



HAL
open science

Compréhension de la capacité d'une plante de Pois à récupérer enternes de croissance et d'acquisition d'azote après un stress hydrique : études écophysiologique et moléculaire

Mégane Couchoud

► **To cite this version:**

Mégane Couchoud. Compréhension de la capacité d'une plante de Pois à récupérer enternes de croissance et d'acquisition d'azote après un stress hydrique : études écophysiologique et moléculaire. Sciences agricoles. Université Bourgogne Franche-Comté, 2020. Français. NNT : 2020UBFCK007 . tel-02940058

HAL Id: tel-02940058

<https://theses.hal.science/tel-02940058>

Submitted on 16 Sep 2020

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

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

UNIVERSITE DE BOURGOGNE FRANCHE-COMTE

INRA - UMR 1347 Agroécologie
Pôle GEAPSI - Equipes EcoLeg et FILEAS

THESE

En vue de l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BOURGOGNE FRANCHE-COMTE
Ecole doctorale Environnement Santé
Spécialité Sciences agronomiques

Par

Mégane COUCHOUD

Compréhension de la capacité d'une plante de pois à récupérer après un stress hydrique : Une étude écophysiological et moléculaire

Directeur de thèse : Christophe SALON

Co-directrices de thèse : Vanessa VERNOUD et Marion PRUDENT

Soutenue le 13 février 2020 devant le jury composé de :

Manuel Blouin	Professeur AgroSup Dijon, Agroécologie Dijon	Président
Sandra Bensmihen	Chargée de recherche CNRS, LIPM Toulouse	Rapporteur
Thierry Simonneau	Directeur de recherche INRA, LEPSE Montpellier	Rapporteur
Christophe Robin	Directeur de recherche INRA, LAE Nancy	Examineur
Sylvain Pluchon	Chef de projet R&D, Groupe Roullier St Malo	Examineur
Christophe Salon	Directeur de recherche INRA, Agroécologie Dijon	Directeur de thèse
Marion Prudent	Chargée de recherche INRA, Agroécologie Dijon	Co-directrice de thèse
Vanessa Vernoud	Chargée de recherche INRA, Agroécologie Dijon	Co-directrice de thèse

Remerciements

Mes premiers remerciements vont à mon directeur de thèse, Christophe Salon et mes deux co-encadrantes de thèse, Marion Prudent et Vanessa Vernoud. Et oui, plus on est de fous plus on rit ! Merci de m'avoir accordé votre confiance et m'avoir soutenu durant ces trois années. Merci pour votre disponibilité et votre aide. Merci pour votre bienveillance quotidienne et tous vos conseils précieux. Vous avez toujours été là pour m'encourager, me conseiller et me rassurer dans mes grands (et nombreux ^^) moments de doutes. Vos expertises complémentaires et nos discussions scientifiques, toujours ponctuées d'une pointe d'humour et toujours dans la bonne humeur, m'ont permis de tirer le meilleur de moi-même afin de pouvoir fournir un travail de qualité et d'explorer toujours plus profondément « la vie fantastique du petit pois ».

Je tiens à remercier Nathalie Munier-Jolain, directrice de l'INRA de Dijon, ainsi que Philippe Lemanceau, directeur de l'UMR Agroécologie, pour m'avoir accueilli au sein de leur laboratoire et m'avoir permis d'y réaliser ma thèse.

J'adresse mes remerciements aux financeurs de ma bourse de thèse sans qui rien de tout cela n'aurait pu être possible : la région Bourgogne Franche-Comté, le département BAP (Biologie et Amélioration des Plantes) de l'INRA, ainsi que le groupe Roullier.

Je remercie chacun des membres de mon comité de pilotage de thèse : Bertrand Hirel, Philippe Nacry, Nicolas Langlade, Gilles Vercambre et Mustapha Arkoun. Ils ont suivi mon travail lors de ces trois années et ont su me promulguer de précieux conseils que ce soit lors de la préparation de mes différentes expérimentations ou lors de l'analyse de mes données afin notamment de définir des priorités dans l'analyse de la quantité importantes de données acquises. Nos échanges scientifiques ont été des plus enrichissants.

Je tiens également à remercier les membres de mon jury qui ont accepté de lire mon manuscrit et d'évaluer mon travail que ce soit en tant que rapporteurs : Sandra Bensmihen et Thierry Simonneau, ou en tant qu'examineurs : Manuel Blouin, Christophe Robin et Sylvain Pluchon.

Les différentes expérimentations menées au cours de cette thèse ont impliquées le semis, la culture et le prélèvement de plusieurs centaines de plantes. Leur réalisation n'a évidemment pas pu se faire sans l'aide de nombreuses personnes. Je tiens donc tout d'abord à remercier

les membres de l'équipe serres et PPHD : Céline Bernard, Karine Palavioux, Damien Gironde, Frank Zenk, Alexis Beaufiles et Julien Martinet. Merci pour tout ce que vous avez fait, pour avoir toujours pu vous rendre disponible lorsque j'en avais besoin, même en plein week-end ou lors de mes appels à des heures incongrues (spéciale dédicace à Julien !) et pour avoir toujours répondu à mes questions même les plus existentielles. Je tiens également à remercier les membres de mes deux équipes d'accueil, l'équipe FILEAS et l'équipe Ecophy. Sans eux et leur motivation à toute épreuve (mais aussi sans les talents de pâtissier et pâtissière de chacun ^^) le prélèvement de toutes ces plantes n'aurait pu être possible. Ce furent des milliers de nodosités à retirer une à une à la pince à épiler et à compter, des centaines de racines à laver, démêler, étaler et scanner, ... C'est grâce à la bonne humeur de tout le monde, une gestion parfaite de la playlist musicale et encore et toujours des gâteaux que ces prélèvements ont pu se faire dans une ambiance extraordinaire.

Je souhaiterais remercier tout particulièrement Sylvie Girodet qui a toujours été d'un soutien sans faille. Elle a été présente pour moi à chaque étape de ma thèse, que ce soit pour m'aider au niveau technique, pour le suivi de la culture des plantes et pour la préparation de cette multitude d'échantillons mais aussi au niveau émotionnel, toujours dernière moi pour me soutenir et me remonter le moral.

Je souterais également remercier Nadia Rossin et Vincent Durey pour leur aide technique et nos discussions tellement agréables sur tous les sujets possibles et inimaginables.

Merci à Christian Jeudy pour m'avoir initiée à l'art du marquage isotopique et pour avoir supporté ces horaires de dingue. C'est grâce à lui, nous avons pu mettre au point et réaliser à la quasi perfection cette seconde expérimentation.

Je remercie aussi Judith Burstin pour m'avoir permis d'avoir accès à la première version du génome du pois avant sa publication et sans quoi la moitié de ces résultats n'aurait pu exister. Merci également aux deux meilleurs bio-informaticien : Morgane Terezol et Jonathan Kreplak, pour leur travail et leur aide précieuse dans mon analyse de données RNA-Seq. C'est eux qui m'ont formé à l'art de l'analyse des données de transcriptomique mais c'est également eux qui m'ont vu débarquer toutes les 5 minutes dans leur bureau afin de m'aider à ~~me battre contre~~ exploiter au mieux R.

Cette thèse m'a également permis de faire de magnifiques rencontres et j'ai ainsi pu être entourée par les meilleures personnes au monde que je tiens à remercier de tout mon cœur.

On a tout d'abord le trio de choc Mickael, Baptiste, Clémence : des heures de fou rire et de blagues en tout genre. Mais aussi les thésards et thésardes avec qui j'ai partagé tant de bons moments lors de cette aventure : Aurélie et Charlotte mes collègues de bureau, lieu de passage incontournable, Kévin et Thibault pour lesquels j'ai bien trop souvent joué le rôle de la secrétaire. Et enfin tous mes fantastiques collègues, stagiaires, CDD and Co : Morgane, Ludivine, Déborah, Marion, Adrien, Maxime, Fatima-Zahra, Valentin, Aurélien et Jonathan. Vous avez permis la naissance de vraies amitiés et participé grandement à rendre cette expérience inoubliable. Toutes ces bons moments passés ensemble, ces discussions à table qui me faisant terminer la dernière, nos soirées mémorables, nos randonnées du week-end, ...

Merci à tous mes amis que je n'ai vus autant que je le voulais pendant ces trois années mais qui ont toujours été là pour moi : Marine, Elsa, Iris, Marie et Guillaume.

