbant. D'après Ehrhardt *et al.*, (1996).

MtCNGC15 et DMI1 interagissent ensemble pour former un complexe sur la membrane nucléaire. Cela laisse penser que ces deux protéines s'activent simultanément pour être à la base des flux de Ca^{2+} nucléaires impliqués dans la voie de signalisation de symbiose (Charpentier *et al.*, 2016).

Les oscillations calciques sont décodées par une protéine kinase appelée CCaMK chez *L. japonicus* (DMI3 chez *M. truncatula*) (Gleason *et al.*, 2006; Tirichine *et al.*, 2006). Cette protéine est activée par le calcium et la calmoduline. Son activation aboutit à la phosphorylation de facteurs de transcription de type GRAS, NSP1 et NSP2 (Nodulation Signalling Pathway) (Figure I.6 B). Ces facteurs de transcription entraînent l'activation des gènes impliqués dans la formation du primordium nodulaire au sein du cortex de la racine (Kaló *et al.*, 2005; Smit *et al.*, 2005).

* *
*
*

Comme cela a été indiqué dans le texte précédent, mon projet de recherche a été de contribuer à l'identification des systèmes de transport ionique membranaire participant aux processus de signalisation électrique et calcique initial dans le poil absorbant. Avant d'entrer dans la description de mon travail, je présente ci-dessous un résumé des connaissances et concepts qui m'ont été utiles dans la conduite de ce projet : les différences entre grandes catégories de systèmes de transport ionique membranaire, pompes, canaux et transporteurs, en détaillant plus spécifiquement l'état des connaissances actuelles sur les canaux ou transporteurs cationiques, perméables à K^+ , Na^+ ou Ca^{2+} .

* *
*
*

I.3. Les canaux ioniques exprimés sur la membrane des poils absorbants de *Medicago truncatula*

Le processus de signalisation électrique et calcique précoce déclenché par la perception des FNs dans le poil absorbant implique très probablement des canaux calciques, anioniques et potassiques de la membrane plasmique. La recherche et la caractérisation de tels canaux

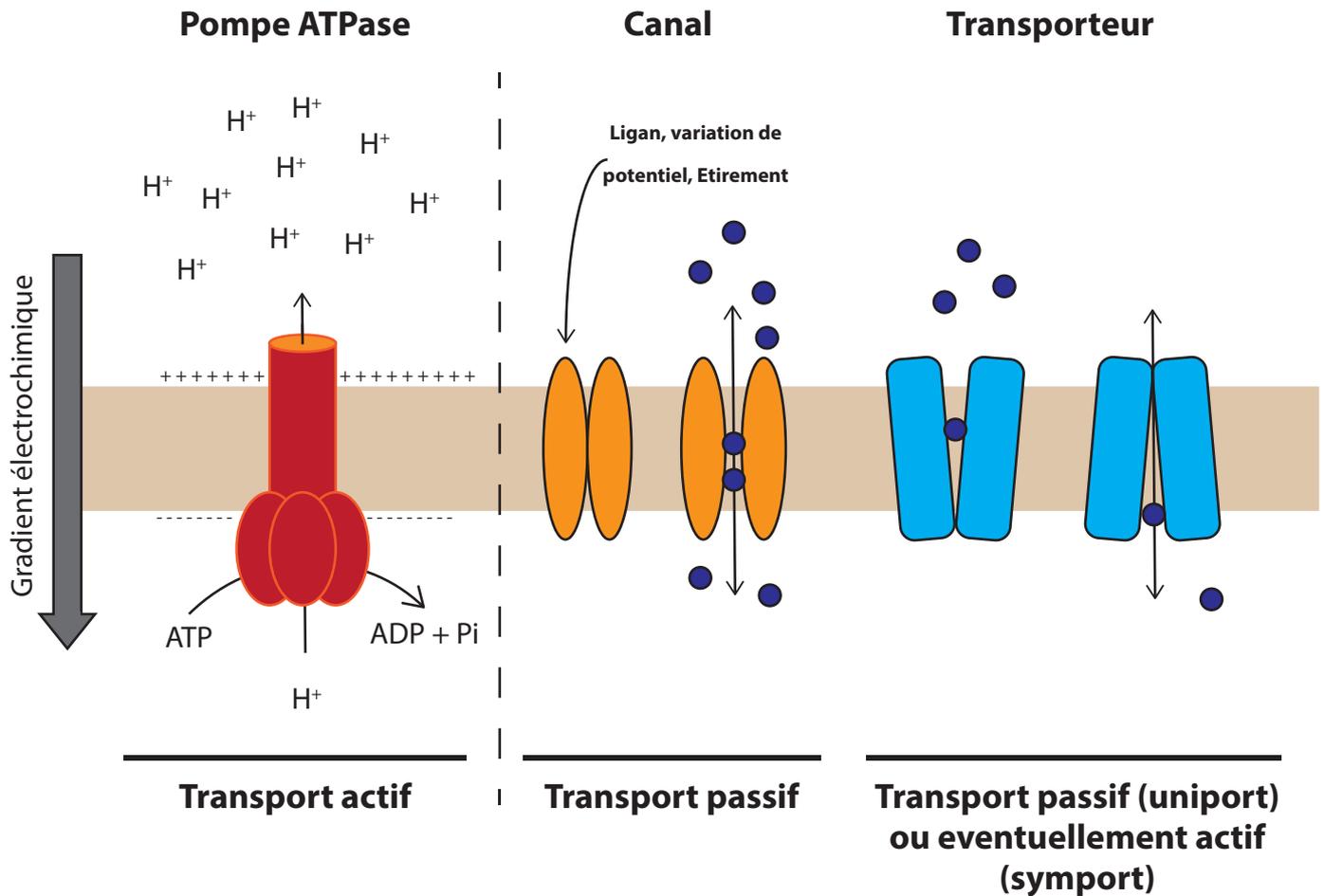


Figure I.9 : Représentation schématique des 3 catégories de systèmes de transport membranaire.

Les pompes permettent un transport contre le gradient électrochimique grâce à l'hydrolyse de liaisons covalentes. Les ATPases pompes à H⁺ permettent chez les plantes l'énergisation de la membrane en créant une différence de potentiel électrochimique de H⁺ (gradient de pH et gradient électrique) de part et d'autre de la membrane. Le domaine cytosolique hydrolyse de l'ATP, ce qui libère l'énergie nécessaire au transport des ions H⁺ contre leur gradient électrochimique.

Les canaux ioniques sont des protéines transmembranaires perméables à des ions lorsqu'ils sont « ouverts ». Ils peuvent être activés (« ouverts ») par différents stimuli : fixation d'un ligand (« ligand-gated » channels), variation du potentiel de membrane (« voltage-gated » channels) ou également un étirement de la membrane (mechanosensitive channels). Ces stimuli provoquent un changement de conformation qui permet de faire passer le canal d'un état fermé à un état ouvert. Dans son état ouvert, le canal permet le passage de nombreux ions sans changement conformationnel.

Les transporteurs nécessitent pour le passage d'un ion de profonds changements de conformation à chaque ion transporté. Ils sont divisés en 3 sous-groupes, les uniport qui transporte un seul ion, les symports qui permettent le passage de deux ions dans le même sens et les antiports qui transportent deux ions dans des sens opposés. Les transporteurs ne permettent le passage que d'un ion à la fois (avec éventuellement l'ion co-transporté énergisant le transport). Le transport de l'ion nécessite plusieurs états conformationnels du transporteur pour faire passer chaque ion d'un côté à l'autre de la membrane.

peuvent bénéficier des connaissances et travaux acquis chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana* dans le domaine des systèmes de transport ionique membranaire. De façon générale, les canaux ioniques les mieux caractérisés chez les plantes sont les canaux potassiques. Les connaissances concernant les canaux calciques chez les plantes sont par contre encore très réduites.

Les systèmes de transport ionique membranaire peuvent être classés en 3 catégories : les pompes, les canaux et les transporteurs. Les pompes catalysent l'hydrolyse de liaisons covalentes et récupèrent l'énergie ainsi libérée pour transporter leur substrat contre son gradient de potentiel électrochimique. C'est par exemple le cas des ATPases dites « pompes à protons » de la membrane plasmique végétale. L'activité des canaux et des transporteurs n'implique pas d'hydrolyse de liaison covalente mais seulement la rupture de liaisons ioniques et hydrogène (Stein, 1990; Logan *et al.*, 1997) (Figure I.9). Chez ces deux catégories de système de transport, des changements de conformation au sein de la protéine ouvrent une voie de perméation aux ions transportés. Les transporteurs présentent un cycle de changements de conformation qui se reproduit identique à lui-même à chaque substrat transporté, ou couple de substrats dans le cas des co-transporteurs. Le ou les solutés se fixent sur une des faces de la protéine, et un changement de conformation se produit, permettant le transport du ou des solutés sur l'autre face de la protéine où ils sont libérés. Un nouveau changement de conformation se produit ensuite, restituant à la protéine la capacité de fixer à nouveau son ou ses substrats sur l'autre face de la membrane. (Figure I.9). Un canal se caractérise comme un système de transport dont le changement de conformation conduit à l'ouverture ou la fermeture en son sein d'un pore aqueux, allant d'un côté à l'autre de la membrane. Une fois ouvert, le pore permet la migration d'un grand nombre d'ions (jusqu'à plusieurs millions), passant d'un côté à l'autre de la membrane, sans changement de conformation de la protéine et jusqu'à ce qu'un nouveau changement de conformation le referme. L'ouverture du canal peut être provoquée par une variation du potentiel électrique de part et d'autre de la membrane (« voltage-gated channels »), ou par la fixation d'un ligand (« ligand-gated channels »), ou encore par une variation de la tension de la membrane (« mechanosensitive channels », appelés aussi « stretch-gated channels »). Cette différence entre les transporteurs et les canaux permet à ces derniers de transporter des ions de façon beaucoup plus rapide : des canaux peuvent transporter environ 10^6 ions

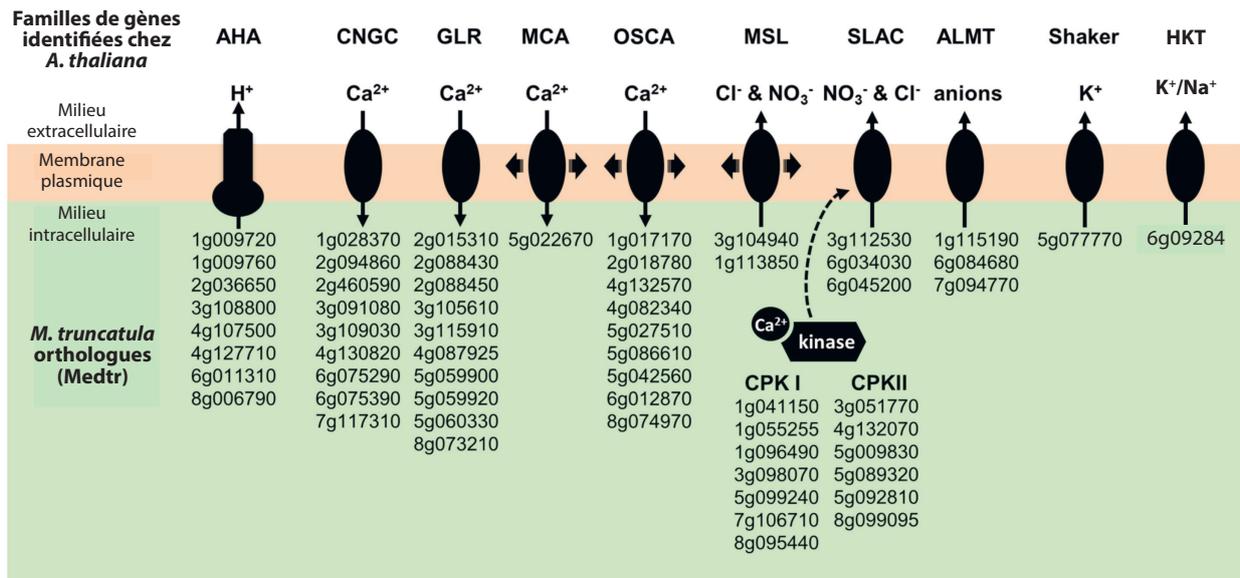


Figure I.10 : Systèmes de transport membranaire et kinases régulatrices qui peuvent jouer un rôle dans la signalisation calcique et électrique précoce induite par la perception des FNs.

Ces gènes candidats ont été identifiés lors du séquençage des ARN du poil absorbant de *M. truncatula* (Damiani *et al.*, 2016).

AHA, Autoinhibited H⁺-ATPase. CNGC, Cyclic Nucleotide-Gated Channels. GLR, Glutamate Rceptor-Like. MCA, Mid1-Complementing Activity. OSCA, Reduced hyperosmolarity-induced Ca²⁺ increase. MSL, Mechano-Sensitive MscS-Like channel. SLAC, Slow Anion Channel. ALMT, Aliminium-induced Malata Transporter. CPKI et CPKII, Calcium-dependant Protein Kinase I et II.

D'après Damiani *et al.*, (2016).

par seconde tandis que les transporteurs en font passer environ 10^3 au plus. Il est à noter que cette distinction très dichotomique entre transporteur et canal n'est pas toujours pertinente. Certains systèmes de transport peuvent fonctionner selon des mécanismes de type canal ou de type transporteur, le tout en fonction des conditions ioniques (DeFelice, 2004; Gadsby et By, 2004).

Les connaissances disponibles concernant les familles candidates de système de transport sur lesquelles j'ai ciblé mon travail de thèse sont présentées ci-dessous. Des membres de ces familles ont pu être identifiés comme exprimés dans la membrane du poil absorbant de *M. truncatula* (Figure I.10). Ce travail d'analyse transcriptomique a été précédemment conduit par l'équipe en ciblant le poil absorbant de *M. truncatula*, préalablement traité ou non par des facteurs Nods (Damiani *et al.*, 2016).

I.3.1. Les canaux perméables à K^+

Chez *A. thaliana* on recense 3 familles de canaux et 3 familles de transporteurs membranaires perméables à K^+ . Concernant les canaux, ces familles ont pour nom Shaker, TPK et KCO. Concernant les transporteurs, les 3 familles ont pour nom KUP/HAK/KT (selon les auteurs), HKT et CPA. La famille Shaker est, à ce jour, la mieux caractérisée de ces 6 familles.

I.3.1.1. La famille Shaker

Puisque le processus de repolarisation implique une activation de canaux potassiques provoquée par une dépolarisation de la membrane, il est raisonnable d'imaginer que ces canaux doivent appartenir à la famille des canaux potassiques régulés par la polarisation de la membrane cellulaire (« voltage-gated » K^+ channels). Une seule famille de canaux de ce type est connue chez les plantes. Il s'agit des canaux appelés Shaker (Figure I.11), du nom de leurs homologues chez les animaux. Chez *A. thaliana* les canaux Shaker dominent les conductances potassiques de la membrane dans la plupart des types cellulaires, de la cellule de garde en passant par l'épiderme racinaire ou le poil absorbant (Maser, 2001; Very *et al.*, 2014). Tout cela fait des membres de cette famille les meilleurs candidats à une participation aux processus impliquant K^+ dans la signalisation électrique du poil absorbant en réponse aux FNs. Ils le sont notamment dans la repolarisation de la membrane après la dépolarisation initiale induite par les FNs.

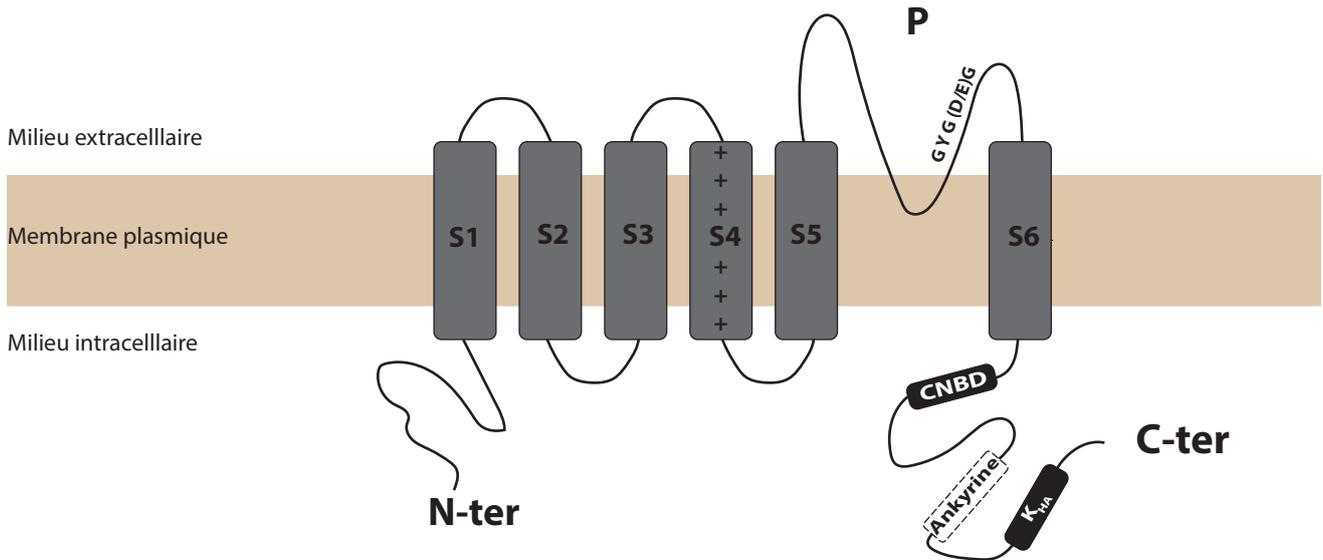
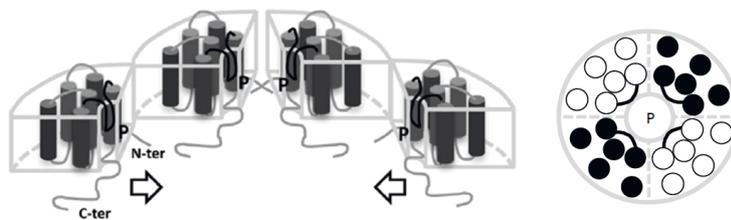
A**B**

Figure I.11 : Topologie des canaux de type Shaker.

A : Les régions N-terminale (N-ter) et C-terminale (C-ter) des sous-unités des canaux de la famille Shaker sont cytosoliques. Chaque sous-unité présente 6 domaines transmembranaires (S1 à S6) ainsi qu'un domaine pore (P) entre les domaines S5 et S6. Le motif de sélectivité à K^+ GYG(D/E)G est présent dans la séquence du domaine pore (P). Le segment S4 joue le rôle de senseur de voltage. Il porte des charges électriques positives (présence de résidus K et R) qui se déplacent au sein de la membrane en réponse aux variations du gradient de potentiel électrique transmembranaire et induisent ainsi les changements conformationnels qui ouvrent ou ferment le pore du canal. Ces canaux sont donc sensibles au voltage. Selon le type de canal, ils sont ouverts par une dépolarisation ou une hyperpolarisation de la membrane, permettant alors, respectivement, un efflux ou un influx de K^+ dans le sens du gradient de potentiel électrochimique de cet ion (« voltage gated outwardly rectifying channels » ou « voltage-gated inwardly rectifying channels »). La région C-terminale en aval de S6 est constituée d'un domaine de liaison aux nucléotides cycliques (CNBD), d'un domaine ankyrine intervenant dans les interactions protéine-protéine et d'un domaine K_{HA} qui permet la tétramérisation des sous-unités.

B : Structure tétramérique d'un canal Shaker. Un canal fonctionnel résulte de l'assemblage de 4 polypeptides (« sous-unités ») Shaker, codées par le même gène ou des gènes Shaker différents (canaux homo- ou hétéro-tétramériques).

D'après Véry *et al.*, (2014).

Chez *A. thaliana*, AKT1 et KAT1 sont les premiers canaux Shaker identifiés et clonés (Anderson *et al.*, 1992; Schachtman *et al.*, 1992; Sentenac *et al.*, 1992). Après le séquençage du génome de cette espèce, 7 autres gènes *Shaker* ont pu être identifiés par analyse *in silico* : KAT2, AKT2, SPIK, AKT6, AtKC1, GORK et SKOR (Véry et Sentenac, 2003).

Chaque sous-unité Shaker présente un court domaine N-terminal (N-ter) et une plus longue région C-terminale (C-ter), localisés sur la face cytoplasmique de la membrane (Figure I.11 A). Un grand domaine hydrophobe transmembranaire est présent entre ces deux régions cytoplasmiques. Il est composé de 6 segments transmembranaires, appelés S1 à S6 (Figure I.11 A). La régulation, par les variations de la polarisation électrique de la membrane cellulaire implique le segment S4. Ce segment transmembranaire n'est pas constitué que de résidus hydrophobes mais contient aussi plusieurs résidus hydrophiles basiques, arginines, lysines et histidines. La charge positive portée par ces résidus permet à ce segment S4 d'assurer le rôle de « senseur de voltage » dans le canal. Les variations du gradient de potentiel électrique dans la membrane vont induire un déplacement de ces résidus chargés positivement et ainsi des mouvements du segment S4. Ces mouvements de S4 se traduisent par des changements de conformation de la protéine, ce qui ouvre ou ferme la voie de perméation du canal. Ce mécanisme permet aux canaux Shaker d'être régulés par le voltage. Selon le canal étudié, une hyperpolarisation ou une dépolarisation de la membrane peut entraîner l'ouverture du canal (Véry et Sentenac, 2003).

Entre le segment S5 et S6 se trouve le domaine appelé pore (P, Figure I.11 A). Ce domaine structure la voie de perméation du canal et contrôle la sélectivité ionique. Les canaux potassiques présentent dans ce domaine une séquence très conservée, le motif GYG(D/E), qui est responsable de la forte sélectivité du canal pour K^+ (Figure I.11 A). Le motif GYG(D/E) constitue le cœur du filtre de sélectivité du domaine pore. C'est la région la plus étroite du pore, et les ions K^+ ne peuvent la traverser qu'après avoir perdu leur coque d'hydratation. La cristallographie du canal potassique bactérien KcsA (Doyle, 1998) a permis l'analyse de la relation structure-fonction du filtre de sélectivité et notamment du motif GYG(D/E) (Figure I.11 A). Le canal est formé de 4 sous-unités (voir ci-dessous), et l'agencement dans l'espace des quatre motifs GYG(D/E) permet de mimer la présence de 4 coques d'hydratation de l'ion K^+ . Ces « pseudo-coques » d'hydratation accueillent successivement l'ion K^+ « nu » (déshydraté) au cours de sa migration dans cette région du

pore, permettant ainsi de faire baisser la barrière énergétique que représente la déshydratation de l'ion K^+ nécessaire à son passage à travers le filtre de sélectivité (Bernèche et Roux, 2001). Ce mécanisme permet aux canaux potassiques d'avoir une grande sélectivité tout en conservant une capacité pour contrôler des flux ioniques importants (jusqu'à 10^6 à 10^7 ions K^+ par protéine et par seconde dans des conditions physiologiques).

En aval du domaine hydrophobe transmembranaire, la région C-terminale cytoplasmique est constituée d'un domaine CNBD (Figure I.11 A), qui permet la fixation de nucléotides cycliques (CNBD étant l'acronyme de « Cyclic Nucleotide Binding Domain »). Ce domaine est impliqué dans les interactions physiques entre les 4 sous-unités constituant le canal (Daram *et al.*, 1997; Cf. ci-dessous). La fixation de son ligand permettrait aussi de moduler la sensibilité du canal au voltage (Nieves-Cordones et Gaillard, 2014). Certains canaux Shaker présentent dans leur partie C-terminale un domaine ankyrine, immédiatement en aval du domaine CNBD (Figure I.11 A). Chez *A. thaliana*, un tel domaine est présent dans 6 des 9 membres de la famille Shaker (AKT1, AKT2, SPIK, AKT6, GORK et SKOR). Ce domaine permet des interactions protéine-protéine. En particulier, certaines kinases de la famille des CIPK peuvent interagir avec ce domaine des canaux Shaker. Sur la fin de la région C-terminale, on trouve un domaine appelé « K_{HA} » (Figure I.11 A) qui est important pour les interactions entre les sous-unités Shaker pour former des clusters de canaux fonctionnels dans la membrane (Daram *et al.*, 1997; Ehrhardt *et al.*, 1997).

La formation d'un canal fonctionnel nécessite l'assemblage de 4 sous-unités Shaker. Les canaux Shaker sont donc des protéines tétramériques (Figure I.11 B) (Daram *et al.*, 1997; Urbach *et al.*, 2000). Les 4 sous-unités peuvent être codées par le même gène Shaker, formant ainsi un canal homo-tétramérique, ou par des gènes Shaker différents, formant un canal hétéro-tétramérique. La possibilité de former des canaux hétéro-tétramériques permet d'accroître leur diversité fonctionnelle *in planta* (Reintanz *et al.*, 2002; Jeanguenin *et al.*, 2011). Chez *A. thaliana* il a été démontré que la sous-unité AKT2 peut s'associer avec KAT1, KAT2, AKT1 et avec la sous-unité régulatrice AtKC1 (Reintanz *et al.*, 2002; Pilot *et al.*, 2003; Obrdlik *et al.*, 2004; Xicluna *et al.*, 2007). AtKC1 est ainsi appelée car elle est incapable d'interagir avec elle-même pour former un canal fonctionnel homo-tétramérique (Duby *et al.*, 2008). Par contre, cette sous-unité AtKC1 est capable d'interagir avec d'autres sous-unités (AKT1, KAT1, KAT2 et AKT2) pour former des canaux hétéro-tétramériques. Lors de

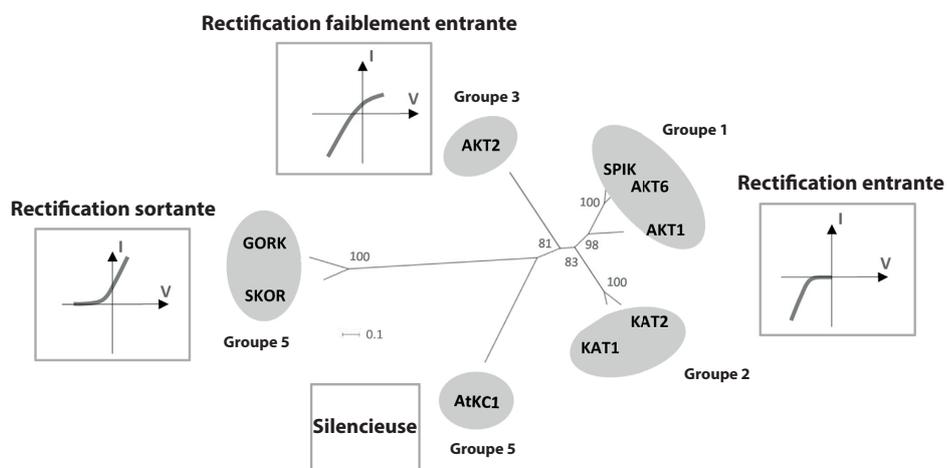


Figure I.12 : Arbre phylogénétique lié à la caractérisation fonctionnelle des canaux Shaker d'*A. thaliana*.

Arbre phylogénétique réalisé à partir des séquences protéiques des canaux Shaker d'*A. thaliana*. A chaque nœud est indiqué sa valeur de bootstrap sous forme de pourcentage. Chaque groupe fonctionnel est associé à une représentation schématique de sa courbe courant (I) voltage (V) caractéristique. AtKC1 est considéré comme une sous-unité silencieuse car elle ne peut pas former de canal homo-mérique fonctionnel, mais elle peut s'associer avec d'autres sous-unités rectifiantes entrantes. D'après Véry *et al.*, (2014).

telles associations, elle modifie les propriétés fonctionnelles des canaux hétéro-tétramériques, en particulier leur sensibilité au voltage (Reintanz *et al.*, 2002; Hosy *et al.*, 2005; Duby *et al.*, 2008; Jeanguenin *et al.*, 2011).

A ce jour, les caractérisations électrophysiologiques des canaux Shaker permettent de les classer en trois groupes fonctionnels : rectifiant-entrant (IR, « Inwardly Rectifying »), faiblement rectifiant (WIR, « Weakly Inwardly Rectifying »), ou rectifiant-sortant (OR, « Outwardly Rectifying »). Le groupe fonctionnel des rectifiants-entrants est constitué des canaux AKT1, KAT1, KAT2, AKT6, SPIK et AtKC1 chez *A. thaliana* (Figure I.12). Lorsque la membrane est faiblement polarisée électriquement, ces canaux sont complètement fermés. Ces canaux s'ouvrent lorsque la polarisation de la membrane devient plus négative qu'une valeur de potentiel dite « seuil » (en anglais : « activation potential »), propre à chaque canal. Au fur et à mesure que le gradient de potentiel électrique transmembranaire devient négatif, chaque canal a une probabilité de plus en plus importante d'être à l'état ouvert. Par ailleurs, le fait que le potentiel devient de plus en plus négatif peut rendre le potentiel électrochimique de K^+ négatif dans le cytoplasme, par rapport au milieu extérieur, ce qui est en faveur d'un influx de K^+ . Autrement dit, l'ouverture des canaux se produit alors que le gradient de potentiel électrochimique de K^+ peut permettre une entrée de K^+ dans la cellule. Dans des conditions physiologiques, la sensibilité de ces canaux au voltage leur permet donc d'avoir pour fonction l'absorption de K^+ . Le second groupe fonctionnel, faiblement rectifiant, est constitué chez *A. thaliana* par un seul canal, AKT2 (Figure I.12). Ce canal est activé par une hyperpolarisation de la membrane comme le groupe des canaux rectifiants-entrants. Mais il peut rester ouvert lorsque la membrane se dépolarise, ce qui permet à ce canal de pouvoir conduire un influx ou un efflux de K^+ , en fonction du gradient de potentiel électrochimique transmembranaire de cet ion. Le troisième groupe fonctionnel de canaux Shaker, les rectifiants-sortants, est constitué chez *A. thaliana* par les canaux GORK et SKOR (Figure I.12). Ces canaux s'ouvrent lorsque la membrane se dépolarise. Le gradient électrochimique de K^+ à travers la membrane devient alors en faveur d'un efflux de K^+ , puisque la cellule est dépolarisée. L'analyse de la relation structure-fonction du canal SKOR a permis l'identification du résidu D312 comme étant très conservé dans les canaux sortants, et remplacé par N chez les canaux entrants. La double mutation D312N et L271P (située dans

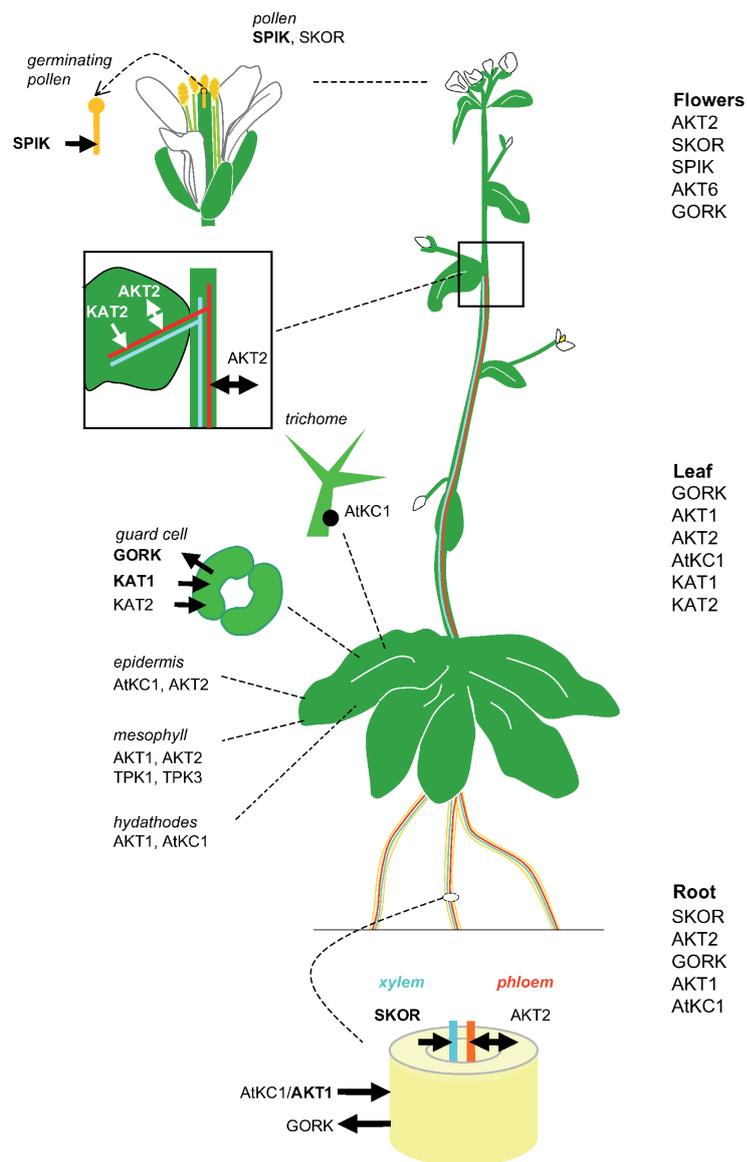


Figure I.13 : Localisation de l'expression des canaux Shaker chez *A. thaliana*.

Représentation de l'expression des canaux Shaker dans les différents organes chez *A. thaliana*. SPIK est exprimé dans le grain de pollen et entraîne un influx de K^+ jouant un rôle dans le développement du tube pollinique. KAT1, KAT2 et GORK sont exprimés dans les cellules de gardes et jouent un rôle dans le phénomène d'ouverture et fermeture du stomate. KAT1 et KAT2 permettent un influx de K^+ et sont impliqués dans l'ouverture du stomate, alors que GORK permet un efflux de cet ion et joue ainsi un rôle dans la fermeture stomatique. Dans le phloème, AKT2, pourrait être impliqué à la fois dans le chargement et le déchargement de K^+ dans la sève élaborée. AKT2 pourrait également intervenir dans le contrôle du potentiel de membrane permettant le chargement des sucres dans la sève. AKT1, AtKC1 et SKOR sont exprimés dans la racine. Les deux premiers forment des canaux impliqués dans l'absorption de K^+ dans la solution du sol. SKOR, quant à lui, permet de charger la sève xylémienne en K^+ .
D'après Lebaudy *et al.*, (2007).

S4, le segment senseur de voltage) chez le canal sortant SKOR le transforme en un canal activé par l'hyperpolarisation (Li *et al.*, 2008).

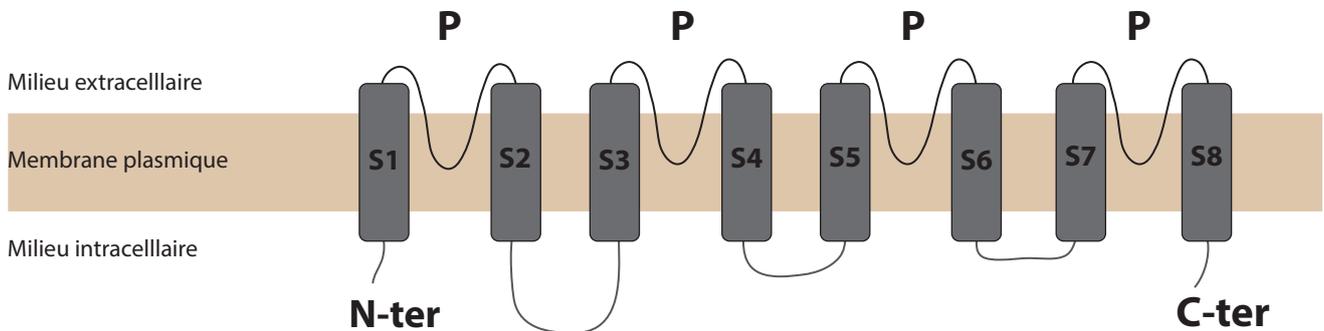
Divers travaux ont étudié la localisation des canaux Shaker d'*A. thaliana*. Ces canaux sont retrouvés sur la membrane plasmique de nombreux types cellulaires (Figure I.13). Les canaux KAT1 et GORK sont exprimés dans les cellules de garde (Nakamura *et al.*, 1995; Becker *et al.*, 2004). Ils jouent un rôle dans l'ouverture et la fermeture des stomates en conduisant respectivement des influx ou efflux de K^+ . Le canal SPIK permet un influx de K^+ dans le tube pollinique, et ainsi le maintien de la pression de turgescence du tube en élongation, malgré l'augmentation du volume du tube due à cette élongation (Mouline *et al.*, 2002). Le canal faiblement rectifiant AKT2, qui a la capacité à conduire des influx et efflux de K^+ , est retrouvé exprimé dans les tissus du phloème. Il permettrait à la fois la charge de la sève phloémienne en K^+ dans les organes sources et la décharge dans les organes puits (Lacombe *et al.*, 2000). Dans les parties racinaires, on retrouve les canaux AKT1, AtKC1, GORK et SKOR. Ce dernier est retrouvé exprimé dans les tissus de la stèle racinaire (péricycle et parenchyme xylémien). Il est impliqué dans la sécrétion de K^+ dans la sève xylémienne (Gaymard *et al.*, 1998). AKT1, AtKC1 et GORK, sont exprimés dans les cellules périphériques de la racine (épiderme et cortex). Le rôle physiologique de GORK n'est pas clair, mais l'hypothèse actuelle est que ce canal permettrait un efflux de K^+ , lors d'un stress hypo-osmotique par exemple (Ivashikina *et al.*, 2001). AKT1 et AtKC1 jouent un rôle dans l'absorption de K^+ depuis la solution du sol (Hirsch *et al.*, 1998; Reintanz *et al.*, 2002).

1.3.1.2. Les transporteurs de K^+ et/ou Na^+ de la famille HKT

Les transporteurs végétaux HKT appartiennent à une famille de systèmes de transport de K^+ et/ou Na^+ ; qui inclut aussi les transporteurs de K^+ des familles Trk et Ktr chez les bactéries, et Trk chez les champignons (Corratgé-Faillie *et al.*, 2010). Chez les plantes, les transporteurs HKT (acronyme de « High affinity K^+ Transporter ») présentent divers niveaux de sélectivité pour K^+ et Na^+ , et tous ne sont pas perméables à K^+ .

Des études, basées initialement sur des analyses *in silico* de séquences, puis sur des approches biochimiques et des résultats de mutagenèse dirigée ou aléatoire, et enfin sur l'élucidation cristallographique récente de la structure d'homologues bactériens (TrK/Ktr), ont permis de déterminer la topologie des transporteurs HKT (Durell et Guy, 1999; Kato *et al.*, 2001; Cao *et al.*, 2011; Vieira-Pires *et al.*, 2013). Le cœur hydrophobe transmembranaire

A



B

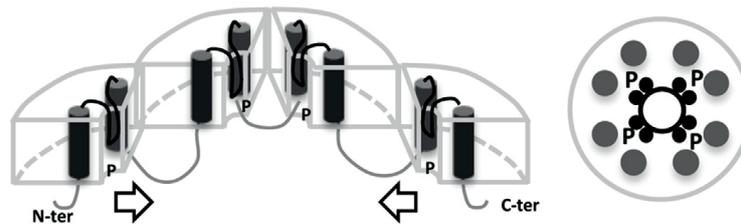


Figure I.14 : Topologie des transporteurs de type HKT (High-affinity K^+ Transporter).

A : Les transporteurs HKT sont constitués de 4 domaines « MPM », chaque « MPM » étant constitué de la succession d'un domaine transmembranaire d'un domaine pore et d'un domaine transmembranaire. Les régions N-terminale (N-ter) et C-terminale (C-ter) sont cytosoliques.

B : Repliement schématique de la protéine HKT pour former un transporteur transmembranaire. Il est important de noter que ces transporteurs ont typiquement la structure de canaux ioniques (par exemple d'un tétramère de la sous-unité de canal potassique bactérien KcsA) et certains d'entre eux sont susceptibles de se comporter comme des canaux. Le terme de « transporteurs » est cependant retenu pour ces protéines parce que certaines d'entre elles, chez les champignons et peut-être chez les plantes également, se comportent comme des système de co-transport actif.

D'après Véry *et al.*, (2014).

de la protéine est formé de 4 domaines « MPM » (acronyme de Membrane-Pore-Membrane). Chaque domaine MPM est formé d'un segment transmembranaire, d'un domaine pore (P) et d'un deuxième segment transmembranaire. Les parties C-terminale (C-ter) et N-terminale (N-ter) sont courtes et situées sur la face cytoplasmique de la protéine (Figure I.14 A). Les quatre domaines « MPM » s'assemblent selon une symétrie axiale pour former une voie de perméation entourée des domaines pore (Figure I.14 A).

De nombreux HKT ont pu être caractérisés par expression en système hétérologue. L'ensemble des résultats conduit à considérer qu'il existe trois types fonctionnels de systèmes de transport HKT, selon leur perméabilité relative à K^+ et Na^+ . Certains transporteurs présentent une forte sélectivité en faveur de Na^+ par rapport à K^+ (e.g., AtHKT1 chez *Arabidopsis* ; Uozumi *et al.*, 2000). D'autres sont sélectifs de K^+ par rapport à Na^+ (e.g. OsHKT2;4 chez le riz ; Sassi *et al.*, 2012). D'autres encore présentent des perméabilités à K^+ et Na^+ comparables et sont susceptibles de fonctionner comme des systèmes de symport K^+ - Na^+ quand ils sont exprimés en système hétérologue. (e.g., TaHKT1, aussi appelé TaHKT2;1, chez le blé ; Rubio *et al.*, 1995). Les analyses phylogénétiques conduisent, par contre, à classer ces transporteurs en deux sous-familles uniquement (Figure I.14 B). La sous-famille 1 est probablement représentée chez toutes les plantes dicotylédones ou monocotylédones, et regroupe les transporteurs présentant une forte sélectivité pour Na^+ . La sous-famille 2 est jusqu'à présent retrouvée chez les monocotylédones seulement, et regroupe tous les transporteurs significativement perméables à K^+ , présentant des perméabilités comparables à K^+ et Na^+ ou une sélectivité en faveur de K^+ (Platten *et al.*, 2006) (Figure I.15). *Arabidopsis* possède un seul gène *HKT*, appelé *AtHKT1* (Uozumi *et al.*, 2000), alors que le riz possède 8 ou 9 gènes *HKT*, selon le cultivar analysé (Garcia-deblás *et al.*, 2003) (Figure I.15). Cette famille HKT est composée chez le riz de quatre transporteurs de la sous-famille 1, et de trois (chez la plupart des cultivars/variétés de riz) ou quatre transporteurs de la sous-famille 2, et d'un dernier membre, appelé *OsHKT1;2*, qui est considéré comme non fonctionnel parce qu'un codon stop est présent de façon prématurée dans son cadre de lecture (Garcia-deblás *et al.*, 2003). La famille *HKT* du riz respecte les critères actuellement retenus pour la classification des HKT. A l'exception d'*OSHKT2;3* qui n'est pas encore caractérisé, les *OSHKT* de la sous-famille 2 ont tous pu être analysés par expression en système hétérologue (levure ou ovocyte de

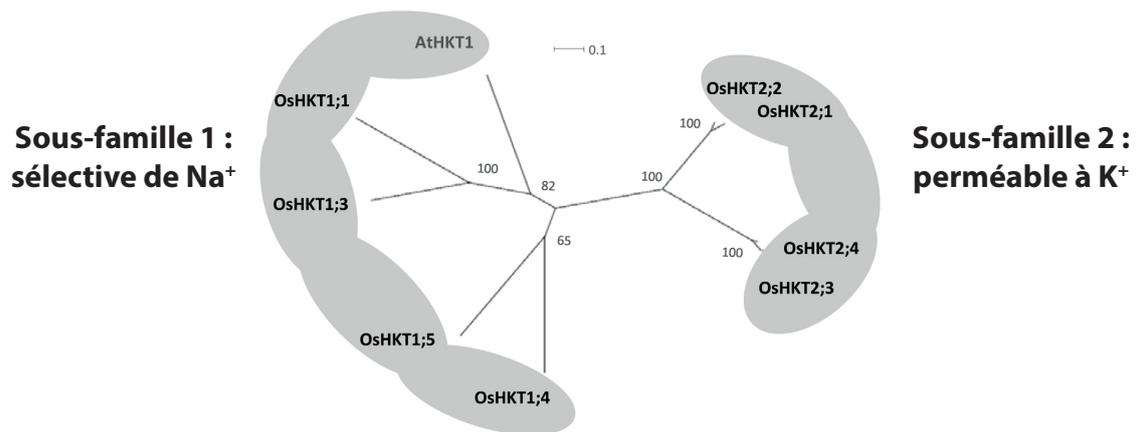


Figure I.15 : Arbre phylogénétique de la famille des transporteurs HKT d'Arabidopsis et de riz.

Arbre phylogénétique réalisé à partir des séquences protéiques des transporteurs HKT d'Arabidopsis et de riz. A chaque nœud est indiquée sa valeur de bootstrap sous forme de pourcentage. Les deux sous-familles sont représentées : la sous-famille 1 qui est sélective de Na⁺ et la sous-famille 2 qui est perméable à la fois à Na⁺ et K⁺. D'après Véry *et al.*, (2014).

Xénope) et présentent tous une perméabilité à K^+ . Ce sont des transporteurs sélectifs du K^+ (pour OsHKT2;4) ou des systèmes perméables à la fois à K^+ et Na^+ , présentant en système hétérologue une activité de symport Na^+-K^+ (pour OsHKT2;1 et OsHKT2;2 ; Jabnune *et al.*, 2009; Yao *et al.*, 2010; Oomen *et al.*, 2012; Sassi *et al.*, 2012). Un déterminant moléculaire de la perméabilité à K^+ a pu être identifié dans leur filtre de sélectivité (dans le premier domaine pore). Chez ces transporteurs, tout comme chez les transporteurs de K^+ des familles Trk/KTR bactériennes, un résidu glycine conservé dans le filtre de sélectivité du domaine P du premier MPM semble contribuer de façon essentielle à la perméabilité du pore à K^+ (Mäser *et al.*, 2002b; Cao *et al.*, 2011; Vieira-Pires *et al.*, 2013). Cette glycine n'est pas présente chez les HKT de la sous-famille 1 (Hauser et Horie, 2010) et elle est considérée comme un résidu « poinçon » caractéristique des transporteurs de la sous-famille 2. Les HKT de la sous-famille 1, présents chez Arabidopsis et le riz ainsi que caractérisés de façon détaillée sur le plan fonctionnel par expression dans l'ovocyte de Xénope, sont tous sélectifs de Na^+ (Uozumi *et al.*, 2000; Berthomieu *et al.*, 2003; Ren *et al.*, 2005; Jabnune *et al.*, 2009). L'appartenance à cette sous-famille sur la base d'une analyse phylogénétique et l'absence ou présence de la glycine « poinçon » dans le filtre de sélectivité conduit à présumer l'existence d'une forte sélectivité en faveur de Na^+ chez les transporteurs non encore caractérisés sur le plan fonctionnel (Platten *et al.*, 2006). Cependant, plusieurs travaux suggèrent l'existence de transporteurs dotés d'une perméabilité à K^+ significative au sein de la sous-famille 1 de dicotylédones (Fairbairn *et al.*, 2000; Su *et al.*, 2003; Ali *et al.*, 2012).

Chez Arabidopsis et le riz, des travaux indiquent que les gènes *HKT* sont impliqués dans la résistance au stress salin, notamment en contrôlant l'accumulation de Na^+ (Mäser *et al.*, 2002a; Berthomieu *et al.*, 2003; Ren *et al.*, 2005). Ces gènes sont exprimés dans le parenchyme xylémien racinaire et dans le phloème des racines et des parties aériennes. Ils préservent les parties aériennes d'une suraccumulation de Na^+ , en limitant le flux de sodium transporté jusqu'aux parties aériennes ou en remettant en circulation dans le phloème l'excès de Na^+ dans les parties aériennes (Berthomieu *et al.*, 2003; Sunarpi *et al.*, 2005). La mutation de gènes *HKT* induit une plus grande sensibilité au stress salin (Mäser *et al.*, 2002a; Berthomieu *et al.*, 2003; Davenport *et al.*, 2007). Plusieurs membres de la sous-famille 1 des HKT de dicotylédones ou mono-cotylédones sont associées à des QTL de résistance au stress salin, notamment par le contrôle du ratio Na^+/K^+ des teneurs foliaires en K^+ et Na^+ (Ren *et al.*,

2005; Huang *et al.*, 2006; Byrt *et al.*, 2007; Asins *et al.*, 2013). Le rôle de la sous-famille 2 des transporteurs HKT est beaucoup moins clair. Chez le riz, *OsHKT2;1* est fortement exprimé dans les cellules périphériques de la racine et crée ainsi une voie d'entrée pour l'absorption de Na^+ . Ce transporteur semble aussi impliqué dans la croissance sous carence en K^+ (Horie *et al.*, 2007). Son rôle dans l'absorption de K^+ n'a pas été analysé. Un rôle dans l'absorption de K^+ par la racine peut par contre être très raisonnablement proposé pour *OsHKT2;4*, puisque ce transporteur présente une forte perméabilité à K^+ et qu'il est exprimé lui aussi dans les couches cellulaires périphériques de la racine (Lan *et al.*, 2010; Horie *et al.*, 2011; Sassi *et al.*, 2012).

1.3.2. Les canaux perméables à Ca^{2+}

L'analyse par électrophysiologie des conductances de la membrane plasmique chez *A. thaliana* (et également chez *M. truncatula*) a permis d'identifier des conductances perméables à Ca^{2+} . Ces dernières peuvent être activées par une dépolarisation de la membrane, ou par une hyperpolarisation de la membrane ou par des ligands. Les gènes responsables de ces conductances sont encore très mal identifiés. Deux grandes familles de protéines sont fréquemment proposées dans la bibliographie comme susceptibles de constituer des canaux perméables à Ca^{2+} : la famille des GLR (Glutamate Like Receptors) et la famille des CNGC (Cyclic Nucleotide Gated Channels) (Hedrich, 2012). Ces deux familles ont des homologues très bien caractérisés chez les animaux. Les récepteurs ionotropes du glutamate animaux (iGluR) sont des canaux cationiques peu sélectifs. Ils sont souvent perméables au K^+ , Na^+ et Ca^{2+} . Ils sont impliqués dans la signalisation électrique au niveau des synapses du système nerveux central ou des organes sensoriels périphériques. Les canaux CNGC animaux présentent une faible sensibilité au voltage et sont activés par la fixation de nucléotides cycliques. Ils sont perméables à Ca^{2+} , avec une faible sélectivité ionique, et participent à la transduction électrique de différents signaux sensoriels (olfactifs, visuels, gustatifs...) dans les épithéliums impliqués dans ces fonctions (rétine... ; Kaupp et Seifert, 2002).

1.3.2.1. La famille des GLR chez les plantes

La famille des canaux GLR d'*A. thaliana* a pu être identifiée par analyse *in silico* du génome d'*A. thaliana*. Elle est composée de 20 membres homologues des récepteurs ionotropes du

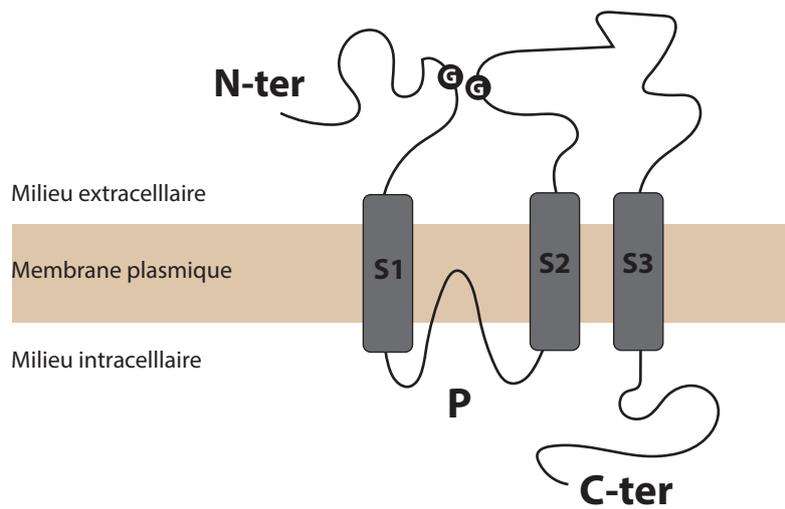


Figure I.16 : Topologie des canaux GLR (Glutamate-Receptor-like channels).

Chaque canal présente 3 domaines transmembranaires (S1 à S3), un domaine pore situé entre le domaine S1 et S2 et un domaine de liaison au glutamate situé du côté externe de la membrane. Ce domaine de fixation au glutamate est constitué par deux sites (G), le premier est situé sur l'extrémité N-terminale et le second sur la boucle extracellulaire entre les domaines S2 et S3. L'extrémité N-terminale (N-ter) est située dans le milieu extracellulaire et l'extrémité C-terminale (C-ter) dans le milieu intracellulaire.

glutamate (iGluR) exprimés dans les synapses d'animaux. Ces récepteurs transforment de façon extrêmement rapide un message présynaptique chimique en message post-synaptique électrique (Lacombe *et al.*, 2001).

Chez tous les organismes procaryotes et eucaryotes, des membres de la famille des récepteurs du glutamate sont présents. Cette famille serait issue d'un gène initial qui résulterait d'une fusion entre une séquence codant un canal potassique homologue du canal bactérien KcsA (Doyle, 1998) à 2 segments transmembranaires et une séquence codant une protéine périplasmique affine d'un substrat (Price *et al.*, 2012).

Chez les animaux, la protéine est formée de 3 domaines transmembranaires (S1 à S3) et d'un domaine pore (P) (Figure I.16). La région N-terminale (N-ter) est située sur la face externe de la membrane. C'est dans cette région de la protéine que la première partie du domaine de fixation au glutamate est située, la deuxième partie de ce domaine étant localisée entre les segments transmembranaires S2 et S3. Le domaine pore (P) est situé entre les segments transmembranaires S1 et S2 (Figure I.16) et s'insère dans la membrane à partir de la face interne de la membrane. La protéine fonctionnelle a une structure homo- ou hétéro-tétramérique. La voie de perméation, qui détermine la sélectivité ionique du canal, est formée par l'agencement des 4 domaines P de la protéine. La fixation du glutamate sur son domaine de liaison entraîne un changement de conformation qui active le canal. Les caractérisations électrophysiologiques des iGluR animaux ont permis de déterminer que ces canaux sont perméables à K^+ , Na^+ et Ca^{2+} . Dans les conditions *in vivo*, la sélectivité ionique précise dépend des sous-unités constitutives (Dietrich *et al.*, 2010).

Les connaissances concernant les GLR végétaux sont beaucoup plus réduites. La structure des protéines GLR végétales apparaît semblable à celle de leurs homologues animaux, avec cependant une grande différence entre ces deux sous-familles au niveau du domaine P (Price *et al.*, 2012). L'extrapolation des données obtenues avec les iGluR aux canaux GLR végétaux est très risquée, notamment concernant leur sélectivité ionique.