Enfin un grand merci à ma famille et tout particulièrement mes parents, mon frère Tanguy et ma sœur Charlotte. Vous avez toujours été là pour moi, vous m'avez soutenu et aidé pendant toute ces années. Vous me demandiez souvent où j'en étais de mon « stress hydrolique du petit pois » ^^ . C'est votre amour et votre soutien inconditionnel m'a permis d'arriver là où j'en suis aujourd'hui. Vous m'avez accompagné du début à la fin, prêt à débarquer à Dijon au moindre souci pour m'aider. Charlotte, tu as été un pilier indispensable et d'une aide inestimable, tout particulièrement dans ces derniers mois difficiles et j'espère pouvoir t'aider tout autant quand ton tour viendra.

Et pour finir un grand merci à mon chéri, Aymeric, qui a été présent pour moi pendant ces trois années, prêt à accourir pour me reconforter (quitte à faire un aller-retour Allemagne France pour cela). Il m'a soutenu dans les bons et les moins bons moments, m'a permis de garder le moral tout au long de cette aventure. Cette thèse, c'est aussi un peu la tienne et je souhaite vous la dédier à toi et à notre petit bébé à venir !

Table des matières

Table des abréviations :	15
Liste des Figures :	17
Liste des tableaux	19
INTRODUCTION GENERALE	21
CHAPITRE 1 : Synthèse bibliographique	29
I- Les légumineuses et le pois	30
1- Les légumineuses	30
a- Avantages des légumineuses	30
b- La culture des légumineuses en France et en Europe	31
2- Le pois.....	33
II- Le système racinaire	37
1- Mise en place et développement des racines	37
2- Prélèvement de l'eau et des nutriments	38
a- Prélèvement de l'eau	38
b- Prélèvement des nutriments.....	39
3- L'architecture racinaire et sa modulation en réponse à l'environnement	41
a- Déterminisme génétique de l'architecture racinaire.....	43
b- Modulation de l'architecture par l'environnement	43
c- Importance de l'architecture pour définir l'efficacité de prélèvement des racines.....	45
4- Régulation hormonale du développement racinaire	47
a- Initiation des racines latérales.....	47
b- Croissance racinaire.....	48
III- Les nodosités, lieu de la symbiose rhizobienne chez les légumineuses.....	48
1- Mise en place, développement des nodosités	49
2- Fonctionnement de la fixation symbiotique.....	53
3- Déterminisme génétique du développement et du fonctionnement des nodosités.....	55

a-	Perception des facteurs de nodulation.....	55
b-	Cascade de signalisation au niveau de l'épiderme	56
c-	Cascade de signalisation au niveau du cortex	56
d-	Différenciation des nodosités	56
e-	Fonctionnement des nodosités.....	57
4-	La régulation de la formation des nodosités	57
a-	Coût en carbone associé à la symbiose fixatrice de N ₂	57
b-	Une régulation de la nodulation par le statut azoté de la plante	59
c-	Une régulation fine du nombre et de l'activité des nodosités via l'autorégulation systémique de la nodulation (AON)	61
d-	Le rôle des hormones dans la régulation de la nodulation	62
IV-	Les effets du stress hydrique et la récupération post-stress.....	65
1-	Mécanismes généraux de résistance / tolérance des plantes à un déficit hydrique du sol	68
a-	La fermeture stomatique.....	68
b-	La réduction de l'élongation foliaire	68
c-	Inhibition de la photosynthèse.....	69
d-	Réduction de la croissance.....	69
e-	Modification de l'efficacité d'utilisation en eau.....	69
f-	L'ajustement osmotique.....	69
g-	Accumulation de molécules de défense / protection.....	70
2-	La spécificité des légumineuses : des modifications structurales et fonctionnelles au sein du système racinaire nodulé lors d'un stress hydrique	71
a-	Modifications structurales.....	71
b-	Modifications fonctionnelles.....	73
3-	Les hormones et les facteurs de transcription, éléments régulateurs clés de ces réponses adaptatives	75
a-	Les hormones	75
b-	Facteurs de transcription	79
4-	La récupération après un stress : un ensemble de mécanismes encore peu exploré	80

CHAPITRE 2 : Caractérisation écophysologique de la réponse au stress hydrique et au ré-arrosage de deux génotypes de pois ayant une capacité de résilience contrastée.....85

I- Objectif et démarche 86

II- Quelle stratégie utiliser pour favoriser une meilleure résilience à la sécheresse ? Une comparaison de 2 génotypes de pois grâce à l'utilisation d'un cadre d'analyse écophysologique de type structure-fonction..... 87

Abstract 88

1- Introduction 89

2- Materials and methods 93

2.1- Plant growth conditions 93

2.2- Experimental design and sampling 94

2.3- Measurement and calculation 95

2.4- ^{13}C and ^{15}N content and enrichment determination 97

2.5- Isotopic calculations for the labelling experiments 97

2.6- Statistical analyses 99

3- Results..... 99

3.1- Kayanne and Puget which have contrasted plant architecture display different resilience abilities towards water deficit. 99

3.2- Plant growth was similarly impacted during water deficit whatever the genotype while plant growth recovery initiation was genotype dependent. 101

3.3- Water deficit affects water fluxes in both genotypes..... 101

3.4- Shoot functional but not structural components recovered fully after two weeks of re-watering 103

3.5- Water deficit and subsequent re-watering triggered changes in biomass allocation towards the nodule compartment in a genotype-dependent manner..... 105

3.6- Plant nitrogen status was negatively impacted by water deficit then completely recovered, but with a different timing depending on the genotype. 107

3.7- Combined $^{13}\text{CO}_2$ and $^{15}\text{N}_2$ labelling experiment highlighted different C and N uptake activities and allocations depending on the genotype 107

4- Discussion 109

4.1- Similar tolerance levels to water deficit between the two genotypes but different mechanisms involved..... 110

4.2- Contrasted strategies between genotypes during the re-watering period might explain differences in recovery efficiency and ultimately resilience.....	111
4.3- Conclusion.....	115
5- Acknowledgements.....	115
6- Author Contributions Statement.....	116
7- Supplementary material.....	117
Supplementary Figure S1:.....	117
Supplementary Figure S2:.....	118
Supplementary Figure S3.....	119
Supplementary Figure S4:.....	120
III- Conclusion du chapitre.....	121
A-Synthèse des principaux résultats.....	121
B- Conclusion.....	122
CHAPITRE 3 : Identification des bases moléculaires sous-jacentes à la récupération au sein du système racinaire nodulé du pois.....	125
I- Objectif et démarche.....	126
II. Matériels et méthodes.....	129
A- Conditions de culture des plantes et prélèvements.....	129
B- Dosage de phytohormones.....	130
1- Extraction.....	131
2- Analyse et quantification.....	131
3- Analyse statistique.....	132
C- Analyse métabolomique par GC-MS.....	132
1- Extraction.....	132
2- Dérivation.....	132
3- Analyse.....	132
4- Traitement des données.....	133
5- Quantification absolue.....	134
6- Analyses statistiques.....	134
D- Analyse transcriptomique par séquençage d'ARN (RNA-seq).....	135
1- Extraction des ARN totaux.....	135

2- Séquençage ARN.....	135
3- Traitement bio-informatique des données de séquençage, alignement sur le génome et comptage	135
4- Analyse différentielle	137
III. Résultats et discussion	139
A- Effet du déficit hydrique et du ré-arrosage sur l'accumulation de phytohormones dans les racines et les nodosités	139
B - Analyse du métabolome de racines et de nodosités de pois en réponse au déficit hydrique et au ré-arrosage	147
1- Analyse exploratoire du jeu de données	147
2- Analyse des différents profils d'accumulation de métabolites en réponse au déficit hydrique et au ré-arrosage	149
C- Analyse du transcriptome de racines et de nodosités de pois en réponse au déficit hydrique et au ré-arrosage	155
1- Analyse exploratoire du jeu de données	155
2- Analyse différentielle en réponse au déficit hydrique et au ré-arrosage	157
3- Analyses des gènes différentiellement exprimés chez les deux génotypes en réponse au déficit hydrique et au ré-arrosage	161
4- Analyses des gènes différentiellement exprimés spécifiquement chez chacun des génotypes en réponse au déficit hydrique et au ré-arrosage	166
D- Bases moléculaires sous-jacentes à la fixation du N ₂ dans les nodosités et à l'interaction entre métabolismes C et N dans les racines.....	173
1- La fixation symbiotique de l'azote dans les nodosités.....	173
2- Le métabolisme C : N dans les racines.....	177
IV- Conclusion.....	179
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	185
I - Retour sur les principaux résultats de la thèse	186
1) Les capacités de résilience de Kayanne et Puget sont contrastées et peuvent s'expliquer par la mise en place de stratégies de récupération différentes (Chapitre 2)	187
2) Les analyses des bases moléculaires sous-jacentes à la récupération soulignent des différences de régulation principalement dans les nodosités (Chapitre 3)	189
II - Perspectives de recherche.....	191

1) Etude de l'architecture racinaire des deux génotypes et de l'effet du déficit hydrique et du ré-arrosage sur cette dernière	191
2) Approfondissement des analyses « omiques »	192
3- Validation fonctionnelle.....	197
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	199
VALORISATION DES TRAVAUX DE THESE	223
Articles.....	223
Communications orales.....	223
Posters.....	223
ANNEXES	227
Annexe 1 : Article de stage de Master 2	228
Annexe 2 : Architecture aérienne et racinaire de Kayanne et Puget	243
Annexe 3 : Table S1 - Chapitre 2.....	245
Annexe 4 : Figure et tableaux supplémentaires du chapitre 3	264

Table des abréviations :

AAT	Aspartate AminoTransférase
ABA	Acide abscissique
ABF	ABRE-Binding Factor
ABRE	ABA- Responsive Element
ACP	Analyse en Composante Principale
AI	Alcaline Invertase
AON	Autoregulation Of Nodulation
AREB	ABRE-Binding protein
AS	Asparagine Synthase
AUX1	AUXIN RESISTANT1
BR	Brassinostéroïdes
bZIP	basic leucine ZIPper
CK	Cytokinines
CLE	CLAVATA3/EMBRYO SURROUNDING REGION
DE	Différentiellement Exprimé
DRE	Dehydration Responsive Element
DREB	Dehydration responsive element binding protein
ERN	Ethylene Responsive Factor Required for Nodulation
FNod	Facteurs de Nodulation
FT	Facteur de Transcription
GA	Gibbérellines
Gb	Giga bases
GC-MS	Gaz Chromatography - Mass Spectrometry
GO	Gène Ontologie
GOGAT	Glutamine amidotransférase
GS	Glutamine Synthétase
HATS	Transporteurs de haute affinité
Hr	High response
HSP	Heat-Shock Proteins
INN	Indice de nutrition azotée
JA	Acide jasmonique
LAE	LAtE Embryogenesis Abundant
LATS	Transporteurs de basse affinité

LC-MS	Liquide Chromatography - Mass Spectrometry
HAR1	Hypernodulation Aberrant Root
TML	Too Much Love
LRR RLK	Leucin-Rich Repeat –Receptor-Like Kinase
LysM-RLKs	Lysin Motif Receptor-Like Kinase
MSTFA	N-méthyl-N-triméthylsilyl-trifluoroacétamide
RIP1	Rhizobium-Induced Peroxidase 1
SUNN	Super Numeric Nodules
MYB	MYeloBlastosis oncogen
NCR	Nodule Cysteine-Rich
NIN	Nodule INception
NPA	N-1-naphthylphthalamic acid
NSP	Nodulation Signaling Pathway
NUE	Nitrogen Use Efficiency
PEPc	PhosphoEnolPyruvate carboxylase
PINs	PINFORMED
PR	Pathogenesis-Related
QTL	Quantitative Trait Loci
ROS	Reactive Oxygen Species
RTK	Receptor-Like Kinase
RUE	Radiation Use Efficiency
SA	Acide salicylique
SDI	Shoot Derivated Inhibitor
SNFa	Activité spécifique de fixation de l'azote
SPLS	Sparse Partial Least Squares
sRWU	specific Root Water Uptake
SS	Sucrose Synthase
TCA	Tricarboxylic Acid Cycle
WD	Water Deficit
WUE	Water Use Efficiency,
WW	Well Watered

Liste des Figures :

- Figure 1** : Principales étapes du cycle de développement du pois. *p 32*
- Figure 2** : Facteurs limitant du pois et répartition au cours de son cycle de développement. *p 32*
- Figure 3** : Anatomie d'une plante de pois. *p 34*
- Figure 4** : Différents types morphologiques de feuilles de pois. *p 34*
- Figure 5** : Développement des racines latérales chez *Arabidopsis*. *p 36*
- Figure 6** : Assimilation de l'ammonium via le cycle GS/GOGAT. *p 40*
- Figure 7** : Modification de l'architecture racinaire chez *Arabidopsis* en réponse à différentes disponibilités en nutriments du milieu. *p 42*
- Figure 8** : Représentation graphique d'un système de description proposé par McPhee (1992) de l'architecture des racines de pois, en huit classifications de formes générales possibles croisées. *p 44*
- Figure 9** : Représentation schématique de l'action de différentes hormones sur les différents tissus et régions racinaires chez *Arabidopsis*. *p 46*
- Figure 10** : Stades de développement des nodosités de légumineuses indéterminés. *p 50*
- Figure 11** : Schéma des voies métaboliques du carbone et de l'azote avec les enzymes, métabolites et transporteurs clés dans les nodosités indéterminées. *p 52*
- Figure 12** : Événements moléculaires associés aux premiers stades de la nodulation. *p 54*
- Figure 13** : La voie d'autorégulation de la nodulation (AON). *p 58*
- Figure 14** : Effets des phytohormones sur la nodulation des légumineuses. *p 60*
- Figure 15** : Stratégies d'adaptation au stress hydrique. *p 64*
- Figure 16** : Effets du stress hydrique sur les plantes et réponses possibles. *p 66*
- Figure 17** : Limitation de l'activité de fixation de l'azote. *p 74*
- Figure 18** : Réseau de régulation transcriptionnelle majeur des facteurs de transcription impliqués dans les réponses au stress hydrique. *p 78*
- Figure 19** : Experimental design used to characterize plant responses to water deficit and subsequent re-watering. *p 92*
- Figure 20** : Plant yield and yield components at physiological maturity are affected by water deficit applied during the vegetative stage. *p 100*
- Figure 21** : Plant growth during water deficit and subsequent re-watering. *p 100*
- Figure 22** : Water fluxes during water deficit and subsequent re-watering. *p 102*
- Figure 23** : Leaf area and radiation use efficiency during water deficit and subsequent re-watering. *p 102*
- Figure 24** : Biomass partitioning during water deficit and subsequent re-watering. *p 104*
- Figure 25** : Plant nitrogen status during water deficit and subsequent re-watering. *p 106*

Figure 26: Theoretical and conceptual frameworks for the analysis of plant drought resilience. *p 112*

Figure 27 : Design expérimental utilisé pour analyser les réponses au déficit hydrique et au ré-arrosage. *p 128*

Figure 28 : Explication de la méthode de comptage Mmquant avec un exemple. *p 136*

Figure 29 : Effet du déficit hydrique et du ré-arrosage sur l'accumulation d'acide abscissique (A) et d'acide salicylique (B) dans les racines. *p 138*

Figure 30 : Effet du déficit hydrique et du ré-arrosage sur l'accumulation d'acide abscissique (A), d'acide salicylique (B) et d'acide jasmonique (C) dans les nodosités. *p 140*

Figure 31 : Effet du déficit hydrique et du ré-arrosage sur l'accumulation de cytokinines dans les nodosités. *p 142*

Figure 32 : Diagramme de Venn représentant le nombre de métabolites identifiés et quantifiés dans les racines et les nodosités. *p 144*

Figure 33 : Analyse en composantes principales des données métabolomique obtenues pour les échantillons de racines. *p 146*

Figure 34 : Analyse en composantes principales des données métabolomique obtenues pour les échantillons de nodosités. *p 146*

Figure 35: Analyse par clustering hiérarchique des profils d'accumulation des métabolites différemment accumulés dans les racines en réponse au déficit hydrique et au ré-arrosage chez Kayanne et Puget. *p 150*

Figure 36 : Analyse par clustering hiérarchique des profils d'accumulation des métabolites différemment accumulés dans les nodosités en réponse au déficit hydrique et au ré-arrosage chez Kayanne et Puget. *p 152*

Figure 37 : Analyse en composantes principales des données transcriptomiques obtenues à partir des échantillons de racines et de nodosités. *p 156*

Figure 38 : Analyse en composantes principales des données transcriptomiques obtenues à partir des échantillons de racines. *p 158*

Figure 39 : Analyse en composantes principales des données transcriptomiques obtenues à partir des échantillons de nodosités. *p 158*

Figure 40 : Diagramme de Venn représentant le nombre de gènes différemment exprimés (DE) en réponse au déficit hydrique ou au ré-arrosage dans les racines (A et B) et les nodosités (C et D) des génotypes Kayanne et Puget. *p 160*

Figure 41 : Nombre de gènes sur-exprimés (UP) et sous-exprimés (DOWN) en réponse au déficit hydrique et au ré-arrosage dans les racines (A et C) et les nodosités (B et D) pour les génotypes Kayanne (A et B) et Puget (C et D). *p 160*

Figure 42 : Analyse par clustering hiérarchique des gènes différemment exprimés (DE) à la fois chez Kayanne et chez Puget dans les racines. *p 162*