Jusqu'à présent, l'expression en ovocyte de Xénope et la caractérisation de façon détaillée par des techniques d'électrophysiologie sont restées des approches relativement peu fructueuses dans le cas des GLR végétaux. Des constructions génétiques codant des protéines chimériques intégrant le domaine P d'origine végétale (issu de *AtGLR1.1* et

AtGLR1.4) à une séquence iGluR d'origine animale ont cependant été créées et exprimées en ovocyte de Xénope pour être caractérisées par les techniques d'électrophysiologie. Comme les iGluR animaux, ces protéines chimériques sont perméables à Na^+ , K^+ et Ca^{2+} (Tapken et Hollmann, 2008; Tapken *et al.*, 2013). Ce travail suggère donc que les GLR végétaux présentent des propriétés de perméabilité semblables à celles des iGluR animaux. Cette hypothèse est confortée par une série de résultats obtenus pour le GLR végétal *AtGLR3.4*, d'*Arabidopsis thaliana*. Ce GLR a pu être exprimé dans des cellules HEK en culture, et son adressage à la membrane plasmique a pu être démontré. Des courants activés par l'addition dans la solution extérieure d'acides aminés (Asn, Ser, Gly, Glu, Ala, par ordre décroissant dans leur capacité d'activation du courant) ont pu être mis en évidence. Ces courants sont responsables d'une augmentation de la concentration cytoplasmique de Ca^{2+} dans les cellules HEK (Vincill *et al.*, 2012). L'activation de canaux GLR *in planta* pourrait donc être responsable de la dépolarisation de la membrane cellulaire et de l'augmentation de la concentration de Ca^{2+} dans le cytoplasme observées en réponse à l'addition d'acides aminés dans le milieu extérieur (Dennison et Spalding, 2000; Qi *et al.*, 2006). Récemment, le canal *AtGLR1.4* a pu être exprimé en ovocyte de Xénope. Il génère dans ce système d'expression hétérologue une conductance ligand-activable, conduisant des courants cationiques entrants avec une faible sélectivité : il est perméable aux cations monovalents Na^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+ , et NH_4^+ , et présente également une perméabilité à Ca^{2+} . Un large éventail d'acides aminés sont capables de l'activer (Tapken *et al.*, 2013).

Les 20 gènes *GLR* de la famille d'*A. thaliana* peuvent être classés en trois sous-groupes. Pour déterminer si les membres de ces sous-groupes s'associent dans des fonctions communes, une analyse *in planta* de l'expression de la famille complète des *AtGLR* a été réalisée par Chiu *et al.*, (2002). Les trois sous-groupes ne présentent pas de patron d'expression sous-groupe spécifique.

Tous les *AtGLR* sont exprimés dans les racines et 5 *GLR* du sous-groupe II sont exclusivement exprimés dans les racines (*AtGLR2.1*, *2.2*, *2.3*, *2.6* et *2.9*). Le fait que ces GLR soient fortement exprimés dans les racines pourrait leur permettre de jouer des rôles importants dans différents processus de transport membranaire d'ions et/ou de signalisation et développement racinaires. La redondance d'expression de GLR dans des tissus racinaires suggère aussi que ces canaux pourraient interagir entre eux et partager des

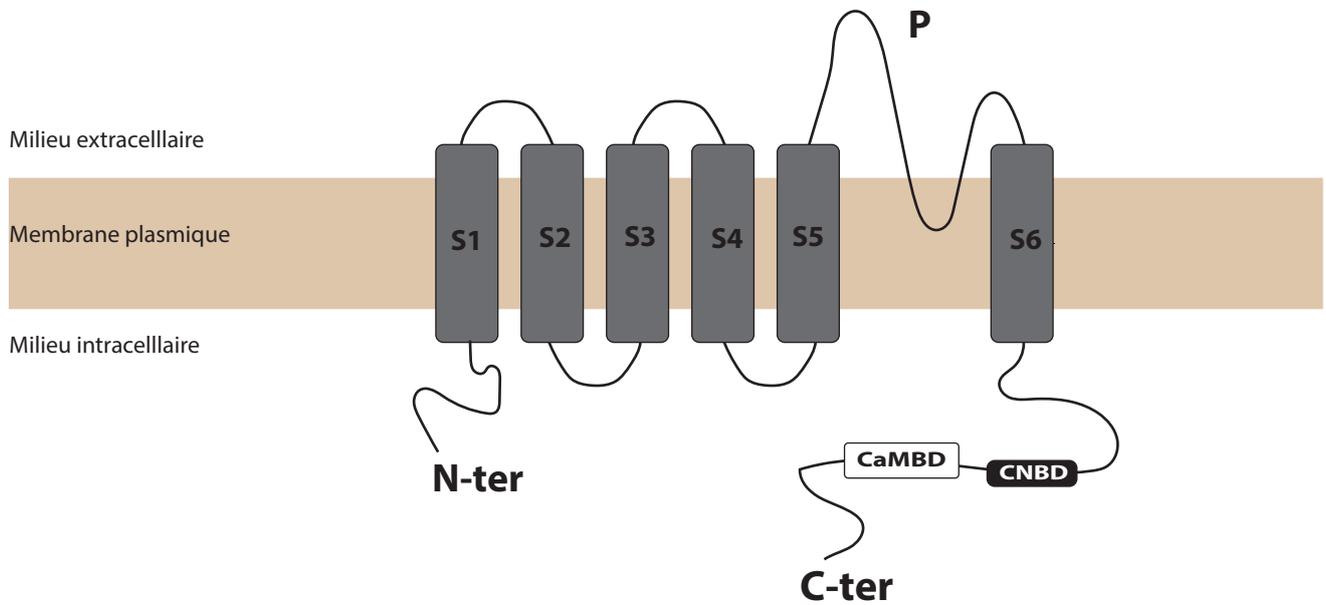


Figure I.17 : Topologie des canaux CNGC (Cyclic Nucleotide-Gated Channels).

Chaque canal présente 6 domaines transmembranaires (S1 à S6), un domaine pore (P) situé entre le domaine S5 et S6, un domaine de liaison aux nucléotides cycliques (CNBD) et un domaine de liaison à la calmoduline (CaMBD). Les extrémités N-terminale (N-ter) et C-terminale (C-ter) sont situées dans le milieu intracellulaire.

rôles physiologiques communs *in planta* (Jammes *et al.*, 2011). Les gènes *AtGLR3.2* et *AtGLR3.4* sont principalement exprimés dans les cellules du phloème. Il a été démontré que ces deux protéines GLR sont localisées sur la membrane plasmique et capables de s'assembler pour former des canaux hétéromériques dans les cellules de feuille de *Nicotiana benthamiana*. La mutation d'un de ces canaux ou des deux engendre le même phénotype chez la plante, qui présente une surproduction et un placement aberrant des primordia de racines latérales. Ces résultats suggèrent qu'*AtGLR3.2* et *AtGLR3.4* sont des récepteurs actifs à la surface des cellules du phloème et participent à des processus de régulation du développement de racines latérales impliquant une signalisation calcique et une sensibilité aux acides aminés apoplastiques (Vincill *et al.*, 2013). La surexpression d'*AtGLR3.1* induit une réduction de la fermeture des stomates impliquant la signalisation calcique (Cho *et al.*, 2009). Une étude récente met en évidence que *AtGLR1.2* et *AtGLR3.7* permettent un influx de Ca^{2+} à travers la membrane plasmique, ce qui influence le gradient apical de la concentration en Ca^{2+} ayant pour conséquence d'affecter la croissance du tube pollinique (Michard *et al.*, 2011). En résumé, toutes ces études mettent en évidence que les GLR sont impliqués dans divers processus de signalisation et de développement.

1.3.2.2. La famille des CNGC

Les canaux CNGC ont une structure très similaire de celle des canaux Shaker. Chaque protéine présente un cœur hydrophobe constitué de 6 segments transmembranaires (S1 à S6) et un domaine pore (P) situé entre S5 et S6 (Figure I.17). Les parties N-terminale (N-ter) et C-terminale (C-ter) sont situées sur la face cytosolique de la protéine (Figure I.17). Deux domaines de régulation sont situés sur la partie C-terminale : le CNBD et le CamBD (Figure I.17) (Kaplan *et al.*, 2007; Jammes *et al.*, 2011). Le CNBD (Cyclic Nucleotide Binding Domain) est un domaine de liaison aux nucléotides cyclique et le CamBD (Calmodulin Binding Domain) est un domaine de liaison à la calmoduline. Chaque canal fonctionnel est composé de quatre sous-unités pour former une structure tétramérique. La voie de perméation est située au centre du complexe. Elle est structurée par les 4 domaines P, qui déterminent ainsi la sélectivité ionique du canal. Chez *A. thaliana*, la famille des canaux CNGC est composée de 20 membres, organisés en 5 sous-familles (Maser, 2001).

Tout comme les iGluR, les CNGC animaux ont pu être exprimés en système d'expression hétérologue, notamment l'ovocyte de Xénope, et caractérisés en détail par

électrophysiologie. Par contre, tout comme les GLR végétaux, les CNGC végétaux sont encore très mal caractérisés sur le plan fonctionnel : cela s'explique en particulier par le fait que l'expression de ces protéines dans les systèmes hétérologues classiques (*e.g.*, oocyte de Xénope) se révèle fréquemment très problématique et ne permet pas d'analyser l'activité de ces protéines de façon aussi univoque que dans le cas d'autres systèmes de transport ionique membranaire végétaux, comme les transporteurs HKT ou certains canaux Shaker. Il est important aussi de noter que la séquence P des CNGC n'est pas conservée entre règne animal et règne végétal, ce qui empêche toute extrapolation des résultats entre les deux règnes (Spalding et Harper, 2011).

Des analyses génétiques ayant concerné des CNGC chez *A. thaliana* appuient l'hypothèse que ces canaux sont perméables à Ca^{2+} . La mutation d'*AtCNGC2* et *AtCNGC4* (Clough *et al.*, 2000; Balagué *et al.*, 2003) dérégule la réponse hypersensible et la mort cellulaire programmée en réponse à des bactéries pathogènes. Ce phénotype a été appelé « Defense, No Death ». Ces mécanismes impliquent des flux transmembranaires de Ca^{2+} (Moeder *et al.*, 2011). Divers autres travaux, *in planta* ou en systèmes hétérologues, fournissent aussi des arguments en faveur de l'hypothèse que les canaux CNGC sont perméables aux Ca^{2+} . (i) La mutation d'*AtCNGC2*, *AtCNGC5* et *AtCNGC6* affecte le courant calcique induit par les nucléotides cycliques dans les cellules de gardes (Ali *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2013). (ii) La concentration intracellulaire dans *E. coli* est augmentée par l'expression d'*AtCNGC18*. (iii) L'expression d'*AtCNGC2* dans des cellules HEK (Human Embryonic Kidney cells) conduit à une augmentation de leur concentration cytosolique en Ca^{2+} après traitement par des nucléotides cycliques (Leng *et al.*, 1999). (iv) La diminution du niveau d'expression d'*AtCNGC10* induit une réduction des influx de Mg^{2+} , Ca^{2+} et H^+ dans les cellules apicales racinaires (Guo *et al.*, 2010).

Il a été aussi observé que l'expression de CNGC végétaux peut compléter des bactéries ou levures déficientes pour l'absorption de K^+ , Na^+ ou Ca^{2+} , ce qui indique que ces canaux présentent une perméabilité à ces ions. Des résultats similaires ont également pu être obtenus en système d'expression hétérologue, notamment dans les cellules HEK. Généralement, les canaux CNGC, dont le filtre de sélectivité dans le domaine pore contient la séquence GQN, sont perméables au Ca^{2+} , ce qui est le cas d'*AtCNGC1*, *2*, *10*, *11*, *12* et *18* (Jammes *et al.*, 2011). Plusieurs membres sont aussi capables de transporter K^+ : *AtCNGC1*,

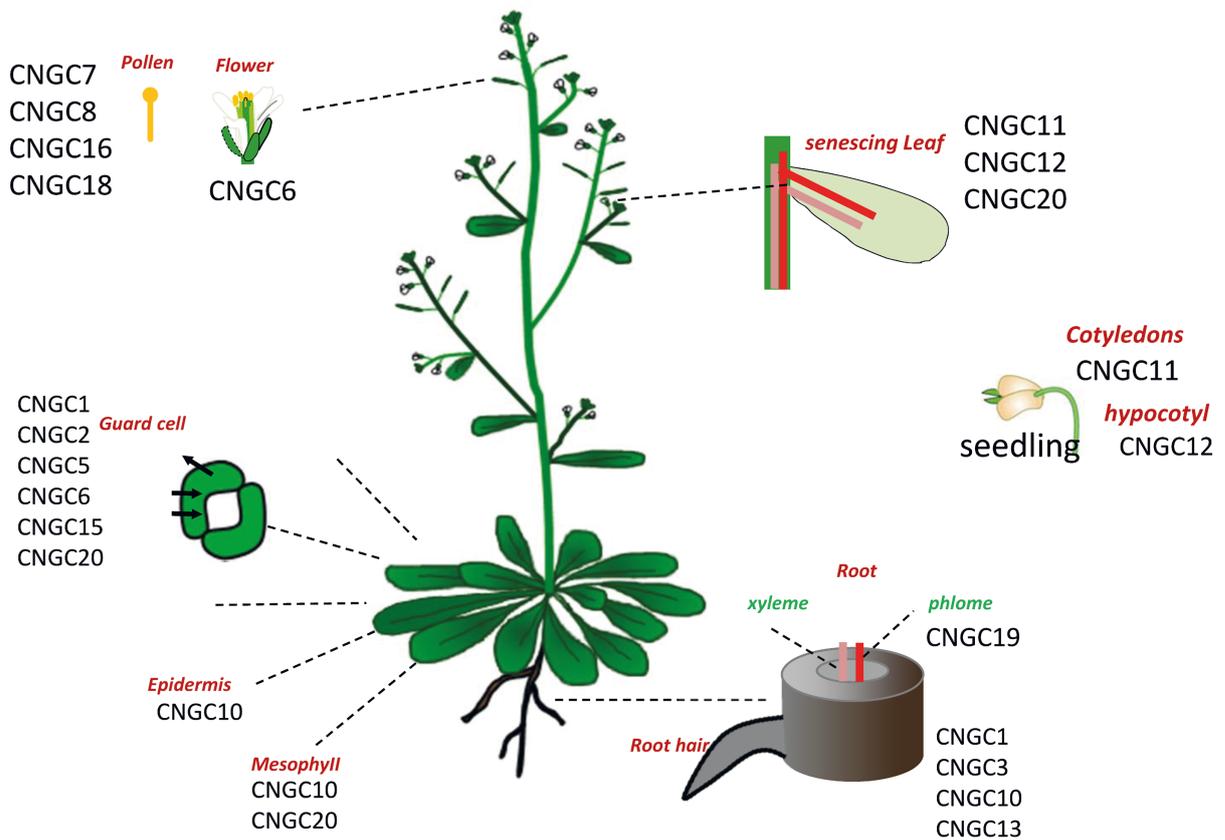


Figure I.18 : Localisation de l'expression des canaux CNGC chez *A. thaliana*

Représentation de l'expression des canaux CNGC dans les différents organes chez *A. thaliana*. Cette synthèse se base sur la littérature concernant les CNGC d'*Arabidopsis* qui est présentée dans le paragraphe I.3.2.2.

D'après Wang (2015).

2, 3, 4, 10, 11 et 12 (Balagué *et al.*, 2003; Hua *et al.*, 2003; Gobert *et al.*, 2006; Yoshioka *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2010). Seulement 3 CNGC sont considérés comme perméables à Na^+ : *AtCNGC1*, 3 et 4 (Balagué *et al.*, 2003; Hua *et al.*, 2003; Gobert *et al.*, 2006). Curieusement *AtCNGC2* est capable de transporter des ions monovalents à l'exception du Na^+ et avec une plus forte perméabilité pour K^+ que pour Li^+ , Rb^+ et Cs^+ . Cette spécificité s'explique probablement par la séquence de son filtre de sélectivité dans le domaine pore, qui diffère de la séquence correspondante chez les autres CNGC (Jammes *et al.*, 2011).

Les résultats d'analyses de la localisation de l'expression des gènes *CNGC* chez *A. thaliana* sont présentés dans la Figure I.18. Dans leur ensemble, ces données suggèrent que chacun des membres de la famille des CNGC d'*A. thaliana* pourrait jouer un rôle physiologique différent, que ce soit dans des stress biotiques ou abiotiques. Par génétique inverse, un rôle d'*AtCNGC2* et *AtCNGC4* a été mis en évidence dans les réponses immunitaires de la plante (mécanismes de défense face aux pathogènes : « Defense no Death » DND genes ; Clough *et al.*, 2000; Balagué *et al.*, 2003). *AtCNGC11*, *AtCNGC12* et *AtCNGC20* pourraient également être impliqués dans le système immunitaire de la plante. L'expression constitutive en système hétérologue (feuilles de *N. benthamiana*) de ces CNGC induit des phénotypes de mort cellulaire (Yoshioka *et al.*, 2006; Urquhart *et al.*, 2007). Les gènes *AtCNGC5* et *AtCNGC6* sont fortement exprimés dans les cellules de gardes. Mais les mutants *atcngc5* et *atcngc6* ne présentent pas de défaut dans la fermeture des stomates en réponse à l'ABA, au CO_2 ou à la lumière (Wang *et al.*, 2013), suggérant que ces canaux ne sont pas essentiels dans la signalisation en réponse à ces stimuli. Néanmoins, *AtCNGC6* a été identifié comme acteur de l'adaptation au stress thermique (Gao *et al.*, 2012). *AtCNGC10* est retrouvé exprimé dans les feuilles (cellules de l'épiderme, du mésophylle et du parenchyme palisadique) mais également, et plus fortement, dans les racines (cellules méristématiques, de la columelle et de la coiffe; Christopher *et al.*, 2007). Ce canal pourrait jouer un rôle dans l'absorption de Na^+ et K^+ et/ou le transport à longue distance de ces ions (Guo *et al.*, 2008). *AtCNGC3* et *AtCNGC19* sont impliqués dans l'adaptation au stress salin et ils sont exprimés dans la racine (Gobert *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2008; Kugler *et al.*, 2009). Pour finir, la résistance des plantes à la toxicité des métaux lourds ou à de fortes concentrations de calcium implique les gènes *AtCNGC1* et *AtCNGC2* (Sunkar *et al.*, 2000; Chan *et al.*, 2003).

Enfin, il a été démontré que des CNGC peuvent aussi jouer un rôle dans les processus développementaux de la plante (Chan *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2006; Borsics *et al.*, 2007). *AtCNGC7* et *AtCNGC8* sont exprimés dans le pollen et nécessaires pour la fertilité de ce dernier (Tunc-ozdemir *et al.*, 2013). *AtCNGC18* est essentiel pour la croissance du tube pollinique (Zhou *et al.*, 2014).

I.4. Les objectifs de mon travail de thèse

Les travaux de recherche menés par notre équipe ont pour but d'identifier et caractériser à la fois au niveau moléculaire et fonctionnel les conductances potassiques, calciques et anioniques actives sur la membrane du poil absorbant de *M. truncatula* et impliquées dans la signalisation électrique précoce induite par la perception des facteurs Nods. Dans ce cadre général, le travail de thèse que ce manuscrit présente concerne deux familles de système de transport de K^+ , les Shaker et les HKT, et une famille de canaux potentiellement perméable au Ca^{2+} , les CNGC.

Le travail que j'ai conduit a eu 3 grands objectifs :

(1) L'analyse du rôle du canal Shaker MtSKOR exprimé dans les poils absorbants de *M. truncatula*. Ma contribution à cette étude, initiée dans notre équipe par la thèse d'Alice Drain (2015), a principalement porté sur la caractérisation du rôle *in planta* de MtSKOR lors de l'interaction symbiotique entre *M. truncatula* et *S. sinorhizobium*.

(2) L'étude de la famille des transporteurs HKT de *M. truncatula*. Les gènes *HKT* de *M. truncatula* ont été exprimés en ovocytes de Xénope puis caractérisés par la technique de voltage-clamp à deux électrodes. Le niveau d'expression de ces gènes a été analysé par Q-RT-PCR en réponse à des stress abiotiques (salin et sécheresse) dans un contexte d'interaction symbiotique entre *M. truncatula* et *S. sinorhizobium*. Je conduis actuellement des expériences utilisant le gène rapporteur GUS pour préciser le patron d'expression de ces gènes dans le nodule et la racine.

(3) L'analyse et la caractérisation de canaux candidats CNGC exprimés dans les poils absorbants de *M. truncatula*. Le rôle de CNGC candidats potentiellement exprimés sur la membrane plasmique des poils absorbants de *M. truncatula* a été initié par l'obtention et la caractérisation de lignées mutantes pour ces gènes. Ce travail sur les CNGC de *M. truncatula* concerne également la caractérisation fonctionnelle du canal MtCNGC15a. Ce dernier est

exprimé sur la membrane du noyau des poils absorbants de *M. truncatula* et participe aux oscillations de calcium nucléaires induites par la perception des facteurs Nods. Il a été exprimé en ovocytes de Xénope puis caractérisé par la technique de voltage-clamp à deux électrodes (Charpentier *et al.*, 2016).

Tableau II.1 : Caractéristiques des plasmides et souches bactériennes utilisés.

Plasmides	Caractéristiques	Origine
pGEM [®] -T Easy	Permet l'insertion rapide de fragment de PCR, identification visuelle des colonies possédant l'insert (enzyme de la bêta-galactosidase), résistance ampicilline	Promega
pGEMXho	Promoteur T7 pour la synthèse <i>in vitro</i> d'ARNm, séquence 3' UTR et 5' UTR de bêta-globine de Xénope autour d'un poly-linker	BPMP
pGEMXho+MtHKT 1.2	Vecteur pGEMXho avec l'insert de l'ADNc du gène <i>Medtr6g092840</i>	Ce travail
pGEMXho+MtHKT 1.4	Vecteur pGEMXho avec l'insert de l'ADNc du gène <i>Medtr6g09240</i>	Ce travail
pGEMXho+MtHKT 1.5	Vecteur pGEMXho avec l'insert de l'ADNc du gène <i>Medtr6g092970</i>	Ce travail
pGWB3 + pSKOR	Vecteur pGWB3 avec la région promotrice (2 kb) du gène <i>Medtr5g077770</i>	Drain 2015
Bactéries	Caractéristiques	Origine
One Shot [®] TOP10 Electrocomp [™] <i>E. coli</i>	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1</i> <i>nupG</i> Grande efficacité pour le clonage par électroporation, utilisées pour amplifier l'ADN plasmidique. Souche résistante à la Streptomycine.	Invitrogen
<i>S. meliloti</i> RM1021	Str ^R Souche de <i>Sinorhizobium meliloti</i> RM1021 sauvage	BPMP
<i>S. meliloti</i> RM1021 DsRed	Str ^R Souche de <i>Sinorhizobium meliloti</i> RM1021 modifiée génétiquement pour exprimer la protéine fluorescente DsRed	BPMP
<i>S. meliloti</i> RM2011 GFP	hemA::lacZ Tet ^R Souche de <i>Sinorhizobium meliloti</i> RM2011 modifiée génétiquement pour exprimer la protéine fluorescente GFP	LIPM
<i>S. meliloti</i> RM2011 LacZ	pHC41 Tet ^R Souche de <i>Sinorhizobium meliloti</i> RM2011 modifiée génétiquement pour exprimer la protéine β -galactosidase	LIPM
<i>R. Rhizogenese</i>	Str ^R + Kan ^R Souche d'agrobactérie <i>Rhizobium rhizogenes</i> Arqual	BPMP

Chapitre II : Matériel et méthodes

II.1. Description du matériel biologique

II.1.1. Souches bactériennes et plasmides utilisés

Les souches bactériennes et plasmides utilisés sont présentés dans le tableau II.1.

II.1.2. Milieux et conditions de culture pour les bactéries

Les quatre milieux de culture différents utilisés ont été sélectionnés selon le type de bactérie à cultiver.

- **Milieu TY** (tryptone-yeast extract-calcium chloride; Vincent, 1970) : bactotryptone 5 g/L, extrait de levure 3 g/L, $\text{CaCl}_2(2 \text{ H}_2\text{O})$ 0,87 g/L.

- **Milieu YM** (Yeast extract-Malt extract) : extrait de levure 3 g/L, extrait de malt 3 g/L, peptone 5 g/L, Glucose 10 g/L.

- **Milieu LB** (Lennox, 1955) : bactotryptone 10 g/L, extrait de levure 5 g/L, NaCl 10 g/L, pH ajusté à 7 avec NaOH 1 M.

- **Milieu SOC** : tryptone 2% (p/v), extrait de levure 0,5% (p/v), NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl_2 10 mM, MgSO_4 10 mM, glucose 20 mM.

Les milieux solides sont obtenus par addition de 16 g/L d'agar. Lorsque nécessaire, les milieux sont additionnés d'antibiotique de sélection. Les cultures bactériennes sont incubées une nuit à 37°C pour *E. coli* et un à deux jours à 30°C pour *S. meliloti*, soit sous agitation (170 rpm) en milieu liquide, soit sans agitation en milieu gélosé.

II.1.3. Matériel végétal

II.1.3.1. Germination des graines de *M. truncatula*

Les graines sont scarifiées dans de l'acide sulfurique (H_2SO_4) concentré à 95%, ce qui permet également de commencer la stérilisation des graines. Après rinçage dans de l'eau stérile, les

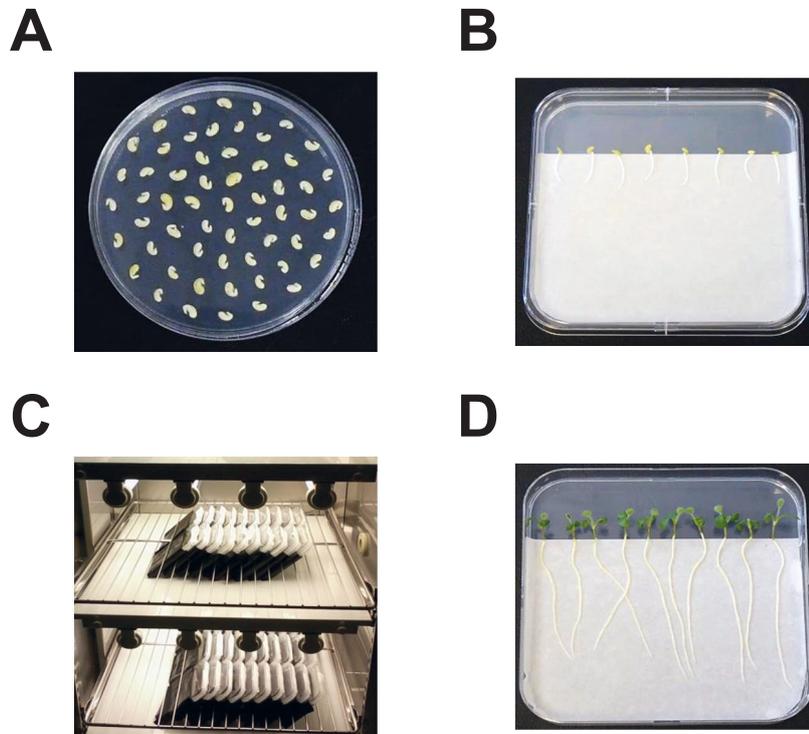


Figure II.1 : Culture *in vitro* de *M. truncatula*.

A : La germination des graines de *M. truncatula* se fait dans des boîtes de Petri contenant de l'eau gélosée (Agar 8 g/l) après scarification et stérilisation des graines. Dans le but de vernaliser les graines pour lever leur dormance, elles subissent un traitement par le froid : 2 à 3 jours à 4°C. Pour déclencher la germination, les graines sont placées à 21°C pendant 24 heures.

B : Le transfert des plantules se fait dans des boîtes de Petri carrées (12*12 cm), contenant du milieu Fahraeus solide. Les plantules ayant une racine bien droite d'environ 2 cm sont déposées sur du papier stérile qui empêche les racines de pénétrer dans la gélose.

C : Les boîtes de Petri sont recouvertes d'une poche plastique opaque sur les 3/4 inférieurs pour protéger les racines d'un stress lumineux. Les boîtes sont placées dans un cabinet de culture.

D : Dans ces conditions les racines poussent d'environ 8 cm en 5 jours de croissance.

graines sont placées 1 à 3 min dans de l'eau de Javel pour poursuivre la stérilisation. Elles sont rincées une deuxième fois abondamment à l'eau stérile puis déposées sur boîtes de Petri contenant de l'eau gélosée (Agar 8 g/L) (Figure II.1 A). Elles sont laissées à germer à 4°C et à l'obscurité pendant 1 à 3 jours, puis à 20°C et toujours à l'obscurité pendant minimum 24 heures.

II.1.3.2. Culture *in vitro*

Des boîtes de Petri carrées (12*12 cm) contenant du milieu Fahraeus solide (MgSO₄ 0.5 mM, KH₂PO₄ 0.7 mM, Na₂HPO₄ 0.8 mM, CaCl₂ 1 mM, citrate ferrique 20 µM ; MnSO₄, CuSO₄, ZnSO₄, H₃BO₃ et Na₂MoO₄ 0.1 µg/L, agar 1.5%, pH ajusté à 7.5 avec KOH) sont utilisées pour la culture *in vitro* de *M. truncatula*. Les plantules possédant une racine d'environ 2 cm sont repiquées sur le milieu solide (Figure II.1 B). La boîte est fermée avec du scotch micropore et la partie inférieure est recouverte d'un plastique noir afin de protéger les racines d'un stress par la lumière. Les boîtes sont placées dans un cabinet dédié à la culture *in vitro* (Figure II.1 C) dans les conditions suivantes : 70% d'hygrométrie, 70 µmol.m⁻².s⁻¹ d'intensité lumineuse et photopériode de type « jours longs » avec 16 heures d'éclairage avec une température de 25°C et 8 heures d'obscurité à 21°C.

II.1.3.3. Culture sur sable et vermiculite

Le fond des pots de dimensions 6*6*8 cm (respectivement largeur*longueur*hauteur) est recouvert d'une mousseline à maillage très fin afin de permettre l'écoulement de la solution nutritive tout en empêchant la fuite des grains de sable du substrat (Figure II.2). Chaque pot est rempli d'un mélange de sable et vermiculite dans des proportions volumiques 3 : 1 (sable : vermiculite). Le substrat est hydraté avec une solution nutritive (milieu Fahraeus liquide). Après germination sur boîte d'Agar (Figure II.2) les plantules ayant une racine d'environ 2 cm sont déposées dans le substrat préalablement creusé par introduction d'un cône de micropipette d'un millilitre. Pendant les deux premiers jours après le transfert, les pots sont recouverts de film étirable transparent afin de maintenir une forte hygrométrie. La croissance se fait dans une chambre de culture à 70% d'humidité relative, une intensité lumineuse comprise entre 250 et 300 µmol.m⁻².s⁻¹ et une photopériode de type « jours longs » avec 16 heures d'éclairage à 25°C et 8 heures d'obscurité à 23°C. Les plantes sont arrosées avec une solution nutritive (milieu Fahraeus liquide) une fois par semaine puis deux fois par semaine pour des plantes plus âgées (après 3 semaines de culture).

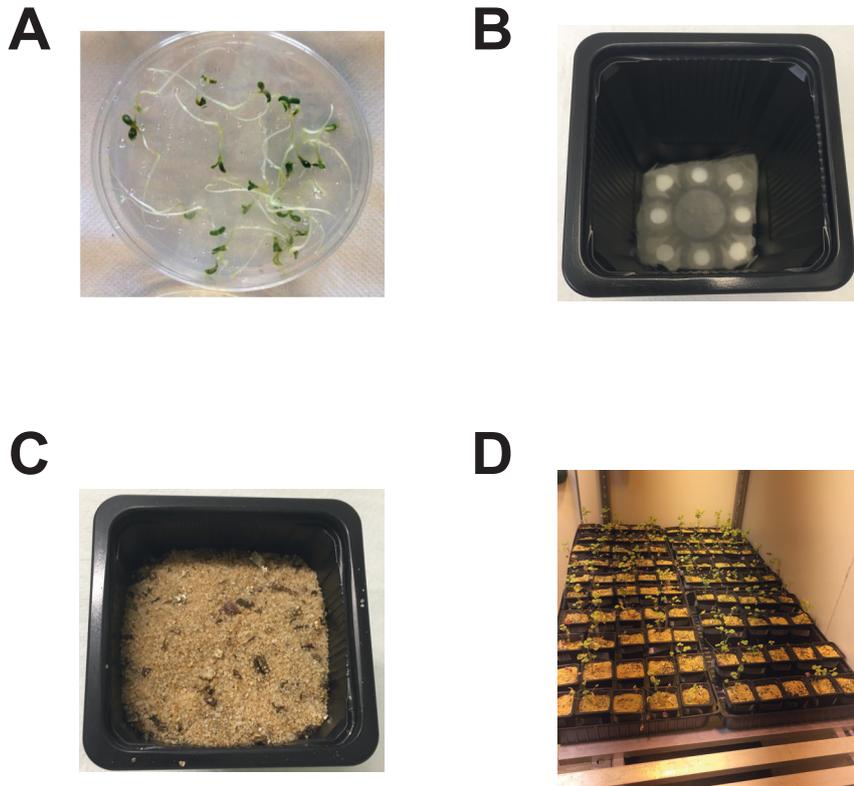


Figure II.2 : Culture de *M. truncatula* sur sable et vermiculite.

A : La germination des graines de *M. truncatula* se fait dans des boîtes de Pétri contenant de l'eau gélosée (Agar 8 g/l) après scarification et stérilisation des graines. Dans le but de vernaliser les graines pour lever leur dormance, elles subissent un traitement par le froid : 2 à 3 jours à 4°C. Pour déclencher la germination, les graines sont placées à 21°C pendant 24 heures.

B : Le fond du pot est recouvert d'un tissu au maillage très fin empêchant le sable de sortir de celui-ci.

C : Les plantes sont cultivées dans des pots individuels de 6*6*8 cm. Le pot est rempli du mélange de sable et vermiculite.

D : Les plantes sont disposées de façon aléatoire dans la chambre de culture. Tous les 3 jours, une rotation est effectuée pour éviter tout effet de positionnement.

II.1.3.4. Culture sur terreau

Pour l'amplification des différentes lignées de *Medicago truncatula*, les plantes sont cultivées en serre. Les plantules sont transférées de façon progressive dans des pots de plus en plus grands jusqu'à atteindre un volume d'environ 1,5 L. Les pots sont remplis de terreau additionné de sable pour assurer un meilleur drainage. Les plantes sont arrosées une à deux fois par semaine en alternant 1 semaine sur 2 un arrosage avec une solution nutritive commerciale et un arrosage avec de l'eau.

II.1.3.5. Culture hydro-aéroponique

Après germination, les plantules sont transférées dans bouteilles en verre de 250 ml. Ces dernières sont enveloppées de papier aluminium pour protéger les racines d'un stress par la lumière. Les plantules passent à travers un trou fait dans un bouchon en caoutchouc et du coton empêche les plantules de tomber. Le système racinaire trempe dans une solution nutritive (K_2SO_4 0,7 mM, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 mM, $CaCl_2$ 1,65 mM, Fe 22.5 μM , Mn 6,6 μM , Bo 4 μM , Cu 1.5 μM , Zn 1,5 μM) dont le pH est maintenu à 7 grâce à l'ajout de $CaCO_3$ 0,2 g.l⁻¹. Les deux premières semaines, la solution est additionnée d'urée 1 mM et de KH_2PO_4 30 μM . Par la suite la solution nutritive est renouvelée chaque semaine et additionnée de KH_2PO_4 30 μM . Après les deux premières semaines de croissance, chaque bouteille est reliée au système d'aération (400 ml.min⁻¹). Un tube plastique connecté au système de distribution plonge dans chaque bouteille pour faire « buller » la solution. Les plantes sont inoculées lors de leur transfert en bouteille puis à chaque changement de solution jusqu'à l'apparition des nodules. L'inoculation est faite avec la souche de *S. meliloti* RM2011 GFP. La DO600 de l'inoculum final est comprise entre 10^{-2} et 10^{-3} . Le nombre de nodules est déterminé tout au long de la culture par observation du système racinaire. Les plantes sont récoltées à l'apparition de la première gousse. Le poids frais ainsi que le poids sec des parties aériennes, racinaires et nodulaires sont déterminés.

II.1.3.6. Inoculation des racines de *M. truncatula* par des rhizobia

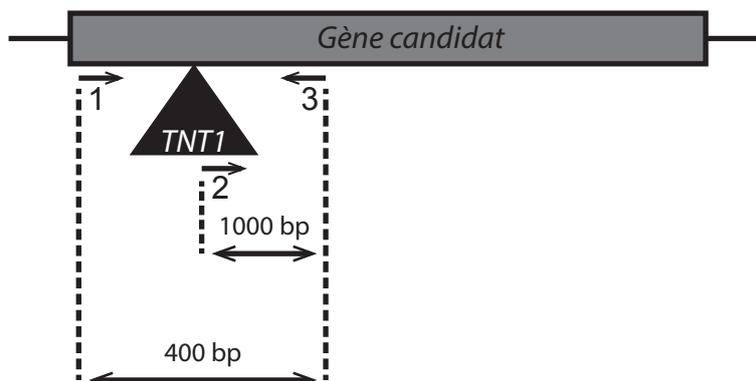
Pour les inoculations sur le mélange sable-vermiculite, la souche de *Sinorhizobium meliloti* Rm1021 a été utilisée pour les inoculations. Une pré-culture dans du milieu TY liquide supplémenté de streptomycine à 50 $\mu g.ml^{-1}$ est lancée J-2 avant l'inoculation. Après 24 heures d'incubation (J-1) à 30°C sous agitation forte, la pré-culture permet l'ensemencement d'un plus grand volume de milieu TY liquide supplémenté de

streptomycine à $50 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. Le jour de l'inoculation, lors que la DO600 (l'absorbance à 600 nm) de la culture bactérienne est comprise entre 0.8 et 1.2, les bactéries sont récoltées par centrifugation pendant 15 minutes. Elles sont ensuite resuspendues dans du milieu Fahraeus. Ce processus de centrifugation/resuspension est répété 2 fois supplémentaires pour éliminer l'antibiotique de la suspension bactérienne. La DO600 de l'inoculum final est comprise entre 10^{-2} et 10^{-3} . Chaque plante est arrosée avec 70 ml d'inoculum.

Pour les inoculations de plantes cultivées *in vitro*, la souche de *Sinorhizobium meliloti* utilisée est Rm2011 *LacZ*. Une culture dans 10 ml de TY supplémenté de tétracycline à $10 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ est lancée 24 heure avant l'inoculation. Les bactéries sont lavées et récupérées par centrifugation. Elles sont reprises dans un volume de milieu Fahraeus tel que la DO600 de cet inoculum final est voisine de 10^{-2} . Les plantules sont inoculées après 2 jours de croissance. Pour cela, chaque plante reçoit environ 50 μl d'inoculum déposé au niveau de l'apex racinaire.

II.1.3.7. Transformation des racines de *M. truncatula*

D'après le protocole de Boisson-Dernier *et al.*, (2001). Après 24 heures de germination, les plantules de *M. truncatula* possédant une radicule d'environ 1 cm sont prêtes à être transformées. L'apex de la radicule, à environ 3 mm de l'extrémité, est sectionné à l'aide d'une lame de scalpel stérile. La surface sectionnée de la plantule est ensuite légèrement frottée sur les colonies de *R. rhizogenes* transformées avec la construction d'intérêt préalablement cultivées sur milieu TY solide. Les plantules sont ensuite déposées sur une boîte de Petri carrée (12 cm x 12 cm) contenant du milieu Fahraeus supplémenté de NH_4NO_3 à 1 mM et de Kanamycine à 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Les boîtes sont fermées avec du scotch micropore et la partie inférieure est recouverte d'une poche en plastique opaque. Pour favoriser l'agro-infection les boîtes sont placées dans une chambre de culture *in vitro* (70% d'hygrométrie, $70 \mu\text{E}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ d'intensité lumineuse et photopériode de 16 heures) à 21°C pendant une semaine. Pour favoriser ensuite l'élongation racinaire les boîtes sont placées dans un cabinet de culture à 25°C (70% d'hygrométrie, $70 \mu\text{E}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ d'intensité lumineuse et photopériode de 16 heures). Après 2 à 3 semaines de croissance, les racines transformées peuvent être criblées.

A**B**

Génotype au locus étudié	Taille du produit PCR	
	400 bp	1000 bp
Wild Type (WT)	+	-
Hémizygote (HE)	+	+
Homozygote (HO)	-	+

Figure II.3 : Génotypage des lignées mutantes de *M. truncatula* par insertion du rétrotransposon *TNT1*.

A : Représentation schématique de l'insertion du rétrotransposon de tabac (*TNT1*) dans le gène candidat. Les amorces permettant le génotypage de l'insertion sont positionnées sur le schémat. Les amorces sens 1 et antisens 3 encadrent le site d'insertion du *TNT1*, elles permettent d'amplifier un fragment d'environ 400 bp lorsque le *TNT1* n'est pas inséré dans le gène. Le programme de PCR utilisé ne permet pas une amplification d'ADN > à 1,5 kb, si le *TNT1* (mesure plus de 5 kb) est inséré dans la séquence du gène candidat, aucun fragment d'ADN ne peut être amplifié avec les amorces 1 et 3. L'amorce sens 2, spécifique de la région LTR (Long Terminal Repeat) du *TNT1* et l'amorce antisens 3 permettent l'amplification d'un fragment d'environ 1000 bp lorsque le *TNT1* est inséré dans la séquence du gène candidat.

B : Tableau récapitulatif des amplifications possibles en fonction du génotype des plantes. L'amplification d'une bande unique à 400 bp correspond à un génotype sauvage ou Wild Type (WT) pour l'insertion du *TNT1* dans le gène candidat. L'amplification de deux bandes correspond à un génotype hétérozygote (HE) pour l'insertion dans le gène candidat. Enfin l'amplification d'une bande unique à 1000 bp correspond à un génotype homozygote pour l'insertion dans le gène candidat.

II.2. Analyses réalisées sur les plantes de *M. truncatula*

Diverses lignées de *Medicago truncatula* provenant de différents fonds génétiques ont été utilisées. Les lignées et leurs caractéristiques, sont indiquées dans le tableau II.2.

II.2.1. Identification et génotypage des lignées mutantes

Les lignées de *Medicago truncatula* possédant une insertion du rétrotransposon *TNT1* dans un gène ciblé (dans une séquence exonique de préférence) sont identifiées par la technique de BLAST de la séquence codante du gène correspondant contre la banque de FST (Flanking Sequence Tag) disponible sur le site de la Noble Foundation (<https://medicago-mutant.noble.org/mutant/index.php>). Les graines reçues sont mises en culture pour être génotypées. Les plantes sont ensuite transférées en serre pour permettre leur amplification.

Les différentes lignées sont génotypées par PCR en utilisant l'enzyme Phire Hot Start II DNA Polymerase (Life Technologie). Ce kit permet d'amplifier par PCR la séquence cible sans passer par l'étape de purification de l'ADN génomique de chaque plante. Des disques de tissus foliaires prélevés sur de jeunes feuilles (à l'aide de cônes en plastique de micropipette de 10 µl utilisés comme emporte-pièce) fournissent la matrice des réactions de PCR. Les séquences des amorces utilisées sont présentées dans le tableau II.3. Pour chaque gène ciblé, un couple d'amorces sens et anti-sens entourant le site d'insertion du *TNT1* est conçu. Une troisième amorce sens située à la fin du rétrotransposon est également utilisée lors de la PCR de génotypage (Figure II.3).

II.2.2. Mise en place des expériences de phénotypage de la nodulation

Des graines de *M. truncatula* sauvages (A17 ou R108) et des graines homozygotes et sauvages concernant l'insertion du *TNT1* au locus étudié sont mises à germer et cultivées sur un substrat sable-vermiculite (Cf. § 1.3.1 et 1.3.3 de ce chapitre). Les plantes sont arrosées avec du milieu Fahraeus modifié, contenant de l'urée 1 mM lors de la première semaine. L'inoculation a lieu après une semaine de croissance (Cf. § 1.3.6 de ce chapitre). Les plantes sont ensuite récoltées à 7, 14 et 21 jours après inoculation (DPI, Day Post Inoculation). A partir de l'inoculation et jusqu'à la récolte les plantes sont arrosées avec du milieu Fahraeus modifié, ne contenant pas de source minérale d'azote. Les racines sont observées sous loupe binoculaire (Olympus SZ61) pour déterminer le nombre de nodules. Le poids frais ainsi que le poids sec des plantes sont ensuite déterminés.

Tableau II.2 : Caractéristiques des plantes utilisées

Plantes		Caractéristiques	Origine
<i>M. truncatula</i> - A17		Plante de <i>M. truncatula</i> sauvage, écotype A17	BPMP
<i>M. truncatula</i> - R108		Plante de <i>M. truncatula</i> sauvage, écotype R108	BPMP
Plantes mutées pour un gène candidat			
Plantes	Lignée	Caractéristiques	Origine
<i>M. truncatula</i> - MtSKOR - A17	NF9352	Insertion du rétrotransposon <i>TNT1</i> dans le gène <i>MtSKOR</i> (<i>Medtr5g077770</i>). Cette lignée présente au total 15 insertions qui ont été identifiées par amplification et séquençage des séquences bordantes du <i>TNT1</i> (FST, Flanking Sequence Tag).	Dr. Pascal Ratet - Noble Foundation
<i>M. truncatula</i> - MtSKOR - R180	NF21235	Insertion du rétrotransposon <i>TNT1</i> dans le gène <i>MtSKOR</i> (<i>Medtr5g077770</i>). Cette lignée présente au total 40 insertions qui ont été identifiées par amplification et séquençage des séquences bordantes du <i>TNT1</i> .	Noble Foundation
<i>M. truncatula</i> – MtCNGC 1b - R180	NF17083	Insertion du rétrotransposon <i>TNT1</i> dans le gène <i>MtCNGC 1b</i> (<i>Medtr7g117310</i>). Cette lignée présente au total 35 insertions qui ont été identifiées par amplification et séquençage des séquences bordantes du <i>TNT1</i> .	Noble Foundation
<i>M. truncatula</i> – MtCNGC 1a - R180	NF7899	Insertion du rétrotransposon <i>TNT1</i> dans le gène <i>MtCNGC 1a</i> (<i>Medtr1g028370</i>). Cette lignée présente au total 20 insertions qui ont été identifiées par amplification et séquençage des séquences bordantes du <i>TNT1</i> .	Noble Foundation
<i>M. truncatula</i> – MtCNGC 1a - R180	NF9524	Insertion du rétrotransposon <i>Tnt1</i> dans le gène <i>MtCNGC 1a</i> (<i>Medtr1g028370</i>). Cette lignée présente au total 3 insertions qui ont été identifiées par amplification et séquençage des séquences bordantes du <i>TNT1</i> .	Noble Foundation
<i>M. truncatula</i> – MtCNGC 1b - R180	NF4050	Insertion du rétrotransposon <i>Tnt1</i> dans le gène <i>MtCNGC 1a</i> (<i>Medtr3g091080</i>). Cette lignée présente au total 3 insertions qui ont été identifiées par amplification et séquençage des séquences bordantes du <i>TNT1</i> .	Noble Foundation

II.2.3. Dosage par spectrométrie de la teneur des plantes en Na⁺

Les racines, les nodules et les parties aériennes sont récoltés, pesés (poids frais) et mis à l'étuve à 70°C pendant plusieurs jours afin de les déshydrater complètement, avant d'être à nouveau pesés (poids sec). Les échantillons sont ensuite incubés dans de l'acide chlorhydrique 0,1 N pendant 24 heures pour extraire les ions. Les concentrations en K⁺, Ca²⁺ et Na⁺ des solutions d'extraction sont déterminées par spectrométrie de flamme en absorption atomique (spectrophotomètre 243 aa/ae, Instrumentation Laboratory Inc., Wilmington, MA).

II.2.4. Observation du nombre de cordons d'infection

Les cordons d'infection sont dénombrés après inoculation avec la souche de *S. meliloti* rm2011 *LacZ*. Cette souche permet l'utilisation du gène rapporteur *LacZ* pour visualiser les cordons d'infection.

II.2.4.1. Analyse histochimique de l'expression du gène rapporteur *LacZ*

Les racines prélevées sur les plantes transformées sont placées dans une solution de tampon Z' (tampon phosphate (KH₂PO₄-K₂HPO₄) 100 mM, KCl 10 mM, MgSO₄ 1 mM, pH 7,4). Les tissus sont ensuite fixés dans une solution de glutaraldéhyde (2,5% dans le tampon Z') sous vide pendant 1 heure et 30 minutes, puis rincés dans du tampon Z' avant d'être placés dans la solution de coloration (Tampon Z' additionné de ferricyanure 5 mM, ferrocyanure 5 mM et XGal 0,08%). La coloration se fait sous vide pendant 1 heure à température ambiante, puis toute la nuit à 28°C. Après rinçage dans du tampon Z', les tissus peuvent être conservés ainsi jusqu'à l'observation. Juste avant l'observation, les tissus sont décolorés pendant 1 minute dans de la javel 3,2%.

Analyse histochimique de l'expression du gène rapporteur *LacZ*

II.2.4.2. Observations microscopiques

Les racines sont observées entre lame et lamelle sous microscope (microscope Olympus BH-2 et caméra Olympus ColorView II). Les événements de colonisation par *S. meliloti* 2011 *LacZ* sont comptabilisés en observant la racine sur 9 cm de longueur depuis l'apex.

Tableau II.3 : Oligonucléotides utilisés pour le génotypage des différentes lignées.

Lignée	Oligonucléotides
NF9352	NF9352F : ATGAAGATGAAGGAGGAAGAGGA NF9353R : TCATGAAGAAGAGTTCGACGACT
NF21235	NF21235F : AGAGGGCTACACATGGATAGGA NF21235R : TCAGAGTTTCTTTCAATTGTTTCCC
NF17083	NF17083F : GGTTGGAGCTAACTGGTATCTG NF17083R : ACCCCACCAAAGCAGTAGAAG
NF7899	NF7899F : TTGATTTTGAAAGGGGACACATTTACC NF7899R : CTCCATGTATCAAACGAAGCACAAGC
NF9524	NF9524F : TTGATTTTGAAAGGGGACACATTTACC NF9524R : CTCCATGTATCAAACGAAGCACAAGC
NF4050	NF4050F : CTCCGTCGCTATCTCTGTAA NF4050R : AGTCATGATCGTGAGAAAGTTG
Tnt1	Tnt1F : TCCTCTGGATGAATGAGACTGG

II.2.5. Observation de l'expression *in planta* de *MtSKOR*

II.2.5.1. Analyse histochimique de l'expression du gène rapporteur *GUS*

Les racines prélevées sur les plantes transformées sont placées dans une solution de préfixation (tampon phosphate : $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ 50 mM pH 7, formaldéhyde 1.5% et Triton 5%). Une infiltration est réalisée pendant 5 minutes dans une cloche à vide, puis les échantillons sont laissés 45 minutes à température ambiante pour permettre la fixation des tissus. Avant l'étape de coloration, les tissus subissent trois lavages dans le tampon phosphate 50 mM pH 7. Les tissus sont ensuite placés dans la solution de coloration (tampon phosphate 50 mM pH 7, ferricyanide 0.5 mM, ferrocyanide 0.5 mM et X-Gluc 1 mM) préparé extemporanément. Une infiltration est réalisée pendant 30 minutes dans une cloche à vide, puis les échantillons sont mis à incuber à 37°C pendant 4 à 12 heures. Le mélange réactionnel doit être aéré au maximum pour favoriser la réaction d'oxydation. Les tissus colorés sont ensuite lavés dans le tampon phosphate 50 mM pH 7 pendant 5 minutes et placés dans une solution de fixation GUS-Fix (tampon phosphate 50 mM pH 7, formaldéhyde 2% et glutaraldéhyde 1%) pendant 24 heures afin de stopper les réactions métaboliques et fixer les protéines. Enfin, les échantillons sont déshydratés par des lavages successifs dans des solutions d'éthanol 50%, 70%, 95% et 100%.

II.2.5.2. Observations microscopiques

Les nodules sont découpés avec un vibratome (Micro-cut H1200 BIO-RAD). Des coupes longitudinales de 50 μm d'épaisseur sont réalisées. Les coupes sont observées entre lame et lamelle sous microscope (microscope Olympus BH-2 et caméra Olympus ColorView II).

II.3. Techniques de biologie moléculaire

II.3.1. Extraction d'ADN génomique

Les plantes entières sont congelées à l'azote liquide et broyées avec un Vibro-broyeur MM 400 (Retsch). L'ADN génomique est extrait et purifié à partir d'une aliquote de 80 mg de poudre végétale à l'aide du kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit de Promega selon le protocole décrit par le manuel du kit.

II.3.2. Extraction d'ARN

Les parties végétales récupérées sont congelées à l'azote et broyées avec un Vibro-broyeur MM 400 (Retsch). La poudre végétale récupérée est conservée à -80°C. A partir d'un aliquote

Tableau II.4 : Oligonucléotides utilisés pour les expériences de Q-RT-PCR des gènes de famille HKT de *M. truncatula*.

Gène	Oligonucléotides
<i>MtHKT 1;2</i> (<i>Medtr6g092840</i>)	qPCR F : TCTAGTGTGCATAACTGAGAGGA qPCR R : CCCTCATCACTCCATTTCCC 400 pb F : GTACCTTCCTCCTTACACCTCATTCC 400 pb R : TGATATGTGAAATTGATGATGAATCAGAG
<i>MtHKT 1;4</i> (<i>Medtr6g092940</i>)	qPCR F : TGTCGGAAAGCAGTGAGAGA qPCR R : TCGATGCAACTGTCGTTCCAC 400 pb F : GTACCTCCACCTTACACCTCATTC 400 pb R : TGGGTAGAATTGATATTCAAGAATCAG
<i>MtHKT 1;5</i> (<i>Medtr6g092970</i>)	qPCR F : TCCCCTCAACTTCAACGTCT qPCR R : AGCTTCCCTTCTGACTCCA 400 pb F : GTATCTCCACCGTACACAACATTTT 400 pb R : TGGAGAGAATTTTGACCCTGTTAGC
<i>TC77416</i> (<i>Medtr1g079510</i>)	qPCR F : ACGCGCTAATGATTCCAGTG qPCR R : AGTGTTGCTGTGTTCCAACG 400 pb F : GTTGGCTCATCCGACAGCTC 400 pb R : GGACGAAGCTCAATGGCAATC
<i>MtCNGC 1b</i> (<i>Medtr7g117310</i>)	F 1536 : GAAGAGCTGCATTGTTGCGGAAGA R 2012 : CCAAGGCTAATAGTTGACCCTTCCTC
<i>MtCNGC 1a</i> (<i>Medtr1g028370</i>)	qPCR F : ACAACACCAGATTGAAGGGCA qPCR R : TTTCGTA CTGGATT CATTGCTCC
<i>MtCNGC 1b</i> (<i>Medtr3g091080</i>)	F 1258 : AGAGATGCAGAACAGTGGATGTCG R 1738 : GAGTTTGGACAGTCCTGGTTGAGATG
<i>MtTubulline</i> (<i>Medtr8g107250</i>)	F : TGCCGAGCTCATTGACTTTG R : GTGAGCATCATTCGATCAGGG

de poudre végétale d'environ 120 mg, les ARN totaux sont extraits à l'aide du kit RNeasy® Plant Mini Kit de Qiagen, selon le protocole préconisé par le kit. La qualité des ARN extraits est vérifiée grâce à un NanoPhotometer® N50 (IMPLEN, Allemagne) en mesurant l'absorbance à 260 et 280 nm.

II.3.3. Rétro-transcription

Pour supprimer toute trace d'ADN résiduelle, les échantillons sont traités à la DNaseI. La rétro-transcription des ARN en ADN complémentaires simple brin est réalisée avec la transcriptase inverse SuperScript® III Reverse Transcriptase (Invitrogen) et une amorce (« primer ») oligo-dT qui s'hybride aux ARNm au niveau de leur extrémité 3' polyadénylée. La réaction de transcription est réalisée selon le protocole du kit.