Figure 43 : Analyse par clustering hiérarchique des gènes différemment exprimés (DE) à la fois chez Kayanne et chez Puget dans les nodosités. *p 164*

Figure 44 : Analyse des gènes différentiellement exprimés spécifiquement chez Kayanne ou chez Puget dans les racines. *p 168*

Figure 45 : Analyse des gènes différentiellement exprimés spécifiquement chez Kayanne ou chez Puget dans les nodosités. *p 170*

Figure 46 : Effet du déficit hydrique et du ré-arrosage sur l'accumulation des métabolites et sur l'expression des gènes codant les enzymes impliqués dans la voie de fixation de l'azote dans les nodosités. *p 172*

Figure 47 : Effet du déficit hydrique et du ré-arrosage sur l'accumulation des métabolites et sur l'expression des gènes codant les enzymes impliqués dans le métabolisme carboné et azoté dans les racines. *p 176*

Figure 48 : Comparaison des génotypes Kayanne et Puget pour leurs réponses transcriptionnelle, métabolique et hormonale dans les racines. *p 178*

Figure 49 : Comparaison des génotypes Kayanne et Puget pour leurs réponses transcriptionnelle, métabolique et hormonale dans les nodosités. *p 180*

Liste des tableaux

Table 1: Photosynthesis and symbiotic nitrogen fixation activity (sNFA) after two weeks of water deficit and one week of re-watering. *p 106*

Table 2: Carbon and nitrogen allocations after two weeks of water deficit and one week of re-watering. *p 108*

Tableau 3 : Statistiques d'alignement des lectures sur le génome pour les échantillons issus des racines et des nodosités. *p 136*

Tableau 4 : Voies métaboliques surreprésentées dans chaque cluster des heatmap issues des données de racines (A) et de nodosités (B). *p 154*

Introduction générale

Devant l'augmentation démographique et face au besoin de nourrir une population toujours plus importante, une démarche de culture dite intensive a été mise en place depuis les années 1960. Cette démarche vise à maximiser la production des cultures via une mécanisation importante et une utilisation accrue d'intrants chimiques (produits phytosanitaires, engrais, ...) (Tilman *et al.*, 2002). Cela a effectivement permis une augmentation de la production agricole ainsi qu'une élévation importante du rendement des cultures. Cependant, ce système de production a également eu de grandes conséquences, à la fois sur l'environnement et sur la santé, avec notamment une pollution des sols et des eaux souterraines ainsi qu'une diminution importante de la biodiversité (Stoate *et al.*, 2001).

Depuis quelques décennies, il y a une prise de conscience des effets néfastes que peut avoir ce type d'agriculture. Ainsi, les acteurs de la recherche et de l'agriculture se tournent de plus en plus vers une agriculture plus « durable », c'est-à-dire des systèmes de production visant à assurer une production pérenne, donc économiquement viable, tout en respectant l'environnement et cela dans le bien-être social (Landais, 1998). Dans ce contexte, des efforts de recherche se sont intensifiés autour de l'agroécologie. Ce concept vise à améliorer la production agricole dans le respect de l'environnement et de la biodiversité (Wezel *et al.*, 2009), en s'appuyant sur les fonctionnalités naturelles favorables des écosystèmes pour les maximiser et ainsi favoriser les différents services écosystémiques et permettre une réduction des intrants. L'un des leviers envisagés dans un contexte agroécologique, consiste notamment à favoriser les interactions biologiques favorables inter-plantes ou entre plantes et micro-organismes du sol.

Dans ce contexte, les légumineuses, telles que le pois, représentent des cultures d'intérêt majeur. Cela est d'autant plus vrai que l'azote est l'un des nutriments les plus limitants pour cette plante (Doré *et al.*, 1998; Davidson *et al.*, 2007). En effet, les légumineuses ne nécessitent aucune fertilisation azotée pour leur culture du fait de leur capacité à fixer le diazote atmosphérique grâce à une symbiose avec des bactéries du sol. Elles constituent également d'excellents précédents culturaux de par l'azote qu'elles restituent au sol via la minéralisation des résidus de culture. Leur introduction dans les rotations culturales permet ainsi de réduire l'utilisation de fertilisants azotés, à la fois sur les légumineuses et sur les cultures suivantes, mais également de réduire l'utilisation de produits phytosanitaires à l'échelle de la rotation, leur introduction participant à casser le cycle de certains ravageurs ou

maladies (Munier-Jolain and Carrouee, 2003). Cette économie d'intrants permet de réduire la consommation en énergie fossile ainsi que les émissions de gaz à effet de serre associées à leur fabrication et à leur épandage. De ce fait, les légumineuses peuvent contribuer à réduire les effets liés au changement climatique (Jensen *et al.*, 2012).

Cependant, ces effets bénéfiques associés aux légumineuses sont valables uniquement si elles maintiennent leur rendement ainsi que leur fixation symbiotique de l'azote atmosphérique. Or la fixation symbiotique est très sensible aux stress, qu'ils soient biotiques ou abiotiques (Salon *et al.*, 2001), et tout particulièrement au stress hydrique (Zahran, 1999).

Dans le contexte actuel de changement climatique, nous faisons face à des évènements de sécheresse plus fréquents et plus intenses (Bernstein *et al.*, 2007; Dai, 2013). Cela explique en partie les rendements fluctuants des légumineuses et peut contribuer à la diminution de la surface cultivée des légumineuses en Europe (Cernay *et al.*, 2015). Il y a donc aujourd'hui une réelle nécessité de concevoir de nouveaux idéotypes de légumineuses plus adaptés, à la fois aux conditions fluctuantes dues aux changements climatiques mais également aux nouveaux systèmes de cultures actuellement développés.

De nombreux travaux s'intéressent à la tolérance des légumineuses au stress hydrique. Cela fut d'ailleurs la thématique de mes **travaux de recherche lors de mon stage de Master 2**. J'avais alors travaillé sur une core-collection de génotypes de la légumineuse modèle *Medicago truncatula*. Les modifications d'architecture racinaire en réponse au stress hydrique, mimé par l'ajout de polyéthylène glycol, avaient été analysées pour chacun des génotypes et les signalisations précoces au niveau de la membrane plasmique des cellules racinaires (endocytose et changement du degré d'ordre de la membrane) avaient été caractérisées pour trois génotypes. Ces travaux ont été valorisés au cours de la thèse et font l'objet d'un article publié dans BMC Plant Biology, qui s'intitule « Drought stress stimulates endocytosis and modifies membrane lipid order of rhizodermal cells of *Medicago truncatula* in a genotype-dependent manner » (voir Annexe 1).

Cependant la stabilité du rendement ne dépend pas uniquement de la capacité des plantes à résister au stress mais également de leur capacité à récupérer après le stress. Cette seconde

période pourtant importante a longtemps été négligée et nécessite d'être prise en compte et plus étudiée.

Les objectifs de la thèse sont ainsi de :

1. Caractériser les mécanismes écophysiologiques mis en jeu lors d'un déficit hydrique, et lors de la période de récupération qui suit, notamment d'un point de vue des flux trophiques entre le pois et son symbiote *rhizobium*, afin d'identifier les mécanismes/traits favorables à une meilleure récupération.

2. Analyser les mécanismes moléculaires (déterminisme génétique et voies de régulation) sous-jacents à la récupération.

La démarche qui a été choisie consiste à étudier et comparer les réponses de deux génotypes de pois : Kayanne et Puget, lors d'un déficit hydrique et au cours de la période de ré-arrosage qui suit. La sélection de ces génotypes a été réalisée à partir de l'analyse d'une partie des données produites au sein du laboratoire en 2015 dans le cadre du projet européen LEGATO. Lors de cette expérimentation, 5 génotypes avec une architecture racinaire et une tolérance au stress hydrique différentes, ont été étudiés pour leur réponse à des stress hydriques répétés. Leur capacité à tolérer le stress hydrique et à récupérer après ce dernier a été évaluée au travers d'une caractérisation du développement et de la croissance des plantes avec un focus particulier sur l'architecture racinaire et la caractérisation nodulaire. Ces deux génotypes ont été sélectionnés du fait de leur niveau de tolérance au stress hydrique proche et de leur capacité de récupération contrastée.