II.3.4. Analyse de l'expression de gènes par Q-RT-PCR

L'analyse de l'expression des gènes de *M. truncatula* est réalisée avec une machine de Real-Time PCR (Q-RT-PCR) LightCycler® 480 (Roche Molecular Systems, USA). La réaction d'amplification par PCR sur les ANDc simple brin est réalisée avec 40 ng d'ARNc totaux, l'enzyme SYBR® Premix Ex Taq™ II (TAKARA Bio Inc) et des amorces spécifiques. Les séquences des amorces sont déterminées à l'aide du programme Primer3web (<http://primer3.ut.ee>). Elles sont présentées dans le tableau II.4. La réaction d'amplification est réalisée selon les recommandations du fabricant. Trois répliques techniques sont réalisés pour chacun des trois répliques biologiques. L'eau est utilisée comme contrôle négatif (en remplacement de la solution d'ADNc) pour la réaction. Le programme de PCR est le suivant : 95°C pendant 30 secondes, puis 40 cycles à 95°C pendant 10 secondes, 60°C pendant 10 secondes et 72°C pendant 15 secondes. Après chaque étape d'amplification, la fluorescence est mesurée. Une fois le programme d'amplification terminé, la fluorescence est mesurée de façon continue de 64°C à 95°C pour établir la courbe de dénaturation thermique.

L'expression de chaque gène a été normalisée par le niveau d'expression du gène *TC77416 (Medtr1g079510)*, qui a été montré comme ayant une expression constante dans différents tissus (Lohar *et al.*, 2006; Serwatowska *et al.*, 2014), ce que nous avons vérifié dans nos conditions expérimentales (résultats non illustrés). Les données obtenues sont analysées de façon manuelle et les calculs réalisés permettent d'estimer l'expression absolue ou relative selon le gène étudié.

Tableau II.5 : Oligonucléotides utilisées pour l'amplification des ADNc.

Gène	Oligonucléotides
MtHKT1;1 (<i>Medtr6g092820</i>)	F1 : CTAAATTAATACAAAAAGCAGAGATGAATATC F2 : GATGAATATCCTAAGCACTTCATGCC R2 : AATCAATGAAGCTTCCATGCTTTG R1 : AGAATTGATATTGATCATGAATCAATGAAG
MtHKT1;2 (<i>Medtr6g092840</i>)	F1 : TAGTCACTTGTGTATATTAAGAGAAAACAAATATG F2 : ATGCATATCTTAAATTCTTTTTTGAAAAAG R2 : AATCAGAGAAGTTTCCATGGCTTG R1 : TGATATGTGAAATTGATGATGAATCAGAG
MtHKT1;3 (<i>Medtr6g092890</i>)	F1 : CAACTAAACATAACACAGCATAACCATG F2 : GCATAACCATGAAGAACAACCTTTGG R2 : CTAGGACAAGTTCCATGCTTTGC R1 : CACAGCACTTAGATATGCTAGGACAAGT
MtHKT1;4 (<i>Medtr6g092940</i>)	F1 : CATTGCAACAAATCAAGATGGAGAT F2 : GATGGAGATCTTAGGTTGTTATATGAAAAAG R2 : ATATTCAAGAATCAGAGAAGTTTCCATG R1 : TGGGTAGAATTGATATTCAAGAATCAG
MtHKT1;5 (<i>Medtr6g092970</i>)	F1 : CTAAACACAAGAATGAAGAACTTTGGTAT F2 : ATGCCTTTCCACTTGATCTACATTC R2 : CTAGGACAGGTGCCATGCCTT R1 : TGGAGAGAATTTTGACCCTGTTAGC
MtCNGC 1a (<i>Medtr1g028370</i>)	F1 : CATAGGCTGCAGTTATGAGTACC F2 : ATGAGTACCTTTCAGCAAGAGAAGT R2 : TATTGTTTCATCATCAGTAAAGTTAGGTTCT R1 : CACATCAACTATACACTATTGTTTCATCATC
MtCNGC 1b (<i>Medtr7g117310</i>)	F1 : GGACTCAAACAGGTTTCTAATTTGATG F2 : GTTTCTAATTTGATGTTGAATTTTACAGGC R2 : AGCTAGGTCTAGTGTTTTTGAGC R1 : ACTTAAAATTCTTAGCTAGGTCTAGTGTT

II.3.5. Amplification des ADNc d'intérêt

Il est possible d'amplifier les gènes d'intérêt à l'aide d'amorces spécifiques à partir de ces ADNc simple brin. Deux PCR successives pour chaque ADNc d'intérêt peuvent être nécessaires pour amplifier les gènes d'intérêts. La première PCR est réalisée avec un couple d'amorces F1 et R1 s'hybridant dans les parties 3' et 5' UTR. La deuxième PCR utilise un second couple d'amorces F2 et R2 s'hybridant sur les codons START et STOP en direction du cadre de lecture du gène. Les séquences des différents couples d'amorces utilisés pour les différents gènes sont fournies dans le tableau II.5. Lors de ces PCR des enzymes avec une haute-fidélité ont été utilisées, principalement la iProof™ High-Fidelity DNA Polymerase (Bio-rad). Cependant, lors de difficultés parfois rencontrées pour amplifier les ADNc, l'enzyme Platinum® Pfx DNA Polymerase (Invitrogen) a également été utilisée.

II.3.6. Ligation de l'ADNc avec un plasmide

La ligation permet l'insertion des fragments d'ADN amplifiés (ADNc) dans le plasmide. Le volume total est de 20 µl pour chaque ligation (2 µl de tampon, 1 µl de ligase, 1 à 5 µl d'insert, 1 à 5 µl de plasmide et H₂O qsp 20 µl). La durée d'incubation dépend de chaque enzyme : 10 min à 22°C pour la T4 DNA Ligase de ThermoScientific et 3 heures pour la ligase fournie par Promega.

II.3.7. Transformation des bactéries électrocompétentes

Cinquante µL d'une suspension de bactéries électrocompétentes (*E. coli* Top10) sont décongelés dans de la glace pendant environ 5 minutes, puis 1 à 2 µl d'ADN plasmidique ou de ligation sont ajoutés dans le tube et mélangés par pipetage, et le tout est laissé 1 minute supplémentaire dans la glace. Le mélange d'ADN et de bactéries est transféré dans une cuve d'électroporation préalablement refroidie dans la glace. Une décharge de 180 kV est imposée sur la cuve pendant un optimum de temps situé entre 3 et 5 ms par un électroporateur (MicroPulser™ Electroporator, Bio-Rad). Les bactéries sont re-suspendues immédiatement dans la cuve avec 1 ml de milieu LB. Le tout est ensuite incubé à 37°C sous agitation pendant 1 heure. Pour finir, 50 et 100 µl de la suspension bactérienne sont étalés sur milieu solide contenant l'antibiotique adapté et mis à l'étuve à 37°C pour 12 heures.

II.3.8. Criblage des bactéries transformées

Après 12 heures de croissance, la présence du plasmide désiré dans les bactéries présentes sur la gélose est vérifiée par PCR. L'enzyme utilisée est la GoTaq® polymérase (Promega). Les colonies positives sont repiquées dans 5 ml de milieu de culture liquide (LB), additionné de l'antibiotique adapté et incubé toute une nuit à 37°C, sous agitation. Le lendemain les stocks glycérolés sont préparés en ajoutant 600 µl de culture bactérienne à 600 µl de glycérol 40% stérile, et stockés à -80°C. Le reste de la culture bactérienne est gardé pour réaliser les extractions d'ADN plasmidique.

II.3.9. Minipréparations d'ADN plasmidique et séquençage

L'extraction et la purification des plasmides sont réalisées avec le kit PureYield™ Plasmid Miniprep System de Promage, selon le protocole décrit dans le manuel du kit. Les concentrations en ADN plasmidique sont ensuite déterminées par un NanoPhotometer® N50 (IMPLEN, Allemagne). Selon le besoin, une aliquote des plasmides est envoyée pour séquençage à une entreprise (Eurofins Genomics). Les plasmides amplifiés sont conservés à -20°C.

II.4. Analyse électrophysiologique par empalement de racines

II.4.1. Miniaturisation de la cuve contenant le segment de racine

Dans le but de réduire le volume de la cuve pour les mesures d'électrophysiologie sur racine de *M. truncatula* et ainsi optimiser les changements de solution de perfusion (contenant des facteurs Nods), une nouvelle cuve a été mise au point (Chapitre III, Figure III.5) Elle est fabriquée à partir d'une cuvette de spectrométrie de type UVette Eppendorf®. L'UVette est découpée à l'aide d'un scalpel chauffé avec un bec électrique, et la partie supérieure est enlevée ainsi que des languettes de plastique qui obstruent l'observation de la racine dans la cuve. Elle est ensuite percée de part et d'autre avec une pipette Pasteur et une aiguille chauffée pour permettre l'insertion des tuyaux d'entrée et de sortie de la solution de perfusion. Un troisième trou est réalisé pour permettre l'insertion de l'électrode de référence.

II.4.2. Enregistrements du potentiel de membrane

L'électrode de mesure du potentiel est insérée dans une micropipette de verre préalablement étirée (étireuse Narishige ELP.24) et remplie de KCl 3 M. L'ensemble du

dispositif de mesure (la cuve, la camera d'observation, le dispositif de perfusion de la cuve et les micromanipulateurs) est placé à l'intérieur d'une cage de Faraday sur une table anti-vibration. L'amplificateur utilisé est un Axopore 1A (Axon Instruments, USA). Il est relié à un ordinateur pour l'enregistrement grâce à un digitaliseur MiniDigi 1A (Axon Instruments, USA). L'acquisition et l'analyse des données sont réalisées à l'aide du logiciel pCLAMP 9.0 (Axon Instruments). Les expériences sont conduites à température ambiante (20 à 22°C).

Un segment de racine, d'un centimètre de long à partir de l'apex, est placé dans la cuve et maintenu sur le fond de la cuve grâce à deux points de vaseline. La perfusion de la cuve est démarrée avec la solution « matrice de base » contenant KCl 0.1 mM, CaCl₂ 0.1 mM, NaCl 0.1 mM et MES-BisTrisPropane 2 mM, pH 6,5. La solution de perfusion est changée une fois le potentiel de membrane stable. Les facteurs Nods (FNs) sont dilués dans la solution matrice de base à une concentration finale de 10⁻⁶ M. En fin d'enregistrement, pour s'assurer que l'électrode est bien dans une cellule et que la cellule a conservé sa capacité à réguler son potentiel de membrane en réponse à une modification de la solution extérieure, on utilise une solution de perfusion contenant du KCl 30 mM, dont on s'attend à ce qu'elle induise une forte dépolarisation de la cellule.

II.5. Analyse électrophysiologique par expression hétérologue en ovocyte de Xénope

II.5.1. Synthèse des ARNc des gènes canaux

La synthèse *in vitro* des ARNc coiffés et polyadénylés est réalisée à l'aide du kit mMMESSAGE mMACHINE® T7 Ultra (Invitrogen). Le plasmide PGEMXho est linéarisé par l'enzyme de restriction NheI et les ARNc sont synthétisés à partir du promoteur T7 présent sur le plasmide en amont de l'ADNc d'intérêt. Les ARNc sont ensuite purifiés par extraction phénolique et précipitation.

II.5.2. Expression dans l'ovocyte de Xénope

Les ovocytes sont récupérés chirurgicalement sur des Xénopes (*Xenopus laevis*) femelles anesthésiées par le froid (immersion dans de la glace pilée durant 30 minutes). La peau puis le muscle sont incisés au niveau du bas de l'abdomen. Un ou plusieurs lobes ovariens sont prélevés et placés dans une solution OR2 (NaCl 82,5 mM, KCl 2 mM, MgCl₂ 1 mM, Hepes-NaOH 5 mM, pH 7,4). Le muscle puis la peau sont ensuite suturés avec du fil chirurgical

résorbable. Les ovocytes subissent un traitement de 40 minutes, sous agitation, dans la solution OR2 additionnée de 1 mg/ml de collagénase afin de digérer l'épithélium ovarien et les cellules folliculaires qui entourent les ovocytes. Les ovocytes sont ensuite rincés et conservés dans une solution ND96 (NaCl 96 mM, KCl 2 mM, CaCl₂ 1,8 mM, MgCl₂ 1 mM, Na-pyruvate 2,5 mM et Hepes-NaOH 5 mM, pH 7,4) supplémentée de 50 µg/l de gentamicine ou dans une solution Modified Bath Saline (MBS) avec calcium (NaCl 88 mM, KCl 1 mM, NaHCO₃ 2,4 mM, Ca(NO₃)₂ 0,3 mM, CaCl₂ 0,41 mM, MgSO₄ 0.82 mM, Hepes-NaOH 5 mM, pH 7,4 et 10 µg/ml de pénicilline) ou sans calcium (NaCl 88 mM, KCl 1mM, NaHCO₃ 2,4 mM, MgSO₄ 0.82 mM, Hepes-NaOH 5 mM, pH 7,4 et 10 µg/ml de pénicilline).

Les ovocytes sont triés sous la loupe binoculaire et seuls les ovocytes ayant un pôle animal noir bien différencié du pôle végétatif blanc sont sélectionnés. Les ovocytes sont ensuite injectés avec 50 nl de la préparation d'ARNc, ou de 50 nl d'eau pour les témoins, à l'aide d'un injecteur mécanique et d'une micropipette dont la pointe a un diamètre compris entre 8 et 12 µm. Les ovocytes injectés sont placés à 19°C, dans la solution ND96 ou la solution MBS, pendant 1 à 2 jours afin de permettre la traduction des ARNc.

II.5.3. Enregistrements électrophysiologiques

Les analyses sont réalisées 1 à 2 jours après injection des ARNc. L'ovocyte est placé dans une cuve en plexiglas dans laquelle circule la solution de perfusion. La cuve possède 10 entrées indépendantes reliées chacune par un capillaire à une seringue alimentant la cuve par gravité. La solution s'écoule à une vitesse de 1 ml/min. Toutes les solutions possèdent une base commune composée de CaCl₂ 1,8 mM, MgCl₂ 6 mM, et d'un tampon de pH (Hepes-NaOH 10 mM, pH 7,5 ou MES-BisTrisPropane 10 mM, pH 5,6).

Les enregistrements électrophysiologiques utilisent la technique de voltage-clamp à deux électrodes intracellulaires. Les deux électrodes sont insérées dans des micropipettes de verre remplies de KCl 3 M et possèdent une résistance comprise entre 0,5 et 2 MΩ. Pour faciliter leur positionnement et leur insertion dans l'ovocyte, elles sont montées sur des micromanipulateurs. Une électrode de référence est placée au contact de la solution qui s'écoule dans la cuve. Pour corriger la chute du potentiel dans la solution extérieure (« bain ») et enregistrer seulement la différence de potentiel de part et d'autre de la membrane de l'ovocyte, une quatrième électrode est placée à proximité immédiate de l'ovocyte. Le potentiel de cette électrode est soustrait, directement par l'amplificateur, du

potentiel de l'électrode de référence. Cette électrode permet une correction en temps réel de la résistance série du bain. L'ensemble du dispositif de mesure (la cuve, une loupe binoculaire et les micromanipulateurs) est placé à l'intérieur d'une cage de Faraday sur une table anti-vibration. L'amplificateur utilisé est un GeneClamp 500B (Axon Instruments, USA). Les protocoles d'imposition de potentiel, l'acquisition et l'analyse des données sont réalisés à l'aide du logiciel pCLAMP 9.0 (Axon Instruments). Les expériences sont conduites à température ambiante (20 à 22°C).

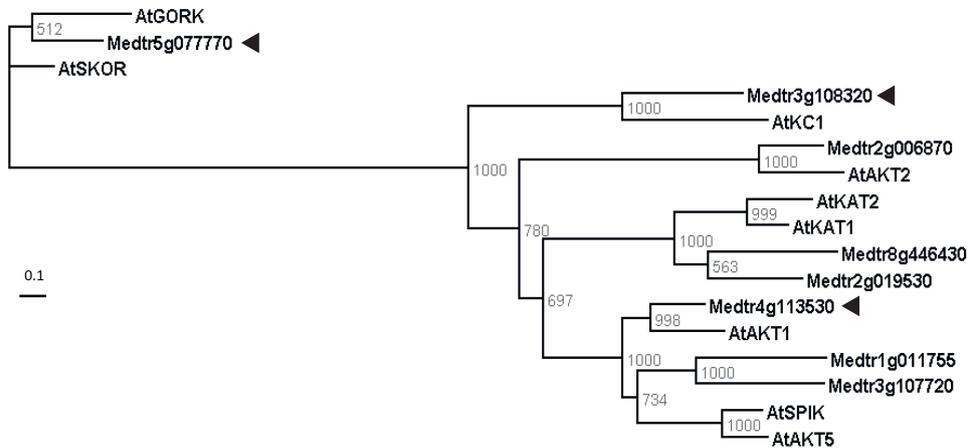
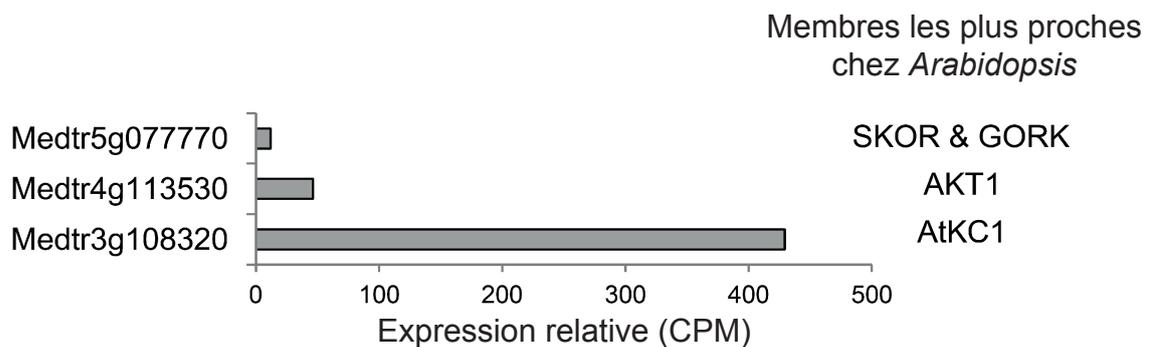
A**B**

Figure III.1 : La famille de canaux potassiques Shaker de *Medicago truncatula* : phylogénie et niveaux d'expression dans le poil absorbant.

A : Arbre phylogénétique des canaux Shaker d'*A. thaliana* et de *M. truncatula*. Les relations phylogénétiques sont basées sur l'alignement des séquences protéiques de ces canaux. Les 3 gènes identifiés comme exprimés dans le poil absorbant (Damiani *et al.*, 2016) sont indiqués par une pointe de flèche en regard du nom des canaux qu'ils codent. La barre d'échelle représente la distance évolutive, qui correspond ici à 10 substitutions par 100 résidus d'acides aminés.

B : Niveaux d'expression relative des gènes de la famille Shaker dans le poil absorbant de *M. truncatula*. Données obtenues par RNA-seq (Damiani *et al.*, 2016) et exprimées en CPM (Count per Million fragment mapped).

Chapitre III : Analyse du rôle du canal sortant potassique de la famille Shaker MtSKOR exprimé sur la membrane du poil absorbant de *Medicago truncatula*

III.1. Introduction

Les Facteurs Nods (FNs) sont perçus par le poil absorbant et déclenchent très rapidement des événements de signalisation de nature électrique et calcique ainsi qu'une modification du niveau de production des ROS (Reactive Oxygen Species ; Peleg-grossman *et al.*, 2012). Ces événements de signalisation initient la mise en place de l'infection de la racine par les bactéries fixatrices d'azote et une reprogrammation de l'expression du génome de la plante qui va notamment aboutir à la mise en place d'un nouvel organe, le nodule.

Concernant les premiers événements de signalisation électrique et calcique, les données disponibles conduisent au modèle présenté dans l'introduction bibliographique. La membrane du poil connaît une dépolarisation électrique rapide, provoquée par un influx de Ca^{2+} , une inhibition des pompes H^+ -ATPases et une activation de canaux anioniques, puis une repolarisation due à l'activation de canaux potassiques d'efflux. Cette série d'événements constitue la signalisation calcique et électrique précoce impliquée dans l'initiation du dialogue entre la bactérie et les poils absorbants (Felle *et al.*, 1995, 1996, 1998; Cárdenas *et al.*, 1998).

L'équipe a conduit récemment une approche de séquençage massif des ARN du poil absorbant (Damiani *et al.*, 2016). Celle-ci a permis de sélectionner le canal MtSKOR appartenant à la famille Shaker (Figure III.1A), comme candidat pour être impliqué dans la repolarisation de la membrane en réponse aux FNs (Figure III.1B). Les travaux de thèse de Limin Wang et d'Alice Drain ont permis de caractériser le canal MtSKOR par des analyses électrophysiologiques et de démarrer l'étude d'une lignée mutante, NF9352, pour le gène *MtSKOR*. Un résumé des résultats ainsi obtenus est présenté ci-dessous.

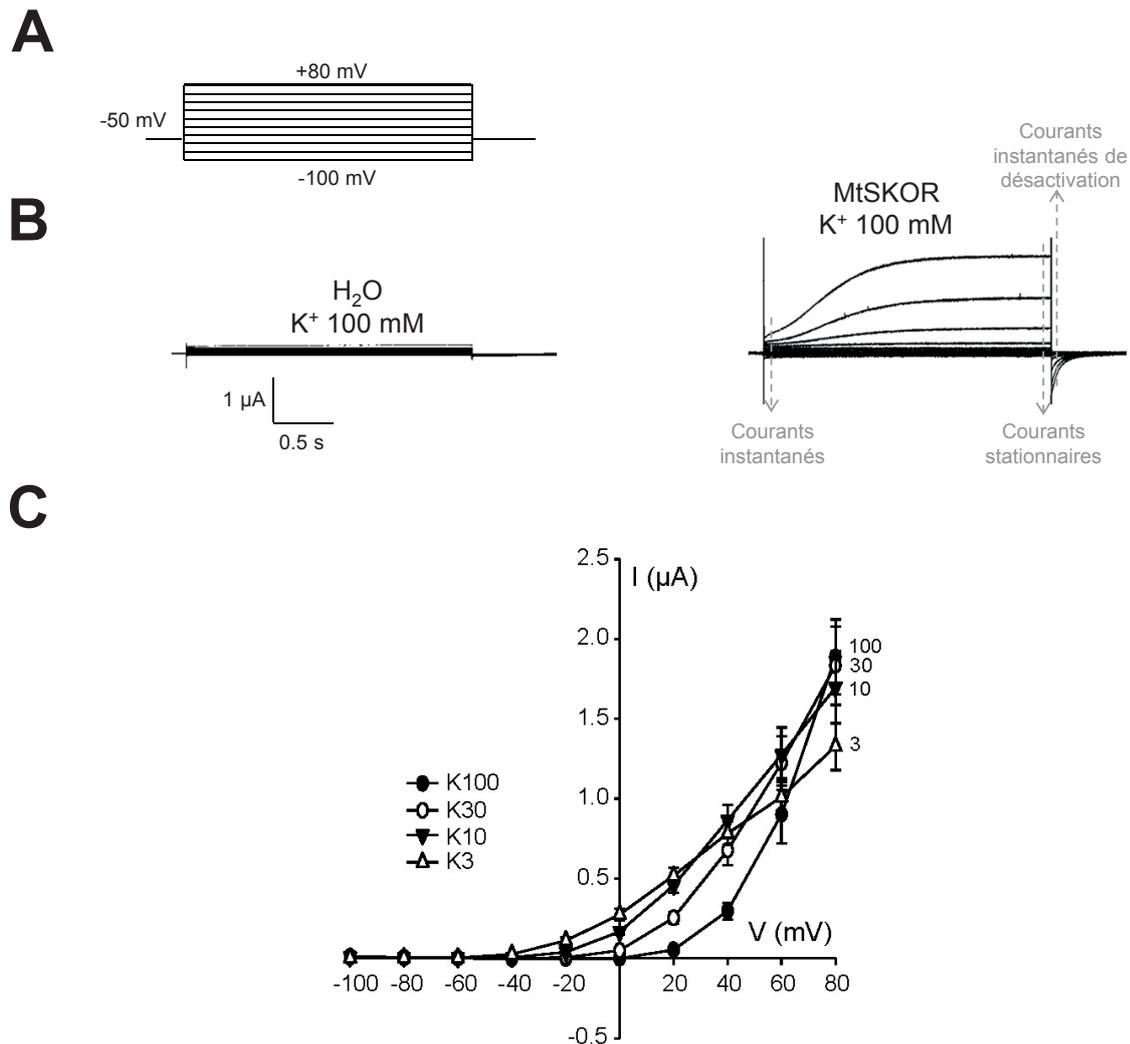


Figure III.2 : MtsKOR est un canal rectifiant sortant activé par le voltage.

A : Représentation du protocole de voltage-clamp, qui comprend 10 épisodes. Lors du premier épisode, un potentiel de -100 mV est imposé à la membrane de l'ovocyte. Pour les épisodes suivants, la valeur du potentiel imposé augmente de +20 mV à chaque épisode jusqu'à atteindre +80 mV lors du dernier épisode. Chaque épisode de voltage imposé dure 3 secondes. Entre 2 épisodes successifs, un potentiel de maintien de -50 mV est appliqué pendant 1 seconde au total.

B : Exemple représentatif de traces de courants enregistrées lors de l'application du protocole de voltage-clamp à un ovocyte injecté avec de l'eau (30 nl, panneau de gauche) ou injecté avec l'ARNc du canal MtsKOR (30 ng dans 30 nl, panneau de droite).

C : Sensibilité des courbes courant-voltage des ovocytes exprimant MtsKOR à la concentration de K⁺ dans la solution extérieure. Les enregistrements ont été effectués dans des solutions contenant K⁺ 3, 10, 30, ou 100 mM. Les données sont des moyennes ± l'erreur standard (n ≥ 8).

D'après la thèse de Drain (2015).

MtSKOR est le seul canal de la famille Shaker de *Medicago truncatula* qui permet un efflux de potassium (Figure III.1A). Il a été caractérisé par la technique de voltage-clamp à deux électrodes en système d'expression hétérologue. Ce travail permet de conclure que MtSKOR est un canal rectifiant sortant, sélectif du K⁺, activé par la dépolarisation de la membrane et régulé par le pH externe (Figure III.2, thèse d'Alice Drain). L'expression de MtSKOR dans les poils absorbants de *Medicago truncatula* a été validée par fusion transcriptionnelle du promoteur avec le gène rapporteur GUS (Figure III.3).

Une lignée d'insertion du *TNT1* dans le gène *MtSKOR*, dans le fond génétique Jemalong A17 de *Medicago truncatula*, a été obtenue auprès de Pascal Ratet. Dans cette lignée NF9352, l'insertion du retrotransposon dans le premier exon du gène invalide complètement celui-ci (Figure III.4). En effet, aucun transcrit n'est produit (Figure III.4B) et l'analyse des courants par patch-clamp sur des cellules de garde de plantes mutantes homozygotes *mtskor* montre une absence totale de courant potassique de type Shaker rectifiant sortant (Figure III.4C).

Les objectifs de ma thèse concernant MtSKOR ont été d'une part, de continuer la caractérisation de la lignée mutante NF9352 concernant la mise en place et le fonctionnement de la symbiose fixatrice d'azote avec *S. meliloti*, et d'autre part, d'identifier et commencer la caractérisation d'une deuxième lignée mutante, NF21235.

III.2. Résultats

III.2.1. Lignée NF9352 et mutation *mtskor-1*

III.2.1.1. Méthodologie de l'analyse du potentiel de membrane des cellules périphériques de la racine de *Medicago truncatula*

La perception des FNs induit une dépolarisation de la membrane du poil absorbant de *M. truncatula*. Le moyen de mesurer et d'analyser ce phénomène que nous avons choisi consiste à mesurer le potentiel de membrane avec une microélectrode implantée dans les cellules périphériques de la racine. Les cellules végétales constituent un continuum (le symplaste) via les plasmodesmes (Roberts et Oparka, 2003; Lucas et Lee, 2004; Lee, 2014). La dépolarisation, qui a pour origine la membrane du poil absorbant de *M. truncatula* est ainsi transmise aux cellules périphériques du poil absorbant sur la racine.

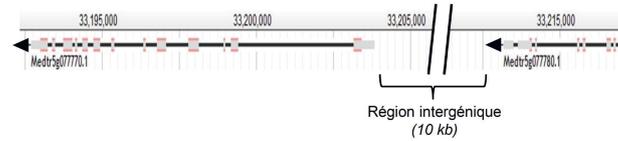
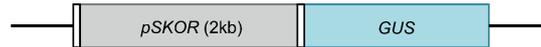
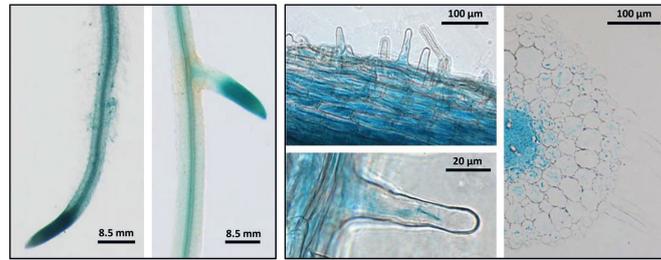
A**B****C**

Figure III.3 : Localisation de l'expression de *MtSKOR* via la fusion transcriptionnelle avec le gène rapporteur GUS.

A : Organisation du gène et du promoteur *MtSKOR* sur le chromosome 5 (image provenant du site <https://www.jcvi.org/medicago-truncatula-genome-database>). La coupure dans l'échelle correspond à 5800 pb.

B : Construction génique réalisée pour analyser la localisation de l'expression de *MtSKOR*. La région promotrice de 2 kb directement en amont de l'ATG du gène *MtSKOR* a été amplifiée et clonée dans le vecteur pGWB3.

C : Photographies de racine de *M. truncatula* après coloration GUS permettant une localisation de l'expression de *MtSKOR*. Les observations sont réalisées sur des racines de *M. truncatula* transformées par *R. rhizogenes*.

D'après la thèse de Drain (2015).

Le poste de mesure du potentiel de membrane sur racine disponible à BPMP a dû être adapté aux contraintes imposées par cette expérience. La cuve disponible avait un volume important (plusieurs millilitres) ne permettant pas de changement rapide de la solution de perfusion. D'autre part, les plantules utilisées lors de ces expériences n'ont que 2 jours de croissance et ne nécessitent donc pas une cuve d'une grande dimension. De plus, seule la région de la racine correspondant à la zone d'élongation des poils absorbants est sensible aux FNs (Figure I.5). Ce sont donc des segments apicaux de racine, longs de 1 cm environ, qui ont été utilisés pour cette expérience, basée sur le protocole établi par Hubert Felle (Felle *et al.*, 1998 ; Figure III.5). La cuve, redimensionnée et réadaptée (voir Chapitre II, § 4.1.), a l'avantage d'avoir un volume de perfusion très faible (quelques centaines de microlitres), ce qui permet un changement rapide du bain de perfusion dans lequel la racine est plongée (Figure III.5).

Un segment de racine est fixé au fond de la cuve avec deux points de vaseline. La perfusion est activée avec la solution matrice « standard » et la racine est ensuite empalée avec une microélectrode de verre (Figure III.5 D). La cuve est positionnée sur la platine d'un microcontrôleur qui permet des mouvements verticaux (Micro-contrôle ITGD CA I). Il est ainsi possible de contrôler la profondeur d'enfoncement de l'électrode dans la racine avec précision. Lors de l'obtention d'un potentiel de membrane, le dispositif demeure strictement immobile jusqu'à ce que le potentiel de membrane de repos soit stable (1^{ère} phase de l'enregistrement Figure III.6 A). La solution de perfusion est alors changée pour la même solution additionnée de FNs (10^{-6} M). Environ 20 secondes après le changement de solution, la membrane commence à se dépolariser. La membrane se dépolarise en moyenne de $+26,7 \text{ mV} \pm$ l'écart type 16,4 mV. Sans aucun changement de solution, la membrane se repolarise spontanément avec un retour jusqu'au potentiel de repos à l'état d'équilibre (2^{ème} phase de l'enregistrement Figure III.6 A). La cuve est rincée avec la solution « matrice standard » (3^{ème} phase de l'enregistrement Figure III.6 A). Puis le fonctionnement du dispositif et l'état physiologique de la racine sont testés en induisant une dépolarisation de la membrane cellulaire via une forte augmentation de la concentration externe en K^+ (30 mM ; 4^{ème} phase de l'enregistrement Figure III.6 A). A partir de ces enregistrements, l'épisode de repolarisation est extrait pour analyser la vitesse initiale de repolarisation.

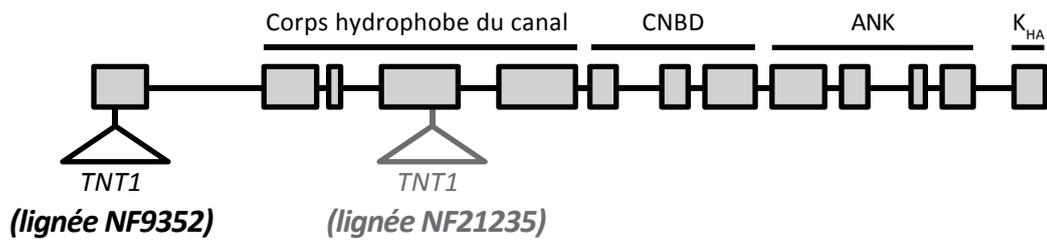
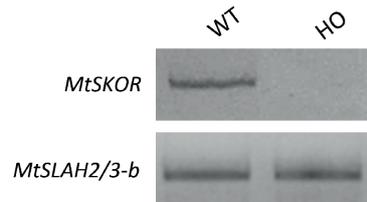
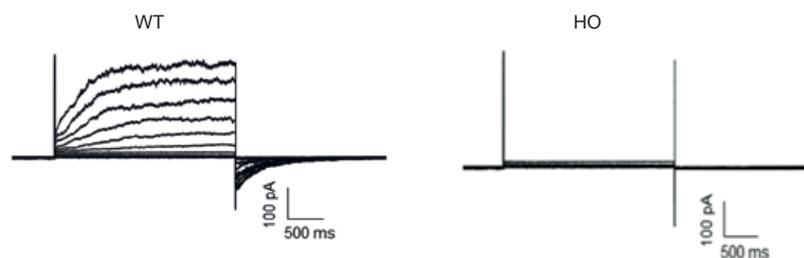
A**B****C**

Figure III.4 : La mutation *mtskor-1* par insertion du rétrotransposon invalide complètement l'expression fonctionnelle du canal.

A : Structure du gène *MtSKOR* et localisation de l'insertion du rétrotransposon. Le gène *MtSKOR* possède 13 exons. Les exons 2 à 5 codent le corps hydrophobe du canal, composé de 6 segments transmembranaires et du domaine pore. Les exons 6 à 8 codent le domaine de liaison aux nucléotides cycliques. Les exons 9 à 12 codent le domaine ankyrine impliqué dans les interactions protéine-protéine. Enfin l'exon 13 code pour le domaine K_{HA} impliqué dans les interactions entre sous-unités. La lignée NF9352, identifiée via le site de la Noble comme mutée dans le gène *MtSKOR*, possède une insertion du rétrotransposon de tabac *TNT1* dans le premier exon.

B : Analyse par RT-PCR de l'effet de la mutation *mtskor-1* sur la présence du transcrit. Amplification de l'ADNc *MtSKOR* à partir d'une banque d'ADNc issue soit de plantes sauvages (WT, bande en haut à gauche) soit de plantes mutantes homozygotes pour la mutation *mtskor-1* (plantes HO, absence de bande en haut à droite). Dans cette même expérience d'amplification le contrôle utilisé est *MtSLAH2/3-b* (canal anionique potentiel). Résultats obtenus par Alice Drain (Thèse, 2015).

C : Expériences de patch-clamp réalisées sur des protoplastes de cellules de garde de plantes WT et de plantes HO. Le protocole de voltage imposé fait varier le potentiel entre +75 et -180 mV (par décrément de -15 mV), avec un potentiel de maintien à -60 mV. Résultats obtenus par Limin Wang (Thèse, juillet 2015).

III.2.1.2. Analyse de la vitesse initiale de repolarisation du mutant *mtskor*

Lors de l'épisode de repolarisation, on observe trois phases : (i) une première phase pendant laquelle la vitesse de repolarisation est faible mais en phase d'augmentation, (ii) une phase où la vitesse de repolarisation a atteint sa vitesse maximale et stable et (iii) une phase de diminution de la vitesse de repolarisation jusqu'à ce que le potentiel de repos initial soit de nouveau atteint. Lors de la deuxième phase (ii), on peut ajuster une courbe de régression linéaire à la cinétique expérimentale de repolarisation de la membrane. Le coefficient directeur de cette droite de régression est pris de façon opérationnelle comme mesure de la vitesse maximale de repolarisation de la membrane (Figure III.6 B).

Ce travail a permis d'analyser la vitesse de repolarisation du mutant *mtskor* (lignée NF9352) et de la comparer à celle de plantes de génotype sauvage (Wild-Type) (Figure III.6 C). Les plantes mutantes *mtskor-1* ont une vitesse de repolarisation réduite d'environ 50% par rapport aux plantes sauvages et cette différence est statistiquement significative.

III.2.1.3. Analyse du nombre de cordons d'infection

Pour déterminer le nombre de cordons d'infection, les plantes sont cultivées *in vitro* en boîtes de Petri carrées sur milieu Fahraeus. L'inoculation est faite 2 jours après le transfert avec une souche de *Sinorhizobium meliloti* exprimant le gène rapporteur *LacZ*.

Trois et cinq jours après inoculation, les plantes sont récoltées et les racines sont traitées pour colorer les bactéries.

L'observation au microscope des racines inoculées et colorées de plantes sauvages et plantes mutantes homozygotes *mtskor-1* (lignée NF9352) a permis de déterminer le nombre de cordons d'infection. Cette analyse n'a fait apparaître aucune différence significative entre plantes mutantes et sauvages (Figure III.7).

III.2.1.4. Analyse du nombre de nodules

Les plantes mutantes *mtskor-1* ont été cultivées sur différents substrats pour analyser leur capacité à établir une relation symbiotique avec *Sinorhizobium meliloti*. Quatre expériences indépendantes sont présentées ci-dessous (Figure III.8). Une première analyse concernant la lignée NF9352 a été initiée au cours de la thèse d'Alice Drain. Elle a réalisé une expérience

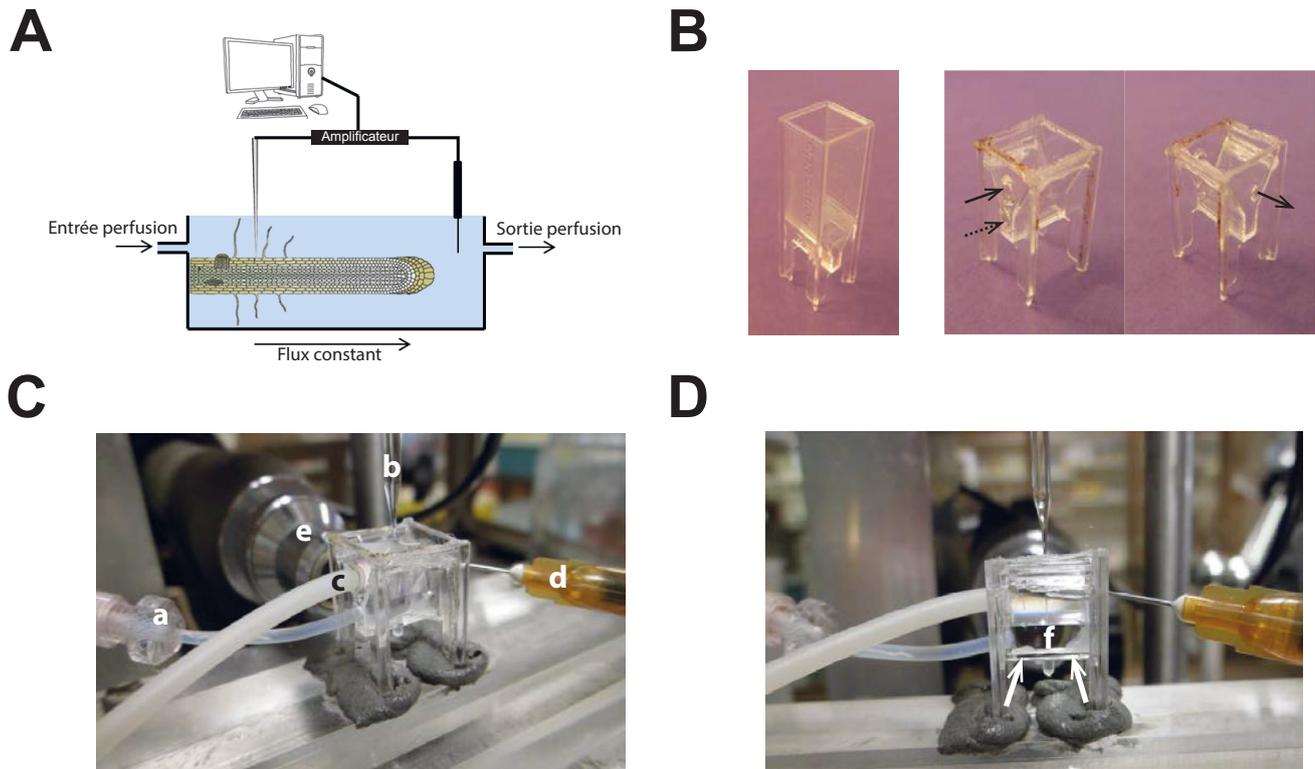


Figure III.5 : Mesure du potentiel de membrane de cellules de la périphérie racinaire chez *M. truncatula* par empalement d'une micro-électrode.

A : Représentation schématique du dispositif de mesure du potentiel de membrane. La racine est placée dans une cuve dans laquelle perfuse une solution. Une microélectrode de verre est empalée dans la racine. Elle est reliée à un amplificateur, lui-même connecté à un ordinateur pour l'enregistrement du potentiel de membrane.

B : Cuve de fixation de la racine. La cuve dans laquelle la racine est introduite et immobilisée par deux points de vaseline a été conçue de façon à réduire le volume de perfusion (en particulier du fait de l'utilisation de FNs). La cuve est construite à partir d'UVette Eppendorf (panneau de gauche). L'UVette est découpée et percée pour permettre l'insertion des tuyaux d'entrée et de sortie de la solution de perfusion (flèches pleines sur le panneau de droite). Un autre trou est fait pour permettre l'insertion de l'électrode de référence (flèche pointillée).

C : Agencement de la cuve, des électrodes et du dispositif de perfusion. (a) électrode de référence. (b) électrode de mesure. (c) tuyau d'arrivée des solutions. (d) tuyau de sortie des solutions par aspiration. (e) objectif de microscope couplé avec une caméra pour visualiser l'intérieur de la cuve.

D : Montage vue de face. La racine (f) est fixée au fond de la cuve avec deux points de vaseline (flèches).

de comparaison du nombre de nodules formés chez des plantes mutantes *mtskor-1* et des plantes contrôles de génotype sauvage au locus *MtSKOR*. Pour cela, les plantes ont été cultivées dans des bassines contenant un mélange de sable et vermiculite. Chaque bassine contient 12 plantes issues de l'amplification d'une plante hétérozygote pour le locus *MtSKOR*. Le génotypage (homozygote mutant ou sauvage, ou hétérozygote) de ces plantes est effectué *a posteriori*, une fois les mesures du nombre de nodules effectuées, de façon à réaliser une analyse « à l'aveugle ». La croissance des plantes se fait sur 8 semaines et deux inoculations sont faites avec *S. meliloti* 1021, après 1 et 2 semaines de croissance. Les plantes ne présentent pas de différence significative de croissance après 8 semaines de croissance (Figure III.8 A) : le poids sec des plantes est le même pour les plantes de génotype sauvage au locus *MtSKOR* et les plantes homozygotes *mtskor-1*. Par contre, concernant le nombre moyen de nodules par plante, les plantes mutantes *mtskor-1* présentent une diminution de l'ordre de 50% du nombre de nodules comparé aux plantes contrôles sauvages (Figure III.8 A).

Pour valider ce phénotype, j'ai réalisé 3 expériences avec des plantes homozygotes mutantes *mtskor-1* et des plantes sauvages issues de la lignée NF9352 qui ne présentaient pas d'insertion du rétrotransposon *TNT1* dans le gène *MtSKOR* (*i.e.*, sauvages au locus *MtSKOR*).

Dans la première expérience, les plantes sont cultivées *in vitro* sur milieu Fahraeus gélosé en boîte de Petri. Elles sont inoculées 2 jours après le transfert sur boîte de Petri avec *S. meliloti* 1021 *DsRED*, qui exprime la protéine fluorescente *DsRED*. Sept, 14 et 21 jours après l'inoculation (DPI), les plantes sont observées avec une loupe binoculaire à fluorescence pour déterminer le nombre de nodules par plante (Figure III.8 B). Le poids sec des plantes est déterminé en fin d'expérience après les avoir séchées dans une étuve (Figure III.8 B). Quatorze jours après l'inoculation, une faible différence du nombre de nodules entre WT et *mtskor* semble apparaître, mais elle n'est pas statistiquement significative. Le poids sec des plantes en fin d'expérience est par contre statistiquement différent entre WT et *mtskor*, les plantes *mtskor-1* ayant produit une biomasse supérieure à celle des plantes WT (Figure III.8 B).

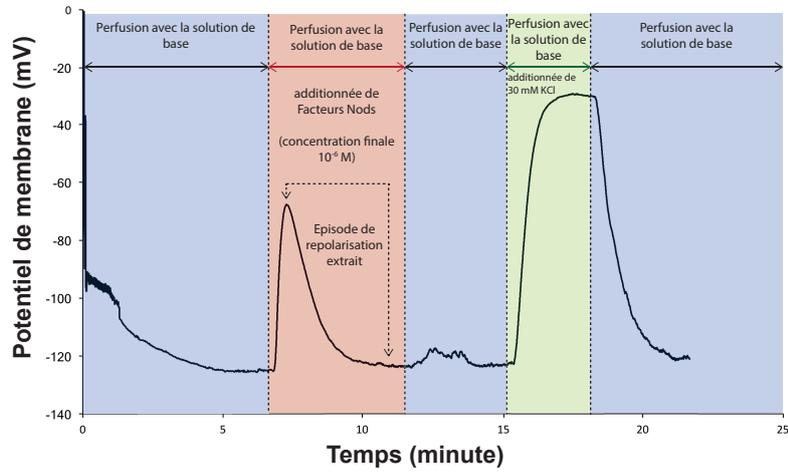
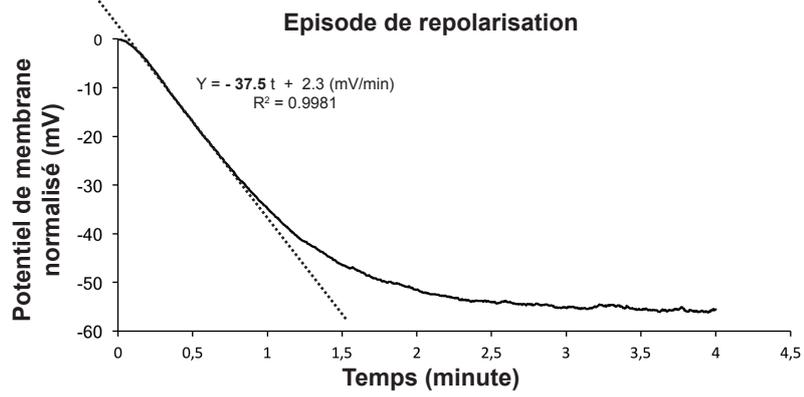
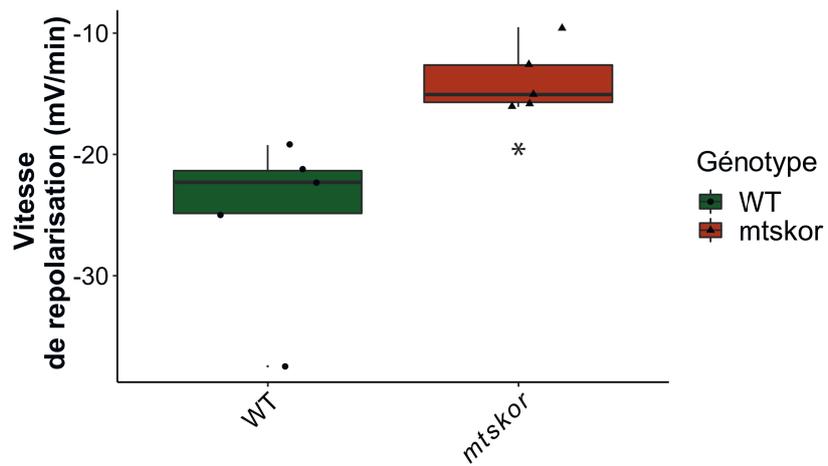
A**Enregistrement du potentiel de membrane sur racine de *M. truncatula*****B****C**

Figure III.6 : Analyse de la vitesse de repolarisation des cellules de la périphérie racinaire chez la lignée porteuse de la mutation homozygote *mtskor-1*.

A : Exemple d'enregistrement des variations du potentiel de membrane en réponse à la séquence des traitements utilisés pour comparer la capacité de repolarisation des cellules après une dépolarisation induite par des facteurs Nods chez les plantes porteuses de la mutation *mtskor-1* (issues de la lignée NF9352) et les plantes contrôle de génotype sauvage A17 (WT). L'enregistrement présenté concerne une plante WT (A17). La racine est empalée avec une microélectrode pour mesurer le potentiel de membrane. La solution de perfusion est changée une fois le potentiel de membrane stable. Les Facteurs Nods (FNs) sont dilués dans la solution matrice standard à une concentration finale de 10^{-6} M. En fin d'enregistrement, pour s'assurer que l'électrode est toujours correctement insérée dans la cellule et que la cellule a conservé un état physiologique lui permettant de répondre à une modification de son environnement, on vérifie si l'addition d'une forte concentration de K^+ (KCl 30 mM) dans la solution matrice standard se traduit effectivement, comme prévu, par une dépolarisation cellulaire.

B : Méthodologie utilisée pour estimer la vitesse de repolarisation de la membrane cellulaire suite à la dépolarisation induite par les FNs. L'enregistrement des variations du potentiel de membrane observées après la phase de dépolarisation induite par les FNs, et alors que les FNs sont encore présents dans le milieu extérieur (à titre d'exemple, voir dans le panneau A, la partie de la cinétique comprise entre les 2 flèches), est utilisé pour construire le graphe présentant les variations du potentiel de membrane (en ordonnée) en fonction du temps (en abscisse). La cinétique ainsi obtenue présente une portion quasi-linéaire (entre 0,1 min et 1,1 min dans l'exemple illustré par le panneau A) pendant laquelle la vitesse de repolarisation est maximale et quasiment constante. Une régression linéaire est ajustée à cette portion de la cinétique. Le coefficient directeur de cette droite de régression est pris comme une estimation opérationnelle de la vitesse de repolarisation de la membrane.

C : Comparaison des vitesses de repolarisation chez les plantes WT contrôle de génotype A17 et les plantes porteuses de la mutation homozygote *mtskor 1* issues de la lignée 9524. Moyennes \pm écart type (n = 5). Le symbole * indique que la différence entre les deux types de plante est statistiquement significative (test de Student, $P < 0,05$).

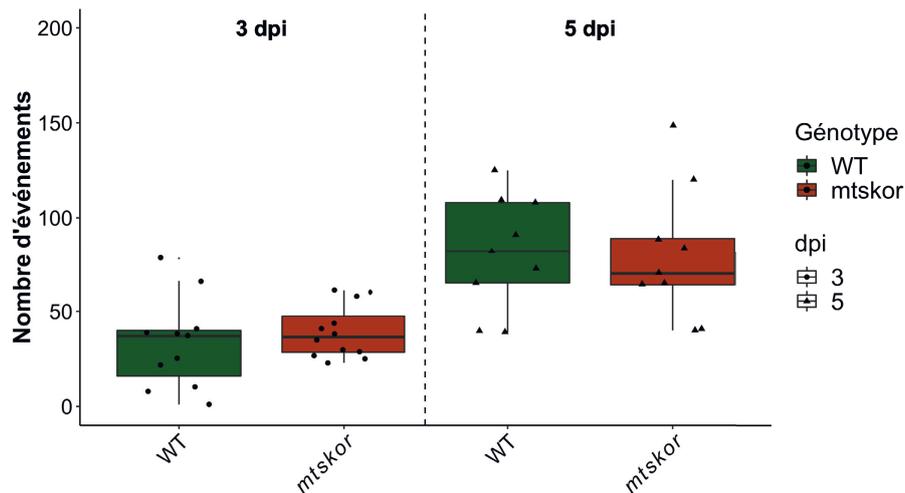


Figure III.7 : Analyse de la capacité de la plante à former des cordons d'infection en absence d'expression fonctionnelle du gène *MtSKOR* (Lignée 9352).

Les plantes appartiennent toutes à la lignée NF9352. Elles sont porteuses de la mutation *mtskor-1* à l'état homozygote ou sont de génotype sauvage (WT) pour le gène *MtSKOR*. Après 2 jours de culture *in vitro* sur milieu Farhaeus, les racines sont inoculées avec une souche de *S. meliloti* exprimant le gène rapporteur *LacZ* (RM2011 *LacZ*). Le système racinaire est récolté à 3 et 5 jours après inoculation (dpi). Il est coloré (révélation de l'activité *LacZ*) pour faciliter l'observation par microcopie des événements de colonisation. Moyennes \pm erreur standard ($n = 10$ pour chaque point de la cinétique). L'analyse statistique (test de Tukey au niveau de 5%) indique qu'il n'y a pas de différence significative entre les deux types de plantes.

Dans la seconde expérience, j'ai comparé le nombre de nodules chez les plantes *mtskor-1* et WT après culture dans du terreau. Les plantes sont cultivées comme décrit dans le chapitre II, § 1.3.3. (Figure III.8 C), mais le substrat est différent : le mélange de sable et vermiculite est remplacé par du terreau. Ce terreau est préalablement autoclavé pour limiter le risque d'inoculation par le substrat. Les plantes sont inoculées avec la souche *S. meliloti* 1021 après une semaine de croissance, puis récoltées à 7, 14 et 21 jours après inoculation (DPI). Le poids sec et le nombre de nodules sont déterminés et présentés dans la Figure III.8 C. On n'observe pas de différence du poids sec à 7 et 14 jours après inoculation, par contre, les plantes *mtskor* sont plus petites que les plantes WT à 21 dpi, sans que cette différence soit statistiquement validée (Figure III.8 C). Concernant le nombre de nodules, les plantes *mtskor* ont environ 50% de nodules en moins à 14 et 21 dpi et ces différences sont validées statistiquement (Figure III.8 C).

Une dernière expérience a été réalisée sur substrat de sable et vermiculite selon le protocole décrit dans le § 1.3.3 du chapitre II. (Figure III.8 D). Cette expérience ne révèle pas de différence du nombre de nodules entre plantes mutantes *mtskor-1* et contrôles sauvages à 7, 14 et 21 dpi, mais les plantes mutantes sont significativement plus développées (biomasse supérieure) à 14 et 21 dpi que les contrôles sauvages (Figure III.8 D).

En résumé, dans les 4 expériences décrites ci-dessus, on observe que les plantes mutantes *mtskor-1* présentent une différence par rapport aux plantes contrôles sauvages, soit en termes de nombre de nodules soit en termes de biomasse produite, selon l'expérience analysée (et le substrat utilisé). Un résultat commun à ces 4 expériences apparaît cependant : le ratio entre le nombre de nodules et le poids sec des plantes est statistiquement différent entre plantes *mtskor* et WT (Figure III.9). A l'exception de l'expérience de culture *in-vitro* et qui s'explique probablement par une croissance limitée des plantes (intensité lumineuse plus faible et espace de croissance limité, Figure III.9 B) L'impact de la mutation du gène *MtSKOR* semble donc avoir un effet sur le fonctionnement du nodule dans nos conditions expérimentales. Pour un poids similaire, les plantes *mtskor-1* ont moins de nodules que les plantes WT, et pour un nombre de nodules similaire, elles présentent plus de croissance que les plantes WT (poids sec plus important). Les nodules paraissent donc présenter une activité de fixation de N₂ plus élevée dans les différentes conditions expérimentales testées chez les plantes *mtskor-1* que chez les plantes WT.

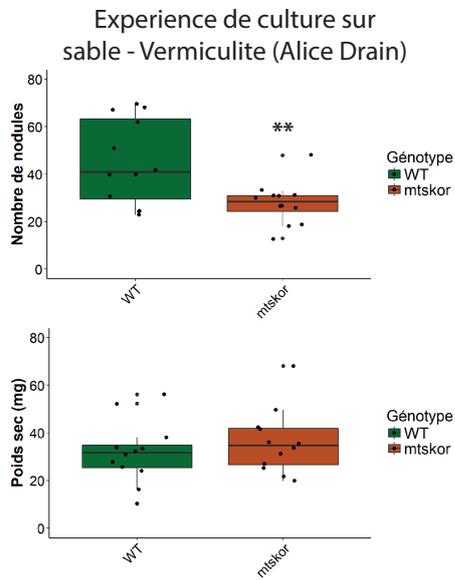
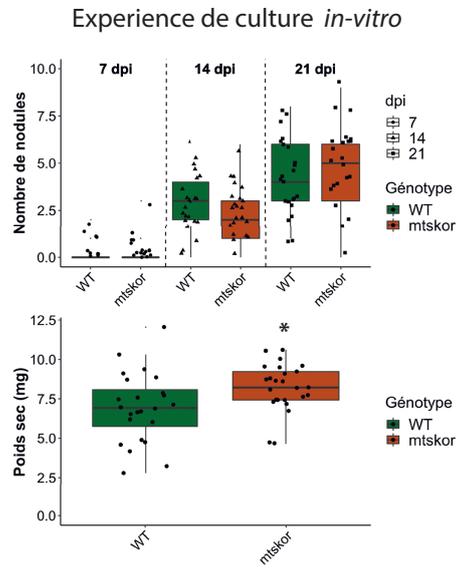
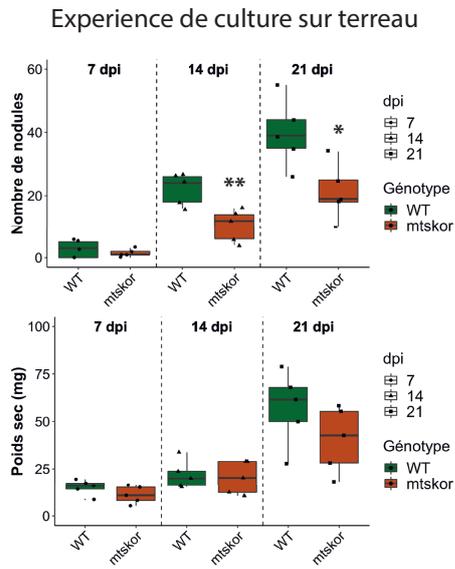
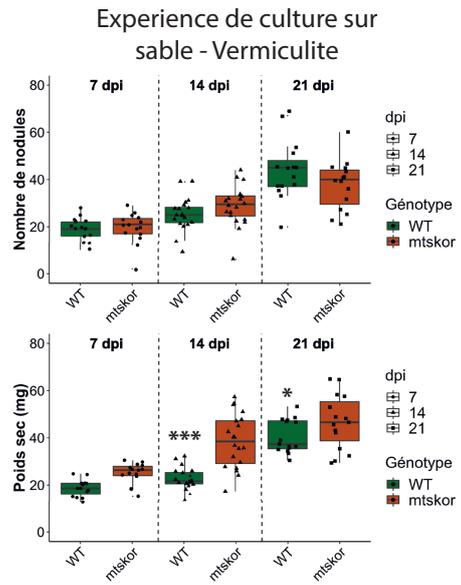
A**B****C****D**

Figure III.8 : Phénotypage de la capacité de nodulation en absence d'expression fonctionnelle du gène *MtSKOR* dans la lignée NF9352 dans différentes conditions de culture.

Les plantes sont toutes issues de la lignée NF9352. Elles sont porteuses à l'état homozygote de la mutation *mtskor-1* ou possèdent un génotype sauvage (WT) pour le gène *MtSKOR*.

A : Plantes cultivées sur un mélange de sable et de vermiculite (Alice Drain, thèse 2015). Les plantes, issues de la descendance d'une plante de la lignée 9352 hétérozygote pour la mutation *mtskor-1* sont cultivées 8 semaines et inoculées avec la souche *S. meliloti* 1021 à la fin de la première semaine puis de la seconde semaine de culture. Les plantes sont cultivées dans de grandes bassines (ca. 12 l) de mélange sable-vermiculite, avec une douzaine de plantes par bassine. A l'issue de la culture, un génotypage par PCR est effectué pour déterminer le génotype de chaque plante. Le nombre de nodules et le poids sec sont déterminés pour chaque plante mutante homozygote *mtskor-1* ou WT pour *MtSKOR*. n = 12 pour chaque génotype.

B : Plantes cultivées *in vitro* sur milieu Fahraeus gélosé. Les plantules, après germination, sont transférées sur milieu Fahraeus gélosé en boîte de Petri et inoculées avec la souche de *S. meliloti* 1021 DsRED. L'apparition des nodules est observée (de façon non destructive) à 7, 14 et 21 jours après inoculation (dpi) sous une loupe binoculaire à fluorescence. A l'issue de la dernière observation (à 21 dpi), les plantes sont récoltées pour mesure de leur poids sec et le nombre de nodules des plantes est déterminé. n = 24 pour chaque génotype.

C : Plantes cultivées sur terreau. Les plantes sont inoculées avec la souche de *S. meliloti* 1021 après une semaine de culture. Sept, 14 et 21 jours après inoculation, 5 plantes par génotype sont récoltées. Le nombre de nodules et le poids sec de chaque plante sont déterminés. n = 5 pour chaque génotype et chaque point de la cinétique.

D : Plantes cultivées sur mélange sable-vermiculite. Les plantes sont inoculées avec la souche de *S. meliloti* 1021 après une semaine de culture. Sept, 14 et 21 jours après l'inoculation, les plantes sont récoltées pour déterminer leur nombre de nodules et leur poids sec ; n = 15 pour chaque génotype à 7 et 21 dpi et n = 20 pour chaque génotype à 14 dpi.

Des tests statistiques de Student (au seuil de 0,05, 0,01 ou 0,001) sont réalisés pour comparer les plantes WT et les plantes *mtskor-1* : * P < 0,05, ** P < 0,01 et *** P < 0,001.

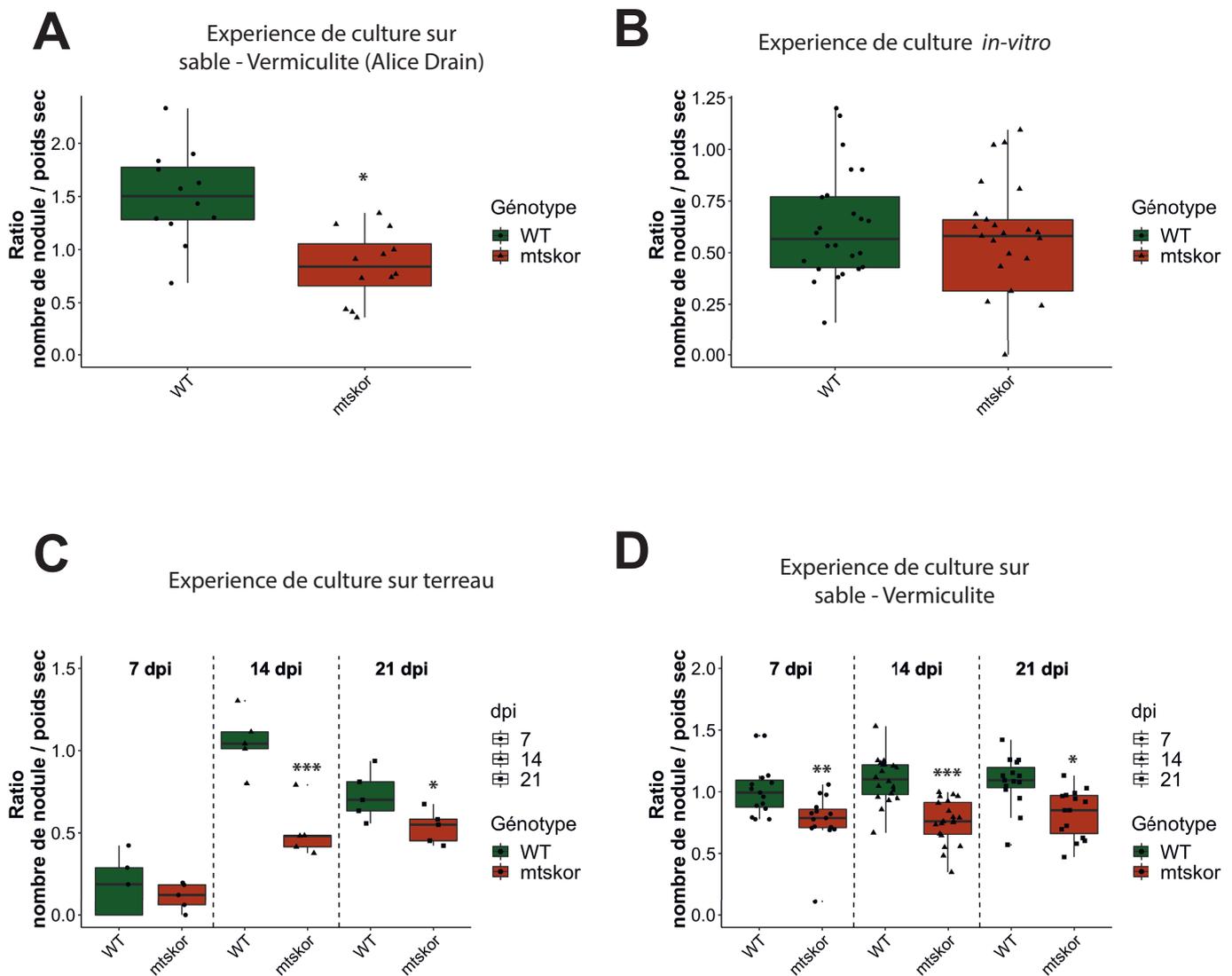


Figure III.9 : Rapport entre le nombre de nodule et le poids sec des plantes en absence d'expression fonctionnelle du gène *MtSKOR* dans la lignée NF9352 dans différentes conditions de culture.

Les plantes sont toutes issues de la lignée NF9352. Elles sont porteuses à l'état homozygote de la mutation *mtskor-1* ou possèdent un génotype sauvage (WT) pour le gène *MtSKOR*. Les conditions de culture et phénotypage des plantes pour **A**, **B**, **C** et **D** sont présentées dans la figure précédente (Figure III.8).

A : Plantes cultivées sur un mélange de sable et de vermiculite, n = 12 pour chaque génotype (Alice Drain, thèse 2015).

B : Plantes cultivées *in vitro* sur milieu Fahraeus gélosé, n = 24 pour chaque génotype.

C : Plantes cultivées sur terreau, n = 5 pour chaque génotype et chaque point de la cinétique.

D : Plantes cultivées sur mélange sable-vermiculite, n = 15 pour chaque génotype à 7 et 21 dpi et n = 20 pour chaque génotype à 14 dpi.

Des tests statistiques de Student (au seuil de 0,05, 0,01 ou 0,001) sont réalisés pour comparer les plantes WT et les plantes *mtskor-1* : * P < 0,05, ** P < 0,01 et *** P < 0,001.

III.2.1.5. Analyse de l'efficacité de fixation du nodule

Dans le but de comparer l'efficacité de fixation du nodule des plantes *mtskor-1* et WT, une collaboration avec Jean-Jacques Drevon de l'UMR Eco&Sols (Montpellier) a été établie. Dans ce cadre, en utilisant le protocole de diagnostic nodulaire développé par Drevon et son équipe (Aydi *et al.*, 2004; Schulze et Drevon, 2005; Mohamed *et al.*, 2010), j'ai étudié l'efficacité de fixation des nodules chez les plantes sauvages et mutantes.

Les plantes sont cultivées de façon hydro-aéroponique. Elles sont placées dans des bouteilles contenant une solution nutritive avec un dispositif de bullage dans chaque bouteille. Le protocole et le dispositif de culture sont présentés dans le § 1.3.5 du chapitre II. Le poids sec des parties aériennes, racinaires et des nodules sont déterminés en fin de croissance. Les résultats obtenus pour chaque plante sont représentés sur un graphique à deux dimensions : le poids sec des parties aériennes sur l'axe des ordonnées, en fonction du poids sec des nodules sur l'axe des abscisses. Une régression linéaire pour les plantes *mtskor-1* et une deuxième pour les plantes sauvages WT sont effectuées (Figure III.10). L'équation de ces régressions linéaires permet d'analyser la fixation de l'azote par les nodules et l'utilisation de l'azote minérale de départ. Le coefficient directeur de chaque droite est lié à l'efficacité de fixation de l'azote des nodules, et l'ordonnée à l'origine est prise comme une mesure de l'efficacité d'utilisation de l'azote minéral de départ. Dans le cadre de ce type d'interprétation, les résultats présentés par la Figure III.10 indiquent que les plantes *mtskor-1*, comparées aux plantes sauvages WT, ont une capacité similaire d'utilisation de l'azote minéral initialement (« starter ») apporté aux plantes. Mais ils présentent une efficacité de fixation de l'azote par les nodules plus importante que celle des plantes WT (Figure III.10).

III.2.2. **Lignée NF21235 et mutation *mtskor-2***

Lors de mon travail de thèse, nous avons obtenu une deuxième lignée mutante pour le gène *MtSKOR*. Cette lignée, dont le nom est NF21235, provient de la collection de *M. truncatula* mutantes dans le fond génétique R108 rendue disponible par la Noble Foundation. J'ai effectué le travail de génotypage et d'amplification des plantes mutantes homozygotes pour l'insertion du *TNT1* dans le gène *MtSKOR*. J'ai également identifié des plantes de génotype homozygote sauvage pour le gène *MtSKOR* au sein de cette lignée NF21235, puis amplifié

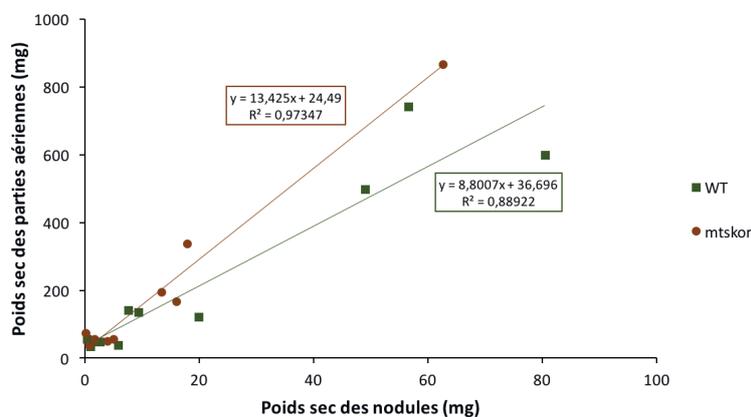


Figure III.10 : Diagnostic nodulaire des conséquences de la mutation *mtskor-1* : analyse de la relation entre le poids sec des parties aériennes et le poids sec des nodules.

Des plantes de génotype A17 sauvage (WT) et des plantes mutantes homozygotes *mtskor-1* de la lignée NF9352 sont cultivées de façon hydro-aéroponique comme décrit dans le paragraphe II.1.3.5. Le poids sec des parties aériennes, racinaires et des nodules est déterminé en fin de croissance. Les plantes sont récoltées à l'apparition de la première gousse. Le poids sec des parties aériennes est présenté en fonction de celui des nodules sur un graphique, et des droites de régression linéaires sont ajustées pour chaque génotype aux points expérimentaux. Le coefficient directeur de la régression linéaire permet de quantifier l'efficacité de fixation des nodules. L'ordonnée à l'origine reflète la capacité d'utilisation de l'azote minérale présent au départ de la culture.

ces plantes. Ce travail a été réalisé selon le protocole décrit dans le chapitre II, § 2.1. Une première analyse de la nodulation de cette lignée a été réalisée lors de mon travail de thèse.

III.2.2.1. Validation de l'inactivation du gène *MtSKOR*

L'insertion du rétrotransposon *TNT1* dans la mutation, appelée *mtskor-2*, de la lignée NF21235 est localisée dans le quatrième exon du gène *MtSKOR* (Figure III.11 A). L'inactivation fonctionnelle du gène a été vérifiée par RT-PCR. Deux banques d'ADNc ont servi de matrice lors des réactions de PCR : une première issue de plantes mutantes homozygotes au locus *MtSKOR* et une deuxième issue de plantes sauvages (WT). L'expression fonctionnelle du canal MtSKOR est totalement inactivée par l'insertion du rétrotransposon TNT1 puisque l'amplification d'une partie de l'ADNc du canal MtSKOR se révèle impossible sur la banque d'ADNc issue de plantes mutantes homozygotes *mtskor-2* (Figure III.11 B). Un fragment du gène de tubuline de *M. truncatula* est amplifié dans les deux banques d'ADNc, ce qui sert de contrôle lors de cette expérience, attestant du bon déroulement de l'ensemble du processus expérimental.

III.2.2.2. Analyse du nombre de nodules

Le nombre de nodules par plante est déterminé après une culture dans un substrat constitué d'un mélange de sable et de vermiculite selon le protocole décrit dans le chapitre II, § 1.3.3, et précédemment utilisé (Figure III.8 D) pour le phénotypage des plantes *mtskor-1* de la lignée NF9352. Les plantes, cultivées au total pendant 4 semaines sur le substrat sable-vermiculite, sont inoculées avec la souche *S. meliloti 1021* à la fin de leur première semaine sur ce substrat. Des plantes sont ensuite récoltées chaque semaine à 7, 14 ou 21 jours après inoculation (dpi) pour une mesure du nombre de nodules ainsi que du poids sec des parties aériennes et racinaires. Lors de cette expérience, 3 lignées de génotype sauvage pour *MtSKOR* (Wt#3, Wt#8 et Wt#10) et 2 lignées homozygotes mutantes *mtskor* (Mt#1 et Mt#2) issues de la lignée NF21235 ont été analysées et comparées à des plantes de génotype R108 sauvage (Figure III.12).

La croissance est relativement semblable, en termes de poids sec, chez les différentes lignées. Par contre, concernant le nombre de nodules, les résultats font apparaître une forte hétérogénéité entre les différentes lignées, mais aussi au sein d'une même catégorie de lignées, mutantes ou sauvages. Les plantes sauvages Wt#3 et Wt#8 issues de la lignée NF21235 présentent une diminution significative du nombre de nodules par rapport aux

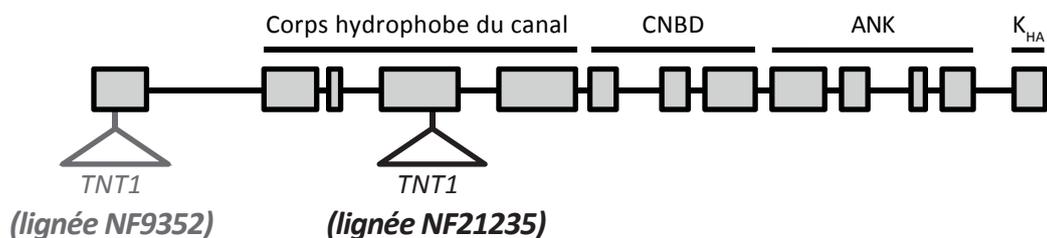
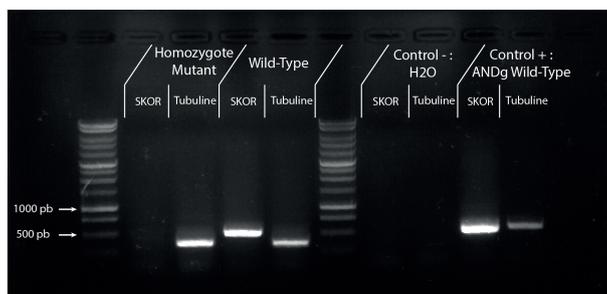
A**B**

Figure III.11 : La mutation *mtskor-2* présente dans la lignée NF21235 invalide complètement l'expression du canal.

A : Structure du gène *MtSKOR* et localisation de l'insertion du rétrotransposon. La lignée NF21235, identifiée via le site de la Noble comme mutée dans le gène *MtSKOR*, possède une insertion du rétrotransposon de tabac *TNT1* dans le quatrième exon. La position (dans le premier exon) de l'insertion du *TNT1* dans la lignée NF9352 est rappelée pour mémoire.

B : Analyse par RT-PCR de l'effet de la mutation sur la présence du transcrit. Amplification d'un fragment de l'ADNc *MtSKOR* à partir d'une banque d'ADNc issue soit de plantes de génotype sauvage (WT) soit de plantes mutantes porteuses de la mutation *mtskor-2* à l'état homozygote. Dans cette même expérience d'amplification le contrôle utilisé est le gène *MtTubiline* (*Medtr8g107250*).

plantes WT R108 contrôles lors des prélèvements à 7 et 14 dpi. Ce retard de nodulation se comble à 21 dpi. Cependant, ces résultats, ainsi que ceux d'autres expériences similaires révélant que certaines plantes de génotype sauvage pour le gène *MtSKOR* au sein de la lignée NF21235 n'avaient presque plus de capacité de nodulation (résultats non illustrés) suggèrent qu'au moins une mutation à un locus différent de *MtSKOR* affecte la cinétique de mise en place de la nodulation au sein de cette lignée. Concernant les plantes mutantes homozygotes *mtskor-2* au sein de la lignée NF21235, les plantes de la sous-lignée Mt#1 présentent un nombre de nodules semblable à celui du contrôle WT R108, alors que les plantes de la sous-lignée Mt#2 présentent un nombre de nodules significativement inférieur à celui de ce contrôle sauvage R108 à 7 dpi, et jamais statistiquement différent de celui des lignées Wt#3, Wt#8 et Wt#10 de génotype sauvage pour *MtSKOR* (à l'exception de la comparaison avec Wt#10 à 14 dpi). Ces observations peuvent également être interprétées dans le cadre de l'hypothèse d'une mutation qui, présente à un locus différent de *MtSKOR*, affecterait la cinétique de nodulation.

III.3. Discussion

L'analyse *in silico* du génome de *M. truncatula* indique que MtSKOR (codé par le gène *Medtr5g077770*) est le seul canal potassique Shaker de type rectifiant-sortant présent chez cette espèce. L'information disponible sur l'implication de ce type de canal chez *Arabidopsis thaliana* conduit donc à imaginer que *MtSKOR* pourrait participer à différentes fonctions physiologiques majeures. Par exemple, dans la stèle racinaire, où la Figure III.3 montre que MtSKOR est exprimé, ce canal pourrait participer à la sécrétion de K^+ dans la sève xylémienne, à l'instar de son homologue AtSKOR chez *Arabidopsis* (Gaymard *et al.*, 1998). Dans les cellules de garde, où nos données montrent qu'il y domine la conductance potassique sortante (Figure III.4C), MtSKOR pourrait jouer un rôle majeur dans l'osmocontractilité stomatique en conduisant le flux de K^+ sortant qui permet une réduction de la pression de turgescence et la fermeture des stomates, à l'instar de son homologue AtGORK chez *Arabidopsis* (Hosy *et al.*, 2003). Dans ce travail, nous nous sommes intéressés aux rôles spécifiques que pourrait jouer MtSKOR dans l'établissement et le fonctionnement de la symbiose fixatrice d'azote. Cette analyse a impliqué une approche de génétique inverse. Pour cela, deux lignées mutantes indépendantes de *M. truncatula* ont été obtenues, NF9524

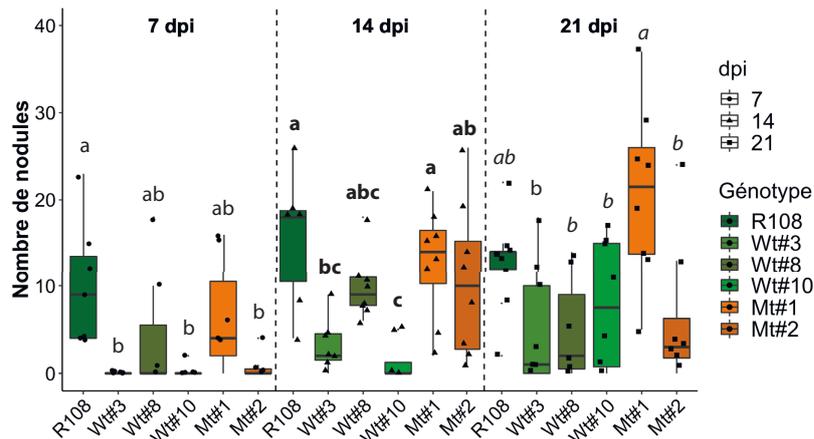
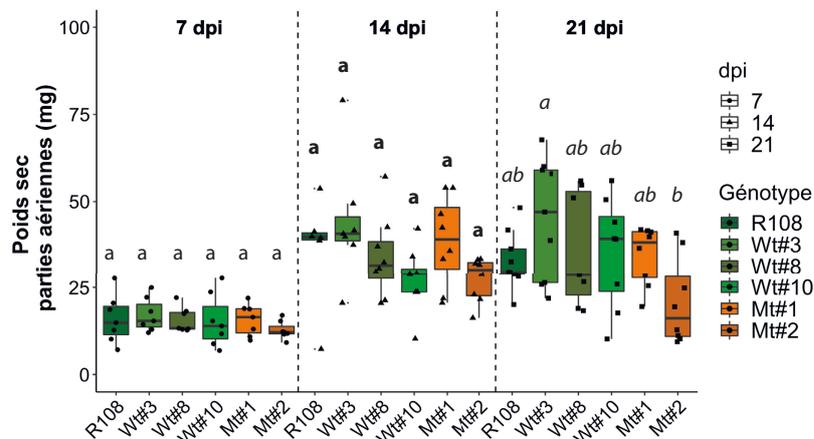
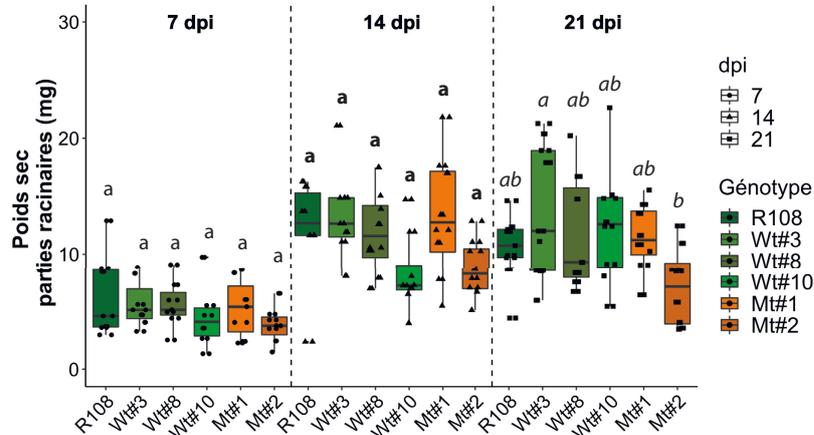
A**B****C**

Figure III.12 : Phénotypage de la capacité de nodulation en absence d'expression fonctionnelle du gène *MtSKOR* dans la lignée NF21235.

Les plantes sont cultivées dans un substrat de sable et vermiculite selon le protocole décrit dans le chapitre II.1.3.3 (voir aussi la légende de la Figure III.8D). Elles sont inoculées avec la souche de *S. meliloti* 1021 après une semaine de culture. Les mesures (nombre de nodules, poids sec des parties aériennes et poids sec des racines) sont faites 7, 14 et 21 jours après inoculation (dpi). Pour chaque point de la cinétique, des lettres différentes indiquent une différence statistiquement significative selon le test de Tukey au niveau de 5%. Les lettres sont normales pour 7 dpi, en gras pour 14 dpi et en italique pour 21 dpi.

A : Nombre de nodules déterminé à 7, 14 et 21 dpi.

B : Poids sec en milligramme des parties aériennes déterminé à 7, 14 et 21 dpi.

C : Poids sec en milligramme des parties racinaires déterminé à 7, 14 et 21 dpi.

et NF21235, présentant une insertion du rétrotransposon *TNT1* respectivement dans le premier et le quatrième exon de la séquence codante de *MtSKOR*. L'invalidation totale de l'expression fonctionnelle du gène *MtSKOR* par les mutations correspondantes, *mtskor-1* et *mtskor-2*, a été vérifiée par RT-PCR avant d'engager les analyses phénotypiques de ces lignées mutantes (Figure III.4 et III.11).

La mutation du gène *MtSKOR* dans les lignées NF9524 et NF21235 résulte de mutagénèses par insertion du rétrotransposon *TNT1*. Ce type de mutagénèse génère des plantes susceptibles de présenter de nombreuses insertions de *TNT1*, et donc de nombreuses mutations. Le phénotype observé chez une lignée mutante, par rapport à une lignée de génotype sauvage, présente donc le risque d'être la conséquence d'une ou plusieurs mutations ailleurs qu'au locus ciblé. C'est probablement cela qui explique l'hétérogénéité des phénotypes de nodulation chez la lignée NF21235. En effet, nos observations identifient au sein de cette lignée des plantes présentant un nombre réduit de nodules, au moins à une date donnée après l'inoculation, ou au contraire présentant un nombre de nodules semblable à celui des plantes contrôles de génotype R108 sauvage. Tout cela est observable à la fois dans la descendance de plantes porteuses de la mutation *mtskor-2* à l'état homozygote et dans la descendance de plantes contrôle présentant de façon homozygote l'allèle *MtSKOR* sauvage. En d'autres termes, l'hypothèse la plus simple pour interpréter les résultats concernant la lignée NF21235 est qu'une mutation à un autre locus que *MtSKOR*, pouvant être présente ou absente chez les plantes mutantes *mtskor-2* comme chez les plantes de génotype *MtSKOR* sauvage, peut affecter la cinétique de nodulation. Cette hypothèse pourra être testée en vérifiant dans un premier temps que ce défaut de nodulation ségrège effectivement parmi les plantes de génotype *MtSKOR* sauvage au sein de la lignée NF21235. Si c'est le cas, la recherche de la mutation à l'origine de ce phénotype présenterait un intérêt certain dans le cadre de l'analyse des mécanismes de mise en place et de fonctionnement de la symbiose rhizobienne. Dans une telle perspective, nous nous sommes intéressés à la position des autres insertions recensées dans cette lignée par la Noble Foundation grâce à l'opération de séquençage systématique des séquences bordantes (FST : « flanking sequence tags ») des *TNT1* chez toutes les plantes de la collection. En résumé, 40 insertions du *TNT1* sont recensées dans la lignée NF21235 par la Noble Foundation (Tableau III.1). L'analyse par BLAST des séquences FST contre le génome

Tableau III.1 : Insertions du rétrotransposon dans la lignée NF21235. Quarante insertions sont recensées dans cette lignée. Treize d'entre elles, non référencées dans ce tableau, sont localisées dans des régions non codante du génome. Parmi les vingt-sept autres insertions, 16 sont localisées dans une séquence exonique, 8 dans une séquence intronique et 3 à proximité de l'extrémité 5' ou 3' d'un gène.

Gène impacté	Fonction associée
Insertion du <i>TNT1</i> dans une région codante d'un gène (exon) :	
Medtr3g072110	Protéine de la famille des transporteurs d'acide aminé
Medtr5g092590	Protéine transmembranaire putative
Medtr6g087260	Protéine transmembranaire putative
Medtr6g087260	Protéine de résistance aux maladies (classe TIR-NBS-LRR)
Medtr1g056640	Protéine de la famille des hydrolyses de l'O-glycosyle
Medtr1g090030	Protéine hypothétique
Medtr2g078750	Protéine kinase sur Serine/Thréonine (WNK)
Medtr3g008640	Protéine inhibitrice de la pectinesterase
Medtr4g075590	Protéine de la famille des transporteurs MIPs (Major Intrinsic Protein)
Medtr5g077770	MtSKOR
Medtr5g092060	Protéine de la famille des GTP
Medtr6g006190	Protéine de stress environnemental
Medtr6g033820	Protéine chaperon
Medtr7g096930	Facteur de transcription Myb
Medtr8g019370	Protéine transmembranaire putative
Medtr8g064530	Protéine polygalacturonase
Insertion du <i>TNT1</i> dans une région non codante d'un gène (intron) :	
Medtr2g038030	Protéine de ligation de l'ADN
Medtr2g090375	Protéine de synthèse du <i>bêta</i> -(1,3)-glucane
Medtr4g063275	Protéine histone H2A/H2B/H3/H4
Medtr5g078360	Protéine de réparation d'ADN
Medtr8g006010	Protéine nodulin-like (MtN21)
Medtr2g012650	Petit ARN nucléolaire
Medtr7g082660	Protéine chloroplastique
Medtr8g028680	Protéase à prényle
Insertion du <i>TNT1</i> dans un région promotrice ou après un gène :	
chr1:34407836..34408413	Région promotrice de Medtr1g077120 C2H2- Perception de l'éthylène par motif en doigt de Zinc
chr2:4708343..4708535	Région promotrice Medtr2g015770 (Protéine Hypothétique)
chr6:8060187..8060435	En amont du gène Medtr6g023190 (Protéine Hypothétique)

de *M. truncatula* indique que 26 de ces 40 insertions sont insérées dans des gènes, et 16 d'entre elles dans une région codante. Cinq insertions sont situées juste en amont ou en aval d'un gène. Parmi les gènes concernés par ces mutations, on retrouve des facteurs de transcription, une kinase et des protéines transmembranaires dont des transporteurs. Dans une approche « gène candidat », plusieurs de ces gènes pourraient donc être sélectionnés pour tester, par génétique inverse, l'hypothèse d'une implication dans la mise en place de la symbiose. En particulier leur implication dans des mécanismes de signalisation (facteurs de transcription, kinase) ou de perception (protéines transmembranaires).

Concernant directement l'analyse du rôle de MtSKOR dans la mise en place et le fonctionnement de la symbiose, les résultats obtenus avec la lignée NF21235 sont pour l'instant peu interprétables à cause de l'existence probable de cette deuxième mutation susceptible d'impacter la cinétique de nodulation. Il est important de noter qu'une troisième lignée présentant une insertion TNT1 dans *MtSKOR* est apparue récemment dans la collection de la Noble Foundation. Cette lignée a été amplifiée, mais les premières expériences n'ont pas permis de déterminer le génotype des 15 plantes testées. Investir du temps pour l'obtention de plantes mutantes *mtskor* à partir de cette troisième lignée sera cependant très utile pour consolider le travail déjà réalisé.

L'analyse du rôle de MtSKOR dans la mise en place et le fonctionnement de la symbiose ne peut donc être conduite à ce jour que sur la base des résultats obtenus avec la lignée NF9524 et les plantes *mtskor-1*.

La lignée NF9352 présente 15 insertions. Du fait de leur localisation, seulement 6 de ces insertions sont susceptibles d'impacter l'expression d'autres gènes que *MtSKOR* (Tableau III.2). Les 9 autres insertions sont localisées dans des régions chromosomiques dépourvues de gènes.

L'analyse électrophysiologique de l'effet d'un traitement par des facteurs Nod (FNs) sur la polarisation électrique des cellules de la périphérie racinaire révèle que la cinétique de repolarisation après la dépolarisation initiale provoquée par les NFs est environ deux fois plus lente chez les plantes mutantes *mtskor-1* que chez les plantes de génotype sauvage (Figure III.6). La caractérisation des propriétés fonctionnelles de MtSKOR dans l'ovocyte de Xénope (Figure III.2) révèle un canal de type rectifiant sortant comme ses homologues SKOR

Tableau III.2 : Insertions du rétrotransposon dans la lignée NF9352

Gène impacté	Fonction associée
Medtr5g083260.1	TBL33 (Trichome Birefringence-Like) : impliqué dans la biosynthèse de la cellulose
Medtr1g099600.1	WRKY27 : facteur de transcription impliqué dans la réponse immunitaire chez <i>A. thaliana</i>
Medtr7g118100.1	Protéine de la famille des D-arabinono-1,4-lactoneoxydase, impliqué dans la biosynthèse de l'acide ascorbique et la biogénèse de la paroi
Medtr3g072300.1	Protéine de la famille des NPF (NRT1/PTR Family), orthologue de AtNPF5.1/PTR3
Medtr1g103180.1	Facteur de transcription de la famille tesmin/TSO1-like, impliqué chez <i>A. thaliana</i> dans le développement des tissus reproducteurs mâle et femelle
Medtr5g011940.1 1.5kb en amont du codon start	Protéine de la famille UDP-D-glucuronate 4-épimérase, impliquée dans la synthèse de pectine

et GORK chez *Arabidopsis*. Un tel canal est donc capable de conduire un flux sortant de K^+ , lorsque la cellule est dépolarisée et que le gradient de potentiel électrochimique de cet ion est en faveur de sa sortie de la cellule. Comme le contrecoup d'un tel efflux est de repolariser la cellule (puisqu'il provoque une sortie de charges électriques positives), il est raisonnable de considérer que le ralentissement de la cinétique de repolarisation chez les plantes mutantes homozygotes *mtskor-1* résulte de cette mutation et de la réduction de la perméabilité de la membrane à K^+ (dans le sens sortant) qu'elle provoque. Dans le cadre de cette hypothèse, l'absence de la conductance potassique sortante MtSKOR diminuerait la vitesse de repolarisation, d'environ un facteur 2 par rapport aux plantes de génotype sauvage, mais ne supprime pas la capacité de repolarisation de la cellule. Une accélération de la sécrétion de H^+ par les ATPases pompes à protons de la membrane plasmique contribue très probablement au processus de repolarisation, puisque le potentiel est rétabli à sa valeur initiale, avant le traitement par les facteurs Nods. Il est possible aussi que d'autres canaux ioniques ou transporteurs, permettant des sorties de cations de la cellule, contribuent à cette repolarisation. C'est dans le cadre de cette dernière hypothèse que nous avons initié une analyse des propriétés fonctionnelles et de l'expression des transporteurs de la famille HKT chez *Medicago* (Cf. chapitre IV).

Après inoculation par *S. meliloti*, le nombre de cordons d'infection n'est pas différent entre plantes mutantes *mtskor-1* et plantes de génotype sauvage. La conclusion est donc que le défaut observé dans la cinétique de repolarisation cellulaire chez les plantes mutantes, qu'il résulte ou non à la mutation *mtskor-1*, n'a pas d'impact déterminant sur la capacité des racines à répondre à la présence des rhizobia en produisant des cordons d'infection. Autrement dit, le signal électrique déclenché par la perception des facteurs Nods peut être sensiblement déformé sans que cela n'affecte l'ensemble des processus ultérieurs conduisant à la production de cordons d'infection. A ce stade, il est même possible de proposer l'hypothèse que le signal électrique déclenché par les facteurs Nods ne fait pas partie des processus de signalisation nécessaires à la production de cordons d'infection.

Les expériences visant à examiner l'effet de la mutation *mtskor-1* sur la nodulation ont mis en évidence des différences entre plantes mutantes et sauvages statistiquement significatives mais diverses et complexes. Par comparaison avec les plantes de génotype sauvage, les plantes mutantes présentaient, selon les conditions expérimentales, un nombre

de nodules inférieur mais une biomasse semblable, ou un nombre de nodules semblable et une biomasse supérieure. Il est intéressant de noter que ces deux types de différence phénotypique entre plantes mutantes et sauvages peuvent être interprétées dans le cadre de l'unique hypothèse suivante : la fixation de l'azote par les nodules serait plus efficace chez les plantes mutantes *mtskor-1* que chez les plantes contrôles de génotype sauvage dans les conditions expérimentales testées. Cette hypothèse est confortée par l'analyse de la relation entre masse des parties aériennes et masse des nodules que nous avons conduite sur des plantes cultivées en « hydro-aéroponie » (Figure III.9). Concernant la mutation à l'origine de ce phénotype, l'examen de la liste des gènes interrompus par l'insertion du TNT1 dans la lignée mutante *mtskor-1* ne génère pas de candidat à privilégier par rapport à *MtSKOR*. Il est clair cependant que seule la caractérisation des 2 autres lignées mutantes présentant une insertion dans ce gène, si ce travail devient possible, ou la complémentation de la lignée *mtskor-1* actuelle par une construction permettant d'exprimer le gène *MtSKOR*, pourront permettre d'apporter la preuve de la responsabilité de l'invalidation de ce gène dans les phénotypes observés. Si cela se révélait être le cas, la conclusion serait donc que l'activité du gène *MtSKOR* conduit, dans les conditions expérimentales que nous avons testées, en serre ou chambre de culture et en absence de stress biotique ou abiotique, à une réduction de l'efficacité de la fixation de N₂ par les nodules. Une possibilité serait alors de rechercher l'origine de ce phénotype dans des fonctions que *MtSKOR* exerce dans des tissus extérieurs au nodule. Par exemple, *MtSKOR* étant susceptible de participer à la sécrétion de K⁺ dans la stèle racinaire, pour une translocation vers les parties aériennes via la sève xylémienne, il serait possible qu'un déficit dans cette fonction favorise l'activité de fixation des nodules. Dans les cellules de garde, l'absence d'activité de *MtSKOR* pourrait se traduire par des stomates plus ouverts. Cela pourrait conduire à une stimulation de l'activité photosynthétique et de la production de substrats carbonés transférés aux racines et aux nodules. Il est aussi possible d'imaginer qu'en absence de déficit hydrique, chez des plantes bien arrosées, une augmentation de la transpiration due à une plus grande ouverture stomatique, favoriserait la translocation vers les feuilles de substrats produits par l'activité symbiotique des nodules, ce qui pourrait stimuler l'activité nodulaire. Il est possible aussi que *MtSKOR* participe à une activité de contrôle de la fixation symbiotique, pénalisant cette activité dans des conditions environnementales optimales, au sein même de tissus nodulaires, par exemple dans les tissus conducteurs du nodule. Une autre hypothèse, décrite

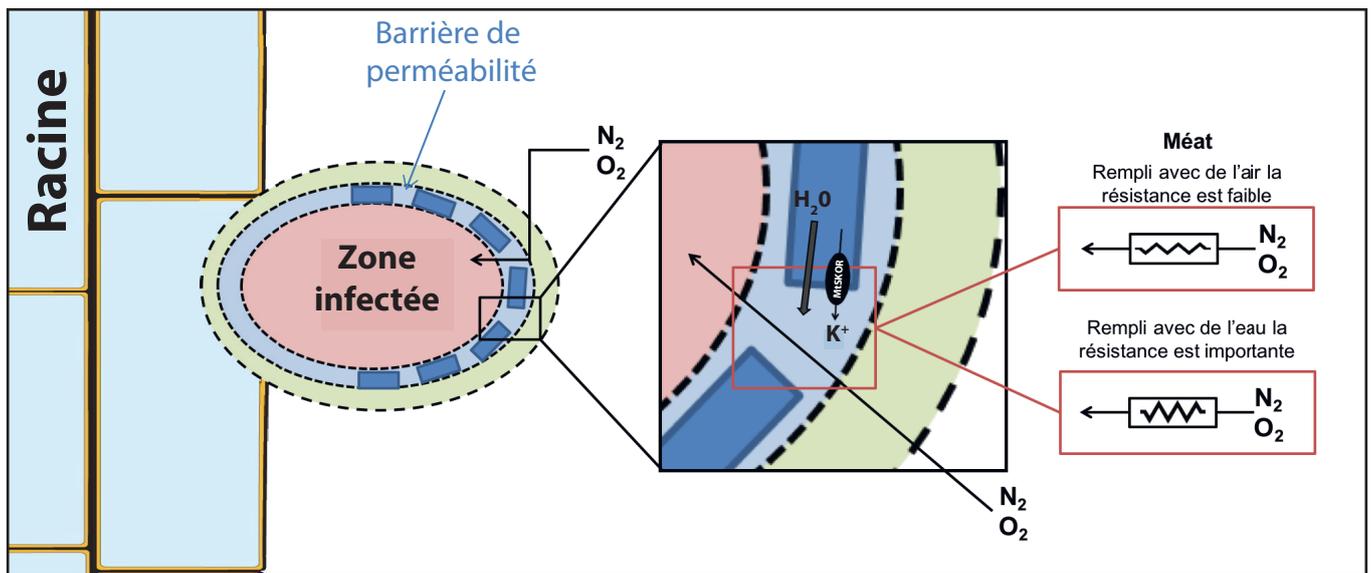


Figure III.13 : Hypothèse concernant le rôle de MtSKOR dans le contrôle de la barrière de perméabilité à l'oxygène du nodule mature.

Représentation schématique d'un nodule mature de la racine de *M. truncatula*. La zone infectée, où la fixation de l'azote prend place, est entourée d'une couche cellulaire qui fait office de barrière de perméabilité protégeant les complexes enzymatiques (nitrogénase) de la zone infectée contre un excès d'O₂ (Hunt and Layzell, 1993; Serraj *et al.*, 1995). Il est raisonnable d'imaginer que la résistance de l'apoplasme et des méats intercellulaires à la diffusion des gaz (O₂ et N₂) vers la zone infectée du nodule est moindre que celle de la voie symplasmique (continuum des cytoplasmes) où les gaz migrent à l'état dissout dans le cytosol (Brown *et al.*, 1997). Dans le cadre de cette hypothèse, nous proposons que l'état hydrique de l'apoplasme et des méats intercellulaires contrôlerait le flux diffusif de O₂ (et de N₂) vers la zone infectée. Lorsque l'apoplasme et les méats sont essentiellement remplis d'air, la résistance à la diffusion de O₂ (et N₂) serait plus faible, et donc le flux de gaz vers la zone infectée plus rapides, que lorsque ces espaces pariétaux sont imbibés de solution. L'état hydrique de ces espaces pariétaux pourrait être contrôlé, de façon osmotique, par des flux nets de K⁺ impliquant le canal MtSKOR en particulier.

par la figure III.12, serait que MtSKOR participe au contrôle des flux gaz, azote N₂ et oxygène O₂, vers la zone infectée active du nodule. Un tel contrôle du flux d'oxygène permet à la plante de gérer la contradiction entre la nécessité d'alimenter en O₂ les mitochondries productrices des substrats énergétiques nécessaires à la réduction de N₂, et la nécessité de maintenir la disponibilité de l'oxygène au niveau des complexes enzymatiques réducteurs pour ne pas pénaliser l'activité nitrogénase et la réduction spécifique de N₂. Pour assurer ce contrôle, la zone de fixation du nodule est entourée d'une barrière de diffusion aux gaz (Hunt et Layzell, 1993). Une assise cellulaire osmo-contractile, pourrait assurer directement cette fonction de contrôle (Serraj et Sinclair, 1996). Elle pourrait aussi contrôler le volume et l'état hydrique de l'espace pariétal et des méats intercellulaires à travers lesquels les gaz N₂ et O₂ peuvent diffuser librement. La résistance à la diffusion des gaz dans cette voie apoplasmique pourrait augmenter avec la quantité d'eau présente dans les méats et imbibant les parois. (Figure III.13). L'hypothèse que nous proposons (Figure III.13) est que l'activité de MtSKOR dans une telle assise cellulaire permettrait un efflux de K⁺ qui entrainerait avec lui, par osmose, un flux d'eau vers les méats et espaces intercellulaires (Figure III.13). Une première étape pour tester cette hypothèse d'une implication de MtSKOR au sein d'une assise cellulaire se comportant comme une barrière et assurant le contrôle de la perméabilité du nodule à O₂ et N₂, serait d'utiliser une fusion transcriptionnelle du promoteur de *MtSKOR* avec le gène rapporteur *GUS* pour déterminer le patron d'expression de *MtSKOR* dans le nodule. Des premières expériences dans ce sens ont été réalisées (Figure III.14). Pour l'instant, elles permettent de mettre en évidence une expression de *MtSKOR* dans le nodule sans toutefois déterminer un patron d'expression précis. La perméabilité du nodule à O₂ pourrait également être comparée chez des plantes mutantes *mtskor* et sauvages dans différentes conditions en faisant varier la pression partielle d'O₂ comme décrit par Aydi *et al.*, (2004), Schulze et Drevon (2005) et Mohamed *et al.*, (2010).

Toutes les hypothèses que nous avons avancées dans les paragraphes précédents pour expliquer qu'une invalidation de *MtSKOR* pourrait se traduire par une stimulation de l'activité nodulaire peuvent être accompagnées du corollaire suivant : cette stimulation ne s'observe que parce que les plantes se développent dans des conditions « environnementales » optimales, en serre ou chambre de culture, et en absence de tout stress abiotique tel que sécheresse, déficit hydrique, stress osmotique ou salin, ou stress

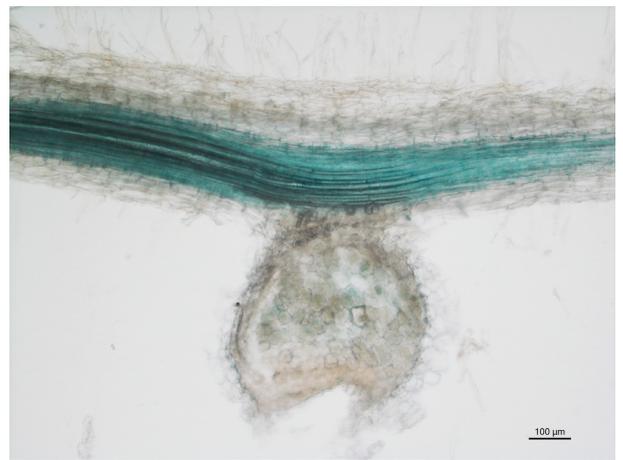


Figure III.14 : Localisation de l'expression de MtSKOR via la fusion transcriptionnelle avec le gène rapporteur GUS.

Photographies représentatives de nodules de *M. truncatula* après coloration GUS permettant une localisation de l'expression de *MtSKOR*. Les observations sont réalisées sur des nodules de *M. truncatula* transformées par *R. rhizogenes* puis inoculés avec *S. meliloti* SM1021. La construction utilisée est présentée dans la Figure III.3. Les nodules ont été récoltés 14 jours après inoculation.

nutritionnel. Il serait donc intéressant de rechercher des conditions environnementales dans lesquelles la présence de MtSKOR ne se traduit pas par un déficit de l'activité nodulaire, pour comprendre la signification physiologique de MtSKOR dans le contrôle de l'activité nodulaire dans certaines conditions environnementales.

Enfin, l'ensemble de ce travail a été réalisé chez la légumineuse modèle *M. truncatula* qui produit des nodules à croissance indéterminée. Il serait intéressant de réaliser une étude similaire chez une autre légumineuse modèle, *Lotus japonicus*, dont les nodules sont à croissance déterminée. A l'instar de *M. truncatula*, *L. japonicus* ne présente dans son génome qu'un seul gène de la famille Shaker permettant un efflux de K^+ . Au moins 4 lignées sont disponibles auprès de la banque de mutants générés par l'insertion du rétrotransposon LORE1 dans le génome de *L. japonicus* (Małolepszy *et al.*, 2016; Mun *et al.*, 2016). L'analyse de la mutation *skor* chez *L. japonicus* permettrait d'analyser l'importance de ce gène dans les deux types de physiologie nodulaire.

Chapitre IV : Analyse de la famille HKT de *Medicago truncatula*

IV.1. Introduction

Soil salinity is one of the most important abiotic stresses affecting plant growth (Munns et Gilliham, 2015). Most crop species are poorly tolerant to salt stress and displays reduced yields when the electrical conductivity of the soil solution (at saturation) becomes higher than ca. 4 dS/m (George E. Brown Jr, 2008), *i.e.* higher than that of a solution containing ca. 40 mM NaCl and, which generates an osmotic pressure of approximately 0.2 MPa (Munns et Tester, 2008; Marschner, 2012). Such soils are then classified as saline. Natural salinity and salinization due to irrigation with poor quality water challenge agriculture in 6 % to 10 % of the earth's land area (Eynard *et al.*, 2005; Munns et Tester, 2008). Enhanced demand for irrigation due to both population increase and climate change, are predicted to dramatically speed up loss of arable land (Eckholm, 1975; Shabala *et al.*, 2014).

Soil salinity results in both an osmotic and an ionic stress for most plants. Osmotic stress results from the fact that high external salt concentrations reduce soil water availability due to the decrease in water potential, and thus make it harder for roots to extract water, which is a situation resembling to drought. The so-called ionic stress corresponds to fact that high salt concentrations within the plant tissues have deleterious effects on plant metabolism and physiology. Molecular, genetic and physiological analyses indicate that Na⁺ rather than Cl⁻ is the major cause of the toxicity in most cases (Munns et Tester, 2008). For instance, screening of mutant plants and searches for QTLs of plant tolerance to salt stress have identified Na⁺ transporters or channels involved in Na⁺ entry into the root or long distance transport of this cation between roots and shoots via the plant vasculature in the model plant *Arabidopsis thaliana* (Shi *et al.*, 2002; Berthomieu *et al.*, 2003) as well as in rice and wheat (Ren *et al.*, 2005; Byrt *et al.*, 2007).

Salt tolerance involves highly complex mechanisms, from osmolyte and osmoprotectant synthesis to anatomical responses, including specific adaptations in some

species, such as succulence or salt excretion by salt glands at the leaf surface. A major determinant of salt tolerance common to all plants is the capacity, under high Na^+ concentrations, to efficiently control Na^+ and K^+ uptake and long distance transport. Amongst the transport systems playing crucial roles in this control are members from the so-called HKT family. The acronym HKT means High affinity K^+ Transporters (Schachtman et Schroeder, 1994) but these systems are either selective of Na^+ (transporters belonging to HKT subfamily 1), with respect to all other inorganic monovalent cations, or selective of both Na^+ and K^+ with respect to the other monovalent cations (subfamily 2; see Discussion).

The HKT family is still very poorly characterized in legumes. The variation in salt tolerance in legumes species appears to be very great (Lauchli, 1984) and salinity strongly affects symbiotic nitrogen fixation in legume nodules. Here we report on HKT transporters from the model legume *Medicago truncatula*, which can be found in sub-arid habitats and exposed to soil salinity and drought conditions (Badri *et al.*, 2007; Gil-Quintana *et al.*, 2015). When compared with other legume crops such as pea, bean and soybean, *M. truncatula* is rather tolerant to soil salinity and drought (Moran *et al.*, 1994; González *et al.*, 1998; Costa França *et al.*, 2000; Gálvez *et al.*, 2005).