Une première expérimentation a été mise en place pour laquelle les plantes, appartenant aux deux génotypes sélectionnés, ont été cultivées dans la plateforme de phénotypage à haut débit de Dijon (PPHD 4PMI) sous deux conditions de cultures : (1) condition témoin avec un apport optimal en eau (WW pour well watered), et (2) condition de déficit hydrique pendant 14 jours suivie d'un ré arrosage en apport optimal en eau (WD pour water deficit). Pour ces deux conditions, les plantes, inoculées avec Rhizobium, n'ont pas reçu d'azote minéral et étaient donc en conditions 100 % fixatrices de N₂. L'application du déficit hydrique et la période de récupération qui s'en suit se sont déroulées durant la période végétative. Une cinétique de prélèvement a été réalisée, avec des prélèvements répartis lors

du déficit hydrique et lors de la phase de récupération. Un dernier prélèvement a été réalisé à maturité physiologique afin d'évaluer l'impact du stress hydrique et l'efficacité de la récupération en terme de rendement. Lors des prélèvements, certaines plantes ont été dédiées aux analyses écophysiologiques (Chapitre 2) et d'autres aux analyses « omiques » (métabolomique, transcriptomique et dosage de phytohormones) (Chapitre 3), les deux types d'analyse ne nécessitant pas d'être réalisés à chaque prélèvement. Les analyses écophysiologiques ont consisté à une caractérisation structurale et fonctionnelle nous permettant de déterminer les processus écophysiologiques impliqués dans la récupération et de comparer la régulation de ces processus entre deux génotypes possédant des stratégies différentes. Les analyses « omiques » ont été réalisées sur les compartiments racinaires et nodulaires et nous ont permis d'analyser les mécanismes moléculaires sous-jacents à la récupération.

Une seconde expérimentation indépendante a été mise en place pour laquelle les plantes ont été cultivées dans les mêmes conditions que pour la première expérimentation. Les flux de carbone et d'azote ont été étudiés grâce à un marquage isotopique au $^{13}\text{CO}_2$ et au $^{15}\text{N}_2$ (Chapitre 2). Pour cela, deux épisodes de marquage ont été mis en place, l'un à la fin de la période de déficit hydrique et l'autre au cours de la période de récupération. Cela nous a permis de définir les stratégies d'allocation (en carbone et en azote) mises en place au sein de la plante et entre la plante et le rhizobium.

C'est dans le cadre du **projet européen LEGATO** (Legumes for the agriculture of tomorrow) que s'inscrit cette thèse. Ce projet, dont l'objectif était d'accroître la place des légumineuses à graines dans les systèmes de culture, a regroupé 17 instituts de recherche et 10 entreprises ou associations professionnelles réparties sur 12 états européens. L'une des ambitions de ce projet consistait en une optimisation de l'adaptation des plantes aux stress abiotiques et notamment au stress hydrique. Le projet LEGATO a ainsi financé les expérimentations, ainsi que les analyses écophysiologiques, fluxomiques et transcriptomiques. Les analyses métabolomiques ont quant à elles été financées par l'institut technique Terres Inovia, dans le cadre de la **convention INRA-Terres Inovia « Stress Hydrique »**. Cette thèse a également été en partie financée par une société privée, le **groupe**

Roullier. Cette entreprise a fondé en 2015 le Centre Mondial de l'Innovation dont la plus grosse unité est consacrée à la recherche sur le végétal. Leurs recherches sont principalement axées sur l'étude de la croissance des plantes, leur développement (racinaire et aérien) ainsi que l'impact de différents stress biotiques et abiotiques tels que le stress hydrique et les carences nutritionnelles sur le rendement des plantes cultivées.

Cette thèse s'est réalisée dans le pôle GEAPSI (déterminismes Génétiques et Environnementaux de l'Adaptation des Plantes à des Systèmes de culture Innovants) de l'UMR Agroécologie de l'INRA de Dijon, au sein de deux équipes : l'équipe EcoLeg « écophysologie des légumineuses », dont l'une des principales thématiques est l'analyse de la nutrition azotée des légumineuses en interaction avec les microorganismes du sol, et l'équipe FILEAS « remplissage de la graine, remobilisation de l'azote et du soufre, et stress abiotique de fin de cycle », dont l'un des axes de recherche consiste à caractériser les acteurs moléculaires de la réponse du pois au stress hydrique. Elle a fait l'objet de collaborations avec Sophie Valière de la Plateforme Get-PlaGE, Genotoul de Toulouse et avec Gilles Clément et Sylvie Citerne de la Plateforme du Plateau Technique Spécifique de Chimie du Végétal de l'INRA de Versailles.

Ce manuscrit est organisé en 3 chapitres.

Le chapitre 1 est une synthèse bibliographique présentant les légumineuses et plus particulièrement le pois et notamment son système racinaire nodulé ainsi que des réponses développées suite à un épisode au stress hydrique et au ré-arrosage qui s'en suit.

Le chapitre 2 présente une caractérisation écophysologique de la réponse de deux géotypes de pois à un déficit hydrique, suivi d'une période de ré-arrosage. Ce chapitre est présenté sous la forme d'un article actuellement en cours de révision mineure à *Frontiers in Plant Sciences*.

Le chapitre 3 présente l'étude des bases moléculaires sous-jacentes à la récupération au sein du système racinaire nodulé de ces deux géotypes de pois. Il est divisé en plusieurs sous-parties correspondant chacune aux différents types d'analyse omiques : transcriptomique, métabolomique et dosages de phytohormones ainsi qu'une analyse ciblée de la fixation symbiotique dans les nodosités et du métabolisme du carbone et de l'azote dans les racines.

Ce manuscrit se termine par une conclusion générale de la thèse et la présentation de perspectives de recherche.

Chapitre 1 :

Synthèse bibliographique

I- Les légumineuses et le pois

1- Les légumineuses

Les légumineuses sont des plantes dicotylédones appartenant à la famille des Fabacées, la 3^{ème} plus grande famille des angiospermes avec près de 20 000 espèces (Smýkal *et al.*, 2015). On distingue deux types de légumineuses cultivées : les légumineuses dites fourragères, pour lesquelles l'ensemble de la partie végétative est récoltée (comme par exemple la luzerne et le trèfle) et les légumineuses à graines, où seules celles-ci sont récoltées (*e.g.* le pois, la féverole, la lentille, le pois chiche).

a- Avantages des légumineuses

Les légumineuses regroupent différentes caractéristiques faisant d'elles des cultures d'intérêt majeur (Stagnari *et al.*, 2017). Les graines et les fourrages constituent une source de protéines végétales de bonne valeur nutritionnelle utilisées pour l'alimentation animale ou humaine (graines). Les légumineuses ont également la capacité de pouvoir s'associer avec des bactéries du sol fixatrices d'azote de type *rhizobia* au sein de structures racinaires appelées nodosités (Rhijn and Vanderleyden, 1995). Cette interaction bénéfique, que l'on nomme symbiose rhizobienne, constitue une seconde voie d'acquisition de l'azote pour la plante hôte légumineuse, complémentaire à l'assimilation des ressources azotées minérales du sol par les racines. De ce fait, la culture des légumineuses ne nécessite pas d'apport d'engrais azoté. De plus, les reliquats azotés laissés dans le sol après la culture d'une légumineuse sont beaucoup plus riches en azote que ceux laissés par la culture d'une céréale. Cela permet une réduction moyenne de 20 à 60 kgN/ha des apports d'engrais azotés à la culture suivant la légumineuse dans une rotation, faisant de ces plantes de bons précédents de culture (Munier-Jolain and Carrouee, 2003). Cette diminution de l'utilisation d'engrais azoté entraîne une diminution du dégagement de gaz à effet de serres ainsi qu'une baisse de la consommation en énergie fossile associée à la fabrication et l'épandage de ces intrants. Les cultures de légumineuses émettent ainsi près de trois fois moins de N₂O que les cultures de céréales (Jensen *et al.*, 2012). De plus, l'introduction de légumineuses dans une rotation culturale participe d'une part à augmenter la diversité (microbienne, des insectes, ...) mais également à créer une rupture dans le cycle de certains ravageurs et peut ainsi permettre une réduction de l'utilisation de produits phytosanitaires (Munier-Jolain and Carrouee, 2003).

b- La culture des légumineuses en France et en Europe

La culture de légumineuses, à graines comme fourragères, a connu un large déclin à partir des années 1960. Ceci s'explique d'une part par une intensification des élevages, et d'autre part par une importation massive de soja et un soutien politique européen en faveur des céréales (Cavaillès, 2009). Cela a conduit progressivement à un remplacement des légumineuses par la culture de maïs ensilage et de graminées monospécifiques abondamment fertilisées permettant ainsi de produire plus. Seules les légumineuses en association prairiales se sont maintenues. La culture des légumineuses à graines a ensuite connu un essor de courte durée dans les années 1980 avec la mise en place d'aides de l'Europe (PAC : Politique Agricole Commune). Cependant, du fait de leur rendement très variable et de l'évolution de leur rendement bien plus lente que celle du blé, certainement dû à un moindre investissement de la sélection variétale, la culture des légumineuses a très fortement diminué jusqu'à atteindre des surfaces inférieures à 400 000 ha (Voisin *et al.*, 2013).

Dans un contexte de la transition agroécologique, les légumineuses occupent donc une place de choix de par leurs avantages nutritionnels (richesse en protéines), économiques et environnementaux (pas d'apport de fertilisation azotée et enrichissement du sol en azote). Elles ont ainsi un rôle majeur dans le développement de systèmes agricoles plus durables et sont progressivement revenues au centre des nouvelles questions de recherche. Alors que les légumineuses étaient principalement cultivées en monoculture ou en tête de rotation elles sont progressivement réintroduites en association dans l'espace (association pluri-espèces) ou le temps (rotation culturale) (Voisin *et al.*, 2013).

En 2017, la France était le principal pays producteur de légumineuses avec 1348 Kt de légumineuses produites par an, juste devant l'Italie et le Royaume-Uni respectivement à 1138 Kt et 927 Kt. Bien que la surface cultivée des légumineuses en France ait diminué pendant une vingtaine d'années (entre 1990 et 2008), elle semble ré-augmenter depuis ces dix dernières années passant d'un peu de moins de 200 Kha en 2008 à 400 Kha en 2018. En 2017, la légumineuse la plus produite était le pois avec 707 Kt suivie du soja et de la féverole avec 414 Kt et 212 Kt respectivement (Terres Univia, 2018).

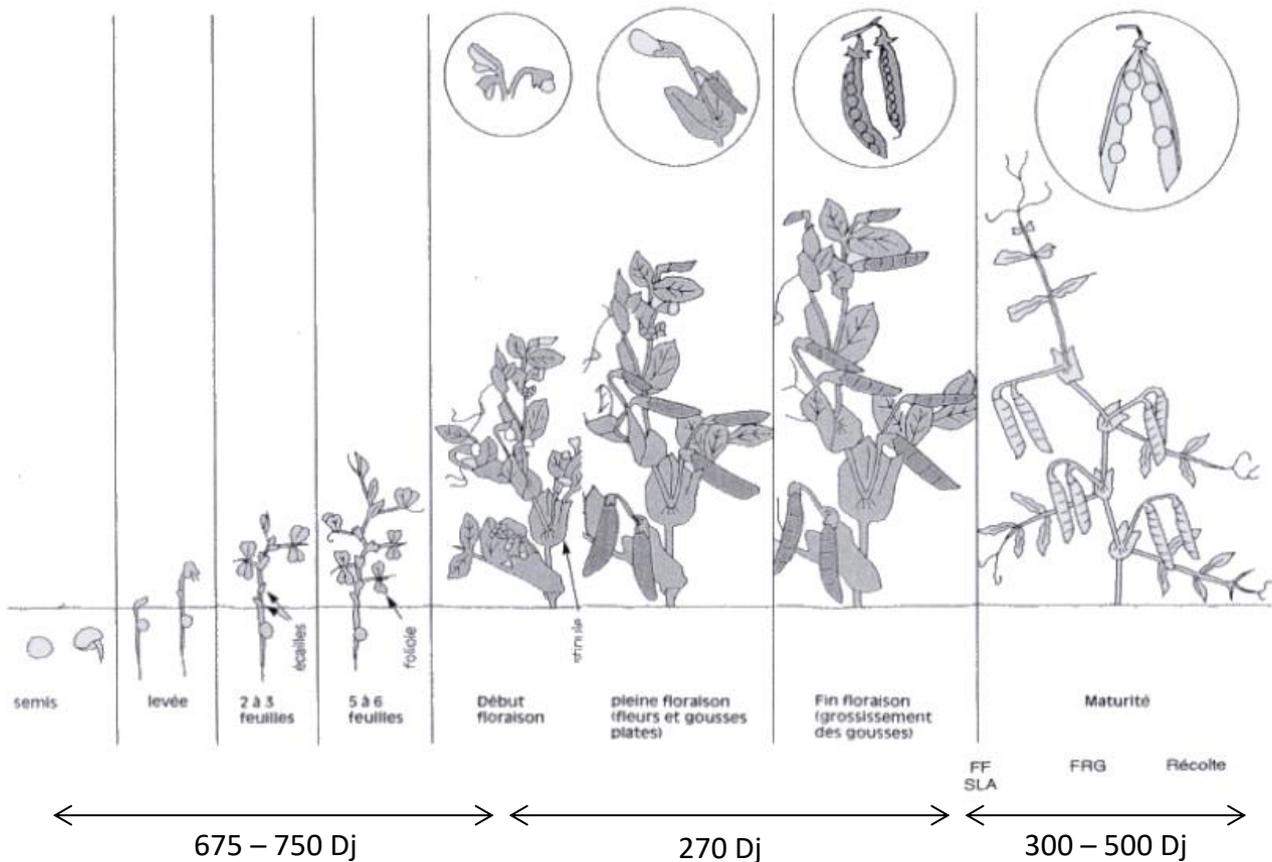


Figure 1 : Principales étapes du cycle de développement du pois (d'après Boyeldieu, 1999)
 Les degrés jour (Dj) indiqués correspondent à une moyenne obtenue pour le pois de printemps.
 FF : fin de floraison, SLA : stade limite d'avortement, FRG : fin de remplissage des graines,

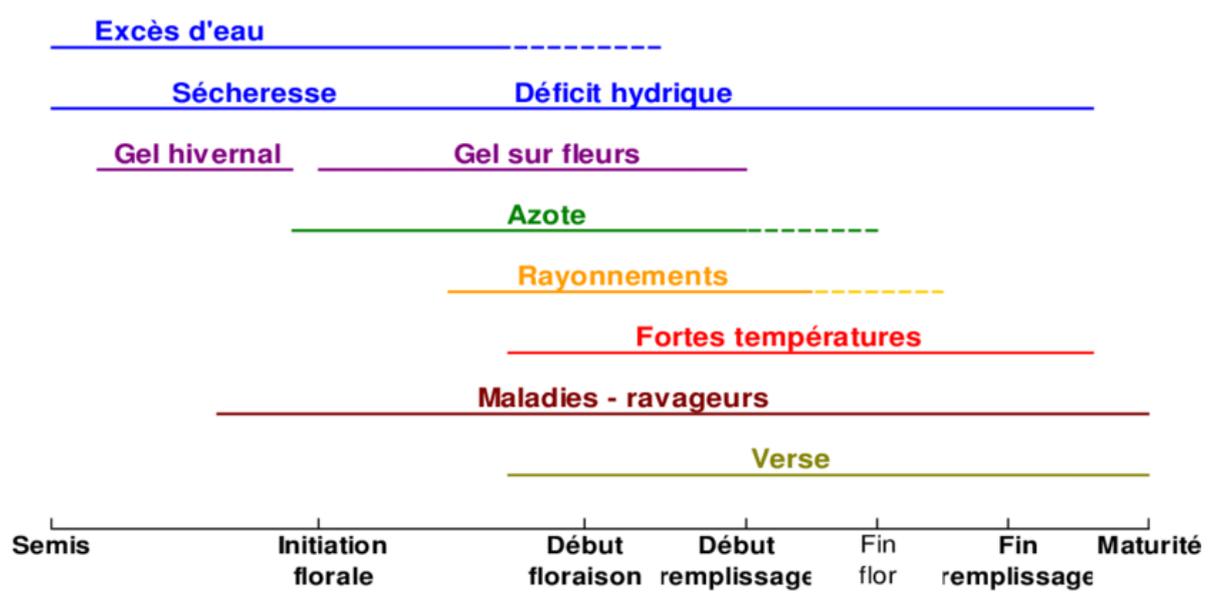


Figure 2 : Facteurs limitant du pois et répartition au cours de son cycle de développement (d'après Lecomte *et al.*, 2009).

2- Le pois

Le Pois (*Pisum sativum* L.) fait partie des légumineuses à graines. Principalement cultivé pour la production de ses graines sèches riches en protéines (entre 20 et 25 % du poids sec total), il est également nommé pois protéagineux. Les graines de pois sont utilisées dans l'alimentation animale en complément des céréales, notamment pour les filières avicole, porcine et bovine, mais également dans l'alimentation humaine. En effet, les céréales sont pauvres en lysine contrairement aux graines de pois et leur association permet de les compléter mutuellement pour leurs acides aminés déficitaires. Pour ce second débouché, deux filières se distinguent : l'utilisation directe des graines entières décortiquées (« pois cassé »), et l'utilisation en tant qu'ingrédients fonctionnels, obtenus par concentration et purification des protéines extraites des graines, et utilisés dans l'industrie agroalimentaire (Denhartig, 2015).