IV.2. Material and methods

IV.2.1. Plant material and experimental conditions for MthKT expression analysis

M. truncatula (ecotype Jemalong A17) seeds were scarified with sulfuric acid (99%) for 10 min, sterilized in 6% sodium hypochlorite solution for 1 min and disposed on inverted 0.8% agar plates. The plates were kept for 48 h in the dark at 4 °C and thereafter transferred at 21 °C during 24 h for germination. Seedlings with a radicle long of about 2 cm were then transferred onto pot filled with vermiculite/sand substrate (1/3, V/V). Plants were grown with a photoperiod of 16 h light (25 °C) and 8 h dark (21 °C) in a growth chamber (70% humidity, 200 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ light intensity). They were watered with Fahraeus solution (ref?): 0.5 mM MgSO_4 , 0.7 mM KH_2PO_4 , 0.4 mM NaH_2PO_4 , 10 μM Fe-EDTA, 1 mM Urea and 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of each of the following micronutrient: MnSO_4 , CuSO_4 , ZnSO_4 , H_3BO_3 , and Na_2MoO_4 . Inoculation, when performed, took place after after one week of growth. The rhizobial strain was *S. meliloti* 2011-GFP (Cheng et Walker, 1998). Rhizobia were grown in TY liquid medium

(3 g.L⁻¹ yeast extract, 5 g.L⁻¹ tryptone and 6 mM CaCl₂) supplemented with 10 µg.l⁻¹ of tetracycline until an OD₆₀₀ of 0.8 was reached. The suspension was then centrifuged for 15 min at room temperature. The pellet was resuspended with 100 mL water, this washing step being repeated twice, allowing antibiotics removal. The resuspended cells were diluted to OD₆₀₀ 0.05 in Fahraeus solution, which was used for watering and thereby inoculating plants. The inoculated plants were then watered with Fahraeus solution without urea.

IV.2.2. Determination of Na⁺ contents

Plant material was weighed (for fresh weight) or dried for at least 48 hr at 70 °C and then weighed (for dry weight). Plant material was then incubated in 0.1 N sulfuric acid for 24 hr for ion extraction. Na⁺ concentrations in the extracts were determined by flame photometry (SpectrAA220 fast sequential atomic absorption spectrometer, Varian, Inc.).

IV.2.3. Cloning of *Medicago truncatula* HKTs cDNA

Total RNA was extracted from 4-week old plants using Qiagen RNeasy Plant Mini kit according to the supplier's instructions. The RNA was treated with DNase I (Thermo Scientific). Reverse transcription cDNA synthesis was performed with the cDNA First Strand cDNA Synthesis kit (Thermo Scientific) according to the manufacturer's recommendations. Based on the available *M. truncatula* genome sequence (Krishnakumar *et al.*, 2014; Tang *et al.*, 2014), primers were designed for each of the 5 *HKT* gene identified in this genome (Supplemental data). The amplification protocol, after denaturation of the template cDNA at 94 °C for 1 min, consisted of 35 cycles of 10 sec at 94 °C, 30 sec at 53 °C, and 1 min at 72 °C, with a final extension for 5 min at 72 °C. High Proof Polymerase (Bio-Rad) enzyme was used. Amplified products were cloned using the pGEM-T Easy vector system (Promega). Successful isolation of *MtHKT*-type cDNA was confirmed by sequencing and comparison with the genome sequence.

IV.2.4. Analysis of gene expression by real-time PCR

Total RNA was extracted using the Qiagen RNeasy Plant Mini kit according to the supplier's instructions. Its quality was checked with a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA) by measuring the absorbance at 260 and 280 nm. Prior to cDNA synthesis, total RNA was treated with DNase I (Thermo Scientific). Reverse transcription reaction for cDNA synthesis was

Table IV.1: Q-RT-PCR Primers

Gene	Name	Sequence
<i>MtTC77416</i> (<i>Medtr1g079510</i>)	TC77416 F	ACGCGCTAATGATTCCAGTG
	TC77416 R	AGTGTTGCTGTGTTCCAACG
	TC77416GE F	GTTGGCTCATCCGACAGCTC
	TC77416GE R	GGACGAAGCTCAATGGCAATC
<i>MtTubulin</i> (<i>Medtr8g107250</i>)	MtTubbQP F	TGCCGAGCTCATTGACTTTG
	MtTubbQP R	GTGAGCATCATTTCGATCAGGG
	MtTubb375 F	TGGTGCCGGAAACAATTTTCG
	MtTubb375 R	GGTGTGGTGAGTTTGAGGGT
<i>MtActin</i> (<i>Medtr7g026230</i>)	MtActin F	CCGTTCTTTCACTGTACGCC
	MtActin R	GGCATGTGGAAGGGCATAAC
	MtActin352 F	ACAATGAGCTTCGTGTCCGCC
	MtActin352 R	ATTTCTCGCTCTGCTGAGGT
<i>MtEF1B</i> (<i>Medtr3g058940</i>)	EF1B F	ATGGTCCCCTCTTTGAGAGC
	EF1B R	ATCCATTGTTCAACGTGGGC
	EF1B377 F	CTGCATGCTCAGAAGGGAAAC
	EF1B377 R	TCTTGACCAAGAGTTGAGCGA
<i>MtHKT1;2</i> (<i>Medtr6g092840</i>)	MtHKT1;2 F1227	GTACCTTCCTCCTTACACCTCATTCC
	MtHKT1;2 R1655	AATCAGAGAAGTTTCCATGGCTTG
	MtHKT1;2 F	TCTAGTGTGCATAACTGAGAGGA
	MtHKT1;2 R	CCCTCATCACTCCATTTCCC
<i>MtHKT1;4</i> (<i>Medtr6g092940</i>)	MtHKT1;4 F1209	GTACCTTCCACCTTACACCTCATTC
	MtHKT1;4 R1649	ATATTCAAGAATCAGAGAAGTTTCCATG
	MtHKT1;4 F	TGTCGGAAAGCAGTGAGAGA
	MtHKT1;4 R	TCGATGCAACTGTGCTTCCAC
<i>MtHKT1;5</i> (<i>Medtr6g092970</i>)	MtHKT1;5 F1272	GTATCTTCCACCGTACACAACATTTT
	MtHKT1;5 R1677	CTAGGACAGGTGCCATGCCTT
	MtHKT1;5 F	TCCCCTCAACTTCAACGTCT
	MtHKT1;5 R	AGCTTCCCTTCTGTACTIONCA

performed from 1 to 2 µg of total RNA treated with DNase I and with the cDNA First Strand cDNA Synthesis kit (Thermo Scientific) according to the manufacturer's recommendations. The cDNA was stored at –20 °C until use.

Real-time PCR (Q-RT-PCR) analysis of *M. truncatula* *HKTs* genes was performed using a LightCycler® 480 (Roche Molecular Systems, USA). cDNA amplification was carried out with 40 ng of total cRNA, SYBR® Premix Ex Taq™ II (TAKARA Bio Inc) and specific primers designed with the Primer3web program (<http://primer3.ut.ee>) (Table IV.1 in the Supplementary Material). The reaction was done according to the manufacturer's recommendations. Three technical replicates were run for each of the three biological replicates. As negative controls, water was used in the reaction mixture instead of cDNA. The temperature profile was 95 °C for 30 sec, followed by 40 cycles of 95 °C for 10 sec, 60 °C for 10 sec, and 72 °C for 15 sec. After each amplification step, fluorescence was measured and at the end of the amplification, a melting curve was generated by continuous reading of fluorescence from 64 °C to 95 °C.

Different housekeeping candidate genes were tested *MtTC77416* (*Medtr1g079510*), *MtTubulin* (*Medtr8g107250*), *MtActin* (*Medtr7g026230*), *MtEF1B* (*Medtr3g058940*). The expression of each *MtHKT* gene was normalized to the expression of the *MtTC77416* gene, which was shown to be of constant expression in different tissues in *Medicago truncatula* (Lohar *et al.*, 2006; Serwatowska *et al.*, 2014) and in our data set. The data obtained were analyzed manually and calculations to estimate the absolute expression of each gene.

IV.2.5. Expression in *Xenopus laevis* oocytes and two-electrode voltage-clamp analysis

MtHKT cDNA were subcloned into the pGEMXho vector (derived from pGEMDG; D. Becker, Würzburg) downstream from the T7 promoter and between the 5' and 3'-untranslated regions of *Xenopus β-globin* gene. Capped and polyadenylated copy RNA (cRNA) were synthesised *in vitro*, from linearized vector, using a mMMESSAGE mMACHINE T7 kit (Ambion). Oocytes, isolated as described previously (Very *et al.*, 1995), were injected with either 50 nl of *MtHKT1;2* (15 ng), *MtHKT1;4* (15 ng), *MtHKT1;5* (30 ng) cRNA or 50 nl of water for control oocytes, and then kept at 18°C in ND96 solution (96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 1

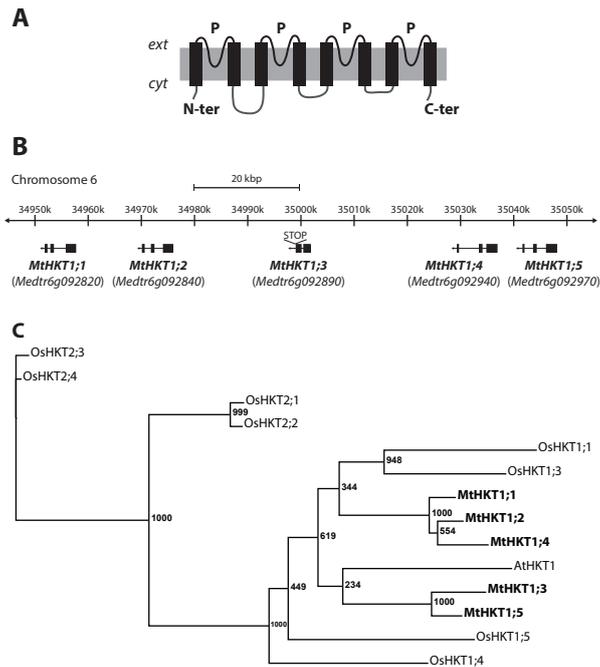


Figure IV.1: The HKT transporter family of *Medicago truncatula*.

A: Topology of an HKT transporter based on that defined for bacterial counterparts. N-ter/C-ter, N-terminus/C-terminus of the polypeptide; *ext/cyt*, extracellular/cytoplasmic side; P, pore-forming domain; from Véry *et al.*, 2014.

B: Illustration of annotated portion of chromosome 6 (34,950,000..35,050,000) of the *M. truncatula* genome. The length of the represented portion of chromosome is 100 kbp and the position on the chromosome 6 is from 34,950,000 to 35,050,000 base pair. STOP: represent a stop codon on the sequence of *MthKT1;3*.

C: Phylogenetic relationship of *A. thaliana*, *O. sativa* and *M. truncatula* HKT proteins. The HKTs polypeptides were aligned with Clustal Omega (<https://galaxy.pasteur.fr>). The unrooted phylogenetic tree was generated with PhyML software (<http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/binaries.php>) using the maximum-likelihood method and 1000 bootstrap replicates. The tree was drawn with FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

mM MgCl₂, 2.5 mM sodium pyruvate, and 5 mM HEPES/NaOH, pH 7,4) supplemented with 0.5 mg.Γ⁻¹ of gentamicin, until electrophysiological recordings.

Whole-oocyte currents were recorded using the two-electrode voltage-clamp technique 2 days after cRNA injection, as described by Mian et al. 2011. All electrodes were filled with 3 M KCl. The external solution bathing the oocyte was continuously percolated during the voltage-clamp experiment. All bath solutions contained a background of 6 mM MgCl₂, 1.8 mM CaCl₂, and 10 mM MES-1,3-bis[tris(hydroxymethyl)methylamino]propane, pH 5,6. Monovalent cations were added to the background solution as glutamate or chloride salts. D-Mannitol was added to adjust the osmolarity, which was set to 220–240 mosM in every solution. To extract MthKT-mediated currents from total oocyte currents, mean currents recorded in water-injected control oocytes from the same batch in the same ionic conditions were subtracted from the currents recorded in the HKT-expressing oocytes.

IV.2.6. Multiple alignment and phylogenetic analysis

The polypeptide sequences were first aligned with ClustalO 1.2.1 (Mareuil *et al.*, 2017) and phylogenetic tree was generated with PhyML 3.1 software (<http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/binaries.php>) (substitution model, blossom62) using maximum-likelihood method and 1000 bootstrap replicates.

IV.3. Results

IV.3.1. Identification and phylogenetic analysis of *M. truncatula* HKT transporters

Analysis of the *Medicago truncatula* genome database (Krishnakumar *et al.*, 2014) revealed the existence of 5 High-affinity Potassium Transporter sequences, all present in a 50 kb cluster in chromosome 6. These sequences were named *MtHKT1;1* to *MtHKT1;5* according to their relative position along this cluster (Figure IV.1 B). RT-PCR experiments carried out to clone the corresponding cDNAs were successful for 3 genes, *MtHKT1;2*, *MtHKT1;4* and *MtHKT1;5*. The amplified cDNAs strictly corresponded to the available plant genome sequence, without any difference. No DNA fragment could be amplified for *MtHKT1;1* and *MtHKT1;3*, whatever the plant growth conditions (control, drought stress or salt stress), neither from roots nor from shoots. *In silico* analysis of the genome sequence indicates that

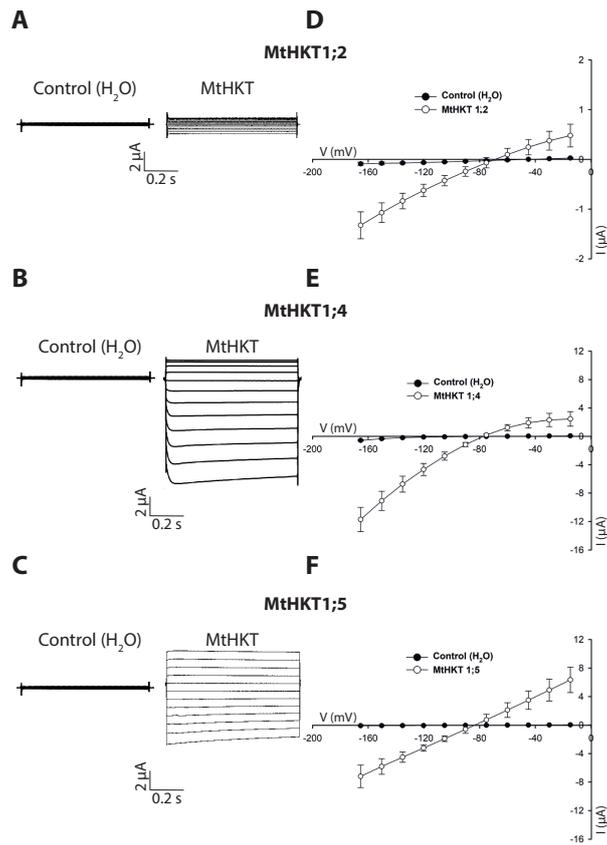


Figure IV.2: MthKT expression in *X. laevis* oocytes gives rise to Na⁺ currents.

A, B and C: current traces recorded in oocytes injected with water or *MthKT* cRNA, respectively *MthKT1;2* (A), *MthKT1;4* (B) and *MthKT1;5* (C), and bathed in 3 mM Na⁺ and 0.3 mM K⁺.

C, D and F: current-voltage curves in presence of 3 mM Na⁺ and 0.3 mM K⁺. Oocytes were injected with water or *MthKT* cRNA, respectively *MthKT1;2* (C), *MthKT1;4* (D) and *MthKT1;5* (F). C: Mean±SD, n = 4 and 5 respectively for control and MthKT1;2. D: Mean±SD, n = 3. C: Mean±SD, n = 5 and 3 respectively for control and MthKT1;5.

MtHKT1;1 displays an early stop codon in its open reading frame, indicating that this gene cannot encode a typical HKT transporter

Phylogenetic analysis of the HKT families from *M. truncatula*, rice and *Arabidopsis thaliana* (8 members in rice, cv. Nipponbare, and 1 member in *Arabidopsis*) indicated that the MtHKT polypeptides would belong to subfamily 1, which gathers transporters permeable to Na⁺ and displaying strong selectivity for this cation against K⁺ (Very *et al.*, 2014). Electrophysiological characterization of the cloned MtHKT transporters was carried out using the *Xenopus* oocyte system.

IV.3.2. MtHKT conductances upon expression in oocytes

Oocytes were injected with *MtHKT1;2*, *MtHKT1;4*, or *MtHKT1;5* cRNA, or injected with water for control oocytes. Figures IV.2 A, IV.2 B and IV.2 C, for *MtHKT1;2*, *MtHKT1;4* and *MtHKT1;5*, respectively, provide representative current traces recorded in presence of 3 mM Na⁺ and 0.5 mM K⁺ in control oocytes and in *MtHKT* expressing-oocytes. Control oocytes displayed very low current levels in the whole range of imposed membrane potentials, from -165 to -15 mV, when compared with oocytes injected with *MtHKT* cRNA. This indicated that each of the 3 cloned MtHKT transporters was expressed and functional at the oocyte membrane. Current-voltage (I-V) curves obtained from such experiments are displayed by Figure IV.2 D, IV.2 E and IV.2 F for *MtHKT1;2*, *MtHKT1;4* and *MtHKT1;5*, respectively, and the corresponding control oocytes. Qualitative differences clearly appear between the 3 MtHKT curves. In the case *MtHKT1;5*, the I-V curve is quasi linear in the whole range of recorded currents, inward or outward, as reported for the *Arabidopsis* AtHKT1 (Xue *et al.*, 2011; Ali *et al.*, 2016) and most other HKT subfamily 1 transporters characterized from dicots (Fairbairn *et al.*, 2000; Almeida *et al.*, 2014b) as well as from monocots (Suzuki *et al.*, 2016). In contrast, in the case of *MtHKT1;4*, the shape of the I-V curve clearly show that the ability of this transporter to mediate inward currents is stronger than its ability to mediate outward currents. In other words, this transporter behaves as an inwardly rectifying conductance. The shape of the *MtHKT1;2* I-V curve indicates that this transporter too is endowed with inward rectification, but to a lesser extent than *MtHKT1;4*. Rectification has been rarely reported in HKT transporters so far (Jabnourne *et al.*, 2009; Ali *et al.*, 2016).

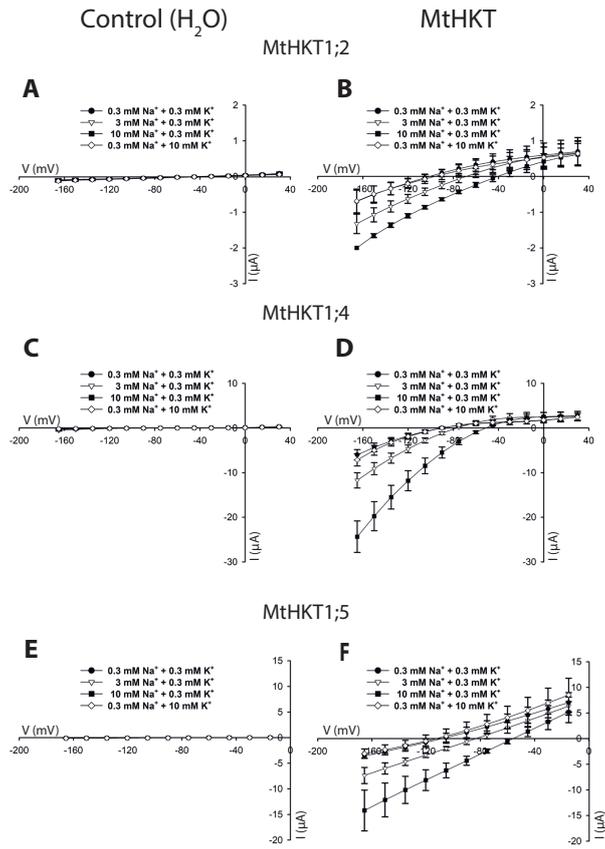


Figure IV.3: Current-voltage curves in presence of various K^+ and Na^+ concentrations.

Oocytes were injected with 50 nl of either water (A, C and E) or *MthKT1;2* (B), *MthKT1;4* (D) and *MthKT1;5* (F) cRNA solution. They were bathed in 4 different solutions, containing variable Na^+ and K^+ concentrations, for currents recordings.

A, C and E: oocytes were injected with water. Mean \pm SD, n = 5 in A, n = 3 in C and n = 5 in E.

B, D and F: oocytes were injected with *MthKT* cRNA. *MthKT1;2* was injected with 15 ng, *MthKT1;4* with 15 ng and *MthKT1;5* with 30 ng. Mean \pm SD, n = 4 in B, n = 3 in D and F.

The magnitude of the currents mediated by the three MthKT cannot be compared directly because the amounts of proteins expressed and functionally targeted to the cell membrane by the oocyte machinery could be different between the three transporters.

IV.3.3. MthKT are preferentially permeable to Na⁺ when compared to K⁺ and Li⁺

Oocytes were successively bathed in solutions containing either a fixed concentration of K⁺, 0.3 mM, and different concentrations of Na⁺, 0.3, 3 and 10 mM, or a fixed concentration of Na⁺, 0.3 mM, and different concentrations of K⁺, 0.3 or 10 mM. I-V curves obtained for MthKT1;2, 1;4 and 1;5 in these conditions (and the corresponding I-V curves of the control oocytes) are displayed by Figures IV.3 A, IV.3 B and IV.3 C, respectively. These figures allow to compare, for each MthKT transporter, the relative positions of the I-V curves obtained in the different ionic conditions and the potentials at which these curves cross the x axis, i.e. the zero current potential, also named reversal potential (E_{rev}). For each MthKT transporter, E_{rev} was very sensitive to the changes in Na⁺ concentration, being strongly shifted towards more positive values when this concentration was increased. Such sensitivity to the concentration of a given ion demonstrates that the transporter is significantly permeable to this ion. Thus, the 3 MthKT transporters are permeable to Na⁺. In contrast, the strong increase in K⁺ external concentration, from 0.3 to 10 mM, poorly affected E_{rev} in the 3 MthKT transporters. The conclusion is thus that these transporters were not significantly permeable to K⁺ in these ionic conditions, where both Na⁺ and K⁺ were simultaneously present in the external solution.

MthKT permeability was then investigated using solutions containing a single monovalent cation, either K⁺, Na⁺ or Li⁺, at a concentration of 10 mM. The corresponding I-V curves are displayed in Figures IV.4 A, IV.4 B and IV.4 C for MthKT1;2, MthKT1;4 and MthKT1;5, respectively. For each of these 3 transporters, E_{rev} and the current magnitude were very similar in presence of K⁺ and Li⁺. The current magnitude was larger and E_{rev} was more positive in presence of Na⁺. These results indicated that K⁺ and Li⁺ were much less permeant than Na⁺ in these ionic conditions. The shift in E_{rev} when K⁺ was replaced by Na⁺ in the external solution was close to +59mV, +51 mV and +58 mV for MthKT1;2, MthKT1;4 and MthKT1;5, respectively (Figure IV.4). The “Goldman” equation allows to determine the

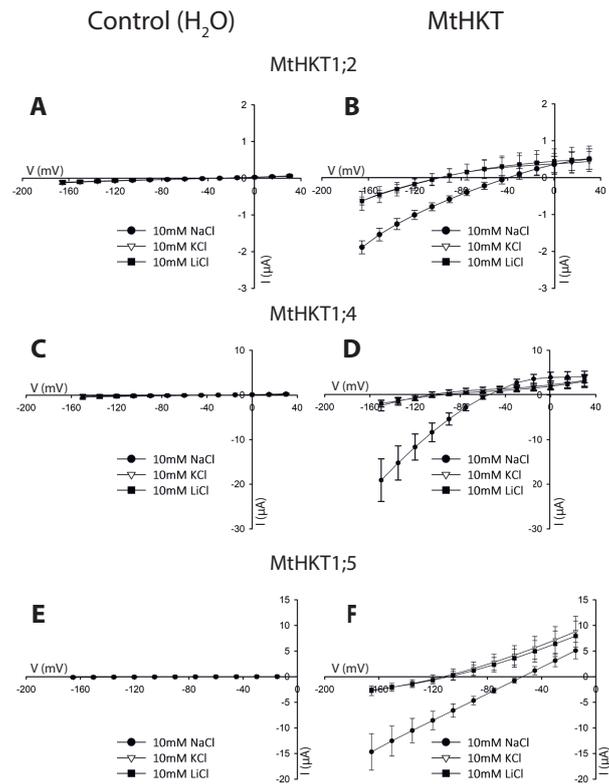


Figure IV.4: Current-voltage curves in presence of 10 mM Na⁺, K⁺ or Li⁺. Oocytes were injected with 50 nl of either water (A, C and E) or *MthKT1;2* (B), *MthKT1;4* (D) and *MthKT1;5* (F) cRNA solution. The tested monovalent cations were introduced as chloride salts. **A, C and E:** oocytes were injected with water. Mean±SD, n = 5 in A, n = 3 in C and n = 5 in E. **B, D and F:** oocytes were injected with *MthKT* cRNA. *MthKT1;2* was injected with 15 ng, *MthKT1;4* with 15 ng and *MthKT1;5* with 30 ng. Mean±SD, n = 3 in B, n = 3 in D and F.

ratio of the permeability of a transport system to a given ion X, P_X , to its permeability to another ion Y, P_Y , from the magnitude of the shift in E_{rev} when X is replaced by Y in the external solution (Dascal *et al.*, 1984). The shifts in E_{rev} determined from Figure IV.4 when K^+ is replaced by Na^+ led to the following values of the P_{Na} to P_K permeability ratio: $P_{Na}/P_K = 10.3$ for MthKT1;2, 7.5 for MthKT1;4 and 9.9 for MthKT1;5. Thus, the 3 MthKT transporters were much more permeable to Na^+ than to K^+ these ionic conditions too.

Figure IV.4 B suggests that MthKT1.4 is endowed with a distinctive functional property, not displayed by MthKT1;2 and MthKT1;5 in the same experimental conditions (Figures IV.4 A and IV.4 C). Indeed, the former Figure shows that, at membrane potential more positive than E_{rev} , in other words when an outward current was observed, the magnitude of the current was more important in presence of 10 mM Na^+ (*i.e.*, "against" 10 mM Na^+) than in presence of 10 mM K^+ or Li^+ . Based on the above results, it can be assumed that this current was mostly carried by Na^+ , the most permeant ion in these experimental conditions. Thus, the presence of a high concentration of Na^+ in the external solution would not reduce the efflux of this ion through MthKT1;4 but instead would increase this efflux. The simplest hypothesis is that MthKT1;4 displays a regulatory site present at its extracellular face and with which external Na^+ ions can interact and stimulate the transporter activity, *i.e.*, its conductance. Within the framework of this hypothesis, the inward conductance of MthKT1;4 too would display a similar positive regulation by external Na^+ .

IV.3.4. Expression of *MthKT* genes under different biotic and abiotic conditions

Shoot, root and nodule expression of the 3 *MthKT* genes in plants inoculated or not inoculated with rhizobia and grown in standard conditions or submitted to drought or salt stress was investigated by Q-RT-PCR (Figure IV.5). When performed, inoculation was achieved by watering the plants with a solution containing rhizobia (*S. Rhizobium*) 7 days after germination, and the nitrogen source (urea) was then withdrawn from the standard (Fahraeus) nutrient solution. All the plants were 6-week-old when harvested. Plants submitted to drought stress were not watered during the last week of growth, a treatment that was observed to result in wilting symptoms at the end of this last growth week. Plants submitted to salt stress were watered with standard Fahraeus solution supplemented with 100 mM NaCl and thereafter 200 mM NaCl during the last growth week. The wilting

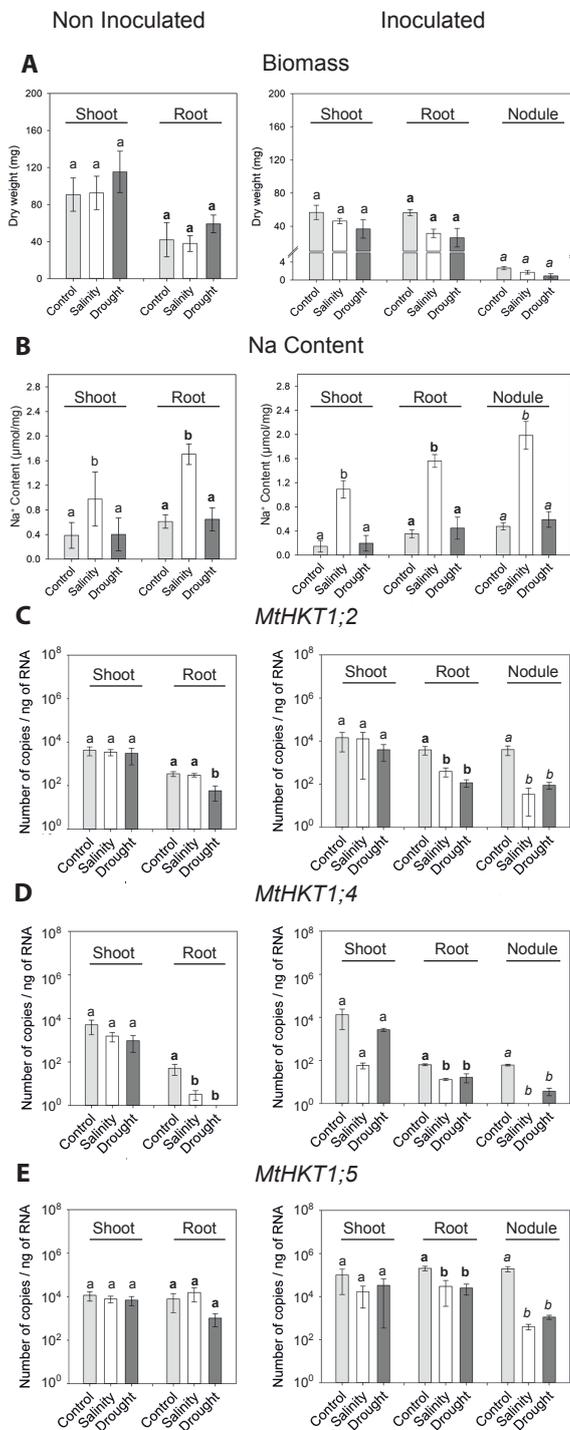


Figure IV.5: Analysis of *MthKT* gene expression under salinity and drought stress in *Medicago truncatula* inoculated or non inoculated with rhizobia. Plants were grown for 6 weeks in total in vermiculite/sand soil. They were inoculated or not inoculated with rhizobia at the end of the first week, and submitted or not submitted (control plants) to either salinity or drought stress during the last growth week. For salinity stress, they were watered with 100 mM NaCl the first day of the 6th week, and with 200 mM NaCl two days later. For drought stress, they were not watered during the last 7 days. Roots, shoots and nodules (in inoculated plants) were then harvested for biomass measurements, Na⁺ content assays and Q-RT-PCR analysis of *MthKT* gene expression. Left panels: non inoculated plants. Right panels: inoculated plants. Light grey, white and dark grey bars: control, salinity and drought treatments. Means \pm SD of at least three biological replicates. Statistical comparison was performed within each kind of organs, roots, shoots or nodules, using Turkey's test. Different letters indicate statistically significant differences between the results from the control, salinity and drought treatments at the level of 5% (Tukey's test). Normal, **bold** and *italic* letters: comparison of the response in shoot, root and nodules, respectively. **A** : Analysis of dry weight (mg) of non inoculated and inoculated plants. **B** : Analysis of sodium content of non inoculated and inoculated plants. The quantity of sodium (mmol) is normalised by the dry weight (mg). **C**, **D** and **E**: *MtTC77416* was used as the reference gene for the analysis of the number of copies by Q-RT-PCR experiment. Results are represented with a logarithmic scale. Results of Q-RT-PCR for the expression of *MthKT1;2* (**C**), *MthKT1;4* (**D**), *MthKT1;5* (**E**).

symptoms observed at the end of the drought treatment (not shown) and the large increase in plant Na⁺ contents did not significantly affect the final biomass of the plant shoots, roots and nodules (Figure IV.5 A and IV.5 B).

In shoots of non-inoculated plants, the 3 *MtHKT* genes were found to have similar levels of expression (transcript accumulation) and their expression was not significantly sensitive to the drought stress and salt stress (Figure IV.5 C, IV.5 D and IV.5 E). Furthermore, inoculation did not appear to alter the expression levels of these genes in shoots and did not make them significantly sensitive to the drought and salt stresses.

In the roots, the 3 genes differed in their expression levels: in absence of drought and salt stress, the *MtHKT1;5* transcript appeared as the most abundant and the *MtHKT1;4* transcript as the less abundant, whether the roots were inoculated or not. The drought stress in the case of *MtHKT1;2*, and both the drought and salt stresses in the case of *MtHKT1;4*, significantly reduced the level of expression of these genes in roots of non inoculated plants. In inoculated plants, root expression of the 3 genes was reduced by each of the two stresses (Figure IV.5 C, IV.5 D and IV.5 E).

In nodules, the expression levels of the 3 *MtHKT* genes and their variations in response to the drought and salt stresses were similar to those observed in inoculated roots, *i.e.*, in the absence as well as in the presence of drought and salt stress, *MtHKT1;5* displayed the highest levels of transcripts, and *MtHKT1;2* the lowest levels, and the levels of transcripts of each of the 3 genes were significantly reduced by each of the two stresses, drought or salinity (Figure IV.5 C, IV.5 D and IV.5 E).

IV.4. Discussion

Phylogenetic analyses have identified 2 subfamilies within plant HKT transporters (Platten *et al.*, 2006), and functional analyses have provided evidence that these 2 subfamilies differ in their K⁺ and/or Na⁺ transport ability. The distinctive property of subfamily 1 members is to be selectively permeable to Na⁺, when compared to K⁺, while subfamily 2 members are significantly permeable to both Na⁺ and K⁺ and have the ability to behave as Na⁺:K⁺ symporters at least when heterologously expressed in animal cells (Rubio *et al.*, 1995;

Uozumi *et al.*, 2000; Sassi *et al.*, 2012). It should however be noted that some HKT members from subfamily 1 could display a physiologically significant permeability to K^+ when heterologously expressed in yeast (Ali *et al.*, 2012). Subfamily 1 is present in both dicots and monocots, while members of subfamily 2 have been identified only in monocots so far. Another difference with respect to the HKT family between dicots and monocots can be the family size, which appears to be smaller in dicots. Indeed, when the first genome sequence became available, it appeared that this family comprised a single member in *Arabidopsis* or poplar, or two members in tomato (Asins *et al.*, 2013), while 8 or 9 HKT genes, depending on the cultivar, could be identified in rice, subfamilies 1 and 2 having a similar number of members, 4 or 5. Also, 10 or so HKT genes are present in each wheat genome. It should however be noted that recent genome sequences do not support such a dichotomous view since 5 HKT genes are present in the dicot *Vitis vinifera* (grape vine).

The number of HKT genes seem to be rather variable in legumes. As shown in the present report, *M. truncatula* possess 4 HKT, which are present within a cluster in chromosome 6. *In silico* analysis (not shown) indicates that the *Lotus japonicus* genome harbors 5 HKT genes, forming 2 clusters, the first one located in chromosome 5 and comprising 2 genes, (*Lj5g3v0196960* and *Lj5g3v0196990*), and the second one located in chromosome 2 and comprising 3 genes (*Lj2g3v0914290*, *Lj2g3v0914260* and *Lj2g3v0914190*) (Sato *et al.*, 2008). In soybean (*Glycine max*), the HKT family displays 4 members, at four different locations in the genome (*Glyma.01g002300*, *Glyma.06g271600*, *Glyma.07g130100* and *Glyma.12g133400*) (Schmutz *et al.*, 2010). In contrast, common bean (*Phaseolus vulgaris*) has only two HKT genes, (*Phvul.004G177200*, *Phvul.004G177300*), which form a cluster (Schmutz *et al.*, 2014). The Chickpea (*Cicer arietinum*) possesses one or two HKT genes depending of the sequence data base (Varshney *et al.*, 2012, 2013). Altogether, these data indicate that the size of this transporter family in dicots is not as reduced as initially thought and can be rather variable even within a same family.

Based on phylogenetic criteria, the 4 HKT transporters identified in *M. truncatula* belong to HKT subfamily 1. Three from them, whose transcripts could be easily detectable in shoots and roots, have been functionally characterized by electrophysiological analyses in *Xenopus* oocytes. They all appear as typical members from subfamily 1, being much more permeable to Na^+ than to K^+ , which is consistent with the hypothesis that only HKT subfamily

			P _A	↓	
AtHKT1	47	TTSRPHDFDL	FFTSVSAITV	S	SMSTVDMEV
MtHKT1;2	72	G-ETPKNLDL	FFTSISATTV	S	SMSTVEMQN
MtHKT1;4	72	YQTSPKNLDL	FFTSVSSTTV	S	SMSTVEMEF
MtHKT1;5	78	TSVKPKDFDL	FYTSVSASTV	S	MTSIEMEVEV
TsHKT1;2	47	TTSRPHDLDL	FFTSVSAITV	S	SMSTIDMEV

			P _B	
AtHKT1	188	DVLSSKEISP	LTFSVFTTVS	TFANCGFVPT
MtHKT1;2	239	QILKNKGLKM	FTFSVFTIVS	TFASCGFVPT
MtHKT1;4	233	QVLENKGLKM	FTFSLFTIVS	TFSSCGFIPT
MtHKT1;5	232	NILQNKGINI	ETFSLFTIVS	TFASCGYIPT
TsHKT1;2	184	DVLSSKKISP	LTFSVFTAVS	TLSDCGFVPT

*

Supplemental Figure IV.1: Pore-loop A and B of HKT proteins.

Sequence comparison of HKT homologs from *A. thalina*, *M. truncatula* and *T. salsuginea*. Amino-acid sequences in the first (P_A) and second pore-loop region (P_B) are aligned with the use of Clustal Omega (<https://galaxy.pasteur.fr>). The conserved serine residues in the P_A region are indicated by an arrow (Mäser *et al.*, 2002) and the single amino acid change is indicated by an asterisk, a D in P_B region of *T. salsuginea* (Ali *et al.*, 2016) are highlighted in red.

1 is present in dicots and that all members of this subfamily display strong selectivity for Na⁺ against K⁺. In HKT subfamily 1, a serine residue located in the pore loop of the first MPM domain has been identified as an important determinant of selectivity for Na⁺ (Mäser *et al.*, 2002b). MtHKT1;2, MtHKT1;4 and MtHKT1;5 display a serine residue at the corresponding position, providing further evidence that this residue plays a major role in the ionic selectivity of HKT subfamily 1 transporters for Na⁺.

MtHKT1;4 and MtHKT1;1 to a lesser extent display a functional property, rectification in favor of inward currents, that has been rarely reported in HKT transporters (Jabnoue *et al.*, 2009; Ali *et al.*, 2016). The strong inward rectification displayed by TsHKT1;2 from *Thellungiella salsuginea* (Ali *et al.*, 2016), a halophytic *Arabidopsis thaliana* relative that was previously *Thellungiella halophila*, has been shown to largely result from a single amino acid change, a D in position 207, in the pore loop of the second MPM domain, where AtHKT1 from *Arabidopsis* displays an N in the corresponding position (position 211 in AtHKT1). Interestingly, while the shape of AtHKT1 current-voltage curves in *Xenopus* oocytes is known to be quasi-linear, indicating that the outward and inward transport activity are quite similar, mutation of the N in position 211 to a D results in a marked decrease of the outward currents, clearly highlighting that the mutated transporters is endowed with stronger inward rectification (Ali *et al.*, 2016). It was thus proposed that a D at this position could be a major inducer of rectification in HKT transporter. The three MtHKT we have characterized have an S in the position corresponding to AtHKT1 N211. S is in the same group of amino acids as N, characterized by a polar uncharged side chain. The three MtHKT are however clearly different in terms of rectification capacity. Thus, rectification does not systematically require a D in the position corresponding to AtHKT1 N211 and, in MtHKT transporters, this position does not appear as a major determinant of rectification.

MtHKT1;4 appears to be endowed with another original property, besides rectification. This transporter seems to be activated by external Na⁺, as suggested by Figure IV.4 B, a functional feature that has not been reported in other HKT so far. Such activation, together with the inward rectification, could render this transporter especially dedicated to Na⁺ uptake from high Na⁺ concentrations (*e.g.*, in Na⁺ retrieval from the xylem sap?). Conversely, the absence of strong rectification in MtHKT1;2 could allow this transporter to

be more specifically involved in Na⁺ secretion (e.g., in Na⁺ release from the phloem vasculature into the root stele and thereby in Na⁺ recirculation from shoots to roots?).

The roles of HKT transporters is probably more documented in monocots than in dicots due to the strong interest that these transporters have for the scientific community and cereal breeders interested in crop adaptation to soil salinity. Indeed, evidence has been clearly provided that members from HKT subfamily 1 play major roles in the control of Na⁺ shoot contents, and thereby in salt tolerance, in agronomically important cereals such as rice and wheat. For instance, a major salt tolerance QTL in rice, named *SKC1* (shoot K⁺ content) which contains the subfamily 1 transporter *OsHKT8* (also named *OsHKT1;5*) (Lin *et al.*, 2004; Ren *et al.*, 2005), is presently used by plant breeders for increasing salt tolerance in rice cultivars (Ashraf *et al.*, 2012). Major QTL of salt tolerance have been shown to correspond to HKT genes in wheat and maize too (Horie *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2017). In dicots, the most detailed information is available for the Arabidopsis *AtHKT1*, which has been shown to be expressed in plant vasculature and to play a major role in salt tolerance by controlling Na⁺ translocation from roots to shoots via the xylem sap and/or Na⁺ recirculation from shoots to roots via the phloem sap (Berthomieu *et al.*, 2003; Horie *et al.*, 2009). Contribution to control of Na⁺ long distance transport in the plant vasculature has also been reported for *SlHKT1;2* in tomato (Almeida *et al.*, 2014a), whose gene is located, together with *SlHKT1;1*, in the major tomato QTL involved in Na⁺/K⁺ homeostasis (Asins *et al.*, 2013). In legumes, information on the role of an HKT transporter has been obtained for *GmHKT1* from soybean: overexpression of its encoding gene enhances salt tolerance in transgenic tobacco plants and reduces shoot Na⁺ contents (Chen *et al.*, 2011). The transcript levels of the *GmHKT1* gene have been found to be upregulated by salt stress in both roots and leaves of soybean plants (Chen *et al.*, 2011)(Chen *et al.*, 2013). Such induction of gene expression upon salt stress appears to be the most frequent response in *HKT* genes characterized as playing a role in plant tolerance to salinity. For instance, it has been reported for *AtHKT1* (Wang *et al.*, 2015), *OsHKT8* (Ren *et al.*, 2005) or *TmHKT1:4-A2* (Tounsi *et al.*, 2016). Induction of *HKT* gene expression upon salt stress is however not a general behavior amongst plants since *SlHKT1;2* from tomato displayed (slightly) reduced expression levels upon a strong increase in external concentration of Na⁺ (from 5 to 70 mM) (Almeida *et al.*, 2014a). A decrease upon salt stress of the expression of an *HKT* gene playing a role in salt

tolerance (Horie *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2015) has also been reported in rice, for *OsHKT1* in the salt tolerant cultivar Pokkali (Kader *et al.*, 2006). In *M. truncatula*, our results indicate that *MtHKT* gene expression was poorly sensitive to high external Na⁺ concentrations in shoots. The expression was markedly reduced in roots, with the exception of *MtHKT1;2*, and in nodules for the 3 *MtHKT* genes. The decrease in expression appeared very strong in nodules, by *ca.* two orders of magnitude, for the 3 *MtHKT* genes. Investigation of the effects of drought stress on the expression of the 3 *MtHKT* revealed changes in transcript accumulation levels that were very similar to those observed upon salt stress. Thus, the osmotic component of salt stress, and not its ionic component, may have underlain the *MtHKT* gene responses to the salt treatment we used. A strong decrease in expression was again observed in nodules for the 3 genes. Symbiotic nitrogen fixation and nodule physiology are strongly sensitive to drought stress (Gil-Quintana *et al.*, 2015; Kunert *et al.*, 2016; Adams *et al.*, 2018). Whether the *MtHKT* gene responses to drought and salt stress we report are merely a consequence of nodule senescence or contributed to nodule adaptation to osmotic/drought stress would be worth to be investigated. Analysis of the expression patterns of the 3 *MtHKT* genes in nodules and their responses to drought and salt stress is under investigation.

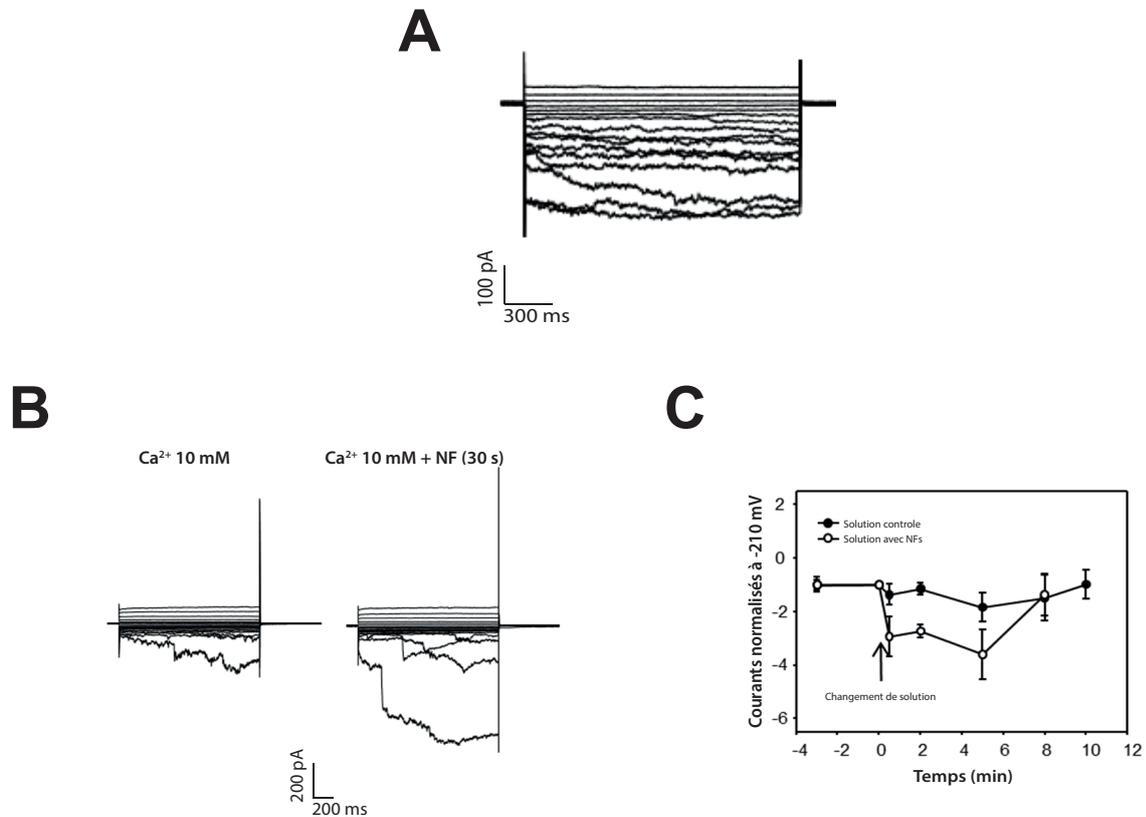


Figure V.1 : Conductance calcique identifiée sur la membrane des poils absorbants de *Medicago truncatula*.

A : Exemple d'enregistrement de courants entrants conduits par une conductance calcique activée par l'hyperpolarisation de la membrane du poil absorbant de *M. truncatula*. Ce travail est réalisé par patch-clamp sur un protoplaste de poil absorbant obtenu par dissection laser. Le voltage imposé à la membrane varie de +45 mV à -225 mV par palier de -15 mV. La solution de bain contient KCl 10 mM, CaCl₂ 10 mM, CsCl 2 mM, Hepes/Tris 10 mM (pH 7.5) et D-sorbitol 250 mM. La pipette contient K-gluconate 100 mM, CsCl 10 mM, EGTA 10 mM, CaCl₂ 4 mM (Ca²⁺ libre = 50 nM), Mg-ATP 2 mM, Hepes/Tris (pH 7.4) 10 mM, et D-sorbitol 80 mM. La présence de Cs⁺ dans ces solutions a pour objectif de bloquer les conductances potassiques (de type Shaker) de façon à favoriser l'enregistrement de courants calciques.

B : Enregistrement représentatif montrant une augmentation du courant calcique en réponse à l'ajout de facteurs Nods dans la solution extérieure. Le panneau de gauche montre l'enregistrement du courant calcique activé par l'hyperpolarisation juste avant l'introduction des facteurs Nods dans le milieu, et le panneau de droite l'enregistrement obtenu 30 secondes après l'ajout des FNs.

C : Analyse cinétique de la réponse de la conductance calcique activée par l'hyperpolarisation à l'ajout de FNs dans le milieu. Le courant calcique augmente fortement en moins de 30 secondes après l'ajout des FNs, puis diminue pour ré-atteindre son niveau initial au bout de 8 minutes au plus. Moyennes ± écart type (n = 3 pour la solution contrôle et n = 7 pour la solution avec FNs).

Chapitre V : Canaux CNGC susceptibles de jouer un rôle dans la signalisation calcique précoce déclenchée par les facteurs Nods : sélection et première analyse de leurs rôles par génétique inverse

V.1. Introduction

Des conductances perméables au Ca^{2+} et présentant des caractéristiques proches de celles des canaux non sélectifs (NSCCs, Non-Selective Cation Channels), ont été enregistrées sur des cellules de gardes et des cellules du mésophile foliaire d'*Arabidopsis* (Pei, 2000; Stoelzle *et al.*, 2003). Des conductances similaires ont aussi été enregistrées dans le grain de pollen et le tube pollinique, respectivement chez *Lilium davidii* et *Pyrus pyrifolia* (Shang *et al.*, 2005; Qu *et al.*, 2007), ainsi que dans les poils absorbants d'*Arabidopsis* (Very et Davies, 2000; Miedema *et al.*, 2008) et de riz (Li *et al.*, 2012). L'identité moléculaire des canaux responsables de ces conductances est à ce jour inconnue (Hedrich, 2012).

L'équipe a développé un post de patch-clamp associé à un dispositif laser qui permet de percer et découper la paroi de cellules végétales. Ce dispositif a été utilisé pour caractériser les conductances présentes sur la membrane du poil absorbant de *M. truncatula* (thèse de Limin Wang, 2015). Un fragment de racine avec ses poils absorbants est traité par une solution légèrement hypertonique, provoquant un « début » de plasmolyse qui « décolle » la membrane plasmique de la paroi à l'extrémité du poil. Un rayon laser est alors utilisé pour découper la paroi à cette extrémité sans endommager la membrane sous-jacente et le protoplaste. La solution extérieure est alors diluée, ce qui provoque une déplasmolyse du protoplaste et son extrusion à l'extrémité du poil. Une légère agitation du milieu provoque la libération du protoplaste dans la cuve. Les conductances ioniques de la membrane du protoplaste ainsi obtenu peuvent alors être caractérisées par patch-clamp. Différentes conductances cationiques activées par une hyperpolarisation de la cellule ont ainsi pu être identifiées sur la membrane du poil absorbant de *M. truncatula*. L'une de ces conductances activables par l'hyperpolarisation a été caractérisée comme perméable à Ca^{2+} (Figure V.1 A). Chez *Arabidopsis* des conductances similaires (activées par l'hyperpolarisation et perméables à Ca^{2+}) sont connues pour être activées par une élévation de la concentration cytosolique en Ca^{2+} et par les ROS (Reactive Oxygen Species) (Very et Davies, 2000; Foreman

et al., 2003). La transposition de ces résultats chez *M. truncatula*, dans le contexte de l'ensemble des données bibliographiques concernant le dialogue moléculaire entre rhizobia et poils absorbants de légumineuses (*Cf.* chapitre I), rend raisonnable l'hypothèse d'une implication de telles conductances dans la signalisation calcique précoce induite par la perception des FNs, notamment parce qu'il a été aussi montré que cette perception conduit à une augmentation de la production de ROS (Peleg-grossman *et al.*, 2012). En travaillant dans le cadre de cette hypothèse, Limin Wang (2015) a observé que l'introduction de facteurs Nods dans la solution extérieure active de façon rapide (en 30 secondes environ), forte et transitoire (disparaissant après *ca.* 5 min) la conductance calcique entrante la plus fréquemment observée sur la membrane des protoplastes de poils absorbants de *M. truncatula* (Figure V.1 B et C). Une telle activation d'un canal calcique par les FNs et les caractéristiques cinétiques de l'activation (rapide et transitoire) évoquent très fortement le processus de signalisation électrique et calcique précoce induit par la perception des FNs (Felle *et al.*, 1995; Felle *et al.*, 1996; Felle and Hepler, 1997; Felle *et al.*, 1998; Kurkdjian *et al.*, 2000; *Cf.* Chapitre I)

Dans le contexte du travail de l'équipe visant à caractériser au niveau moléculaire des acteurs de la signalisation électrique et calcique précoce, un des objectifs de mon travail a été de développer une approche « gène candidat » pour identifier des canaux calciques susceptibles de participer à cette signalisation. Pour cela, je me suis intéressé à la famille des canaux CNGC (*Cf.* Chapitre I, § I.3.2.2).

Dans la bibliographie, les canaux CNGC sont considérés comme de bons candidats à la fonction de canaux cationiques non sélectifs permettant un influx de Ca^{2+} dans le cytoplasme (Köhler *et al.*, 2002; Chan *et al.*, 2003; ROY *et al.*, 2008; Tapken et Hollmann, 2008; Guo *et al.*, 2010; Jammes *et al.*, 2011). Des études récentes ont mis en évidence l'expression de CNGC dans le tube pollinique (Frietsch *et al.*, 2007; Tunc-Ozdemir *et al.*, 2013) et une implication de ces canaux dans la croissance « polarisée » du tube. Les poils absorbants présentent le même type de croissance (« tip growth ») que le tube pollinique. Il est donc raisonnable d'imaginer que des CNGC sont actifs dans les poils absorbants et qu'ils contribuent à la signalisation calcique précoce. Cette dernière conduit notamment à une modification de la morphologie de l'extrémité du poil en croissance et à une réorientation de la direction dans laquelle le poil s'allonge.

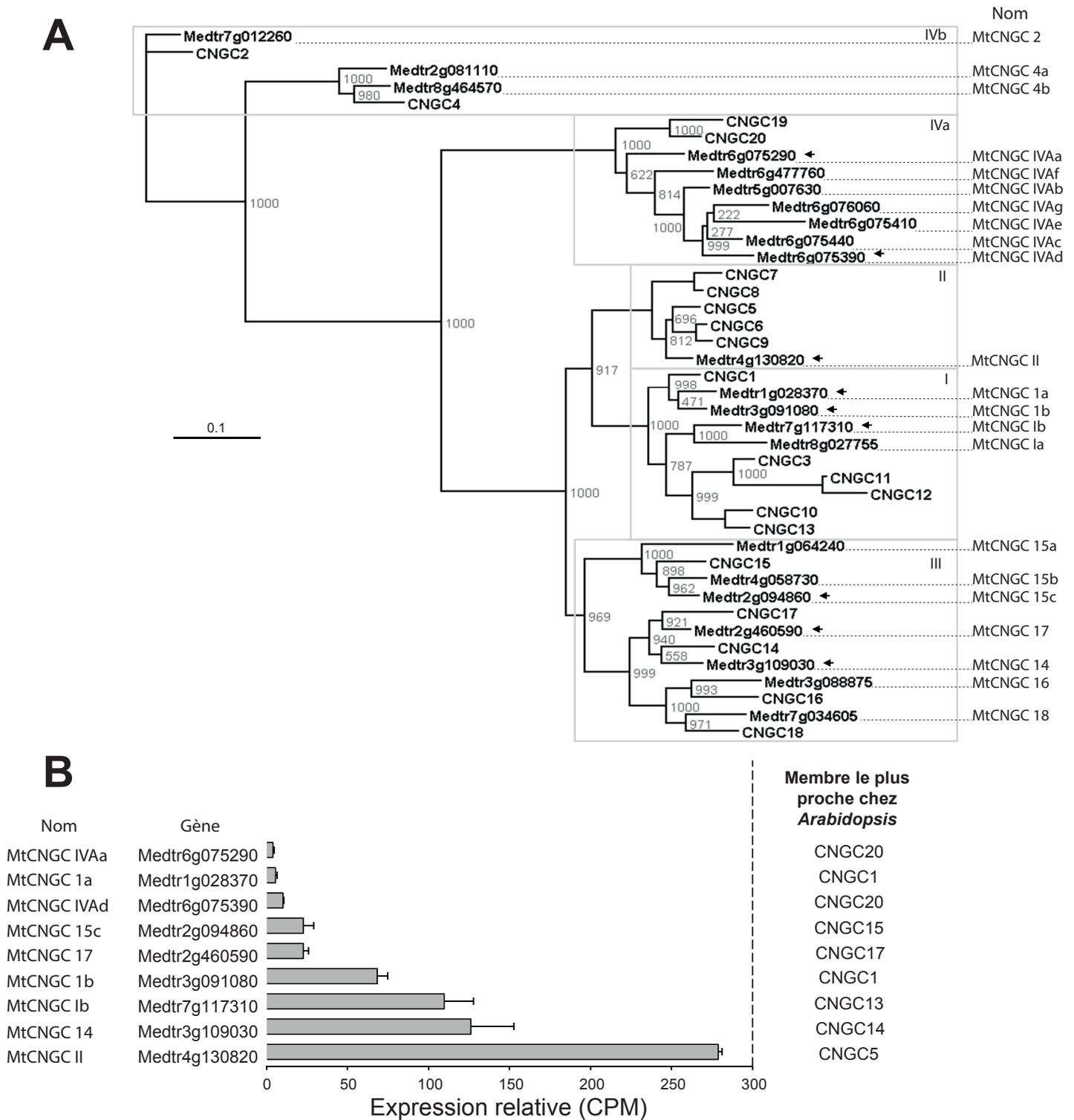


Figure V.2 : La famille des canaux CNGC de *Medicago truncatula* : phylogénie et niveaux d'expression dans le poil absorbant.

A : Arbre phylogénétique des canaux CNGC d'*A. thaliana* et de *M. truncatula*. Les relations phylogénétiques sont basées sur l'alignement des séquences protéiques de ces canaux. Les 9 canaux identifiés comme exprimés dans le poil absorbant de *M. truncatula* (Cf. panneau B) sont indiqués par une flèche en regard du nom des canaux qu'ils codent. La nomenclature utilisée pour désigner les gènes CNGC de *M. truncatula* est celle proposée par Charpentier *et al.*, (2016). La barre d'échelle représente la distance évolutive, qui correspond ici à 10 substitutions par 100 résidus d'acides aminés.

B : Niveaux d'expression relative des gènes de la famille CNGC dans le poil absorbant de *M. truncatula*. Données obtenues par RNA-seq (Damiani *et al.*, 2016) et exprimées en CPM (Count per Million fragment mapped).

V.2. Résultats

V.2.1. Analyse de la famille CNGC de *Medicago truncatula*

La famille CNGC de *Medicago truncatula* est composée de 22 membres. Elle présente donc une taille semblable à celle d'*Arabidopsis thaliana*, qui est composée de 20 membres. Les relations phylogénétiques entre ces deux familles de gènes sont représentées sur l'arbre de la Figure V.2 A. La nomenclature retenue pour les membres de la famille CNGC de *M. truncatula* dans ce travail est celle utilisée dans l'article de Charpentier et al. (2016) dont je suis co-auteur.

Les membres des familles CNGC d'*Arabidopsis* et de *M. truncatula* sont répartis dans les 5 sous-groupes proposés par Dietrich *et al.*, (2010). Seuls les sous-groupes II et IVa présentent une différence de répartition de leurs membres entre les deux familles. Dans le sous-groupe II, 5 CNGC d'*A. thaliana* et seulement 1 de *M. truncatula* sont présents. Cette surreprésentation chez *A. thaliana* s'inverse dans le sous-groupe IVa avec seulement 2 membres chez *Arabidopsis* contre 7 chez *M. truncatula*. Ces différences sont probablement des marques de spécificité de signalisation biotique ou abiotique propres à chacune de ces deux espèces.

V.2.2. Choix de canaux CNGC candidats

Les résultats obtenus par l'équipe lors du séquençage des ARN du poil absorbant de *Medicago truncatula* ont été utilisés pour recenser les CNGC que ces cellules expriment (Damiani *et al.*, 2016). Neuf CNGC sont exprimés dans le poil absorbant de *M. truncatula* dont 5 présentent une expression relative faible (Figure V.2 B). Les 4 CNGC qui ont une abondance relative plus importante sont tous les 4 exprimés également dans la racine mais présentent des profils différents. *MtCNGC II* (*Medtr4g130820*) est le gène CNGC le plus exprimé dans le poil absorbant de *M. truncatula*. Les gènes homologues les plus proches chez *A. thaliana* sont *CNGC 5* et *CNGC6*. Ces gènes sont caractérisés comme codant des canaux cationiques peu sélectifs, perméables à Ca^{2+} , et exprimés sur la membrane plasmique des cellules de garde (Wang *et al.*, 2013). Après *MtCNGC II*, le CNGC présentant le plus fort niveau de transcrits est *MtCNGC14* (*Medtr3g109030*). En revanche, l'expression de ce gène n'est pas détaillée dans les banques de données, ce qui suggère une expression préférentielle dans le poil absorbant. Les plus proches parents de ce gène chez *Arabidopsis*

Groupe	Gene	Nom	Pat4	Pat7	Bipartite	NLS score
I	Medtr1g028370.1	MtCNGC 1a				-0.47
	Medtr3g091080.1	MtCNGC 1b	RKPR à 687			-0.22
	Medtr7g117310.3	MtCNGC 1b				-0.47
II	Medtr4g130820.1	MtCNGC II	RRRR à 663	PGRGKKN à 52		0.81
III	Medtr2g094860.1	MtCNGC 15c	RRHKKRKK à 628			0.4
	Medtr2g460590.1	MtCNGC 17		PWRKRIL à 38	KKAKLVRFYSDVKRVKE à 4	0.45
	Medtr3g109030.1	MtCNGC 14	RRHR à 594		RKELITDPGQIARRYIK à 120	0.58
IVa	Medtr6g075290.3	MtCNGC IVaA	RKKR à 752			-0.16
	Medtr6g075390.1	MtCNGC IVAd		PENLKRR à 463		-0.22
Control	BAD89021.1	LjCASTOR	HRRR à 56			-0.1
	Medtr2g005870	MtDMI1	RKRR à 73	PPLKTK à 17	RTESNKEDVPLKKRVA à 223	1.37

Figure V.3 : Prédiction de l'adressage au noyau des MtCNGCs exprimés dans le poil absorbant de *M. truncatula*

Analyse *in-silico* pour prédire l'adressage au noyau des MtCNGCs. Le logiciel WoLF PSORT a été utilisé pour prédire les NLSs (Nuclear Localization Signal) des MtCNGCs. Wolfpsort classe les NLSs prédits dans trois catégories : Pat4, Pat7 et le Bipartite. Les motifs basiques R/K, X sont en rouge. Pour évaluer la robustesse des prédictions de localisation nucléaire des canaux ioniques, CASTOR de *L. japonicus* et DMI1 de *M. truncatula* ont été analysés comme contrôles.

D'après Charpentier *et al.*, (2016)

sont CNGC 14 et CNGC 17, pour lesquels aucune information n'est disponible dans les bases de données bibliographiques. Après *MtCNGC 11* et *MtCNGC14*, les deux gènes présentant les plus forts niveaux d'expression dans le poil absorbant sont *MtCNGC 1b* (*Medtr7g117310*) et *MtCNGC1b* (*Medtr3g091080* ; Figure V.2 B), dont des proches homologues chez *Arabidopsis* sont *CNGC13* et *CNGC1*. Aucune information précise n'est disponible dans la bibliographie pour *AtCNGC13* (Cf. le site Pubmed). CNGC1 est caractérisé comme impliqué dans la tolérance aux métaux lourds et à de fortes concentrations de Ca^{2+} (Sunkar *et al.*, 2000; Chan *et al.*, 2003). Il est intéressant de noter que l'analyse des données de séquençage des ARN de poil absorbant de *Medicago truncatula* (Damiani *et al.*, 2016) a révélé un effet du traitement par les facteurs Nods sur l'expression de 3 gènes CNGC. Les transcrits *Medtr2g094860* (*MtCNGC15c*) et *Medtr3g109030* (*MtCNGC14*) présentent une augmentation de leur niveau d'accumulation d'un facteur 2 et 1,6, respectivement, 20 heures après la perception des FNs, et le transcrit *Medtr7g117310* (*MtCNGC 1b*) une diminution d'un facteur 0,6.

Après le recensement des *MtCNGC* exprimés dans le poil absorbant, une seconde étape dans la sélection de gènes candidats a été d'identifier, parmi les canaux codés par ces gènes, ceux susceptibles d'être adressés à la membrane plasmique. Charpentier *et al.* (2016) ont analysé *in silico* les séquences protéiques des *MtCNGC* pour identifier les candidats à un adressage à la membrane nucléaire. Les conclusions du travail correspondant pour les 9 CNGC exprimés dans le poil absorbant sont résumées dans la Figure V.3. Cette analyse a été réalisée avec le logiciel WoLF PSORT pour prédire les NLSs (Nuclear Localization Signal). Wolfpsort classe dans trois catégories les NLSs prédits : Pat4, Pat7 et le Bipartite. Le logiciel synthétise les résultats sous forme d'un score (« NLS score »). Plus ce score est négatif moins il est probable que la protéine soit adressée au noyau et, inversement, plus le score est positif, plus il est probable que la protéine soit adressée au noyau. Seuls deux CNGC, *MtCNGC 1a* (codé par *Medtr1g028370*) et *MtCNGC 1b* (*Medtr7g117310*), ne présentent pas de motifs considérés comme NLS par le programme Wolfpsort, et ces deux CNGC ont le « score NLS » le plus négatif parmi les 9 CNGC exprimés dans le poil absorbant. L'homologue le plus proche de ces deux canaux chez *Arabidopsis* est *AtCNGC 1*. Le gène *AtCNGC 1* est exprimé dans les feuilles (dans les cellules de garde) et, de façon plus forte, dans les racines (Figure I.18) (Ma *et al.*, 2006). L'analyse d'une lignée mutante *atcngc1* suggère que ce canal

est impliqué dans la signalisation gravitropique et dans l'absorption de Ca^{2+} dans les racines (Ma *et al.*, 2006). Trois autres MtCNGC présentent un « score NLS » négatif, MtCNGC 1b, dont le gène (*Medtr3g091080*) présente un fort niveau d'expression dans les poils absorbants, et MtCNGC IVAa et MtCNGC IVAd, dont les gènes (*Medtr6g075290* et *Medtr6g075390*) présentent par contre un niveau d'expression très faible dans ces cellules.

Sur la base de ces analyses *in silico*, deux gènes ont été sélectionnés dans une première étape pour démarrer l'approche « gènes candidats » : *MtCNGC 1a* et *MtCNGC 1b*. Le canal MtCNGC 1a présente un niveau d'expression (quantité de transcrits) très faible dans le poil absorbant mais possède un score NLS très négatif, laissant présumer un adressage à la membrane plasmique. MtCNGC 1b a l'avantage, en tant que candidat, de présenter à la fois un fort niveau d'expression dans le poil et un score NLS très négatif. Un troisième gène a ensuite été sélectionné, *MtCNGC 1b* (*N.B.*, *MtCNGC 1b* et *MtCNGC 1b* sont 2 gènes différents du même sous-groupe I de la famille CNGC ; Figure V.2). Le canal MtCNGC 1b présente un fort niveau d'expression dans le poil, mais un score NLS un peu moins négatif que MtCNGC 1a et MtCNGC 1b. Les deux autres CNGC possédant un score NLS négatif, MtCNGCIVAa et MtCNGCIVAd, n'ont pas été retenus pour démarrer notre approche « gène candidat » parce qu'ils présentent un niveau d'expression très faible dans le poil.

Des lignées mutantes dans les gènes CNGC retenus comme candidats, *MtCNGC 1a*, *MtCNGC 1b* et *MtCNGC 1b*, ont été sélectionnées au sein de la collection de la Noble Foundation afin d'analyser le rôle éventuel des canaux correspondants dans l'établissement et le fonctionnement de la symbiose entre *M. truncatula* et *S. meliloti*.

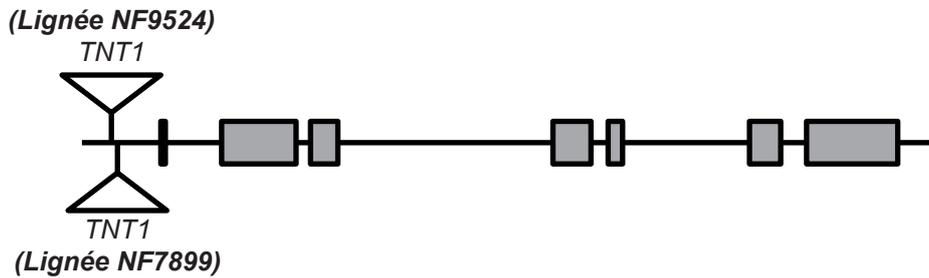
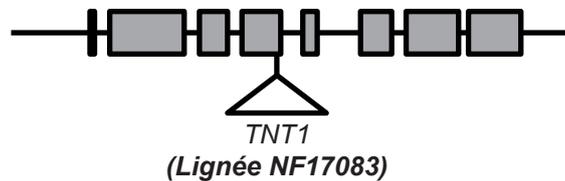
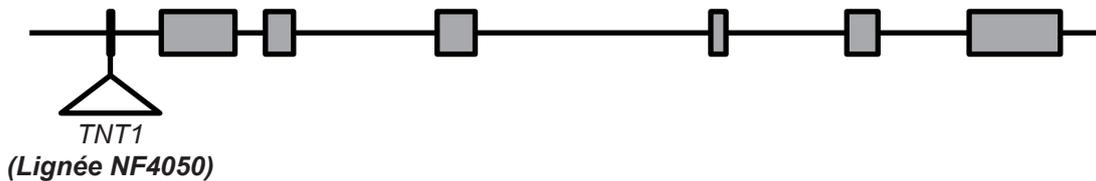
A***MtCNGC 1a***
(*Medtr1g028370*)**B*****MtCNGC 1b***
(*Medtr7g117310*)**C*****MtCNGC 1b***
(*Medtr3g091080*)

Figure V.4 : Structure des gènes *MtCNGC* candidats et localisation de l'insertion du rétrotransposon *TNT1*.

A : Le gène *MtCNGC 1a* possède 7 exons. Les lignées mutantes NF9524 et NF7899 ont été identifiées via le site de la Noble Foundation et présentent une insertion du rétrotransposon de tabac *TNT1* dans la région promotrice proximale de ce gène.

B : Le gène *MtCNGC 1b* possède 8 exons. La lignée NF17083 a été identifiée via le site de la Noble comme mutée dans le gène *MtCNGC 1b*. Elle possède une insertion du rétrotransposon de tabac *TNT1* dans le 4^{ème} exon.

C : L'insertion du *TNT1* dans le gène *MtCNGC 1b* (7 exons) de la lignée mutante NF4050 est localisée dans le premier exon.

V.2.3. Génotypage des lignées mutantes *mtcngc* candidates

V.2.3.1. Identification de lignées mutantes dans la collection de la Noble Foundation

MtCNGC 1b (Medtr7g117310) et lignée NF17083

Une seule lignée présentant une insertion dans l'un des exons du gène *MtCNGC 1b* est disponible dans la collection de la Noble Foundation. Dans cette lignée, appelée NF17083, le *TNT1* est inséré à la fin du 4^{ème} exon du gène *MtCNGC 1b* (Figure V.4 B).

MtCNGC 1a (Medtr1g028370) et lignées NF9524 et NF7899

Aucune lignée présentant une insertion dans l'un des exons du gène *MtCNGC 1a* n'est répertoriée dans la collection de la Noble Foundation. J'ai sélectionné dans cette collection deux lignées, NF9524 et NF7899, qui présentent une insertion du *TNT1* dans la région promotrice du gène *MtCNGC 1a* (Figure V.4 A), environ 350 pb en amont du codon start (Figure V.4 A).

MtCNGC 1b (Medtr3g091080)

Une lignée répertoriée dans la collection de la Noble Foundation, NF4050, présente une insertion du *TNT1* dans le premier exon du gène *MtCNGC 1b*. Elle a été sélectionnée pour notre approche « gènes candidats ».

Après avoir reçu les lots de graines envoyés par la Noble Foundation, 10 d'entre elles sont mises en culture pour être génotypées. Le génotypage est réalisé comme décrit dans le paragraphe II.2.1. J'ai pu identifier des plantes homozygotes mutantes et des plantes sauvages aux locus *MtCNGC 1a* et *MtCNGC 1b* dans chacune des lignées correspondantes : NF9524 et NF7899 pour *MtCNGC 1a*, et NF17083 pour *MtCNGC 1b*. Les plantes sélectionnées ont été mises en culture et amplifiées en serre. Le travail concernant la lignée NF4050 et le gène *MtCNGC 1b* est légèrement moins avancé. J'ai pu identifier des plantes homozygotes mutantes au locus *MtCNGC 1b*, mais je n'ai pas encore pu amplifier de plantes de génotype sauvage à ce locus.

La liste des gènes mutés par une insertion de transposon dans chacune de ces lignées est fournie dans les tableaux V.1 à V.4.

Tableau V.1 : Insertions du rétrotransposon dans la lignée NF17083. Cinquante-deux insertions sont recensées dans cette lignée. Vingt-cinq d'entre elles, non référencées dans ce tableau, sont localisées dans des régions non codante du génome. Parmi les vingt-sept autres insertions, 13 sont localisées dans une séquence exonique, 11 dans une séquence intronique et 3 à proximité de l'extrémité 5' ou 3' d'un gène.

Gène impacté	Fonction associée
Insertion du <i>TNT1</i> dans une région codante d'un gène (exon) :	
Medtr1g110220	Protéine de la famille des kinases de la tyrosine
Medtr3g074410	sTransporteur de sucre (famille MFS)
Medtr7g094080	Membre de la famille des gènes <i>Clavata3/ESR (CLE)</i>
Medtr7g056290	Protéine contenant le domaine d'interaction protéique F-box
Medtr7g117310	CNGC Ib
Medtr4g037560	Protéine transmembranaire putative
Medtr4g091820	G-type lectin S-receptor-like Serine/Threonine-kinase
Medtr1g043220	Transporteur de phosphate haute affinité
Medtr1g079200	Protéine 2-B11 du phloème
Medtr3g065960	Protéine putative associée à la senescence
Medtr6g092620	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxydase
Medtr7g026140	Protéine de choc thermique 70 kDa
Medtr4g098890	Putative méthyltransférase PMT14-like
Insertion du <i>TNT1</i> dans une région non codante d'un gène (intron) :	
Medtr4g125650	Protéine hypothétique
Medtr7g012940	Protéine hypothétique
Medtr3g019120	PTI1-like tyrosine-kinase
Medtr5g038930	Protéines hypothétique
Medtr4g120030	Protéine UDP-glucuronique acide décarboxylase-like
Medtr1g082430	Mog1/PsbP/DUF1795-like photosystème II réaction center famille de protéine PsbP
Medtr3g082200	Protéase sérine subtilisin-like
Medtr8g467540	Famille de protéine CAAX amino terminale protéase
Medtr3g102450	Récepteur kinase
Medtr8g028680	Protéine CAAX prényle protéase-like
Medtr7g115430	Protéine de la famille DIL domaine myosin
Insertion du <i>TNT1</i> dans un région promotrice ou après un gène :	
Medtr7g091850	Endo-polygalacturonase
Medtr4g125650	Protéines hypothétique
Medtr6g034715	Protéine de la famille endonucléase/exonucléase/phosphatase

Tableau V.2 : Insertions du rétrotransposon dans la lignée NF7899. Vingt insertions sont recensées dans cette lignée. Treize d'entre elles, non référencées dans ce tableau, sont localisées dans des régions non codante du génome. Parmi les vingt-sept autres insertions, 8 sont localisés dans une séquence exonique, 5 dans une séquence intronique et 2 à proximité de l'extrémité 5' ou 3' d'un gène.

Gène impacté	Fonction associée
Insertion du <i>TNT1</i> dans une région codante d'un gène (exon) :	
Medtr4g094535	Tubuline
Medtr7g072000	Protéine d'attachement alpha-soluble NSF
Medtr7g077860	Protéine hypothétique
Medtr2g090595	Protéine anneau doigt de zinc
Medtr2g099570	Protéine de la graine : linoléate 9S-lipoxygénase
Medtr2g028610	Putative ATRAD3
Medtr6g034005	Protéine de choc thermique 70 kDa
Medtr1g054450	Protéine putative : C ₂ H ₂ et C ₂ HC doigt de zinc
Insertion du <i>TNT1</i> dans une région non codante d'un gène (intron) :	
Medtr0202s0060	Protéine hypothétique
Medtr4g009420	Protéine hypothétique
Medtr1g037680	Protéine thiorédoxine-like
Medtr4g017200	Pyruvate décarboxylase
Medtr5g099020	Protéine de la famille MATE efflux
Insertion du <i>TNT1</i> dans un région promotrice ou après un gène :	
Medtr1g028370	CNGC 1a
Medtr6g005390	Sirohydrochlorine ferrocyclase

Tableau V.3 : Insertions du rétrotransposon dans la lignée NF9524. Trois insertions sont recensées dans cette lignée. Une seule, non référencées dans ce tableau, est localisée dans des régions non codante du génome. Parmi les 3 autres insertions, une est localisée dans une séquence exonique, et une à proximité de l'extrémité 5' ou 3' d'un gène.

Gène impacté	Fonction associée
Insertion du <i>TNT1</i> dans une région codante d'un gène (exon) :	
Medtr1g026970	Récepteur kinase, liaison au galacturonan, associé à la paroi
Insertion du <i>TNT1</i> dans un région promotrice ou après un gène :	
Medtr1g028370	CNGC 1a

Tableau V.4 : Insertions du rétrotransposon dans la lignée NF4050. Trente-cinq insertions sont recensées dans cette lignée. Quatorze d'entre elles, non référencées dans ce tableau, sont localisées dans des régions non codante du génome. Parmi les vingt-trois autres insertions, 10 sont localisées dans une séquence exonique, 7 dans une séquence intronique et 4 à proximité de l'extrémité 5' ou 3' d'un gène.

Gène impacté	Fonction associée
Insertion du <i>TNT1</i> dans une région codante d'un gène (exon) :	
Medtr2g437530	Protéine DREPP de la membrane plasmique
Medtr1g010250	Protéine putative, récepteur kinase associé à la paroi
Medtr4g122850	Domaine F-box d'interaction protéine-protéine
Medtr6g088245	Protéine de résistance aux maladies (classe TIR-NBS-LRR)
Medtr4g120290	Inhibiteur de pectinesterase ou pectinesterase
Medtr4g051698	Protéine de résistance aux maladies (classe TIR-NBS-LRR)
Medtr5g012590	glucuronosyltransferase PGSIP8
Medtr3g093850	Protéine putative transmembranaire
Medtr1g068970	short-chain dehydrogenase TIC 32
Medtr3g091080	CNGC 1b
Insertion du <i>TNT1</i> dans une région non codante d'un gène (intron) :	
Medtr2g100470	Protéine kinase, LRR receptor-like
Medtr8g098260	Facteur de transcription S-II
Medtr1g021520	Domaine myb-like de liaison à l'ADN, protéine de la classe shaqkyf
Medtr4g073090	Protéine 3-oxo-delta(4,5)-steroid 5-beta-reductase-like
Medtr0049s0070	Protéine NSP-interacting kinase-like
Medtr7g086420	receptor-like kinase
Medtr7g059010	Protéine de la stérilité male de la famille MS5
Insertion du <i>TNT1</i> dans un région promotrice ou après un gène :	
Medtr1g051520	Protéine putative de la famille D-arabinono-1,4-lactone oxidase
Medtr5g061680	Protéine de la superfamille F-box/RNI
Medtr5g012590	glucuronosyltransferase PGSIP8
Medtr5g032330	Protéine hypothétique

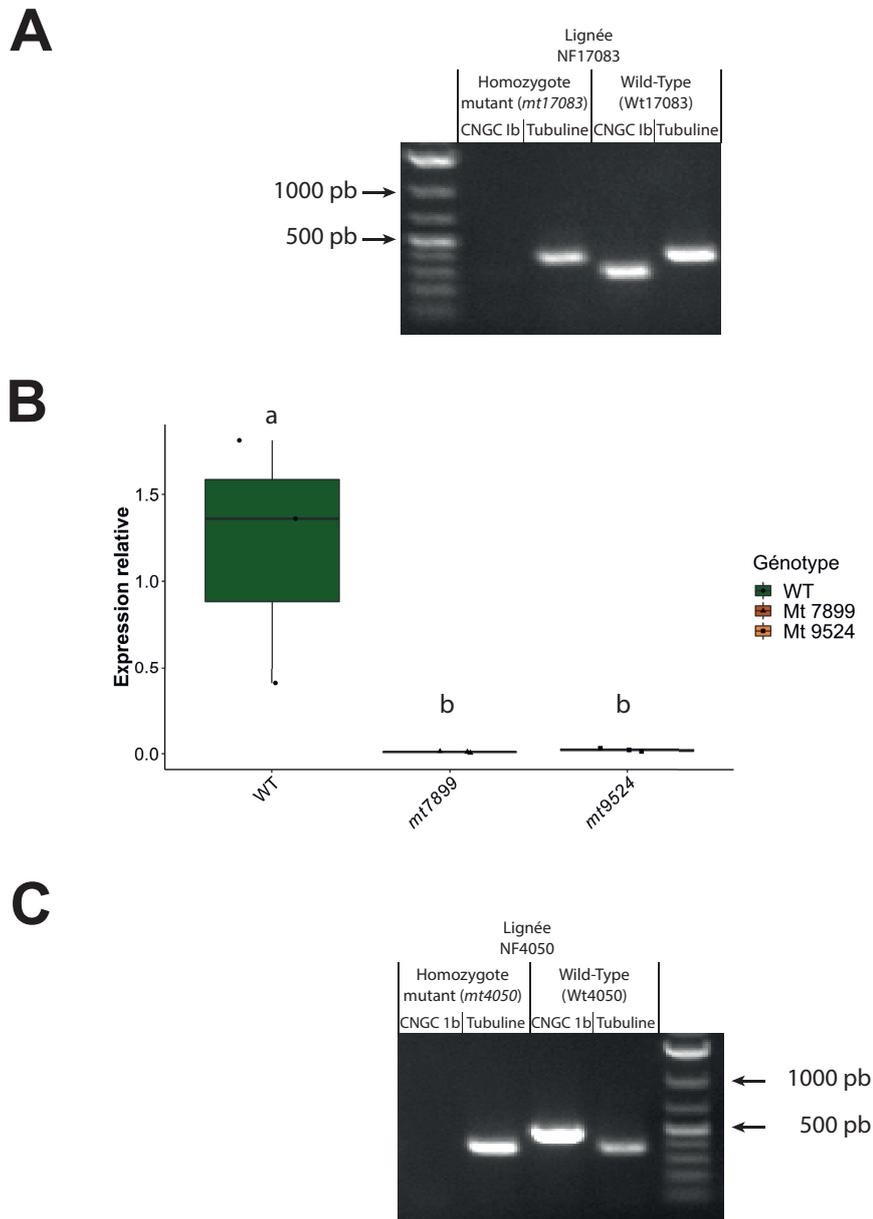


Figure V.5 : Inactivation des gènes *CNGC 1a*, *1b* et *1b* dans les lignées mutantes sélectionnées.

A : Lignée 17083. Analyse par RT-PCR de l'effet de la mutation sur la présence du transcrit. Amplification d'un segment de l'ADNc de *MtCNGC 1b* à partir d'une banque d'ADNc issue soit de plantes sauvages (Wild-Type, Wt17083) soit de plantes mutantes (Homozygote Mutant, *mt17083*). Dans ces expériences d'amplification le contrôle utilisé est *MtTubuline*.

B : Analyse par Q-RT-PCR de l'effet de la mutation sur la présence du transcrit. Amplification d'un segment de l'ADNc *MtCNGC 1a* à partir d'une banque d'ADNc issue soit de plantes sauvages (WT) soit de plantes mutantes (Homozygote Mutant : Mt 7899 et Mt 9524). Les résultats ont été normalisés avec le gène *MtTC77416*. Chaque lettre représente une différence significative avec $P < 0,05$ (Tukey's test) ($n = 3$ pour chaque lignée).

C : Lignée 4050. Analyse par RT-PCR de l'effet de la mutation sur la présence du transcrit. Amplification d'un segment de l'ADNc de *MtCNGC 1b* à partir d'une banque d'ADNc issue soit de plantes sauvages (Wild-Type, Wt4050) soit de plantes mutantes (Homozygote Mutant, *mt4050*). Dans ces expériences d'amplification le contrôle utilisé est *MtTubuline*.

V.2.4. Validation de l'inactivation des gènes CNGC candidats

V.2.4.1. Validation de l'inactivation du gène *MtCNGC 1b*

L'insertion du rétrotransposon *TNT1* dans le gène *MtCNGC 1b* chez la lignée NF17083 est localisée dans le quatrième exon de ce gène (Figure V.4 A). Cette mutation ainsi que les plantes homozygotes mutantes correspondantes, sont appelées *mt17083*. L'inactivation du gène chez ces plantes mutantes a été vérifiée par RT-PCR (Figure V.5 A). Deux banques d'ADNc ont servi de matrice lors des réactions de PCR : une première issue de plantes mutantes *mt17083* et une deuxième issue de plantes sauvages (WT). Les résultats des réactions de PCR révèlent que l'expression fonctionnelle du canal *MtCNGC 1b* est totalement inactivée par l'insertion du rétrotransposon *TNT1* puisque l'amplification d'une partie de l'ADNc du canal *MtCNGC 1b* se révèle impossible à partir de la banque d'ADNc issue de plantes mutantes *mt17083* (Figure V.5 A). Un fragment du gène de tubuline de *M. truncatula* est amplifié dans les deux banques d'ADNc, ce qui sert de contrôle lors de cette expérience, attestant du bon déroulement de l'ensemble du processus expérimental.

V.2.4.2. Validation de l'inactivation du gène *MtCNGC 1a*

Les insertions du rétrotransposon *TNT1* dans le gène *MtCNGC 1a* sont localisées dans la région promotrice proximale du gène *MtCNGC 1a* chez les deux lignées NF7899 et NF9524 (Figure V.4 B). Les plantes porteuses de ces mutations à l'état homozygote sont appelées *mt7899* et *mt9524*, respectivement. Ces mêmes noms sont également utilisés pour désigner les mutations correspondantes. Le niveau d'inactivation du gène a été évalué par Q-RT-PCR comme décrit dans le paragraphe II.3.4 (Figure V.5 B). Trois banques d'ADNc ont servi de matrice lors des réactions de PCR : la première issue de plantes sauvages (WT), la seconde issue de plantes mutantes *mt7899*, et la troisième issue de plantes mutantes *mt9524*. L'expression du transcrit *MtCNGC 1a* est très fortement diminuée par l'insertion du rétrotransposon *TNT1* chez ces deux lignées mutantes (Figure V.5 B). Le gène *MtEF1B* (*Medtr3g058940*) a été utilisé pour normaliser les résultats.

V.2.4.3. Validation de l'inactivation du gène *MtCNGC 1b*

L'insertion du rétrotransposon *TNT1* dans le gène *MtCNGC 1b* chez la lignée NF4050 est localisée dans le premier exon de ce gène (Figure V.4 A). A l'instar de la nomenclature proposée dans les deux paragraphes précédents, cette mutation ainsi que les plantes homozygotes mutantes correspondantes sont appelées *mt4050*. L'inactivation fonctionnelle

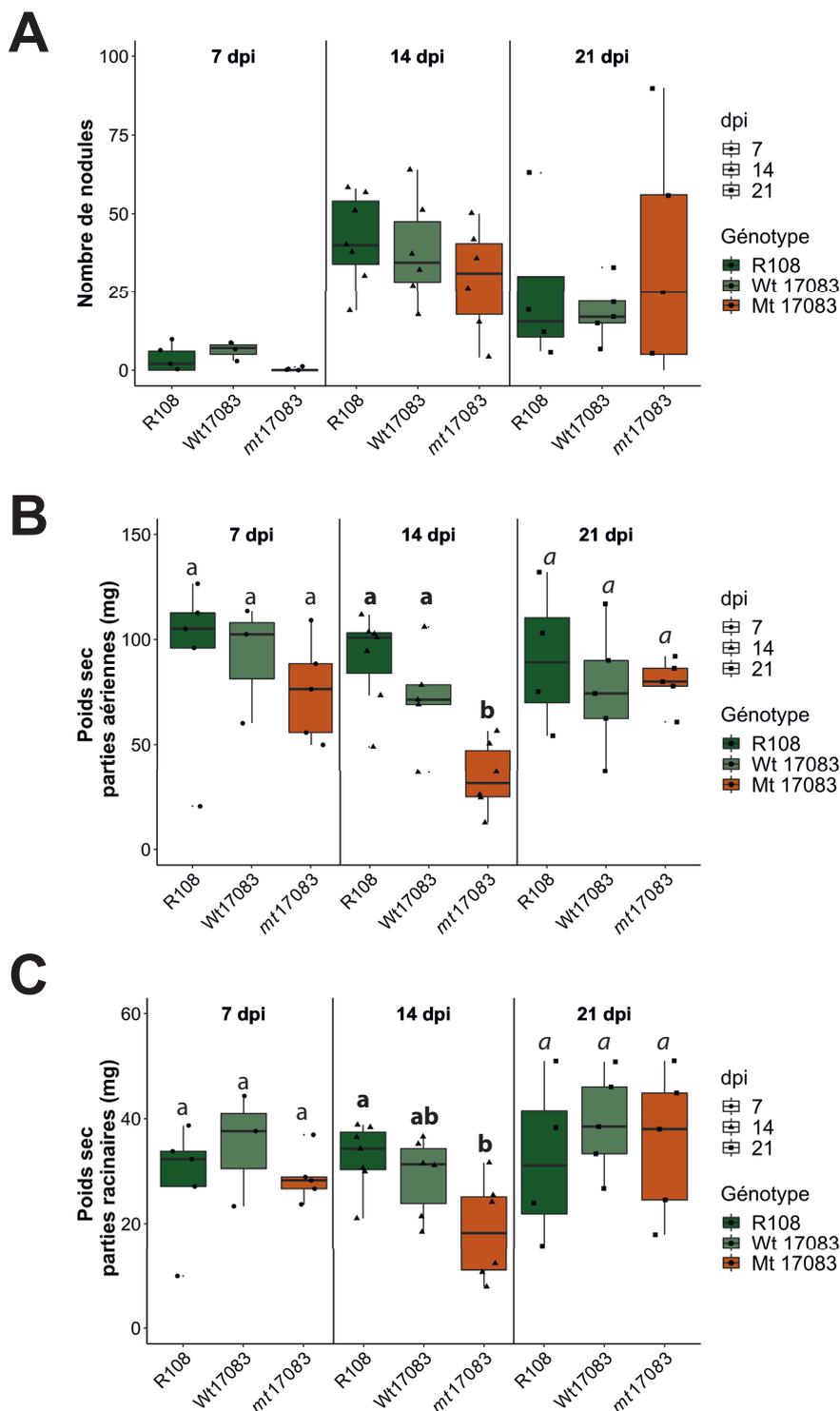


Figure V.6 : Phénotypage de la capacité de nodulation en absence d'expression fonctionnelle du gène *MtCNGC 1b* dans la lignée NF17083.

Les plantes mutantes *mt17083* porteuses d'une insertion *TNT1* dans *MtCNGC 1b* sont comparées à des plantes contrôles WT17083 issues de la même lignée mutante NF17083 mais de génotype sauvage au locus *MtCNGC 1b*, et à des plantes de génotype R108 « totalement » sauvage. Les plantes sont cultivées dans un substrat de sable et vermiculite selon le protocole décrit dans le chapitre II.1.3.3 (voir aussi la légende de la Figure III.8D). Elles sont inoculées avec la souche de *S. meliloti* 1021 après trois semaines de culture. Les mesures (nombre de nodules, poids sec des parties aériennes et poids sec des racines) sont faites 7, 14 et 21 jours après inoculation (dpi). Pour chaque point de la cinétique, des lettres différentes indiquent une différence statistiquement significative selon le test de Tukey au niveau de 5%. Les lettres sont normales pour 7 dpi, en gras pour 14 dpi et en italique pour 21 dpi.

A : Nombre de nodules par plante mesuré à 7, 14 et 21 dpi.

B : Poids sec en milligramme des parties aériennes déterminé à 7, 14 et 21 dpi.

C : Poids sec en milligramme des parties racinaires déterminé à 7, 14 et 21 dpi.

du gène a été vérifiée par RT-PCR (Figure V.5 A). Deux banques d'ADNc ont servi de matrice lors des réactions de PCR : une première issue de plantes mutantes *mt4050* et une deuxième issue de plantes sauvages (WT). Un fragment du gène de tubuline de *M. truncatula* a été amplifié dans les deux banques d'ADNc, servant de contrôle lors de cette expérience. L'amplification d'une partie de l'ADNc du canal *MtCNGC 1b* s'est révélée impossible à partir de la banque d'ADNc issue de plantes mutantes homozygotes *mt17083* (Figure V.5 A). Ce qui indique que l'expression fonctionnelle du canal *MtCNGC 1b* est totalement inactivée par l'insertion du rétrotransposon *TNT1*.

V.2.5. Analyse du nombre de nodules chez les lignées mutantes *mtcngc* lors de leur interaction symbiotique avec les bactéries fixatrices d'azote *Sinorhizobium meliloti*

Les expériences ont été conduites en parallèle pour l'ensemble des lignées sélectionnées. Le nombre de nodules par plante est déterminé après une culture dans un substrat constitué d'un mélange de sable et de vermiculite selon le protocole décrit dans le chapitre II (§ 1.3.3) et précédemment utilisé pour le phénotypage des plantes *mtskor-1* de la lignée NF9352 et *mtskor-2* de la lignée NF21235 (Figure III.8D et Figure III.11). Les plantes, cultivées au total pendant 6 semaines sur le substrat sable-vermiculite, sont inoculées avec la souche *S. meliloti 1021* à la fin de leur troisième semaine de développement sur ce substrat. Des plantes sont ensuite récoltées chaque semaine à 7, 14 ou 21 jours après inoculation (dpi) pour une mesure du nombre de nodules ainsi que du poids sec des parties aériennes et racinaires.

Pour les gènes *MtCNGC 1b* et *MtCNGC 1a*, des plantes porteuses de la mutation homozygote dans le gène *CNGC* étudié ont pu être comparées à la fois à des plantes contrôles issues de la même lignée mais de génotype sauvage au locus *CNGC* correspondant, et à des plantes de l'écotype R108 sauvage dans lequel a été obtenue la collection de la Noble Foundation utilisée dans ce travail. Pour le gène *MtCNGC 1b*, je ne disposais pas, au sein de la lignée sélectionnée NF4050, de plantes de génotype sauvage à ce locus. La comparaison a donc été faite uniquement entre des plantes porteuses de la mutation homozygote *mt4050* et des plantes de génotype R108 sauvage.

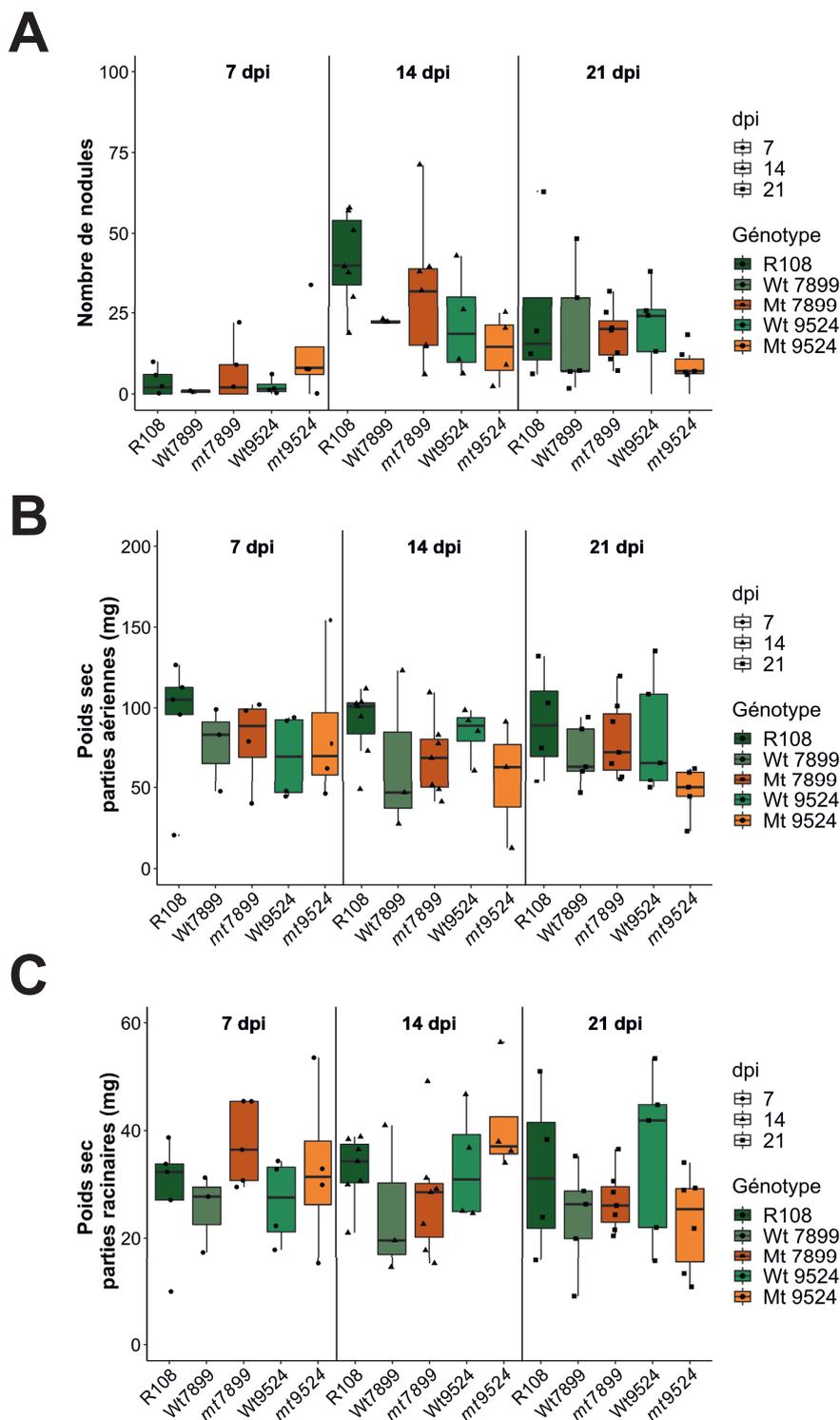


Figure V.7 : Phénotypage de la capacité de nodulation en absence d'expression fonctionnelle du gène *MtCNGC 1a* dans la lignée NF9524 et NF7899.

Les plantes mutantes *mt9524* et *mt7899* porteuses d'une insertion *TNT1* dans *MtCNGC 1a* sont comparées à des plantes contrôles WT9524 ou WT7899 issues des lignées mutantes correspondantes mais de génotype sauvage au locus *MtCNGC 1a*, et à des plantes de génotype R108 « totalement » sauvage. Les plantes sont cultivées dans un substrat de sable et vermiculite selon le protocole décrit dans le chapitre II.1.3.3 (voir aussi la légende de la Figure III.8D). Elles sont inoculées avec la souche de *S. meliloti* 1021 après trois semaines de culture. Les mesures (nombre de nodules, poids sec des parties aériennes et poids sec des racines) sont faites 7, 14 et 21 jours après inoculation (dpi). Pour chaque point de la cinétique, un test statistique (test de Tukey au niveau de 5%) est réalisé. Aucune différence statistiquement significative entre la lignée mutante et les lignées contrôles de génotype sauvage n'est observée.

A : Nombre de nodules par plante mesuré à 7, 14 et 21 dpi.

B : Poids sec en milligramme des parties aériennes déterminé à 7, 14 et 21 dpi.

C : Poids sec en milligramme des parties racinaires déterminé à 7, 14 et 21 dpi.

V.2.5.1. MtCNGC 1b, lignée NF17083 et mutation *mt17083*

La lignée homozygote mutante *mt17083* a été comparée à des plantes (appelées WT 17083) issues de la lignée NF17083 de génotype sauvage pour *MtCNGC 1b* et à des plantes de génotype R108 sauvage (Figure V.6).

Le test de Tukey ne révèle aucune différence significative (à 5%) concernant le nombre de nodules par plante à 7, 14 et 21 dpi entre les 3 lignées Figure V.6 A. Les biomasses aériennes et racinaires apparaissent aussi relativement semblables chez les différentes lignées (Figure V.6 B et C), bien que les plantes mutantes *mt17083* récoltées à 14 dpi présentaient des biomasses réduites par rapport à celles des 2 types de plantes WT contrôles.

V.2.5.2. Gène *MtCNGC 1a*, lignées NF9524 et NF7899, et mutations *mt9524* et *mt7899*

Comme indiqué précédemment, le travail concernant le gène *MtCNGC 1a* a été conduit avec deux lignées mutantes, NF9524 et NF7899. Les deux lignées homozygotes mutantes correspondantes, *mt7899* et *mt9524*, ont été comparées à des plantes appelées WT 7899 ou Wt 9524, sélectionnées respectivement au sein des lignées Mt7899 et Mt9524 comme porteuses homozygotes de l'allèle *MtCNGC 1a* sauvage, et à des plantes de génotype R108 sauvage (Figure V.7).

Les tests de Tukey effectués sur les résultats obtenus ne révèlent aucune différence significative (au seuil de 5%) entre les 5 types de plantes, en termes de nombre de nodules par plante, de production de biomasse aérienne et de production de biomasse racinaire (Figure VI.7).

V.2.5.3. Gène *MtCNGC 1b*, lignées NF4050 et mutation *mt4050*

Les plantes de la lignée mutante *mt4050* ont été comparées uniquement à des plantes de génotype R108 sauvage puisque des plantes issues de la lignée NF4050 et de génotype sauvage homozygote n'étaient pas disponibles. Les résultats présentés par le Figure V.8 font apparaître une différence significative ($P < 0,001$) entre plantes mutantes et plantes contrôles de génotype sauvage en termes de nombre de nodules par plante à 14 dpi. Aucune différence significative n'est observée en termes de biomasse racinaire entre les deux

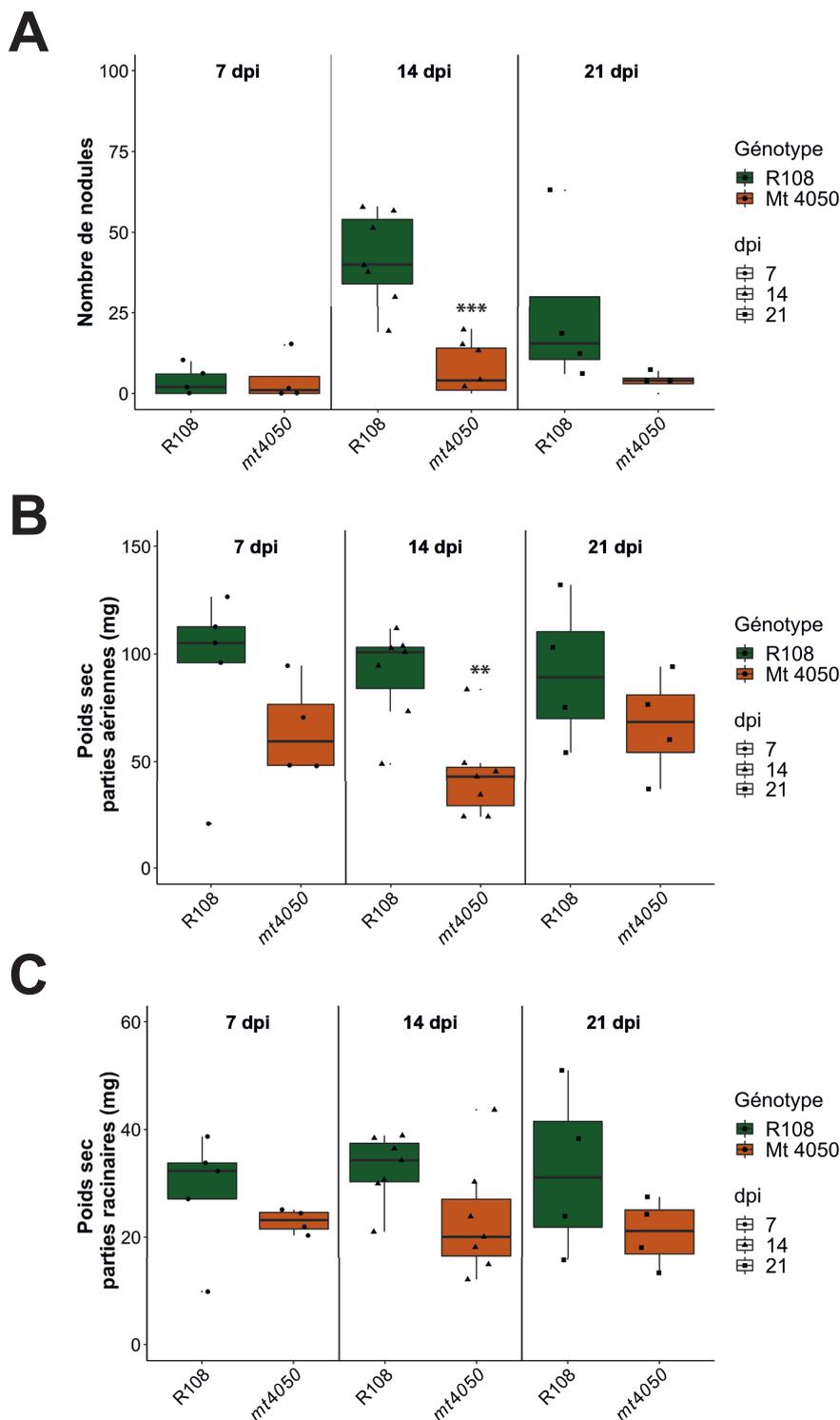


Figure V.8 : Phénotypage de la capacité de nodulation en absence d'expression fonctionnelle du gène *MtCNGC 1b* dans la lignée NF4050.

Les plantes mutantes *mt4050* porteuses d'une insertion *TNT1* dans *MtCNGC 1b* sont comparées à des plantes de génotype R108 « totalement » sauvage. Les plantes sont cultivées dans un substrat de sable et vermiculite selon le protocole décrit dans le chapitre II.1.3.3 (voir aussi la légende de la Figure III.8D). Elles sont inoculées avec la souche de *S. meliloti* 1021 après trois semaines de culture. Les mesures (nombre de nodules, poids sec des parties aériennes et poids sec des racines) sont faites 7, 14 et 21 jours après inoculation (dpi). Pour chaque point de la cinétique, la différence entre plantes mutantes et sauvage est analysée par un test de Student au seuil de 0,05, 0,01 ou 0,001 (* : $P < 0,05$; ** : $P < 0,01$; *** : $P < 0,001$).

A : Nombre de nodules par plante mesuré à 7, 14 et 21 dpi.

B : Poids sec en milligramme des parties aériennes déterminé à 7, 14 et 21 dpi.

C : Poids sec en milligramme des parties racinaires déterminé à 7, 14 et 21 dpi.

lignées. Par contre, la biomasse aérienne apparaît plus faible ($P < 0,01$) chez les plantes mutantes récoltées à 14 dpi.

V.3. Discussion

L'approche « gènes candidats » que j'ai conduit a démarré par une analyse *in silico* visant à identifier des CNGC exprimés dans le poil absorbant et susceptibles d'être adressés à la membrane plasmique. La sélection selon le premier critère, *i.e.* l'existence d'une expression dans le poil absorbant, a été faite à partir des résultats de l'analyse d'un transcriptome obtenu par RNA-Seq (Damiani *et al.*, 2016). Il semble raisonnable de considérer que les données d'une analyse transcriptomique relativement profonde, conduite par RNA-Seq sont susceptibles de fournir la liste complète des CNGC que le poil absorbant exprime de façon significative (dans les conditions de culture utilisées pour la préparation des banques analysées). Il est cependant important (et intrigant) de remarquer que les canaux *MtCNGC15a* et *MtCNGC15b* identifiés par Charpentier *et al.* (2016) comme participant aux oscillations calciques péri-nucléaires déclenchées par la perception des facteurs Nods dans les poils absorbants ne figurent pas dans les données de RNA-Seq de Damiani *et al.* (2016). Une analyse compilant l'ensemble des transcriptomes devenus disponibles pour le poil absorbant de *Medicago truncatula* (Covitz *et al.*, 1998; Larrainzar *et al.*, 2015; Jardinaud *et al.*, 2016) pourrait conduire à une base de sélection plus large, intégrant à notre liste des CNGC candidats supplémentaires. Il est clair aussi qu'un recensement direct par Q-RT-PCR des CNGC exprimés dans le poil présenterait un grand intérêt.

La sélection selon le second critère, *i.e.* l'adressage à la membrane plasmique, a été conduite strictement *in silico*, en utilisant un modèle prédictif de la localisation sub-cellulaire des protéines membranaires. Nous avons écarté de la sélection les CNGC identifiés par le programme comme très probablement adressés à la membrane nucléaire. La pertinence de cette démarche devra donc être testée directement par une approche expérimentale, en utilisant par exemple des protéines chimériques fluorescentes, fusionnant un dérivé de la GFP aux CNGC testés.

Plus de 9 CNGC présenteraient donc une expression dans le poil absorbant de *M. truncatula*, sur les 22 membres de cette famille, selon notre analyse transcriptomique et

les résultats présentés par Charpentier *et al.* (2016). Une telle abondance pourrait indiquer que la famille CNGC est fortement impliquée dans les nombreuses fonctions de perception et transduction de signaux biotiques ou abiotiques que le poil absorbant assure (Laberche, 2010). Au sein de la liste des 9 membres fournie par notre analyse transcriptomique, *MtCNGC15c* est identifié comme adressé à la membrane nucléaire (Charpentier *et al.*, 2016). Quelques autres membres pourraient l'être aussi, sur la base de leur score NLS. Cependant, le nombre important de CNGC exprimés dans le poil laisse penser que plusieurs d'entre eux sont adressés et actifs sur la membrane plasmique. Cela pourrait rendre possible la formation de canaux hétéro-tétramériques, associant des sous-unités codées par des gènes CNGC différents, comme cela a été décrit pour des CNGC animaux (Kaupp et Seifert, 2002). L'adressage de plusieurs CNGC différents à la membrane pourrait aussi donner lieu à des phénomènes de redondance, qui se traduiraient par une absence de phénotype lorsque seulement un gène est inactivé chez une plante mutante.