Cycle de développement. Le pois est une plante annuelle sans dormance, qui peut être semée sans besoin de vernalisation. Son cycle de développement peut être divisé en plusieurs phases distinctes : la levée, le développement végétatif, la floraison, le remplissage des graines (correspondant à l'accumulation des protéines de réserve) et la maturité physiologique (Munier-Jolain *et al.*, 2005, Figure 1). D'un point de vue cultural, on distingue deux types de pois protéagineux, le pois de printemps qui se sème entre février et mars et se récolte en juillet, et dont le cycle de développement est de 90 à 140 jours, et le pois d'hiver qui se sème début novembre et se récolte fin juin. Le pois d'hiver a l'avantage d'avoir un cycle de culture plus long (en moyenne 240 jours) permettant d'améliorer le rendement mais également d'éviter les stress de fin de cycle tels que le stress thermique ou hydrique. On distingue deux types de pois d'hiver, les variétés dites « hr » (high response) non réactives à la photopériode et les variétés dites « Hr » répondant de manière qualitative à la photopériode. Cette réponse à la photopériode permet d'éviter une floraison trop précoce et de réduire les risques de gel à floraison. En effet, il existe différents facteurs pouvant être limitants pour l'élaboration du rendement tout au long du cycle de culture (Lecomte *et al.*, 2009, Figure 2).

Morphologie du pois. D'un point de vue botanique, le pois est une plante grimpante herbacée annuelle. Les variétés cultivées en France sont de type indéterminé. L'appareil aérien est composé d'une ou plusieurs tiges présentant toutes la même organisation : un empilement

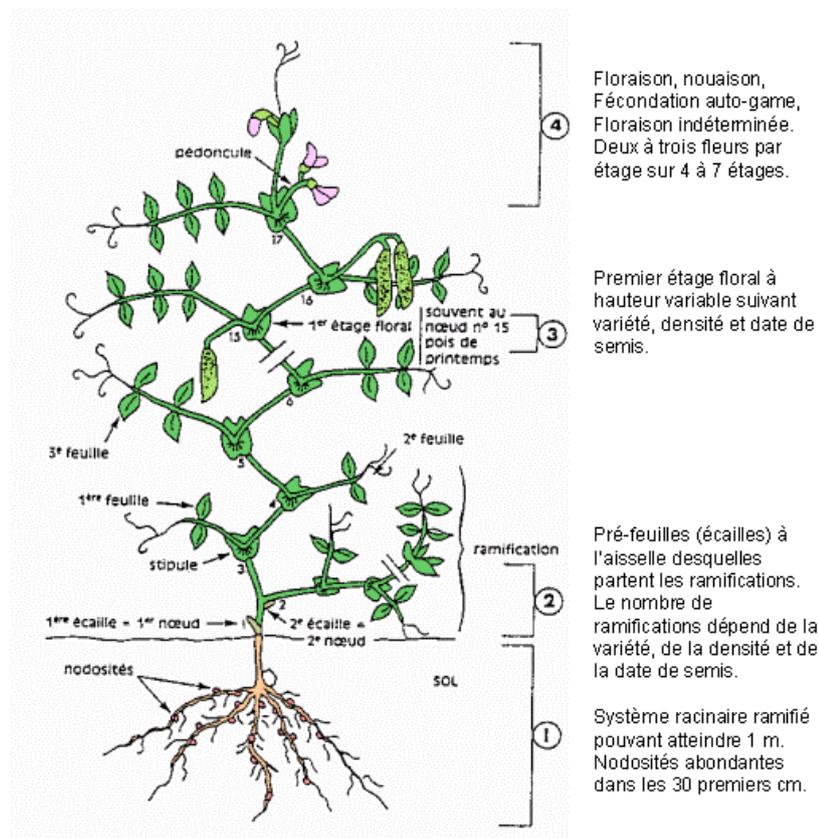


Figure 3 : Anatomie d'une plante de pois (d'après Boyeldieu, 1999).

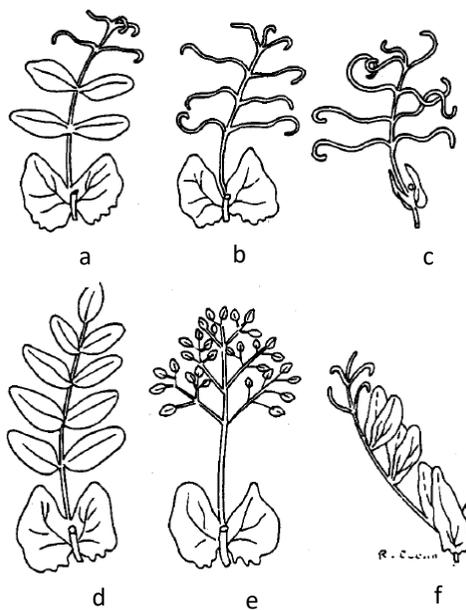


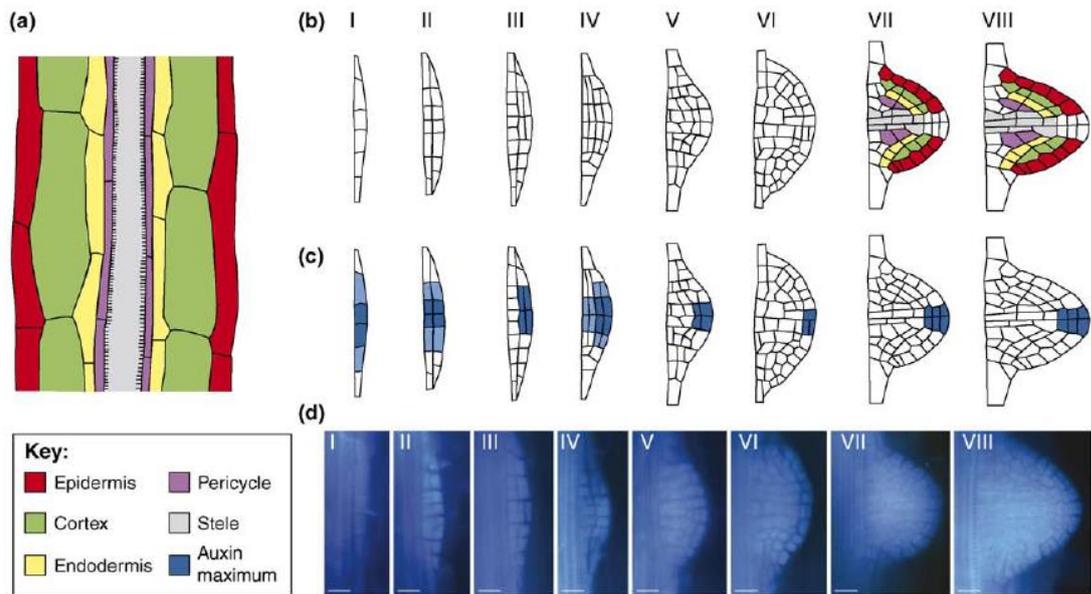
Figure 4 : Différents types morphologiques de feuilles de pois (d'après Cousin, 1997).

(a) feuilles de type sauvage, (b) feuilles de type afila, (c) feuilles afila et « st » (le gène *st* induit une réduction de la taille des stipules), (d) feuilles « tl » (le gène *tl* transforme les stipules en folioles), (e) feuilles afila et « tl », (f) feuilles avec la mutation « rogue » (le gène *rogue* réduit la largeur des stipules et des folioles).

d'unités structurales, les phytomères, se terminant par un méristème caulinaire. Chaque phytomère est composé d'un entre nœud, d'une feuille et d'un méristème axillaire (Munier-Jolain *et al.*, 2005, Figure 3). La feuille de pois est une feuille de type composé, constituée de deux stipules à la base du pétiole puis de folioles et se termine par des vrilles. Chez certaines variétés nommées afila, les folioles sont complètement transformés en vrilles (Figure 4b). Ce caractère, sélectionné afin d'améliorer la culture du pois, et issu de la sélection d'une mutation du gène '*af*', permet aux plantes de s'accrocher entre elles, ce qui les rend plus tolérantes à la verse. Les pois actuellement cultivés en France sont majoritairement de type afila. Il existe cependant différents phénotypes intermédiaires (Cousin, 1997, Figure 4).

La morphologie du système racinaire nodulé du pois est détaillé plus loin dans la section II-3).