Le phénotype auquel nous nous sommes intéressés pour tester l'implication de 3 CNGC candidats, CNGC 1a, 1b et 1c, est le nombre de nodules produits par plante en absence d'expression fonctionnelle du CNGC considéré. Pour cela, nous avons comparé des plantes mutantes ne présentant pas d'expression fonctionnelle de l'un de ces CNGC, du fait de l'insertion d'un *TNT1* dans ce gène, et différentes lignées de plantes contrôles de génotype sauvage. Cette stratégie est semblable à celle développée par Charpentier *et al.*, (2016), qui a abouti à la mise en évidence du rôle de canaux CNGC (CNGC 15a, 15b et 15c) dans les oscillations calciques péri-nucléaires déclenchées par la perception des facteurs Nod. Parmi les résultats de ce travail, il est montré qu'une altération de la cinétique de ces oscillations chez des plantes mutantes se traduit par un défaut de la capacité de nodulation de la plante, en termes de nombre de nodules portés par le système racinaire à un moment donné après inoculation par les rhizobia. Nous avons utilisé la même stratégie pour notre approche « gène candidat ». Il est cependant possible que, selon le processus de signalisation et la mutation étudiés, le temps important qui sépare l'inoculation de la production de nodules permette des phénomènes de compensation, en particulier via les mécanismes qui déterminent et contrôlent le nombre final de nodules que doit produire de façon « optimale » le système racinaire en fonction des conditions environnementales. C'est pour cela que nous avons effectué une analyse cinétique de la production de nodules, en

déterminant leur nombre à 7, 14 et 21 jours après l'inoculation. Il serait cependant très souhaitable que l'examen des plantes mutantes intègre aussi des observations plus précoces que la formation des nodules, concernant par exemple le nombre de cordons d'infection ou l'expression de gènes marqueurs précoces comme *ENOD11*. Il serait aussi très intéressant d'utiliser la méthodologie de patch-clamp sur protoplastes obtenus par « dissection laser » pour directement comparer les conductances ioniques membranaires (en particulier la conductance à Ca^{2+}) chez les plantes mutantes et contrôles sauvages. Une telle démarche serait très lourde expérimentalement mais pourrait avoir pour avantage de fournir directement de l'information sur les caractéristiques fonctionnelles des canaux considérés.

Les lignées mutantes par insertion de *TNT1* étant toutes multi-mutantes, parce que présentant des insertions de *TNT1* à de nombreux loci, nous nous sommes fixés l'objectif d'utiliser comme plantes contrôles à la fois des plantes de génotype R108 « totalement » sauvage et des plantes issues de la lignée multi-mutante considérée mais présentant le génotype sauvage au locus *CNGC* correspondant. Cet objectif a pu être réalisé pour les gènes *CNGC 1a* et *1B*, mais pas pour *CNGC1b*, parce que nous n'avons pas de plantes issues de la lignée mutante NF4050 mais de génotype sauvage au locus *CNGC1b*. Il sera nécessaire, dans la suite de ce travail, d'obtenir de telles plantes contrôles et de les intégrer dans toutes les comparaisons de génotypes.

En complément de l'analyse cinétique de la production de nodules, nous avons mesuré les biomasses racinaires et foliaires des différentes plantes. Les données présentées révèlent une quasi-absence de croissance après l'inoculation, pendant les 3 semaines de culture supplémentaires. Autrement dit, les plantes avaient produit l'essentiel de leur biomasse pendant les 3 semaines précédant l'inoculation. La conclusion est donc que, dans nos conditions expérimentales, l'inoculation impacte fortement la croissance des plantes pendant au moins 3 semaines. Il est possible que cela traduise l'existence de facteurs environnementaux très limitants, et que le type d'environnement affecte fortement la capacité de nodulation, et rende difficile toute stratégie de génétique inverse et de phénotypage différentiel. Pour la suite de cette approche, il sera donc utile de tester les plantes mutantes dans des conditions environnementales différentes (intensité lumineuse, substrat, souche de *S. meliloti*...).

Un résultat obtenu à ce jour dans cette approche « gènes candidats » est cependant positif et encourageant. Il concerne le gène *CNGC 1b*. A 14 jours après inoculation, les plantes mutantes *mt4050* ont un nombre de nodules très significativement inférieur ($p < 0,001$) à celui des plantes contrôles R108 sauvages. Les expériences évoquées dans les paragraphes précédents devront être conduites en priorité pour ce gène, par exemple pour examiner les conséquences de son inactivation sur des étapes précoces de la mise en place de la relation symbiotique, comme la production de cordons d'infection ou l'expression de gènes marqueurs tel que *ENOD11*. L'approche de phénotypage direct par patch-clamp devient aussi beaucoup plus raisonnable à envisager si l'on ne s'intéresse qu'à un seul gène. Des plantes de génotype sauvage au locus *CNGC 1b* sélectionnées au sein de la lignée NF4050 devront être intégrées à l'ensemble de ces expériences. De plus, une seconde lignée, indépendante de NF4050, devra être obtenue et testée.

Il sera aussi très important, pour la suite de cette approche « gène candidat », de prendre en compte la possibilité de redondance fonctionnelle de CNGC adressés à la membrane plasmique du poil absorbant. Cela impliquera la production de plantes porteuses de mutations dans plusieurs gènes *CNGC*. Pour cela, il sera peut-être intéressant d'inactiver des couples de gènes appartenant à la même sous-famille CNGC et présentant des niveaux d'expression comparables dans le poil. C'est le cas par exemple des gènes *CNGC 1b* et *CNGC 1a*.

Enfin, dans une approche complémentaire des analyses *in planta* présentées précédemment, il serait très utile d'exprimer les canaux CNGC ciblés dans divers systèmes d'expression hétérologues, *e.g.* oocytes de xénope, cellules d'insecte ou de mammifère en culture, pour tenter de les caractériser de façon détaillée sur le plan fonctionnel. L'objectif serait de préciser en particulier leur sélectivité ionique, leur perméabilité à Ca^{2+} , leur régulation (par des nucléotides cycliques ?) et les possibilités de formation de canaux hétéro-tétramériques. Je conduis actuellement une opération de clonage de différents canaux CNGC dans des vecteurs d'expression *ad hoc*, en vue de telles analyses dans des systèmes hétérologues.

**Chapitre VI : Des canaux CNGC localisés sur la membrane nucléaire
sont impliqués dans les oscillations calciques périnucléaires
déclenchées par la perception des facteurs Nods**

PLANT SCIENCE

**Nuclear-localized cyclic
nucleotide-gated channels mediate
symbiotic calcium oscillations**

**Myriam Charpentier,^{1*} Jongho Sun,¹ Teresa Vaz Martins,² Guru V. Radhakrishnan,¹
Kim Findlay,¹ Eleni Soumpourou,¹ Julien Thouin,³ Anne-Aliénor Véry,³ Dale Sanders,⁴
Richard J. Morris,² Giles E. D. Oldroyd^{1*}**

Dans le chapitre précédent, j'ai présenté un travail visant à identifier des canaux calciques impliqués dans les processus précoces de la signalisation électrique et calcique déclenchés par la perception des facteurs Nods. Ce travail a été réalisé dans le cadre d'une approche « gènes candidats » ciblant la famille de canaux CNGC. Parallèlement à ce travail, j'ai été associé à un programme conduit par Myriam Charpentier (John Innes Center, UK) visant à identifier des canaux calciques présents sur la membrane nucléaire du poil absorbant de *Medicago truncatula* et jouant un rôle dans l'établissement des oscillations périnucléaires de la concentration calcique, en aval chronologiquement de la signalisation électrique et calcique précoce ciblée par mon propre travail. Ce projet de Myriam Charpentier a reposé lui aussi sur une approche « gènes candidats ». Myriam Charpentier a croisé les conclusions d'une série d'analyses *in silico* visant à identifier dans le génome de *M. truncatula* des gènes codant des « protéines membranaires » porteuses à la fois de motifs considérés comme

« caractéristiques » de canaux ioniques et « typiques » d'un adressage à la membrane nucléaire. Ces analyses ont abouti à la sélection de gènes candidats, dont 4 *CNGC*, *CNGC14*, *CNGC15a*, *15b* et *15c*. L'inactivation de *CNGC15a*, *15b* et/ou *15c* s'est révélée conduire à une altération de la plante à s'engager dans une relation symbiotique avec des rhizobia ainsi qu'avec des champignons endomycorhiziens. Une combinaison d'approches génétiques, moléculaires, cellulaires et physiologiques a ensuite conduit à la conclusion que ces 3 *CNGC* sont localisés sur la membrane nucléaire, où ils ont la capacité de s'associer avec un canal perméable à K^+ pour former un complexe fonctionnel qui contribue à engendrer et moduler, en termes de fréquence, amplitude et forme, les oscillations calciques périnucléaires.

Ce travail est présenté ci-dessous directement sous la forme du manuscrit soumis et accepté par la revue. Ma contribution à cette analyse a été de mettre en évidence, par expression hétérologue dans l'ovocyte de Xénope, une perméabilité à Ca^{2+} chez ces canaux, en travaillant spécifiquement sur *CNGC15a*. Pour cela, la séquence nucléotidique de *CNGC15a* a été adaptée au code génétique du Xénope, et des modifications ont été apportées au protocole classique de préparation des ovocytes, en termes de composition ionique des solutions.

* *
*

Abstract

Nuclear-associated Ca^{2+} oscillations mediate plant responses to beneficial microbial partners: nitrogen-fixing rhizobial bacteria that colonise legume roots and arbuscular mycorrhizal fungi that colonise the majority of plant species. A potassium permeable channel is required for symbiotic Ca^{2+} oscillations, but the calcium channels themselves were unknown. We show that three cyclic nucleotide gated channels of *Medicago truncatula* are required for nuclear Ca^{2+} oscillations and subsequent symbiotic responses. These cyclic nucleotide gated channels are located at the nuclear envelope and are permeable to Ca^{2+} . We demonstrate that the cyclic nucleotide gated channels form a complex with the postassium permeable channel, which modulates nuclear Ca^{2+} release. These channels, like their counterparts in animal cells, might regulate multiple nuclear Ca^{2+} responses to developmental and environmental conditions.

Nuclear calcium (Ca^{2+}) signals transduce a variety of stimuli in animal (1) and plant cells (2). Plant genomes lack genes similar to nuclear localised Ca^{2+} channels present in animals (3), implying alternative mechanisms for nuclear Ca^{2+} release in plants. Nuclei in legume root cells show Ca^{2+} oscillations in response to signalling molecules from microsymbionts: nitrogen-fixing rhizobial bacteria and arbuscular mycorrhizal (AM) fungi (4). The nuclear Ca^{2+} oscillations activate developmental programmes supporting the accommodation of both symbionts (4). In the legume *M. truncatula*, components required for the induction of nuclear Ca^{2+} oscillations include the K^+ -permeable channel Does not Make Infections 1 (DMI1) and the *M. truncatula* Ca^{2+} -ATPase (MCA8), all of which are located on nuclear membranes (5). Ca^{2+} imaging suggests that the nuclear envelope, contiguous with the endoplasmic reticulum (ER), acts as the internal Ca^{2+} store for symbiotic Ca^{2+} responses (5). Here we identify the Ca^{2+} -permeable channels responsible for Ca^{2+} release from the nuclear envelope/ER stores.

We screened the protein database of *M. truncatula* (6) to identify transmembrane proteins containing motifs present in Ca^{2+} channels (PF00622, PF02815, PF08763, PF00036, PF06459) or related to ion channels (PF00520, PF07885, PF02386, PF02026, PF08709), that also possessed predicted nuclear localisation signals (NLS) (fig. S1A). We assessed the genes' impact on symbioses by silencing them in *M. truncatula* roots with RNA interference (RNAi) constructs via *Agrobacterium rhizogenes* mediated gene transfer. We found that members of the cyclic nucleotide gated channel (CNGC) family are required for symbiotic associations (fig. S1, B to E). Among the 21 CNGC members identified in the *M. truncatula* genome, 14 are predicted to contain NLS motifs identified in known nuclear-localised legume channels such as DMI1 (5) and CASTOR (7) (fig. S2). The CNGCs predicted to localize to the nucleus fall into groups II, III, IVA and IVB (8) (fig. S2A).

In order to differentiate which NLS-containing CNGCs contribute to symbiotic signalling we used RNAi to reduce expression of one or several genes from each CNGC group (fig. S3 and S4). We inoculated *M. truncatula* roots expressing the silencing constructs with *Sinorhizobium meliloti* or *Rhizophagus irregularis* (fig. S3A and B). Silencing of *CNGC15a*, *CNGC15b* and/or *CNGC15c*, correlated with defects in symbiotic associations (fig. S3 and fig. S5, C and D). *CNGC15a*, *CNGC15b* and *CNGC15c* belong to the group III of CNGCs alongside *CNGC14*, *CNGC16*, *CNGC17* and *CNGC18* (Fig. 1A and fig. S5A). All group III members except

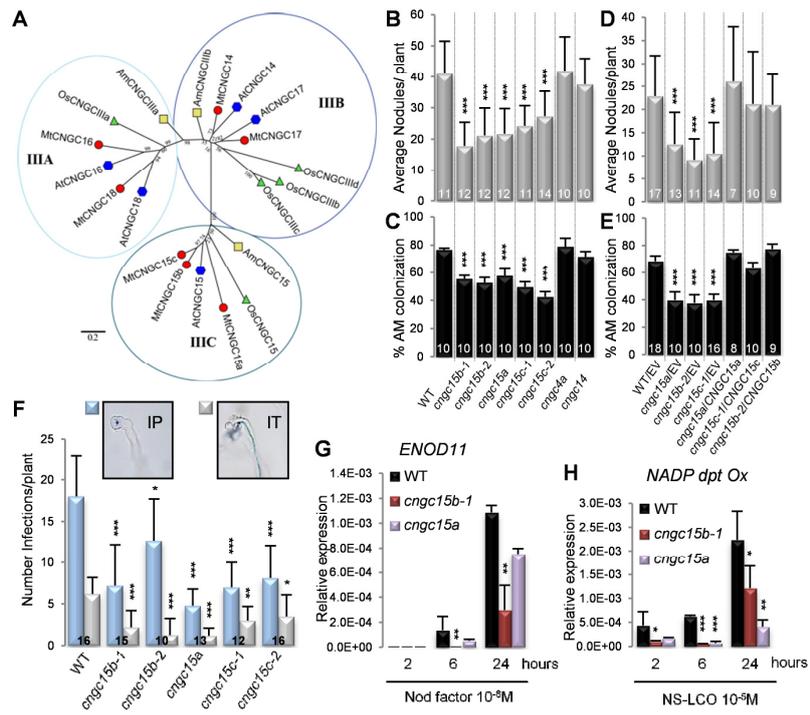


Fig. 1. Mutants in the *CNGC15s* show symbiotic defects

(A) CNGC15a, CNGC15b and CNGC15c belong to subclass C of group III CNGCs. The phylogenetic tree includes CNGC group III members from the basal angiosperm *Amborella trichopoda* “Am” (yellow squares); *Oryza sativa* var. *japonica* “Os”, (green triangles); *Arabidopsis thaliana* “At” (blue polygons) and *M. truncatula* “Mt” (red dots). (B) The *cngc15a*, *b* and *c* mutants were assessed at 25 d.p.i. with *S. meliloti* strain 2011 and (C) *R. irregularis* colonization at 5 w.p.i. Complementation of the nodulation (D) and mycorrhization (E) phenotypes of *cngc15a*, *b* and *c* by expressing *CNGC15a*, *b* and *c* fused to GFP and driven by the *L. japonicus* *Ubiquitin* (*UB*) promoter. (F) Infection pockets (IP) and infection threads (IT) were quantified 7 d.p.i with *S. meliloti*. Values are from two biological replicates. (G) Nod factor induced *ENOD11* expression in WT and *cngc15* mutants and (H) NS-LCO induced *NADP dependent oxidoreductase* expression in WT and *cngc15* mutants after 2, 6 and 24 hours treatment. Values in (G) and (H) are from three biological replicates (each consisting of ten roots) and expression was normalized to *Elongation Factor-1 α* (*EF-1 α*). (B), (D), (F), (G) and (H) Error bars show standard deviation. (C) and (E) Error bars show standard error from the mean. The number of plants are shown at the bottom of each column. * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001 (*t*-test).

CNGC18 have a predicted NLS (fig. S2B). All are expressed in roots except *CNGC16* (fig. S5B). RNAi targeting *CNGC17* and *CNGC18* did not reduce nodulation (fig. S5, E to J). Thus we conclude that *CNGC16*, *CNGC17* and *CNGC18* do not function in symbiosis.

To further assess the function of the CNGC group III in symbioses we identified mutants in *CNGC14*, *CNGC15a*, *CNGC15b*, *CNGC15c* and in a CNGC that falls outside group III, *CNGC4a*, as a control. One or two insertion alleles were identified for each gene (fig. S6) and these were confirmed to reduce mRNA levels (fig. S6). Nodulation and fungal colonisation were assessed in all mutant lines 25 days after inoculation with *S. meliloti* or 5 weeks after inoculation with *R. irregularis* (Fig. 1B, C, fig. S7A and B). *cngc15a*, *cngc15b* and *cngc15c* mutants all showed reduced nodulation and *R. irregularis* colonisation. Nodulation and *R. irregularis* colonisation in *cngc4a* and *cngc14* were unaffected. The nodulation and AM defects of *cngc15* mutants were complemented with their respective genes (Fig. 1D and E). Thus *CNGC15a*, *CNGC15b* and *CNGC15c* are required for both root nodule and AM symbioses. The mutant lines showed defects in rhizobial infection (Fig. 1F) and induction of early gene expression in response to lipochitooligosaccharide signals produced by *S. meliloti* (Nod factor) or *R. irregularis* (NS-LCO) (Fig. 1G and H). We conclude that *CNGC15a*, *CNGC15b* and *CNGC15c* function early in the establishment of both rhizobial and mycorrhizal associations.

Oscillations in nuclear Ca^{2+} levels are a feature of the common symbiotic signalling pathway. Therefore to measure Ca^{2+} changes in the mutants, we microinjected root hair cells with the Ca^{2+} responsive dye Oregon green dextran and the unresponsive dye Texas red dextran (9) as a control. Alleles of *cngc15a*, *b*, *c*, but not *cngc4a* or *cngc14*, reduced nuclear-associated Ca^{2+} oscillations in response to Nod factor treatment (Fig. 2A and fig. S7C). Fewer cells responded, and of those that did in the *cngc15* mutants, many showed defective Ca^{2+} oscillations (Fig. 2B), as measured by assessments of the interspike intervals and probability density functions. These defects include poor maintenance of Ca^{2+} oscillations and irregular oscillation frequencies. While cells not spiking can be seen in wild type, the occurrence of defective cells and the variability in oscillation frequency are much higher in the *cngc15* mutants (Fig. 2A and fig S7C.). These data suggest that each of the three CNGC15 proteins is required for full activation of nuclear-localised Ca^{2+} oscillations.

We generated double mutants to further assess the function of these channels. Among the double mutants tested we observed equivalent defects to those observed in the single

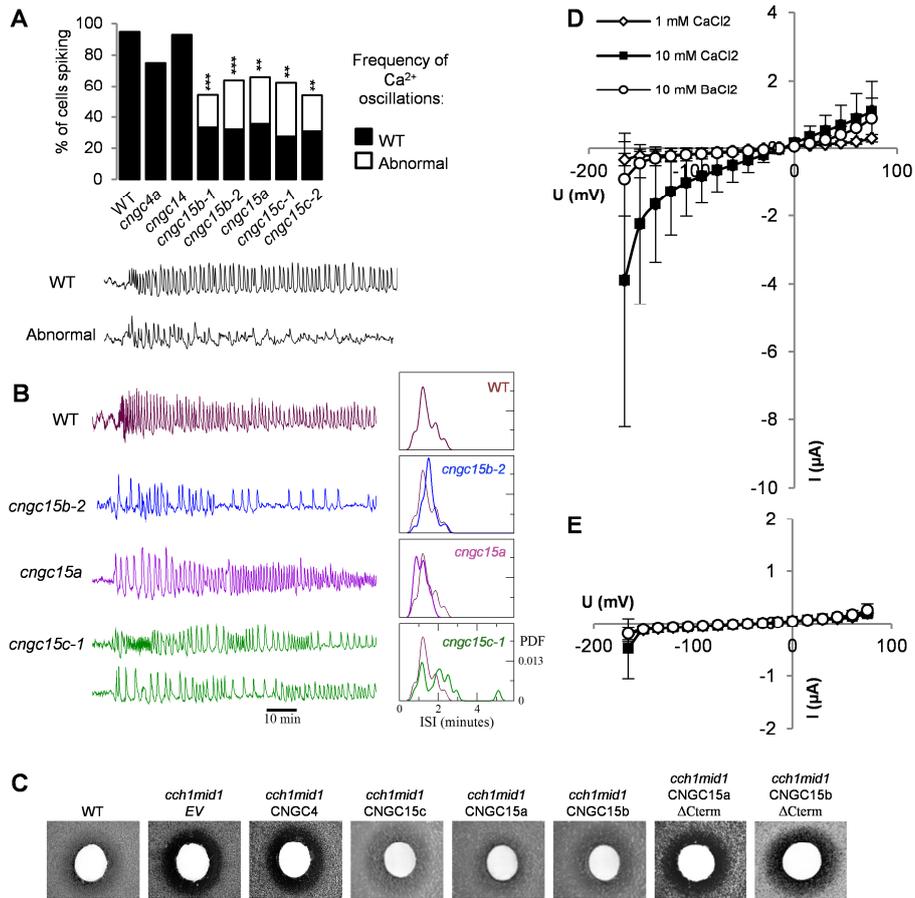


Fig. 2. CNGC15a, b and c are required for nuclear localized Ca²⁺ spiking and transport Ca²⁺.

(A) Nod factor (10⁻⁹ M) induced Ca²⁺ spiking assayed in wild type (WT) and *cngc* mutants. The number of cells analysed is shown in Extended Data Figure 6c. ** P<0.01, *** P<0.001 (χ^2 -test). (B) Representative Ca²⁺ traces of WT and mutants. The Ca²⁺ traces are the detrended Oregon green/ Texas red ratio in arbitrary units. The right panels show density plots for the average interspike interval (ISI) between consecutive Ca²⁺ spikes during 60 minutes, starting 7 minutes after the first spike (*n*=26 WT, 26 *cngc15b-2*, 24 *cngc15a* and 17 *cngc15c-1*). The probability density function (PDF) for average ISI is indicated, with equivalent scales for each plot. (C) CNGC15a, b and c complement the Ca²⁺ uptake deficient yeast mutant *cch1/mid1*. Discs containing α factor inhibits growth in the mutant, but not the WT or CNGC15 complemented strains. CNGC15a and CNGC15b truncated of their C-termini, and CNGC4 do not complement. (D) and (E) Average current-voltage (I-U) relationship in oocytes expressing CNGC15a (D) or injected with water (E) in presence of CaCl₂ or BaCl₂. *n* = 4, error bars represent standard deviation.

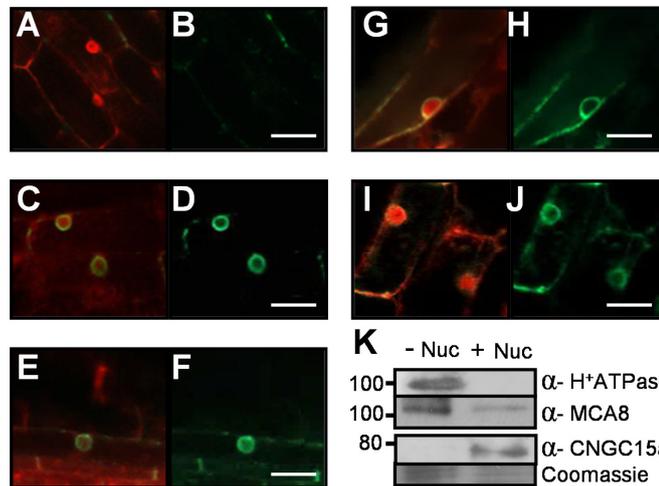


Fig. 3. CNGC15a, CNGC15b and CNGC15c localise to the nuclear membranes.

Confocal microscopy of *M. truncatula* roots expressing the construct used for the complementation of each *cngc15* mutant (Fig. 1D and E). Roots expressing the plant marker DsRed alone (A) and (B), and with CNGC15b:GFP (C) and (D), CNGC15a:GFP (E) and (F), CNGC15c:GFP (G) and (H), and with DMI1:GFP (I) and (J). (A), (C), (E), (G) and (I): overlay green and red channel. (B), (D), (F), (H) and (J) : Green channel. Scale bars: 20 μ m. (K) The microsomal fraction depleted of nuclei (-Nuc) and the membrane fraction of purified nuclei (+Nuc) from *M. truncatula* roots resolved by SDS-PAGE and blotted with indicated antibodies. Anti-H⁺ATPase and anti-MCA8 were used as plasma membrane and ER/nuclear membrane markers, respectively. The presence of CNGC15a is detected with its native antibody.

mutants (fig. S7C to E). The double mutants are impaired in Myc factor- and Nod factor-induced Ca^{2+} oscillations (fig. S7C fig. S8), implying that a single *CNGC15* is sufficient to support a basal level of nuclear Ca^{2+} oscillations in response to symbiotic factors. Our attempts to generate a triple mutant by crossing *cngc15b-1 cngc15c* x *cngc15a-1 cngc15b-2* or *cngc15a* x *cngc15b-1 cngc15c* were unsuccessful. The efficiency of the cross, as demonstrated by pod formation, dropped from approximately 90% (for instance 9/10 successful crosses in *cngc15a-1* x *cngc15b-2*) to 0% for the generation of the triple mutant (0 successful crosses from 103 attempts) (fig. S7F). Successful fertilization requires coordinated Ca^{2+} signals from the female gametophyte in response to the Ca^{2+} dynamics of the pollen tube (10, 11). The identity of the Ca^{2+} channel involved in the female gametophytic Ca^{2+} release is unknown. *CNGC15a*, *CNGC15b* and *CNGC15c* are all expressed in flowers and pods (fig. S5B) and *cngc15a* and *cngc15b* have decreased fertilization similar to the double mutants *cngc15b-1 cngc15c* and *cngc15a-1 cngc15b-1* (fig. S9). This suggests a possible function for these channels during fertilisation in both female and male gametophytic calcium signalling.

Our results demonstrate that CNGC15 proteins support Nod-factor and Myc- factor induced nuclear-localised Ca^{2+} oscillations. We assessed the location of these channels using functional GFP fusions (Fig. 1D and E). We analysed the subcellular localisation of the CNGC15 proteins *via* confocal microscopy and transmission electron microscopy of GFP immunogold labelled sections (Fig. 3, fig. S10 and fig. S11A). We found that CNGC15a, CNGC15b and CNGC15c all localized to the nuclear envelope. We also generated antibodies specific to CNGC15a (fig. S11B), with which we were able to confirm the presence of CNGC15a specifically on nuclear membrane fractions (Fig. 3K). It is interesting to note that these CNGCs and DMI1 have predicted NLS motifs in the N-terminus or between the first few transmembrane domains. This is similar to many nuclear membrane targetted proteins in yeast and animals (12), however, additional work is necessary to test the relevance of this positioning of the NLS in plant proteins.

To determine whether CNGC15 sub-group members were permeable to Ca^{2+} , we expressed them individually in the *cch1/mid1* yeast mutant. In response to mating pheromone (α factor) the haploid *cch1/mid1* fails to generate cytosolic Ca^{2+} signals resulting in growth arrest (13). This phenotype can be complemented by release of Ca^{2+} into the cytosol from any Ca^{2+} store. Each of the three CNGC15 proteins were individually able to

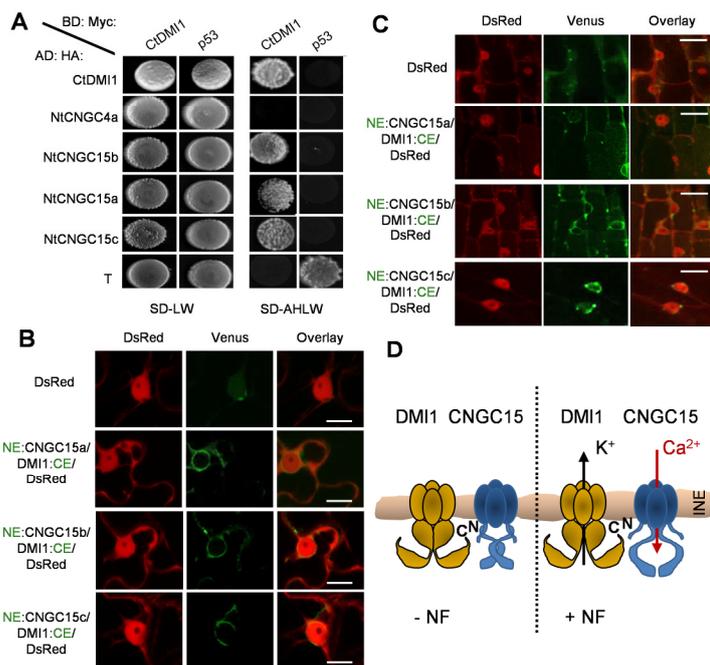


Fig. 4. CNGC15 and DMI1 interact at the nuclear envelope.

(A) Gal4-based yeast two-hybrid assays performed to assess interactions between the C-terminal domain of DMI1 as bait (BD) and the N-terminal domains of CNGC4a, CNGC15a, CNGC15b, CNGC15c and the C-terminal domain of DMI1 as prey (AD). The murine p53 and its interacting partner the SV40 large T-antigen are used as control. SD-LW: synthetic dropout medium lacking Leu and Trp, SD-AHLW: lacking adenine, His, Leu, and Trp. (B) *N. benthamiana* leaves transiently expressing BiFC constructs harbouring N-terminal Venus (NE) fused to the N-termini of each CNGC15 and C-terminal Venus (CE) fused to the C-terminus of DMI1. DsRed was present in all vectors. Scale bars: 16 μ m. (C) *M. truncatula* root cells expressing the same BiFC constructs. Scale bars: 10 μ m. (D) A model of CNGC15 and DMI1 dynamics at the inner nuclear envelope (INE). DMI1 interacts physically with CNGC15 to control the simultaneous opening of both channels *via* direct binding of a secondary messenger to DMI1 or CNGC15.

complement the *cch1/mid1* growth arrest phenotype (Fig. 2C), suggesting their Ca²⁺ permeability. Additionally, expression of *CNGC15a* in *Xenopus laevis* oocytes triggered an inward Ca²⁺ current (Fig. 2D) not observed in control oocytes (Fig. 2E), further demonstrating the Ca²⁺ permeability of this group of channels.

Mathematical modeling demonstrated that the interplay between the K⁺- permeable channel DMI1, a Ca²⁺ channel, and a SERCA-type Ca²⁺ATPase such as MCA8 can give rise to sustained Ca²⁺ oscillations (14). Based on our findings of CNGC involvement, we adapted this model to introduce a cyclic-nucleotide gating mechanism for the Ca²⁺ channel (15) and demonstrated that this system can recapitulate the observed Ca²⁺ oscillations (fig. S12). This model suggests that the activation of DMI1 and CNGC must occur simultaneously as introducing lag times in their activation stopped the Ca²⁺ oscillations (fig. S13). One possibility for such simultaneous activation is the presence of both channels in a single complex. To investigate this hypothesis, we performed yeast two-hybrid analysis and found that the soluble C-terminus of DMI1 and the N-termini of CNGC15a, CNGC15b and CNGC15c interact (Fig. 4A and fig. S11C). These interactions using the full length proteins are confirmed with bimolecular fluorescence complementation (BiFC) *in planta* (16) (Fig. 4B and C, fig. S11D to F). We observed interactions at the nuclear envelope between DMI1 and CNGC15a, CNGC15b and CNGC15c in both *Nicotiana benthamiana* leaves and in *M. truncatula* roots (Fig. 4B and C) and did not see interactions in control iterations (fig. S14). Treatment of *M. truncatula* roots with Nod factor had no effect on this interaction (fig. S15), implying that this complex is maintained after activation of the signalling pathway.

We have shown that CNGC15s are responsible for nuclear Ca²⁺ oscillations in the symbiotic signalling pathway of *M. truncatula*. Previously CNGCs have been demonstrated to locate at vacuoles (17) or the plasma membrane (18). In contrast these CNGCs are located at the nuclear envelope and are permeable to Ca²⁺. We propose that the location of these Ca²⁺ channels to the nuclear envelope allows a targeted nuclear release of the ER Ca²⁺ store. Physical interactions between the CNGC15s and DMI1 may support synchronous activation and modulate the Ca²⁺ signal (Fig. 4D). Further work on this nuclear channel complex should clarify how it is regulated and its implication in developmental processes such as fertility.

References

1. A. G. Oliveira, E. S. Guimaraes, L. M. Andrade, G. B. Menezes, M. Fatima Leite, Decoding calcium signaling across the nucleus. *Physiology* **29**, 361-368 (2014).
2. N. Pauly *et al.*, Control of free calcium in plant cell nuclei. *Nature* **405**, 754- 755 (2000).
3. G. L. Wheeler, C. Brownlee, Ca²⁺ signalling in plants and green algae- changing channels. *Trends in plant science* **13**, 506-514 (2008).
4. G. E. Oldroyd, Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nat Rev Microbiol* **11**, 252-263 (2013).
5. W. Capoen *et al.*, Nuclear membranes control symbiotic calcium signaling of legumes. *Proc Natl Acad Sci* **108**, 14348-14353 (2011).
6. N. D. Young *et al.*, The Medicago genome provides insight into the evolution of rhizobial symbioses. *Nature* **480**, 520-524 (2011).
7. M. Charpentier *et al.*, Lotus japonicus CASTOR and POLLUX are ion channels essential for perinuclear calcium spiking in legume root endosymbiosis. *The Plant cell* **20**, 3467-3479 (2008).
8. P. Maser *et al.*, Phylogenetic relationships within cation transporter families of Arabidopsis. *Plant Physiol* **126**, 1646-1667 (2001).
9. R. J. Wais *et al.*, Genetic analysis of calcium spiking responses in nodulation mutants of Medicago truncatula. *Proc Natl Acad Sci* **97**, 13407-13412 (2000).
10. M. Iwano *et al.*, Cytoplasmic Ca²⁺ changes dynamically during the interaction of the pollen tube with synergid cells. *Development* **139**, 4202-4209 (2012).
11. Y. Hamamura *et al.*, Live imaging of calcium spikes during double fertilization in Arabidopsis. *Nature communications* **5**, 4722 (2014).
12. J. K. Laba, A. Steen, L. M. Veenhoff, Traffic to the inner membrane of the nuclear envelope. *Current opinion in cell biology* **28**, 36-45 (Jun, 2014).
13. M. Fischer *et al.*, The Saccharomyces cerevisiae CCH1 gene is involved in calcium influx and mating. *FEBS letters* **419**, 259-262 (1997).
14. M. Charpentier, T. Vaz Martins, E. Granqvist, G. Oldroyd, R. Morris, The role of DMI1 in establishing Ca²⁺ oscillations in legume symbioses. *Plant Signal Behav* **8**, (2013).
15. D. P. Dougherty, G. A. Wright, A. C. Yew, Computational model of the cAMP-mediated sensory response and calcium-dependent adaptation in vertebrate olfactory receptor neurons. *Proc Natl Acad Sci* **102**, 10415-10420 (2005).
16. R. Waadt *et al.*, Multicolor bimolecular fluorescence complementation reveals simultaneous formation of alternative CBL/CIPK complexes in planta. *Plant Journal* **56**, 505-516 (2008).
17. C. C. Yuen, D. A. Christopher, The group IV-A cyclic nucleotide-gated channels, CNGC19 and CNGC20, localize to the vacuole membrane in Arabidopsis thaliana. *AoB Plants* **5**, (2013).

18. T. Borsics, D. Webb, C. Andeme-Ondzighi, L. A. Staehelin, D. A. Christopher, The cyclic nucleotide-gated calmodulin-binding channel AtCNGC10 localizes to the plasma membrane and influences numerous growth responses and starch accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **225**, 563-573 (2007).
19. F. Verret, G. Wheeler, A. R. Taylor, G. Farnham, C. Brownlee, Calcium channels in photosynthetic eukaryotes: implications for evolution of calcium- based signalling. *New Phytol* **187**, 23-43 (2010).
20. A. K. Zelman, A. Dawe, G. A. Berkowitz, Identification of cyclic nucleotide gated channels using regular expressions. *Methods Mol Biol* **1016**, 207-224 (2013).
21. M. Charpentier, J. Sun, J. Wen, K. S. Mysore, G. E. Oldroyd, Abscisic acid promotion of arbuscular mycorrhizal colonization requires a component of the PROTEIN PHOSPHATASE 2A complex. *Plant Physiol* **166**, 2077-2090 (2014).
22. E. P. Journet *et al.*, *Medicago truncatula* ENOD11: a novel RPRP-encoding early nodulin gene expressed during mycorrhization in arbuscule-containing cells. *Mol Plant Microbe Interact* **14**, 737-748 (2001).
23. F. Maillet *et al.*, Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. *Nature* **469**, 58-63 (2011).
24. M. Giovanetti, B. Mosse, An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscule mycorrhizal infection in roots. *New Phytol* **84**, 489-500 (1980).
25. C. Rosenberg, P. Boistard, J. Denarie, F. Casse-Delbart, Genes controlling early and late functions in symbiosis are located on a megaplasmid in *Rhizobium meliloti*. *Molecular & general genetics : MGG* **184**, 326-333 (1981).
26. S. A. Leong, P. H. Williams, G. S. Ditta, Analysis of the 5' regulatory region of the gene for delta-aminolevulinic acid synthetase of *Rhizobium meliloti*. *Nucleic Acids Res* **13**, 5965-5976 (1985).
27. M. Tadege *et al.*, Large-scale insertional mutagenesis using the Tnt1 retrotransposon in the model legume *Medicago truncatula*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **54**, 335-347 (2008).
28. T. Maekawa *et al.*, Polyubiquitin promoter-based binary vectors for overexpression and gene silencing in *Lotus japonicus*. *Mol Plant Microbe Interact* **21**, 375-382 (2008).
29. B. K. Riely, G. Loughon, J. M. Ane, D. R. Cook, The symbiotic ion channel homolog DMI1 is localized in the nuclear membrane of *Medicago truncatula* roots. *Plant Journal* **49**, 208-216 (2007).
30. M. Walter *et al.*, Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. *Plant Journal* **40**, 428-438 (2004).
31. R. D. Henfrey, R. J. Slater, Isolation of plant nuclei. *Methods Mol Biol* **4**, 447- 452 (1988).
32. M. Charpentier, G. E. Oldroyd, Nuclear calcium signaling in plants. *Plant Physiol* **163**, 496-503 (2013).
33. G. De Palo, A. Boccaccio, A. Miri, A. Menini, C. Altafini, A dynamical feedback model for adaptation in the olfactory transduction pathway. *Biophys J* **102**, 2677-2686 (2012).

34. R. D. Gietz, R. A. Woods, Genetic transformation of yeast. *Biotechniques* **30**, 816-820 (2001).
35. R. Ali, R. E. Zielinski, G. A. Berkowitz, Expression of plant cyclic nucleotide- gated cation channels in yeast. *J Exp Bot* **57**, 125-138 (2006).
36. C. Gehl, R. Waadt, J. Kudla, R. R. Mendel, R. Hansch, New GATEWAY vectors for high throughput analyses of protein-protein interactions by bimolecular fluorescence complementation. *Mol Plant* **2**, 1051-1058 (2009).

Acknowledgements

We thank Jean-Michel Ané for the *35S:DMI1:GFP* construct, Edgar Peiter for yeast strain *cch1/mid1*, Grant Calder for support with confocal microscope, Elaine Barclay for immunogold labelling, Paul Bailey for bioinformatics, Kiran Mysore and Jiangqi Wen for *Tnt1* mutant screening and Michael Hopkins for models of CNGC action. the work was supported by BBSRC (BB/J004553/1 and BB/J018627/1) and by the European Research Council (SYMBIOSIS).

M.C. and G.E.D.O. directed the research. M.C. performed the experiments with contributions by J.S. (calcium spiking), T.V.M. and R.J.M. (mathematical modelling), G.V.R. (phylogeny), K.F. (immunogold labelling, electron microscopy), E.S. (RNA extraction, QRT-PCR), J. T. and A. A. V. (electrophysiology). M.C., G.E.D.O. and D.S. wrote the manuscript.

Supplementary Materials

Materials and Methods

Figures S1-S15

Tables S1-S2

Conclusion générale et perspectives

Aujourd'hui, l'idée que l'agriculture doit s'orienter vers une intensification écologique de sa production pour faire face à la forte augmentation de la population mondiale dans les prochaines décennies tout en réduisant ses intrants et leur coût écologique est devenue consensuelle. Dans cette perspective, il est clair qu'un objectif majeur est une réduction raisonnée de l'usage des engrais issus de l'industrie chimique, et que cela implique un investissement important dans l'analyse du fonctionnement des systèmes racinaires et de leurs interactions avec les microorganismes symbiotiques du sol (Lynch, 2007). Dans ce contexte, les recherches sur le poil absorbant racinaire et son implication dans la fonction de nutrition minérale de la plante et les interactions avec les microorganismes bénéfiques du sol présentent un intérêt crucial.

Chez toutes les plantes, le poil absorbant joue un rôle majeur dans l'exploration du sol, le prélèvement des ions minéraux nutritifs, et ainsi dans la croissance de la plante et finalement la production de biomasse par l'écosystème. Par exemple, un simple pied de seigle peut posséder 14 milliards de poils absorbants représentant une surface d'échange de matière et d'informations avec le « milieu extérieur » d'environ 400 m² (Dittmer, 1937), très supérieure à celle des parties aériennes de la plante. Directement en relation avec son implication dans la fonction de nutrition minérale, le poil absorbant joue un rôle majeur dans la mise en place d'interactions bénéfiques avec des microorganismes de la rhizosphère. Par exemple, les bactéries appelées de façon générique PGPR (pour Plant Growth Promoting Rhizobacteria) induisent fréquemment une stimulation de l'élongation des poils absorbants (Dobbelaere *et al.*, 1999; Contesto *et al.*, 2008; Poitout *et al.*, 2017), qui contribue probablement à la promotion de la croissance de la plante via une amélioration de la nutrition minérale. Le poil absorbant est aussi un acteur clé dans la signalisation conduisant à l'interaction symbiotique avec les Rhizobia et le développement des nodules fixateurs d'azote chez les légumineuses. Dans le futur, il est raisonnable d'imaginer que la caractérisation moléculaire et fonctionnelle des canaux et transporteurs d'ions qui équipent le poil absorbant fournira des informations importantes pour comprendre son

développement et sa croissance polarisée, son rôle dans la nutrition hydrominérale de la plante et ses interactions avec l'environnement abiotique et biotique de la rhizosphère.

Le travail que j'ai conduit s'inscrit dans ce cadre général. L'objectif est de contribuer à l'identification des systèmes de transport ionique membranaire participant aux processus de signalisation électrique et/ou calcique impliqués dans la transduction du signal déclenché par la perception des facteurs Nods dans le poil absorbant chez *M. truncatula*. Je me suis intéressé à différents canaux et transporteurs des familles Shaker, HKT et CNGC, sélectionnés comme candidats à une participation à ces étapes de la transduction du signal Nod. Comme cela a été discuté dans les chapitres précédents, l'étude de ces systèmes de transport est susceptible de bénéficier aussi à la compréhension de nombreuses autres fonctions, comme la croissance polarisée du poil, qui fait intervenir un gradient de Ca^{2+} à son apex, la perception par le poil de signaux biotiques ou abiotiques, ou encore l'adaptation de la plante aux stress salin et hydrique.

La stratégie mise en œuvre repose fondamentalement sur la sélection de gènes candidats, au sein des familles Shaker, HKT et CNGC. Pour 4 gènes, un Shaker (*MtSKOR*) et 3 CNGC (*CNGC1a*, *1b* et *1b*), le travail repose fondamentalement sur la génétique inverse et l'analyse du phénotype de plantes mutantes. Pour chacun de ces 4 gènes, au moins une lignée de *M. truncatula* mutante a pu être identifiée dans la collection de la Noble Foundation. Cela atteste de l'importance des ressources génétiques disponibles pour cette légumineuse modèle. Cependant, si la collection de la Noble Foundation permet d'identifier des lignées mutantes pour la grande majorité des gènes, ces lignées présentent souvent un nombre important d'insertions du rétrotransposon *TNT1*. L'analyse des phénotypes observés est d'autant plus complexe que de nombreux gènes peuvent présenter une expression affectée. Le « nettoyage » des insertions non désirées dans les lignées candidates peut se faire par rétrocroisement avec la lignée sauvage d'origine (Veerappan *et al.*, 2014). Cependant, le travail de rétrocroisement et d'amplification de plusieurs générations de plantes nécessite une quantité de temps qui est difficilement disponible dans le cadre d'un travail de thèse de 3 ans. La difficulté est encore plus grande lorsqu'il s'agit de créer des lignées portant simultanément plusieurs mutations ciblées, comme celles qui devront être obtenues pour poursuivre l'étude du rôle des gènes *CNGC* que j'ai engagée. Des lignées mono-insertionnelle pourraient être obtenues par des techniques récentes de mutagénèse.

L'utilisation de la technique de mutagénèse « CRISPR/Cas9 » n'est cependant pas envisageable « en routine » pour *M. truncatula*, mais une première étude a démontré sa faisabilité chez cette légumineuse (Meng *et al.*, 2017). Il sera important pour la communauté travaillant sur *M. truncatula* de développer des outils permettant l'obtention de lignées mutées par la technique de CRISPR/Cas9, de façon à disposer rapidement de lignées modifiées seulement dans le ou les gènes ciblés, si possible homozygotes dès la première génération.

Le travail concernant le Shaker MtSKOR (Chapitre III) démontre l'implication de ce canal potassique rectifiant sortant, régulé par le voltage et activé par la dépolarisation, dans le processus de repolarisation électrique de la membrane qui met un terme à la dépolarisation que les facteurs Nods déclenchent au démarrage de la voie de signalisation. Par contre, concernant les étapes en aval, mon travail n'a révélé aucune conséquence de l'inactivation de *MtSKOR* sur la formation des cordons d'infection. La capacité de nodulation des plantes mutantes *mtskor* apparaît néanmoins affectée. Ce phénotype pourrait être la conséquence de changements physiologiques dans le fonctionnement nodulaire qu'il serait très intéressant de comprendre.

L'inactivation de MtSKOR rend la repolarisation de la membrane lors de l'épisode électrique précoce de la transduction du signal Nod plus lente, d'environ 50%, mais n'empêche pas cette repolarisation et la restauration du potentiel initial. Il est possible que cette simple « altération » du signal électrique n'ait pas de conséquence sur les étapes aval de la transduction du signal. L'hypothèse d'une redondance de systèmes de transport membranaire capables de participer à la repolarisation du poil peut être avancée pour expliquer l'absence d'impact de l'inactivation de *MtSKOR* sur la production de cordons d'infection. Par exemple, chez les plantes mutantes, l'absence de contribution de MtSKOR à la repolarisation de la membrane du poil pourrait être compensée par une réactivation plus rapide des H⁺-ATPase de la membrane plasmique. Dans le cadre de l'hypothèse précédente, je me suis intéressé aux transporteurs de la famille HKT. J'ai précisé les caractéristiques fonctionnelles de ces transporteurs (démonstration d'une forte sélectivité en faveur de Na⁺ par rapport à K⁺, analyse des propriétés de rectification de ces transporteurs...), et j'ai engagé une étude de leur patron d'expression dans le nodule et dans la racine *via* l'utilisation du gène rapporteur *GUS* (travail en cours, non présenté dans ce mémoire). J'ai

également conduit une analyse de l'expression de ces gènes par Q-RT-PCR, et de l'impact d'un stress salin ou d'un épisode de sécheresse sur leur expression. Concernant l'hypothèse initiale, un efflux de Na^+ à travers ces systèmes pourrait jouer un rôle similaire à celui d'un efflux de K^+ dans la repolarisation électrique du poil. Ces transporteurs sont également susceptibles de jouer un rôle majeur dans l'adaptation de la plante à une contrainte saline, en contrôlant l'absorption nette de Na^+ par la racine ou les transports de cet ion à longue distance *via* les tissus xylémiens et phloémiens. Je n'ai cependant pas eu le temps de démarrer une analyse du rôle de ces transporteurs par génétique inverse et phénotypage de plantes mutantes. Ce travail sera conduit par mon équipe.

Concernant la famille CNGC, j'ai mis en évidence une perméabilité à Ca^{2+} chez les membres de cette famille exprimés sur la membrane nucléaire. Ce travail a participé au programme de recherche conduit par Myriam Charpentier, démontrant l'implication de ces canaux dans la genèse des oscillations calciques périnucléaires participant à la voie de signalisation déclenchée par la perception des facteurs Nod (Charpentier *et al.*, 2016). En parallèle, je me suis intéressé à des canaux CNGC susceptibles d'appartenir à la membrane plasmique du poil et d'être impliqués dans l'épisode électrique et calcique initial de cette voie de signalisation. Les résultats que j'ai obtenus encouragent fortement à poursuivre ce travail en s'intéressant à *CNGC1b*. Ils suggèrent aussi qu'il serait très pertinent de s'intéresser à l'hypothèse d'une redondance entre *CNGC 1b* et *CNGC 1a*, ainsi qu'à la possibilité de formation de structure hétéromériques associant ces deux protéines.

Au-delà d'une contribution à la compréhension des mécanismes de signalisation impliqués dans la transduction du signal Nod, l'identification au niveau moléculaire de canaux perméables à Ca^{2+} sur la membrane cellulaire ouvrirait des perspectives considérables dans tous les domaines de la biologie végétale, tant les connaissances concernant les canaux calciques végétaux sont actuellement insatisfaisantes, alors que des processus de signalisation impliquant Ca^{2+} semblent participer de façon systématique à la perception par la plante de son environnement abiotique et biotique. Notre équipe a développé une méthodologie associant la « dissection » laser pour l'obtention de protoplastes de poils absorbants sélectionnés à un stade de développement donné et l'analyse par patch-clamp des propriétés électriques de ces protoplastes. Chez des plantes de génotype sauvages ou mutant pour les canaux considérés, cette méthodologie

permettrait alors une analyse détaillée du fonctionnement de ces protéines et de leur rôle dans la modulation des signaux calciques.

Réactions de défense contre les microorganismes pathogènes et accueil des microorganismes bénéfique, immunité et symbiose sont des composantes étroitement interdépendantes des interactions de la plante avec son environnement biotique (Chen *et al.*, 2017). En relation avec le travail que j'ai conduit, Il serait intéressant d'étudier l'effet de la perception de PAMPs (Pathogen Associated Molecular Pattern), tels que la flagelline, en ciblant les processus de signalisation électrique et calcique que le poil absorbant peut générer. Les mécanismes de signalisation électrique chez les plantes sont impliqués dans la perception de signaux environnementaux biotiques ou abiotiques (Szechyńska-Hebda *et al.*, 2017). Il est donc raisonnable d'imaginer que MtSKOR pourrait être impliqué dans divers processus de signalisation électrique au sens large. Les fonctions de MtSKOR pourraient par exemple être analysées dans le contexte de l'établissement et du fonctionnement des symbioses mycorhizienne. Une étude récente a mis en évidence que les facteurs Myc (Mycorrhizal lipochitinoligosaccharides, LCOs), qui ont une structure proche de celle des facteurs Nods, sont capable d'induire une dépolarisation de la membrane plasmique semblable à celle déclenchée par les facteurs Nods (Hürter *et al.*, 2018). Tout comme dans les signaux calciques nucléaires (Pauly *et al.*, 2000), l'amplitude, la fréquence et la durée des signaux électriques pourraient contribuer à la spécificité de réponse aux stimuli. Le même type d'hypothèse peut être fait concernant l'implication des canaux *CNGC 15* dans des réponses calciques peri-nucléaires déclenchées par des microorganismes pathogènes.

Les Rhizobia constituent une grande famille de bactéries vivant dans le sol en interaction avec les plantes. Ils représentent une composante conservée et importante du microbiote racinaire (Garrido-Oter *et al.*, 2018). L'analyse récente du génome de 1314 souches de Rhizobia a mis en évidence que la capacité de fixation de l'azote atmosphérique et d'interaction symbiotique avec les légumineuses est un trait acquis de façon relativement récente (Garrido-Oter *et al.*, 2018). Cette capacité proviendrait d'un ancêtre commun et se serait dispersée dans la population de Rhizobia par transfert horizontal de gènes. La majorité des 1314 souches testées ne présentent pas la capacité d'interaction symbiotique avec les légumineuses. Il a également été démontré que les Rhizobia ont tous un effet PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) chez *Arabidopsis* (Garrido-Oter *et al.*, 2018). La symbiose

fixatrice d'azote entre légumineuse et Rhizobium semble donc n'être qu'une spécificité de l'interaction plante-Rhizobium. Les mécanismes moléculaires identifiés dans les processus de reconnaissance et de colonisation conduisant à la symbiose rhizobienne seront intéressants à étudier dans le contexte des interactions entre Rhizobia et plantes de façon générale. La « colonisation » de la racine d'Arabidopsis par les Rhizobia, qui se traduit par une interaction de type PGPR, nécessite probablement un dialogue moléculaire entre les deux partenaires. A ce jour cependant, les connaissances concernant un tel dialogue paraissent très faibles puisqu'aucune voie de signalisation impliquée dans l'interaction « générique » entre Rhizobia et plantes n'a été mise en évidence.

Références Bibliographique

Adams, M.A., Buchmann, N., Sprent, J., Buckley, T.N., et Turnbull, T.L. 2018. Crops, Nitrogen, Water: Are Legumes Friend, Foe, or Misunderstood Ally? *Trends Plant Sci.* **23**: 539-550.

Ali, A., Raddatz, N., Aman, R., Kim, S., Park, H.C., Jan, M., Baek, D., Khan, I.U., Oh, D.-H., Lee, S.Y., et al. 2016. A Single Amino-Acid Substitution in the Sodium Transporter HKT1 Associated with Plant Salt Tolerance. *Plant Physiol.* **171**: 2112-2126.

Ali, R., Ma, W., Lemtiri-Chlieh, F., Tsaltas, D., Leng, Q., Bodman, S. von, et Berkowitz, G.A. 2007. Death Don't Have No Mercy and Neither Does Calcium: Arabidopsis CYCLIC NUCLEOTIDE GATED CHANNEL2 and Innate Immunity. *Plant Cell Online* **19**: 1081-1095.

Ali, Z., Park, H.C., Ali, A., Oh, D.-H., Aman, R., Kropornicka, A., Hong, H., Choi, W., Chung, W.S., Kim, W.-Y., et al. 2012. TsHKT1;2, a HKT1 Homolog from the Extremophile Arabidopsis Relative *Thellungiella salsuginea*, Shows K⁺ Specificity in the Presence of NaCl. *Plant Physiol.* **158**: 1463-1474.

Almeida, P., Boer, G.J. de, et Boer, A.H. de 2014a. Differences in shoot Na⁺ accumulation between two tomato species are due to differences in ion affinity of HKT1;2. *J. Plant Physiol.* **171**: 438-447.

Almeida, P.M.F., Boer, G.-J. de, et Boer, A.H. de 2014b. Assessment of natural variation in the first pore domain of the tomato HKT1;2 transporter and characterization of mutated versions of SHKT1;2 expressed in *Xenopus laevis* oocytes and via complementation of the salt sensitive *athkt1;1* mutant. *Front. Plant Sci.* **5**: 1-10.

Anderson, J. a, Huprikar, S.S., Kochian, L. V, Lucas, W.J., et Gaber, R.F. 1992. Functional expression of a probable Arabidopsis thaliana potassium channel in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**: 3736-3740.

Ané, J.M., Kiss, G.B., Riely, B.K., Penmetsa, R.V., Oldroyd, G.E.D., Ajax, C., Lévy, J., Debellé, F., Baek, J.M., Kalo, P., et al. 2004. *Medicago truncatula* DMI1 Required for Bacterial and Fungal

Symbioses in Legumes. *Science* (80-.). **303**: 1364-1367.

Ardourel, M. 1994. Rhizobium meliloti Lipooligosaccharide Nodulation Factors: Different Structural Requirements for Bacterial Entry into Target Root Hair Cells and Induction of Plant Symbiotic Developmental Responses. *Plant Cell Online* **6**: 1357-1374.

Ashraf, M., Aisha, N., Rahman, M., et Foolad, M. 2012. Marker-Assisted Selection in Plant Breeding for Salinity Tolerance.

Asins, M.J., Villalta, I., Aly, M.M., Olías, R., Álvarez De Morales, P., Huertas, R., Li, J., Jaime-Pérez, N., Haro, R., Raga, V., et al. 2013. Two closely linked tomato HKT coding genes are positional candidates for the major tomato QTL involved in Na⁺/K⁺homeostasis. *Plant, Cell Environ.* **36**: 1171-1191.

Aydi, S., Drevon, J.J., et Abdelly, C. 2004. Effect of salinity on root-nodule conductance to the oxygen diffusion in the Medicago truncatula-Sinorhizobium meliloti symbiosis. *Plant Physiol. Biochem.* **42**: 833-840.

Badri, M., Ilahi, H., Huguet, T., et Aouani, M.E. 2007. Quantitative and molecular genetic variation in sympatric populations of Medicago laciniata and M. truncatula (Fabaceae): Relationships with eco-geographical factors. *Genet. Res.* **89**: 107-122.

Balagué, C., Lin, B., Alcon, C., Flottes, G., Malmström, S., Köhler, C., Neuhaus, G., Pelletier, G., Gaymard, F., et Roby, D. 2003. HLM1, an Essential Signaling Component in the Hypersensitive Response, Is a Member of the Cyclic Nucleotide-Gated Channel Ion Channel Family. *Plant Cell* **15**: 365-379.

Becker, D., Geiger, D., Dunkel, M., Roller, A., Bertl, A., Latz, A., Carpaneto, A., Dietrich, P., Roelfsema, M.R.G., Voelker, C., et al. 2004. AtTPK4, an Arabidopsis tandem-pore K⁺ channel, poised to control the pollen membrane voltage in a pH- and Ca²⁺-dependent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**: 15621-15626.

Bernèche, S., et Roux, B. 2001. Energetics of ion conduction through the K⁺ channel. *Nature* **414**: 73.

Berthomieu, P., Conejero, G., Nublat, A., Brackenbury, W.J., Lambert, C., Savio, C., Uozumi,

N., Oiki, S., Yamada, K., Cellier, F., et al. 2003. Functional analysis of AtHKT1 in Arabidopsis shows that Na⁺ recirculation is crucial for salt tolerance. *EMBO J.* **22**: 2004-2114.

Boisson-Dernier, A., Chabaud, M., Garcia, F., Bécard, G., Rosenberg, C., et Barker, D.G. 2001. Agrobacterium rhizogenes-Transformed Roots of Medicago truncatula for the Study of Nitrogen-Fixing and Endomycorrhizal Symbiotic Associations. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **14**: 695-700.

Borsics, T., Webb, D., Andeme-Ondzighi, C., Staehelin, L.A., et Christopher, D.A. 2007. The cyclic nucleotide-gated calmodulin-binding channel AtCNGC10 localizes to the plasma membrane and influences numerous growth responses and starch accumulation in Arabidopsis thaliana. *Planta* **225**: 563-573.

Broghammer, A., Krusell, L., Blaise, M., Sauer, J., Sullivan, J.T., Maolanon, N., Vinther, M., Lorentzen, A., Madsen, E.B., Jensen, K.J., et al. 2012. Legume receptors perceive the rhizobial lipochitin oligosaccharide signal molecules by direct binding. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**: 13859-13864.

Byrt, C.S., Platten, J.D., Spielmeier, W., James, R.A., Lagudah, E.S., Dennis, E.S., Tester, M., et Munns, R. 2007. HKT1;5-Like Cation Transporters Linked to Na⁺ Exclusion Loci in Wheat, *Triticum aestivum*, and *Triticum tauschii*. *Plant Physiol.* **143**: 1918 LP-1928.

Cao, Y., Jin, X., Huang, H., Derebe, M.G., Levin, E.J., Kabaleeswaran, V., Pan, Y., Punta, M., Love, J., Weng, J., et al. 2011. Crystal structure of a potassium ion transporter, TrkH. *Nature* **471**: 336.

Capoen, W., Sun, J., Wysham, D., Otegui, M.S., Venkateshwaran, M., Hirsch, S., Miwa, H., Downie, J.A., Morris, R.J., Ane, J.-M., et al. 2011. Nuclear membranes control symbiotic calcium signaling of legumes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**: 14348-14353.

Cárdenas, L., Vidali, L., Domínguez, J., Pérez, H., Sánchez, F., Hepler, P.K., et Quinto, C. 1998. Rearrangement of Actin Microfilaments in Plant Root Hairs Responding to Rhizobium etli Nodulation Signals¹. *Plant Physiol.* **116**: 871-877.

Catoira, R., Timmers, A.C., Maillet, F., Galera, C., Penmetsa, R. V, Cook, D., Denarie, J., et

- Gough, C. 2001. The HCL gene of *Medicago truncatula* controls Rhizobium-induced root hair curling. *Development* **128**: 1507 LP-1518.
- Chan, C.W.M., Schorrak, L.M., Smith, R.K., Bent, A.F., et Sussman, M.R. 2003. A Cyclic Nucleotide-Gated Ion Channel , CNGC2 , Is Crucial for Plant Development and Adaptation to Calcium Stress 1. **132**: 728-731.
- Charpentier, M., Bredemeier, R., Wanner, G., Takeda, N., Schleiff, E., et Parniske, M. 2008. Lotus japonicus CASTOR and POLLUX are ion channels essential for perinuclear calcium spiking in legume root endosymbiosis. *Plant Cell* **20**: 3467-79.
- Charpentier, M., Sun, J., Martins, T.V., Radhakrishnan, G. V, Findlay, K., Soumpourou, E., Thouin, J., Véry, A., Morris, R.J., et Oldroyd, G.E.D. 2016. Nuclear-localized cyclic nucleotide-gated channels mediate symbiotic calcium oscillations. *Science (80-.)*. **352**: 1102-1105.
- Chen, H., He, H., et Yu, D. 2011. Overexpression of a novel soybean gene modulating Na⁺ and K⁺ transport enhances salt tolerance in transgenic tobacco plants. *Physiol. Plant.* **141**: 11-18.
- Chen, T., Duan, L., Zhou, B., Yu, H., Zhu, H., Cao, Y., et Zhang, Z. 2017. Interplay of Pathogen-Induced Defense Responses and Symbiotic Establishment in *Medicago truncatula* . *Front. Microbiol.* **8**: 973.
- Cheng, H., et Walker, G.C. 1998. Succinoglycan Is Required for Initiation and Elongation of Infection Threads during Nodulation of Alfalfa by *Rhizobium meliloti* Succinoglycan Is Required for Initiation and Elongation of Infection Threads during Nodulation of Alfalfa by *Rhizobium meliloti*. **180**: 5183-5191.
- Chiu, J.C., Brenner, E.D., DeSalle, R., Nitabach, M.N., Holmes, T.C., et Coruzzi, G.M. 2002. Phylogenetic and Expression Analysis of the Glutamate-Receptor-Like Gene Family in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Biol. Evol.* **19**: 1066-1082.
- Cho, D., Kim, S.A., Murata, Y., Lee, S., Jae, S.K., Nam, H.G., et Kwak, J.M. 2009. De-regulated expression of the plant glutamate receptor homolog AtGLR3.1 impairs long-term Ca²⁺-programmed stomatal closure. *Plant J.* **58**: 437-449.

Christopher, D.A., Borsics, T., Yuen, C.Y.L., Ullmer, W., Andème-ondzighi, C., Andres, M.A., Kang, B., et Staehelin, A. 2007. The cyclic nucleotide gated cation channel AtCNGC10 traffics from the ER via Golgi vesicles to the plasma membrane of Arabidopsis root and leaf cells. **13**: 1-13.

Clough, S.J., Fengler, K.A., Yu, I., Lippok, B., Smith, R.K., et Bent, A.F. 2000. The Arabidopsis dnd1 « defense, no death » gene encodes a mutated cyclic nucleotide-gated ion channel. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**: 9323-9328.

Contesto, C., Desbrosses, G., Lefoulon, C., Béna, G., Borel, F., Galland, M., Gamet, L., Varoquaux, F., et Touraine, B. 2008. Effects of rhizobacterial ACC deaminase activity on Arabidopsis indicate that ethylene mediates local root responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *Plant Sci.* **175**: 178-189.

Corratgé-Faillie, C., Jabnourne, M., Zimmermann, S., Véry, a. a., Fizames, C., et Sentenac, H. 2010. Potassium and sodium transport in non-animal cells: The Trk/Ktr/HKT transporter family. *Cell. Mol. Life Sci.* **67**: 2511-2532.

Costa França, M., Pham Thi, A., Pimentel, C., Pereyra-Rossiello, R., Zuily-Fodil, Y., et Laffray, D. 2000. Differences in growth and water relations among Phaseolus vulgaris cultivars in response to induced drought stress. *Environ. Exp. Bot.* **43**: 227-237.

Covitz, P.A., Smith, L.S., et Long, S.R. 1998. Expressed Sequence Tags from a Root-Hair-Enriched Medicago truncatula cDNA Library. *Plant Physiol.* **117**: 1325 LP-1332.

Damiani, I., Drain, A., Guichard, M., Balzergue, S., Boscari, A., Boyer, J.-C., Brunaud, V., Cottaz, S., Rancurel, C., Rocha, M. Da, et al. 2016. Nod Factor Effects on Root Hair-Specific Transcriptome of Medicago truncatula: Focus on Plasma Membrane Transport Systems and Reactive Oxygen Species Networks. *Front. Plant Sci.* **7**: 794.

Daram, P., Urbach, S., Gaymard, F., Sentenac, H., et Chérel, I. 1997. Tetramerization of the AKT1 plant potassium channel involves its C-terminal cytoplasmic domain. *EMBO J.* **16**: 3455-3463.

Dascal, N., Landau, E.M., et Lass, Y. 1984. Xenopus oocyte resting potential, muscarinic

responses and the role of calcium and guanosine 3',5'-cyclic monophosphate. *J. Physiol.* **352**: 551-574.

Davenport, R.J., Muñoz-Mayor, A., Jha, D., Essah, P.A., Rus, A., et Tester, M. 2007. The Na⁺ transporter AtHKT1;1 controls retrieval of Na⁺ from the xylem in Arabidopsis. *Plant, Cell Environ.* **30**: 497-507.

DeFelice, L.J. 2004. Going against the flow. *Nature* **432**: 279.

Demont, N., Debelle, F., Aurelle, H., Dénarié, J., et Promé, J.C. 1993. Role of the *Rhizobium meliloti nodF* and *nodE* genes in the biosynthesis of lipo-oligosaccharidic nodulation factors. *J. Biol. Chem.* **268**: 20134-20142.

Dénarié, J., Debelle, F., et Promé, J.-C. 1996. Rhizobium Lipo-Chitooligosaccharide Nodulation Factors: Signaling Molecules Mediating Recognition and Morphogenesis. *Annu. Rev. Biochem.* **65**: 503-535.

Dennison, K.L., et Spalding, E.P. 2000. Glutamate-Gated Calcium Fluxes in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **124**: 1511-1514.

Dietrich, P., Anschütz, U., Kugler, A., et Becker, D. 2010. Physiology and biophysics of plant ligand-gated ion channels. *Plant Biol.* **12**: 80-93.

Dittmer, H.J. 1937. A QUANTITATIVE STUDY OF THE ROOTS AND ROOT HAIRS OF A WINTER RYE PLANT (SECALE CEREALE). *Am. J. Bot.* **24**: 417-420.

Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Broek, A. Vande, et Vanderleyden, J. 1999. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant Soil* **212**: 153-162.

Doyle, D.A. 1998. The Structure of the Potassium Channel: Molecular Basis of K⁺ Conduction and Selectivity. *Science (80-.)*. **280**: 69-77.

Duby, G., Hosy, E., Fizames, C., Alcon, C., Costa, A., Sentenac, H., et Thibaud, J.B. 2008. AtKC1, a conditionally targeted Shaker-type subunit, regulates the activity of plant K⁺ channels. *Plant J.* **53**: 115-123.

Durell, S.R., et Guy, H.R. 1999. Structural models of the KtrB, TrkH, and Trk1,2 symporters based on the structure of the KcsA K⁺ channel. *Biophys. J.* **77**: 789-807.

Eckholm, E.P. 1975. Salting the Earth. *Environ. Sci. Policy Sustain. Dev.* **17**: 9-15.

Ehrhardt, D.W., Wais, R., et Long, S.R. 1996. Calcium spiking in plant root hairs responding to *Rhizobium* nodulation signals. *Cell* **85**: 673-81.

Ehrhardt, T., Zimmermann, S., et Müller-Röber, B. 1997. Association of plant K⁺(in) channels is mediated by conserved and does not affect subunit assembly. *FEBS Lett.* **409**: 166-170.

Eynard, A., Lal, R., et Wiebe, K. 2005. Crop Response in Salt-Affected Soils. *J. Sustain. Agric.* **27**: 5-50.

F. Fisher, R., et Long, S. 1992. Rhizobium-Plant signal exchange.

Fairbairn, D., Liu, W., Schachtman, D.P., Gomez-Gallego, S., Day, S., et Teasdale¹, R.D. 2000. Characterisation of two distinct HKT1-like potassium transporters from *Eucalyptus camaldulensis*. *plant Mol. Biol.* **43**: 515-52542.

Felle, H., et Hepler, P.K. 1997. The cytosolic Ca²⁺ concentration gradient of *Sinapsis alba* root hairs as revealed by Ca²⁺-selective microelectrode tests and fura-dextran ratio imaging. *Plant Physiol.* **114**: 39-45.

Felle, H.H., Kondorosi, É., Ádám, Á., et Schultze, M. 1998. The role of ion fluxes in Nod factor signalling in *Medicago sativa*. *Plant J.* **13**: 455-463.

Felle, H.H., Kondorosi, É., Kondorosi, Á., et Schultze, M. 1995. Nod signal-induced plasma membrane potential changes in alfalfa root hairs are differentially sensitive to structural modifications of the lipochitooligosaccharide. *Plant J.* **7**: 939-947.

Felle, H.H., Kondorosi, É., Kondorosi, Á., et Schultze, M. 1996. Rapid alkalinization in alfalfa root hairs in response to rhizobial lipochitooligosaccharide signals. *Plant J.* **10**: 295-301.

Foreman, J., Demidchik, V., H F Bothwell, J., Mylona, P., Miedema, H., Torres, M.A., Linstead, P., Costa, S., Brownlee, C., Jones, J., et al. 2003. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth.

Frietsch, S., Wang, Y., Sladek, C., Poulsen, L.R., Romanowsky, S.M., Schroeder, J.I., et Harper, J.F. 2007. A cyclic nucleotide-gated channel is essential for polarized tip growth of pollen. **104**.

Gadsby, D.C., et By, H. 2004. Spot the difference. **427**.

Gálvez, L., González, E.M., et Arrese-Igor, C. 2005. Evidence for carbon flux shortage and strong carbon/nitrogen interactions in pea nodules at early stages of water stress. *J. Exp. Bot.* **56**: 2551-2561.

Gao, F., Han, X., Wu, J., Zheng, S., Shang, Z., Sun, D., Zhou, R., Li, B., Biology, C., et Engineering, C. 2012. A heat-activated calcium-permeable channel – Arabidopsis cyclic nucleotide-gated ion channel 6 – is involved in heat shock responses. 1056-1069.

Garciadeblás, B., Senn, M.E., Bañuelos, M.A., et Rodríguez-Navarro, A. 2003. Sodium transport and HKT transporters: The rice model. *Plant J.* **34**: 788-801.

Garrido-Oter, R., Nakano, R.T., Dombrowski, N., Ma, K.W., McHardy, A.C., et Schulze-Lefert, P. 2018. Modular Traits of the Rhizobiales Root Microbiota and Their Evolutionary Relationship with Symbiotic Rhizobia. *Cell Host Microbe* **24**: 155-167.e5.

Gaymard, F., Pilot, G., Lacombe, B., Bouchez, D., Bruneau, D., Boucherez, J., Michaux-Ferrière, N., Thibaud, J.B., et Sentenac, H. 1998. Identification and disruption of a plant shaker-like outward channel involved in K⁺ release into the xylem sap. *Cell* **94**: 647-655.

George E. Brown Jr 2008. Bibliography on Salt Tolerance Salinity Lab. US Dep. Agric., Agric. Res. Serv. Riverside, CA.

Gil-Quintana, E., Lyon, D., Staudinger, C., Wienkoop, S., et González, E.M. 2015. Medicago truncatula and Glycine max: Different Drought Tolerance and Similar Local Response of the Root Nodule Proteome. *J. Proteome Res.* **14**: 5240-5251.

Gleason, C., Chaudhuri, S., Yang, T., Muñoz, A., Poovaiah, B.W., et Oldroyd, G.E.D. 2006. Nodulation independent of rhizobia induced by a calcium-activated kinase lacking autoinhibition. *Nature* **441**: 1149-1152.

Gobert, A., Park, G., Amtmann, A., Sanders, D., et Maathuis, F.J.M. 2006. Arabidopsis

thaliana Cyclic Nucleotide Gated Channel 3 forms a non-selective ion transporter involved in germination and cation transport. *J. Exp. Bot.* **57**: 791-800.

González, E.M., Aparicio-Tejo, P.M., Gordon, A.J., Minchin, F.R., Royuela, M., et Arrese-Igor, C. 1998. Water-deficit effects on carbon and nitrogen metabolism of pea nodules. *J. Exp. Bot.* **49**: 1705-1714.

Graham, P.H., et Vance, C.P. 2003. Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiol.* **131**: 872-877.

Guo, K.M., Babourina, O., Christopher, D.A., Borsic, T., et Rengel, Z. 2010. The cyclic nucleotide-gated channel AtCNGC10 transports Ca²⁺ and Mg²⁺ in Arabidopsis. *Physiol. Plant.* **139**: 303-312.

Guo, K.M., Babourina, O., Christopher, D.A., Borsics, T., et Rengel, Z. 2008. The cyclic nucleotide-gated channel, AtCNGC10, influences salt tolerance in Arabidopsis. *Physiol. Plant.* **134**: 499-507.

Hauser, F., et Horie, T. 2010. A conserved primary salt tolerance mechanism mediated by HKT transporters: A mechanism for sodium exclusion and maintenance of high K⁺/Na⁺ ratio in leaves during salinity stress. *Plant, Cell Environ.* **33**: 552-565.

Hedrich, R. 2012. Ion Channels in Plants. *Physiol. Rev.* **92**: 1777-1811.

Hirsch, R.E., Lewis, B.D., Spalding, E.P., et Sussman, M.R. 1998. A role for the AKT1 potassium channel in plant nutrition. *Sci.* **280**: 918-921.

Horie, T., Brodsky, D.E., Costa, A., Kaneko, T., Schiavo, F. Lo, Katsuhara, M., et Schroeder, J.I. 2011. K⁺ Transport by the OsHKT2;4 Transporter from Rice with Atypical Na⁺ Transport Properties and Competition in Permeation of K⁺ over Mg²⁺ and Ca²⁺ Ions. *Plant Physiol.* **156**: 1493-1507.

Horie, T., Costa, A., Kim, T.H., Han, M.J., Horie, R., Leung, H.Y., Miyao, A., Hirochika, H., An, G., et Schroeder, J.I. 2007. Rice OsHKT2;1 transporter mediates large Na⁺ influx component into K⁺-starved roots for growth. *EMBO J.* **26**: 3003-3014.

Horie, T., Hauser, F., et Schroeder, J.I. 2009. HKT transporter-mediated salinity resistance

mechanisms in Arabidopsis and monocot crop plants. *Trends Plant Sci.* **14**: 660-668.

Horie, T., Yoshida, K., Nakayama, H., Yamada, K., Oiki, S., et Shinmyo, A. 2001. Two types of HKT transporters with different properties of Na⁺ and K⁺ transport in *Oryza sativa*. *Plant J.* **27**: 129-138.

Hosy, E., Duby, G., Véry, A.-A., Costa, A., Sentenac, H., et Thibaud, J.-B. 2005. A procedure for localisation and electrophysiological characterisation of ion channels heterologously expressed in a plant context. *Plant Methods* **1**: 14.

Hosy, E., Vavasseur, A., Mouline, K., Dreyer, I., Gaymard, F., Poree, F., Boucherez, J., Lebaudy, A., Bouchez, D., Very, A.-A., et al. 2003. The Arabidopsis outward K⁺ channel GORK is involved in regulation of stomatal movements and plant transpiration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**: 5549-5554.

Hua, B., Mercier, R.W., Zielinski, R.E., et Berkowitz, G.A. 2003. Functional interaction of calmodulin with a plant cyclic nucleotide gated cation channel. **41**: 945-954.

Huang, S., Spielmeier, W., Lagudah, E.S., James, R.A., Platten, J.D., Dennis, E.S., et Munns, R. 2006. A Sodium Transporter (HKT7) Is a Candidate for Nax1, a Gene for Salt Tolerance in Durum Wheat. *Plant Physiol.* **142**: 1718-1727.

Hunt, S., et Layzell, D.B. 1993. Gas Exchange of Legume Nodules and the Regulation of Nitrogenase Activity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **44**: 483-511.

Hürter, A.L., Fort, S., Cottaz, S., Hedrich, R., Geiger, D., et Rob Roelfsema, M.G. 2018. Mycorrhizal lipochitinoligosaccharides (lcos) depolarize root hairs of *medicago truncatula*. *PLoS One* **13**: 1-14.

Imaizumi-Anraku, H., Takeda, N., et Charpentier, M. 2004. Plastid proteins crucial for symbiotic fungal and bacterial entry into plant roots. *Nature* **748**: 527-531.

Ivashikina, N., Becker, D., Ache, P., Meyerhoff, O., Felle, H.H., et Hedrich, R. 2001. K(+) channel profile and electrical properties of Arabidopsis root hairs. *FEBS Lett.* **508**: 463-469.

Jabnourne, M., Espeout, S., Mieulet, D., Fizames, C., Verdeil, J.-L., Conéjéro, G., Rodríguez-Navarro, A., Sentenac, H., Guiderdoni, E., Abdelly, C., et al. 2009. Diversity in expression

patterns and functional properties in the rice HKT transporter family. *Plant Physiol.* **150**: 1955-1971.

Jammes, F., Hu, H.C., Villiers, F., Bouten, R., et Kwak, J.M. 2011. Calcium-permeable channels in plant cells. *FEBS J.* **278**: 4262-4276.

Jardinaud, M.-F., Boivin, S., Rodde, N., Catrice, O., Kisiala, A., Lepage, A., Moreau, S., Roux, B., Cottret, L., Sallet, E., et al. 2016. A Laser Dissection-RNAseq Analysis Highlights the Activation of Cytokinin Pathways by Nod Factors in the *Medicago truncatula* Root Epidermis. *Plant Physiol.* **171**: 2256-2276.

Jeanguenin, L., Alcon, C., Duby, G., Boeglin, M., Chérel, I., Gaillard, I., Zimmermann, S., Sentenac, H., et Véry, A.A. 2011. AtKC1 is a general modulator of Arabidopsis inward Shaker channel activity. *Plant J.* **67**: 570-582.

Kader, M.A., Seidel, T., Gollack, D., et Lindberg, S. 2006. Expressions of OsHKT1, OsHKT2, and OsVHA are differentially regulated under NaCl stress in salt-sensitive and salt-tolerant rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. *J. Exp. Bot.* **57**: 4257-4268.

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

Kaplan, B., Sherman, T., et Fromm, H. 2007. Cyclic nucleotide-gated channels in plants. *FEBS Lett.* **581**: 2237-2246.

Kato, Y., Sakaguchi, M., Mori, Y., Saito, K., Nakamura, T., Bakker, E.P., Sato, Y., Goshima, S., et Uozumi, N. 2001. Evidence in support of a four transmembrane-pore-transmembrane topology model for the Arabidopsis thaliana Na⁺/K⁺ translocating AtHKT1 protein, a member of the superfamily of K⁺ transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**: 6488-6493.

Kaupp, U.B., et Seifert, R. 2002. Cyclic Nucleotide-Gated Ion Channels. *Physiol. Rev.* **82**: 769-824.

Köhler, C., Merkle, T., et Neuhaus, G. 2002. Characterisation of a novel gene family of putative cyclic nucleotide- and calmodulin-regulated ion channels in Arabidopsis thaliana.

Plant J. **18**: 97-104.

Krishnakumar, V., Kim, M., Rosen, B.D., Karamycheva, S., Bidwell, S.L., Tang, H., et Town, C.D. 2014. MTGD : The Medicago truncatula Genome Database Special Online Collection – Database Paper. *Plant Cell Physiol.* **56**: 1-9.

Kugler, A., Köhler, B., Palme, K., Wolff, P., et Dietrich, P. 2009. Salt-dependent regulation of a CNG channel subfamily in Arabidopsis. *BMC Plant Biol.* **9**: 1-11.

Kunert, K.J., Vorster, B.J., Fenta, B.A., Kibido, T., Dionisio, G., et Foyer, C.H. 2016. Drought Stress Responses in Soybean Roots and Nodules. *Front. Plant Sci.* **7**: 1-7.

Kurkdjian, A., Bouteau, F., Pennarun, A.M., Convert, M., Cornel, D., Rona, J.P., et Bousquet, U. 2000. Ion currents involved in early Nod factor response in Medicago sativa root hairs: A discontinuous single-electrode voltage-clamp study. *Plant J.* **22**: 9-17.

Laberche, J.C. 2010. Biologie végétale 3e édition Dunod.

Lacombe, B., Becker, D., Hedrich, R., Desalle, R., Hollmann, M., Kwak, J.M., Schroeder, J.I., Novère, N., Nam, H.G., Spalding, E., et al. 2001. The identity of plant glutamate receptors [3].

Lacombe, B., Pilot, G., Michard, E., Gaymard, F., Sentenac, H., et Thibaud, J.B. 2000. A shaker-like K(+) channel with weak rectification is expressed in both source and sink phloem tissues of Arabidopsis. *Plant Cell* **12**: 837-851.

Lan, W.-Z., Wang, W., Wang, S.-M., Li, L.-G., Buchanan, B.B., Lin, H.-X., Gao, J.-P., et Luan, S. 2010. A rice high-affinity potassium transporter (HKT) conceals a calcium-permeable cation channel. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**: 7089-7094.

Larrainzar, E., Riely, B.K., Kim, S.C., Carrasquilla-Garcia, N., Yu, H.-J., Hwang, H.-J., Oh, M., Kim, G.B., Surendrarao, A.K., Chasman, D., et al. 2015. Deep Sequencing of the Medicago truncatula Root Transcriptome Reveals a Massive and Early Interaction between Nodulation Factor and Ethylene Signals. *Plant Physiol.* **169**: 233-265.

Lauchli, A. 1984. Salt exclusion: An adaptation of legumes for crops and pastures under saline condition In: salinity tolerance in plants: Strategies for crop improvement. p.

- Lee, J.Y. 2014. New and old roles of plasmodesmata in immunity and parallels to tunneling nanotubes. *Plant Sci.* **221-222**: 13-20.
- Leng, Q., Mercier, R.W., Yao, W., et Berkowitz, G.A. 1999. Cloning and First Functional Characterization of a Plant Cyclic Nucleotide-Gated Cation Channel. *Plant Physiol.* **121**: 753-761.
- Li, L., Liu, K., Hu, Y., Li, D., et Luan, S. 2008. Single mutations convert an outward K⁺ channel into an inward K⁺ channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**: 2871-2876.
- LI, S.U.N., YU, J., ZHU, M., ZHAO, F., et LUAN, S. 2012. Cadmium impairs ion homeostasis by altering K⁺ and Ca²⁺ channel activities in rice root hair cells. *Plant. Cell Environ.* **35**: 1998-2013.
- Limpens, E., et Bisseling, T. 2003. Signaling in symbiosis. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**: 343-350.
- Lin, H.X., Zhu, M.Z., Yano, M., Gao, J.P., Liang, Z.W., Su, W.A., Hu, X.H., Ren, Z.H., et Chao, D.Y. 2004. QTLs for Na⁺ and K⁺ uptake of the shoots and roots controlling rice salt tolerance. *Theor. Appl. Genet.* **108**: 253-260.
- Logan, H., Basset, M., Very, A., et Sentenac, H. 1997. Plasma membrane transport systems in higher plants : From black boxes to molecular physiology. 1-15.
- Lohar, D.P., Sharopova, N., Endre, G., Peñuela, S., Samac, D., Town, C., Silverstein, K. a T., et VandenBosch, K. a 2006. Transcript analysis of early nodulation events in *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.* **140**: 221-234.
- Long, S.R. 1996. Rhizobium symbiosis: Nod factors in perspective. *Plant Cell* **8**: 1885-1898.
- Lucas, W.J., et Lee, J.Y. 2004. Plasmodesmata as a supracellular control network in plants. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**: 712-726.
- Lynch, J.P. 2007. Roots of the Second Green Revolution. *Aust. J. Bot.* **55**: 493-512.
- Ma, W., Ali, R., et Berkowitz, G.A. 2006. Characterization of plant phenotypes associated with loss-of-function of AtCNGC1, a plant cyclic nucleotide gated cation channel. *Plant Physiol. Biochem.* **44**: 494-505.

Madsen, E.B., Antolín-Llovera, M., Grossmann, C., Ye, J., Vieweg, S., Broghammer, A., Krusell, L., Radutoiu, S., Jensen, O.N., Stougaard, J., et al. 2011. Autophosphorylation is essential for the in vivo function of the *Lotus japonicus* Nod factor receptor 1 and receptor-mediated signalling in cooperation with Nod factor receptor 5. *Plant J.* **65**: 404-417.

Małolepszy, A., Mun, T., Sandal, N., Gupta, V., Dubin, M., Urbański, D., Shah, N., Bachmann, A., Fukai, E., Hirakawa, H., et al. 2016. The LORE1 insertion mutant resource. *Plant J.* **88**: 306-317.

Mareuil, F., Doppelt-Azeroual, O., et Ménager, H. 2017. A public Galaxy platform at Pasteur used as an execution engine for web services. *F1000Research* **6**: 157022.

Marschner, P. 2012. Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants.

Maser, P. 2001. Phylogenetic Relationships within Cation Transporter Families of Arabidopsis. *Plant Physiol.* **126**: 1646-1667.

Mäser, P., Eckelman, B., Vaidyanathan, R., Horie, T., Fairbairn, D.J., Kubo, M., Yamagami, M., Yamaguchi, K., Nishimura, M., Uozumi, N., et al. 2002a. Altered shoot/root Na⁺ distribution and bifurcating salt sensitivity in Arabidopsis by genetic disruption of the Na⁺ transporter AtHKT1. *FEBS Lett.* **531**: 157-161.

Mäser, P., Hosoo, Y., Goshima, S., Horie, T., Eckelman, B., Yamada, K., Yoshida, K., Bakker, E.P., Shinmyo, A., Oiki, S., et al. 2002b. Glycine residues in potassium channel-like selectivity filters determine potassium selectivity in four-loop-per-subunit HKT transporters from plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**: 6428-33.

Meng, Y., Hou, Y., Wang, H., Ji, R., Liu, B., Wen, J., Niu, L., et Lin, H. 2017. Targeted mutagenesis by CRISPR/Cas9 system in the model legume *Medicago truncatula*. *Plant Cell Rep.* **36**: 371-374.

Mian, A., Oomen, R.J.F.J., Isayenkov, S., Sentenac, H., Maathuis, F.J.M., et Véry, A.A. 2011. Over-expression of an Na⁺- and K⁺-permeable HKT transporter in barley improves salt tolerance. *Plant J.* **68**: 468-479.

Michard, E., Lima, P.T., Borges, F., Silva, A.C., Portes, M.T., Carvalho, J.E., Gilliam, M., Liu, L.,

Obermeyer, G., et Feijó, J.A. 2011. RESEARCH ARTICLE Glutamate Receptor – Like Genes Form Ca²⁺ Channels in Pollen Tubes and Are Regulated by Pistil. *Science (80-.)*. **332**: 434-437.

Miedema, H., Demidchik, V., Véry, A.-A., Bothwell, J.H.F., Brownlee, C., et Davies, J.M. 2008. Two voltage-dependent calcium channels co-exist in the apical plasma membrane of *Arabidopsis thaliana* root hairs. *New Phytol.* **179**: 378-385.

Miwa, H., Sun, J., Oldroyd, G.E.D., et Allan Downie, J. 2006. Analysis of calcium spiking using a cameleon calcium sensor reveals that nodulation gene expression is regulated by calcium spike number and the developmental status of the cell. *Plant J.* **48**: 883-894.

Moeder, W., Urquhart, W., Ung, H., et Yoshioka, K. 2011. The role of cyclic nucleotide-gated ion channels in plant immunity. *Mol. Plant* **4**: 442-452.

Mohamed, M.A.N., Carlson, G., Schulze, J., Drevon, J.J., et Ragab, M. 2010. Proton Efflux in *Medicago Truncatula* as Affected by Phosphorus Nutrition and Nitrogen Fixation by *Sinorhizobium Meliloti* Strain. **6**: 2010-2017.

Moran, J.F., Becana, M., Iturbe-Ormaetxe, I., Frechilla, S., Klucas, R.V., et Aparicio-Tejo, P. 1994. Drought induces oxidative stress in pea plants. *Planta* **194**: 1-23.

Mouline, K., Véry, A., Gaymard, F., Boucherez, J., Pilot, G., Devic, M., Bouchez, D., Thibaud, J., et Sentenac, H. 2002. disruption of a Shaker K⁺ channel in *Arabidopsis* Pollen tube development and competitive ability are impaired by disruption of a Shaker K⁺ channel in *Arabidopsis*. 339-350.

Mun, T., Bachmann, A., Gupta, V., Stougaard, J., et Andersen, S.U. 2016. Lotus Base: An integrated information portal for the model legume *Lotus japonicus*. *Sci. Rep.* **6**: 1-18.

Munns, R., et Gilliam, M. 2015. Salinity tolerance of crops – what is the cost? *New Phytol.* **208**: 668-673.

Munns, R., et Tester, M. 2008. Mechanisms of Salinity Tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* **59**: 651-681.

Nakamura, R.L., McKendree Jr, W.L., Hirsch, R.E., Sedbrook, J.C., Gaber, R.F., et Sussman,

M.R. 1995. Expression of an Arabidopsis Potassium Channel Gene in Guard Cells. *Plant Physiol.* **109**: 371-374.

Nieves-Cordones, M., et Gaillard, I. 2014. Involvement of the S4-S5 linker and the C-linker domain regions to voltage-gating in plant shaker channels: Comparison with animal HCN and Kv channels. *Plant Signal. Behav.* **9**: 37-41.

Obrdlik, P., El-Bakkoury, M., Hamacher, T., Cappellaro, C., Vilarino, C., Fleischer, C., Ellerbrok, H., Kamuzinzi, R., Ledent, V., Blaudez, D., et al. 2004. K⁺ channel interactions detected by a genetic system optimized for systematic studies of membrane protein interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**: 12242-12247.

Oldroyd, G.E.D., et Downie, J.A. 2004. Calcium, kinases and nodulation signalling in legumes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**: 566-576.

Oomen, R.J.F.J., Benito, B., Sentenac, H., Rodríguez-Navarro, A., Talón, M., Véry, A.A., et Domingo, C. 2012. HKT2;2/1, a K⁺-permeable transporter identified in a salt-tolerant rice cultivar through surveys of natural genetic polymorphism. *Plant J.* **71**: 750-762.

Ott, T., Dongen, J.T. Van, Günther, C., Krusell, L., Desbrosses, G., Vigeolas, H., Bock, V., Czechowski, T., Geigenberger, P., et Udvardi, M.K. 2005. Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. *Curr. Biol.* **15**: 531-535.

Pauly, N., Knight, M., Thuleau, P., Luit, A. van der, Moreau, M., Trewavas, A., Ranjeva, R., et Mazars, C. 2000. Control of free calcium in plant cell nuclei.

Pei, Z.M. 2000. Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nat.* **406**: 731-734.

Peleg-grossman, S., Melamed-book, N., et Levine, A. 2012. ROS production during symbiotic infection suppresses pathogenesis-related gene expression. 409-415.

Pilot, G., Gaymard, F., Mouline, K., Chérel, I., et Sentenac, H. 2003. Regulated expression of Arabidopsis Shaker K⁺ channel genes involved in K⁺ uptake and distribution in the plant. *Plant Mol. Biol.* **51**: 773-787.

Platten, J.D., Cotsaftis, O., Berthomieu, P., Bohnert, H., Davenport, R.J., Fairbairn, D.J., Horie, T., Leigh, R. a, Lin, H.-X., Luan, S., et al. 2006. Nomenclature for *HKT* transporters, key determinants of plant salinity tolerance. *Trends Plant Sci.* **11**: 372-374.

Poitout, A., Martinière, A., Kucharczyk, B., Queruel, N., Silva-Andia, J., Mashkoo, S., Gamet, L., Varoquaux, F., Paris, N., Sentenac, H., et al. 2017. Local signalling pathways regulate the *Arabidopsis* root developmental response to *Mesorhizobium loti* inoculation. *J. Exp. Bot.* **68**: 1199-1211.

Price, M.B., Jelesko, J., et Okumoto, S. 2012. Glutamate Receptor Homologs in Plants: Functions and Evolutionary Origins. *Front. Plant Sci.* **3**: 1-10.

Qi, Z., Stephens, N.R., et Spalding, E.P. 2006. Calcium Entry Mediated by GLR3.3, an *Arabidopsis* Glutamate Receptor with a Broad Agonist Profile. *Plant Physiol.* **142**: 963-971.

Qu, H.-Y., Shang, Z.-L., Zhang, S.-L., Liu, L.-M., et Wu, J.-Y. 2007. Identification of hyperpolarization-activated calcium channels in apical pollen tubes of *Pyrus pyrifolia*. *New Phytol.* **174**: 524-536.

Radutoiu, S., Madsen, L.H., Madsen, E.B., Jurkiewicz, A., Fukai, E., Quistgaard, E.M.H., Albrektsen, A.S., James, E.K., Thirup, S., et Stougaard, J. 2007. LysM domains mediate lipochitin-oligosaccharide recognition and *Nfr* genes extend the symbiotic host range. *EMBO J.* **26**: 3923-3935.

Reintanz, B., Szyroki, A., Ivashikina, N., Ache, P., Godde, M., Becker, D., Palme, K., et Hedrich, R. 2002. AtKC1, a silent *Arabidopsis* potassium channel alpha -subunit modulates root hair K⁺ influx. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**: 4079-84.

Ren, Z.H., Gao, J.P., Li, L.G., Cai, X.L., Huang, W., Chao, D.Y., Zhu, M.Z., Wang, Z.Y., Luan, S., et Lin, H.X. 2005. A rice quantitative trait locus for salt tolerance encodes a sodium transporter. *Nat. Genet.* **37**: 1141-1146.

Roberts, A.G., et Oparka, K.J. 2003. Plasmodesmata and the control of symplastic transport. *Plant, Cell Environ.* **26**: 103-124.

Roche, P., Debelle, F., Maillet, F., Lerouge, P., Faucher, C., Truchet, G., Dénarié, J., et Promé,

J.C. 1991. Molecular basis of symbiotic host specificity in rhizobium meliloti: nodH and nodPQ genes encode the sulfation of lipo-oligosaccharide signals. *Cell* **67**: 1131-1143.

Rosenberg, C., Boistard, P., Dénarié, J., et Casse-Delbart, F. 1981. Genes controlling early and late functions in symbiosis are located on a megaplasmid in Rhizobium meliloti. *Mol. Gen. Genet. MGG* **184**: 326-333.

ROY, S.J., GILLIHAM, M., BERGER, B., ESSAH, P.A., CHEFFINGS, C., MILLER, A.J., DAVENPORT, R.J., LIU, L.-H., SKYNNER, M.J., DAVIES, J.M., et al. 2008. Investigating glutamate receptor-like gene co-expression in Arabidopsis thaliana. *Plant. Cell Environ.* **31**: 861-871.

Rubio, F., Gassmann, W., et Schroeder, J.I. 1995. Sodium-Driven Potassium Uptake by the Plant Potassium Transporter HKT1 and Mutations Conferring Salt Tolerance. *Science (80-.).* **270**: 1660 LP-1663.

Ruijter, N.C.A. De, Rook, M.B., Bisseling, T., et Emons, A.M.C. 1998. Lipochito-oligosaccharides re-initiate root hair tip growth in Vicia sativa with high calcium and spectrin-like antigen at the tip. *Plant J.* **13**: 341-350.

Ruvkun, G.B., et Ausubel, F.M. 1980. Interspecies homology of nitrogenase genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **77**: 191-195.

Sassi, A., Mieulet, D., Khan, I., Moreau, B., Gaillard, I., Sentenac, H., et Very, A.-A. 2012. The Rice Monovalent Cation Transporter OsHKT2;4: Revisited Ionic Selectivity. *Plant Physiol.* **160**: 498-510.

Sato, S., Nakamura, Y., Kaneko, T., Asamizu, E., Kato, T., Nakao, M., Sasamoto, S., Watanabe, A., Ono, A., Kawashima, K., et al. 2008. Genome structure of the legume, *Lotus japonicus*. *DNA Res.* **15**: 227-239.

Schachtman, D.P., et Schroeder, J.I. 1994. Structure and transport mechanism of a high-affinity potassium uptake transporter from higher plants. *Nature* **370**: 655.

Schachtman, D.P., Schroeder, J.I., Lucas, W.J., Anderson, J.A., et Gaber, R.F. 1992. Expression of an inward-rectifying potassium channel by the Arabidopsis KAT1 cDNA. *Science (80-.).* **258**: 1654 LP-1658.

Schmutz, J., Cannon, S.B., Schlueter, J., Ma, J., Mitros, T., Nelson, W., Hyten, D.L., Song, Q., Thelen, J.J., Cheng, J., et al. 2010. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature* **463**: 178-183.

Schmutz, J., McClean, P.E., Mamidi, S., Wu, G.A., Cannon, S.B., Grimwood, J., Jenkins, J., Shu, S., Song, Q., Chavarro, C., et al. 2014. A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications. *Nat. Genet.* **46**: 707-713.

Schultze, M., et Kondorosi, A. 1998. REGULATION OF SYMBIOTIC ROOT NODULE DEVELOPMENT. *Annu. Rev. Genet.* **32**: 33-57.

Schulze, J., et Drevon, J.-J. 2005. P-deficiency increases the O₂ uptake per N₂ reduced in alfalfa. *J. Exp. Bot.* **56**: 1779-84.

Sentenac, H., Bonneaud, N., Minet, M., Lacroute, F., Salmon, J., Gaymard, F., et Grignon, C. 1992. NE9K. **256**.

Serraj, R., et Sinclair, T.R. 1996. Inhibition of nitrogenase activity and nodule oxygen permeability by water deficit. *J. Exp. Bot.* **47**: 1067-1073.

Serwatowska, J., Roque, E., Gómez-Mena, C., Constantin, G.D., Wen, J., Mysore, K.S., Lund, O.S., Johansen, E., Pío Beltrán, J., et Cañas, L.A. 2014. Two euAGAMOUS genes control C-function in *Medicago truncatula*. *PLoS One* **9**.

Shabala, S., Bose, J., et Hedrich, R. 2014. Salt bladders: Do they matter? *Trends Plant Sci.* **19**: 687-691.

Shang, Z.L., Ma, L.G., Zhang, H.L., He, R.R., Wang, X.C., Cui, S.J., et Sun, D.Y. 2005. Ca²⁺-influx into lily pollen grains through a hyperpolarization-activated Ca²⁺-permeable channel which can be regulated by extracellular CaM. *Plant Cell Physiol.* **46**: 598-608.

Shi, H., Quintero, F.J., Pardo, J.M., et Zhu, J.K. 2002. The putative plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter SOS1 controls long-distance Na⁺ transport in plants. *Plant Cell* **14**: 465-477.

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

- Smith, B.E. 2002. Nitrogenase Reveals Its Inner Secrets. *Science* (80-.). **297**: 1654 LP-1655.
- Spalding, E.P., et Harper, J.F. 2011. The ins and outs of cellular Ca²⁺ transport. *Curr. Opin. Plant Biol.* **14**: 715-720.
- Stark, A., et Madar, Z. 2002. Phytoestrogens: a review of recent findings. *J Pediatr Endocrinol* **15**: 561-572.
- Stein, W.D. 1990. Channels, carriers, and pumps : an introduction to membrane transport San Diego (Calif.) : Academic press.
- Stoelzle, S., Kagawa, T., Wada, M., Hedrich, R., et Dietrich, P. 2003. Blue light activates calcium-permeable channels in Arabidopsis mesophyll cells via the phototropin signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**: 1456 LP-1461.
- Su, H., Balderas, E., Vera-Estrella, R., Gollack, D., Quigley, F., Zhao, C., Pantoja, O., et Bohnert, H.J. 2003. Expression of the cation transporter McHKT1 in a halophyte. *Plant Mol. Biol.* **52**: 967-980.
- Sunarpi, Horie, T., Motoda, J., Kubo, M., Yang, H., Yoda, K., Horie, R., Chan, W.Y., Leung, H.Y., Hattori, K., et al. 2005. Enhanced salt tolerance mediated by AtHKT1 transporter-induced Na⁺ unloading from xylem vessels to xylem parenchyma cells. *Plant J.* **44**: 928-938.
- Sunkar, R., Kaplan, B., Bouché, N., Arazi, T., Dolev, D., Talke, I.N., Maathuis, F.J.M., Sanders, D., Bouchez, D., et Fromm, H. 2000. Expression of a truncated tobacco NtCBP4 channel in transgenic plants and disruption of the homologous Arabidopsis CNGC1 gene confer Pb²⁺ tolerance. *Plant J.* **24**: 533-542.
- Suzuki, K., Yamaji, N., Costa, A., Okuma, E., Kobayashi, N.I., Kashiwagi, T., Katsuhara, M., Wang, C., Tanoi, K., Murata, Y., et al. 2016. OsHKT1;4-mediated Na⁺ transport in stems contributes to Na⁺ exclusion from leaf blades of rice at the reproductive growth stage upon salt stress. *BMC Plant Biol.* **16**: 22.
- Szechyńska-Hebda, M., Lewandowska, M., et Karpiński, S. 2017. Electrical Signaling, Photosynthesis and Systemic Acquired Acclimation . *Front. Physiol.* **8**: 684.
- Tang, H., Krishnakumar, V., Bidwell, S., Rosen, B., Chan, A., Zhou, S., Gentzbittel, L., Childs,

K.L., Yandell, M., Gundlach, H., et al. 2014. An improved genome release (version Mt4.0) for the model legume *Medicago truncatula*. *BMC Genomics* **15**: 1-14.

Tapken, D., Anschütz, U., Liu, L.H., Huelsken, T., Seebohm, G., Becker, D., et Hollmann, M. 2013. A plant homolog of animal glutamate receptors is an ion channel gated by multiple hydrophobic amino acids. *Sci. Signal.* **6**: 1-11.

Tapken, D., et Hollmann, M. 2008. Arabidopsis thaliana Glutamate Receptor Ion Channel Function Demonstrated by Ion Pore Transplantation. *J. Mol. Biol.* **383**: 36-48.

Tirichine, L., Imaizumi-Anraku, H., Yoshida, S., Murakami, Y., Madsen, L.H., Miwa, H., Nakagawa, T., Sandal, N., Albrechtsen, A.S., Kawaguchi, M., et al. 2006. Deregulation of a Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase leads to spontaneous nodule development. *Nature* **441**: 1153-1156.

Tounsi, S., Amar, S. Ben, Masmoudi, K., Sentenac, H., Brini, F., et Véry, A.A. 2016. Characterization of two HKT1;4 Transporters from triticum monococcum to elucidate the determinants of the wheat salt tolerance Nax1 QTL. *Plant Cell Physiol.* **57**: 2047-2057.

Truchet, G., Roche, P., Lerouge, P., Vasse, J., Camut, S., Billy, F. de, Promé, J.-C., et Dénarié, J. 1991. Sulphated lipo-oligosaccharide signals of *Rhizobium meliloti* elicit root nodule organogenesis in alfalfa. *Nature* **351**: 670-673.

Tunc-ozdemir, M., Rato, C., Brown, E., Rogers, S., Mooneyham, A., Harper, J.F., Frietsch, S., Myers, C.T., Poulsen, L.R., et Malho, R. 2013. Cyclic Nucleotide Gated Channels 7 and 8 Are Essential for Male Reproductive Fertility. **8**.

Tunc-Ozdemir, M., Tang, C., Ishka, M.R., Brown, E., Groves, N.R., Myers, C.T., Rato, C., Poulsen, L.R., McDowell, S., Miller, G., et al. 2013. A Cyclic Nucleotide-Gated Channel (CNGC16) in Pollen Is Critical for Stress Tolerance in Pollen Reproductive Development. *Plant Physiol.* **161**: 1010-1020.

Uozumi, N., Kim, E.J., Rubio, F., Yamaguchi, T., Muto, S., Tsuboi, a, Bakker, E.P., Nakamura, T., et Schroeder, J.I. 2000. The Arabidopsis HKT1 gene homolog mediates inward Na(+) currents in xenopus laevis oocytes and Na(+) uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Physiol.* **122**: 1249-1259.

Urbach, S., Cherel, I., Sentenac, H., et Gaymard, F. 2000. Biochemical characterization of the Arabidopsis K⁺ channels KAT1 and AKT1 expressed or co-expressed in insect cells. *Plant J.* **23**: 527-538.

Urquhart, W., Gunawardena, A.H.L.A.N., Moeder, W., Ali, R., Berkowitz, G.A., et Yoshioka, K. 2007. The chimeric cyclic nucleotide-gated ion channel ATCNGC11/12 constitutively induces programmed cell death in a Ca²⁺-dependent manner. *Plant Mol. Biol.* **65**: 747-761.

Vance, C.P. 2001. Update on the State of Nitrogen and Phosphorus Nutrition Symbiotic Nitrogen Fixation and Phosphorus Acquisition . Plant Nutrition in a World of Declining Renewable Resources. *Plant Physiol.* **127**: 390-397.

Varshney, R.K., Chen, W., Li, Y., Bharti, A.K., Saxena, R.K., Schlueter, J.A., Donoghue, M.T.A., Azam, S., Fan, G., Whaley, A.M., et al. 2012. Draft genome sequence of pigeonpea (*Cajanus cajan*), an orphan legume crop of resource-poor farmers. *Nat. Biotechnol.* **30**: 83-89.

Varshney, R.K., Song, C., Saxena, R.K., Azam, S., Yu, S., Sharpe, A.G., Cannon, S., Baek, J., Rosen, B.D., Tar'an, B., et al. 2013. Draft genome sequence of chickpea (*Cicer arietinum*) provides a resource for trait improvement. *Nat. Biotechnol.* **31**: 240-246.

Veerappan, V., Kadel, K., Alexis, N., Scott, A., Kryvoruchko, I., Sinharoy, S., Taylor, M., Udvardi, M., et Dickstein, R. 2014. Keel petal incision : a simple and efficient method for genetic crossing in *Medicago truncatula*. *Plant Methods* **10**: 1-10.

Very, A.-A., et Davies, J.M. 2000. Hyperpolarization-activated calcium channels at the tip of Arabidopsis root hairs . *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **97**: 9801-9806.

Véry, A.-A., et Sentenac, H. 2003. Molecular Mechanisms and Regulation of K⁺ Transport in Higher Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **54**: 575-603.

Very, A.A., Gaymard, F., Bosseux, C., Sentenac, H., et Thibaud, J.-B. 1995. Expression of a cloned plant K⁺ channel in *Xenopus* oocytes: analysis of macroscopic currents. *Plant J.* **7**: 321-332.

Very, A.A., Nieves-Cordones, M., Daly, M., Khan, I., Fizames, C., et Sentenac, H. 2014.

Molecular biology of K⁺ transport across the plant cell membrane: What do we learn from comparison between plant species? *J. Plant Physiol.* **171**: 748-769.

Vieira-Pires, R.S., Szollosi, A., et Morais-Cabral, J.H. 2013. The structure of the KtrAB potassium transporter. *Nature* **496**: 323-8.

Vincent, J. 1970. A Manual for the Practical Study of Root-nodul Bacteria. *Int. Biol. Program. Handb.* **15**: 164.

Vincill, E.D., Bieck, A.M., et Spalding, E.P. 2012. Ca²⁺ Conduction by an Amino Acid-Gated Ion Channel Related to Glutamate Receptors. *Plant Physiol.* **159**: 40-46.

Vincill, E.D., Clarin, A.E., Molenda, J.N., et Spalding, E.P. 2013. Interacting Glutamate Receptor-Like Proteins in Phloem Regulate Lateral Root Initiation in Arabidopsis. *Plant Cell* **25**: 1304-1313.

Wang, Q., Guan, C., Wang, P., Lv, M.-L., Ma, Q., Wu, G.-Q., Bao, A.-K., Zhang, J.-L., et Wang, S.-M. 2015. AtHKT1;1 and AtHAK5 mediate low-affinity Na⁺ uptake in Arabidopsis thaliana under mild salt stress. *Plant Growth Regul.* **75**: 615-623.

Wang, Y.-F., Munemasa, S., Nishimura, N., Ren, H.-M., Robert, N., Han, M., Puzorjova, I., Kollist, H., Lee, S., Mori, I., et al. 2013. Identification of Cyclic GMP-Activated Nonselective Ca²⁺-Permeable Cation Channels and Associated CNGC5 and CNGC6 Genes in Arabidopsis Guard Cells. *Plant Physiol.* **163**: 578-590.

Xicluna, J., Lacombe, B., Dreyer, I., Alcon, C., Jeanguenin, L., Sentenac, H., Thibaud, J.B., et Chérel, I. 2007. Increased functional diversity of plant K⁺ channels by preferential heteromerization of the Shaker-like subunits AKT2 and KAT2. *J. Biol. Chem.* **282**: 486-494.

Xue, S., Yao, X., Luo, W., Jha, D., Tester, M., Horie, T., et Schroeder, J.I. 2011. AtHKT1;1 mediates nernstian sodium channel transport properties in Arabidopsis root stelar cells. *PLoS One* **6**.

Yao, X., Horie, T., Xue, S., Leung, H.-Y., Katsuhara, M., Brodsky, D.E., Wu, Y., et Schroeder, J.I. 2010. Differential Sodium and Potassium Transport Selectivities of the Rice OsHKT2;1 and OsHKT2;2 Transporters in Plant Cells. *Plant Physiol.* **152**: 341-355.

Yoshioka, K., Moeder, W., Kang, H., Kachroo, P., Masmoudi, K., Berkowitz, G., et Klessig, D.F. 2006. The Chimeric Arabidopsis CYCLIC NUCLEOTIDE-GATED ION CHANNEL11 / 12 Activates Multiple Pathogen Resistance Responses. **18**: 747-763.

Zahran, H.H. 1999. Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**: 968-989, table of contents.

Zhang, M., Cao, Y., Wang, Z., Wang, Z., Shi, J., Liang, X., Song, W., Chen, Q., Lai, J., et Jiang, C. 2017. A retrotransposon in an HKT1 family sodium transporter causes variation of leaf Na⁺ exclusion and salt tolerance in maize. *New Phytol.* **217**: 1161-1176.

Zhou, L., Lan, W., Jiang, Y., Fang, W., et Luan, S. 2014. A calcium-dependent protein Kinase interacts with and activates a calcium channel to regulate pollen tube growth. *Mol. Plant* **7**: 369-376.