Développement de ressources en génomique du pois. D'un point de vue génétique, le pois est une espèce diploïde. Son génome, de 4.5 Gb (Giga bases), est composé de 7 paires de chromosomes (Kreplak *et al.*, 2019). Les études conduites sur le pois ont pendant de longues années et encore aujourd'hui fait appel aux ressources génétiques disponibles chez la légumineuse modèle *Medicago truncatula*, notamment grâce à la synténie entre ces deux espèces, c'est-à-dire la conservation de l'ordre dans lequel les gènes sont situés sur les chromosomes (Aubert *et al.*, 2006). Cependant, durant ces dix dernières années, de nombreux outils et ressources génétiques et génomiques ont été développés chez le pois. En particulier, l'année 2019 marque un tournant avec la publication de la première séquence du génome du pois (cv Caméor, Kreplak *et al.*, 2019). Au total, 3.9 Gb (Giga bases) sur les 4.5 Gb totales ont été assemblées, représentant 44756 gènes. La communauté pois dispose également depuis 2015 d'un transcriptome correspondant au séquençage de 20 banques d'ADNc produites dans des conditions de culture variées et à partir d'organes différents (notamment racines et nodosités) (Alves-Carvalho *et al.*, 2015). Une population de mutants TILLING (Targeting Induced Local Lesions in Genomes) chez le génotype de référence Caméor a également été développé dans l'UMR, facilitant ainsi la caractérisation fonctionnelle des gènes, le pois étant une espèce difficile à transformer génétiquement (Dalmais *et al.*, 2008). Enfin, l'UMR Agroécologie héberge une collection de plus de 380 accessions de pois représentant une large diversité génétique et dont une partie a été génotypée (Projet PIA PEAMUST, projet ANR GRASP) ouvrant la voie à des analyses de génétique d'association chez le pois.



TRENDS in Plant Science

Figure 5 : Développement des racines latérales chez Arabidopsis (d'après Péret *et al.*, 2009).

(a) Tissus composant la racine d'Arabidopsis. Les racines latérales sont initiées à partir des cellules du péricycle. (b) Schéma du développement du primordium racinaire en huit étapes (I à VIII). (c) Localisation des maxima d'auxine (en bleu) lors de l'initiation du primordium racinaire. (d) Images de racines colorées au bleu d'aniline pour chaque stade de développement du primordium racinaire (I à VIII). Barres d'échelle : 20 μm.

II- Le système racinaire

La racine, en plus de son rôle d'ancrage de la plante dans le sol, est l'organe responsable du prélèvement de l'eau et des nutriments. Elles sont en contact direct avec les micro-organismes du sol et peuvent interagir avec eux par des échanges de signaux, notamment via la rhizodéposition de différents composés tels que des sucres, des acides organiques ou de petites molécules. En raison de leur caractère sessile, les plantes ont acquis une importante plasticité, tant en termes de réponses physiologiques qu'en termes de développement, leur permettant ainsi de s'adapter à leur environnement.

1- Mise en place et développement des racines

Chez le pois, comme pour la majorité des espèces dicotylédones, le système racinaire est de type pivotant, c'est-à-dire qu'il est composé d'une racine principale ou primaire, le pivot, sur lequel peuvent se développer de multiples racines latérales d'ordres croissants (racines secondaires, tertiaires,...). La croissance de la racine primaire s'initie dès le stade embryonnaire. Elle est rapide au moment de la germination puis ralentit au fur et à mesure de l'épuisement des réserves de la graine (Tricot *et al.*, 1997). La mise en place des racines latérales s'initie dans un second temps (pour une revue voir Péret *et al.*, 2009).

Le développement des racines latérales commence par l'initiation de primordia racinaires. Ces derniers sont issus de la dédifférenciation de cellules du péricycle se situant à l'opposé des pôles de xylème (Dolan *et al.*, 1993, Figure 5). Dans un premier temps, plusieurs cycles de divisions anticlinales permettent la création du primordium, composé d'un maximum de 10 cellules de taille similaire réparties en une unique couche cellulaire : c'est le stade I de développement (Malamy and Benfey 1997, Figure 5). S'en suit alors une succession de divisions, péricleinales et anticlinales, donnant progressivement une forme de dôme au primordium et permettant la création des différents tissus composants la future racine (épiderme, cortex, endoderme, péricycle et faisceaux vasculaires, Figure 5a et 5b) : ce sont les stades de développement II à VII (Figure 5). Au stade VIII de développement, la racine latérale émerge de la racine mère par expansion cellulaire (Dubrovsky *et al.*, 2001). Le méristème de cette nouvelle racine s'active alors et sa croissance démarre. Le développement des racines latérales a largement été décrit chez *Arabidopsis thaliana*, mais une étude conduite sur *Medicago truncatula* par Herrbach *et al.*, (2014) a permis de

comparer les étapes de développement chez ces deux espèces. Bien que le développement des racines latérales soit assez similaire, l'implication de divisions non seulement au niveau des cellules du péricycle, comme *Arabidopsis thaliana*, mais aussi au niveau de l'endoderme et certaines couches du cortex dans la formation des racines latérales a été soulignée.

Classiquement, une racine d'angiosperme peut être divisée en 4 zones distinctes le long de l'axe proximo-distal. En partant de la pointe racinaire, on trouve tout d'abord la zone méristématique correspondant à la zone de division cellulaire active, ainsi que la coiffe puis la zone de transition où les cellules arrêtent de se diviser et commencent à s'allonger, ensuite la zone d'élongation où les cellules subissent une élongation rapide et enfin la zone de différenciation, zone dans laquelle les structures se différencient et où les poils racinaires apparaissent (Ubeda-Tomás *et al.*, 2012). Les poils racinaires ont notamment un rôle important dans le prélèvement de l'eau et des nutriments mais également dans l'élaboration de la symbiose rhizobienne (*cf* partie II).

2- Prélèvement de l'eau et des nutriments

a- Prélèvement de l'eau

L'eau est prélevée du sol par les racines, au niveau des poils absorbants puis transportée jusqu'au xylème où elle circule en suivant un gradient de potentiels hydriques décroissants jusqu'à être libérée dans l'atmosphère par la transpiration. Le transport de l'eau peut donc être divisé en deux parties : un transport du sol jusqu'au xylème selon l'axe radial de la racine puis un transport via le xylème depuis les racines jusqu'à la partie aérienne.

Lors du transport jusqu'au xylème, l'eau circule via trois voies, la voie apoplastique, c'est à dire par diffusion à travers la paroi, la voie symplastique, en utilisant le cytoplasme des cellules végétales grâce aux plasmodesmes et la voie trans-cellulaire, faisant intervenir des canaux d'eau. Au niveau de l'endoderme, les cellules sont subérifiées obligeant ainsi l'eau à pénétrer par la voie symplastique qui agit comme un filtre. Les canaux d'eau majoritairement trouvés dans les racines sont les aquaporines. Elles jouent un rôle clé dans le transport trans-cellulaire de l'eau et peuvent également permettre une régulation fine du prélèvement en eau. Elles sont retrouvées à la fois au niveau de la membrane plasmique et au niveau du tonoplaste (Javot and Maurel, 2002).

La circulation de l'eau dans la plante s'effectue principalement par un transport passif qui repose d'une part sur les forces de succion et d'autre part sur les forces osmotiques. Les forces de succion sont dues à la transpiration prenant place au niveau aérien. En effet, l'eau en s'évaporant à travers les stomates des feuilles crée une augmentation de la tension dans le xylème qui se propage alors à chaque segment de racine selon le principe de cohésion-tension (Steudle, 2001). Dans le xylème, la transpiration constitue le principal moteur pour la circulation de l'eau dans la plante mais elle entraîne aussi une augmentation de la pression osmotique des cellules racinaires. Ainsi, l'eau circule également grâce aux forces osmotiques reposent quant-à elles sur les différences de pression osmotique existant entre les poils absorbants et la solution du sol. En effet, par osmose, l'eau va passer du compartiment le moins concentré (le sol) vers le compartiment le plus concentré (les cellules racinaire).

Cette entrée d'eau n'est cependant possible que lorsque la pression osmotique des poils absorbants est supérieure à celle de la solution du sol, l'eau passe alors. Dans le cas contraire, par exemple la nuit lorsque les stomates sont fermés, un transport actif peut se mettre en place via la poussée racinaire. Cette poussée racinaire est due à une accumulation de solutés dans les racines permettant de créer une force osmotique et de faire entrer l'eau dans les racines par pression hydrostatique.

Les stomates agissent comme des régulateurs du flux d'eau dans la plante. En se fermant plus ou moins, ils permettent de moduler la transpiration afin que les flux d'eau au niveau des racines correspondent à la demande évaporative (Tardieu *et al.*, 2017). La quantité d'eau transpirée par la plante est donc fonction de la conductance stomatique et de la demande évaporative atmosphérique en eau de la plante. Cependant, il y a également une régulation par rapport au déficit de pression de vapeur, c'est-à-dire à la différence entre l'humidité de l'air et l'humidité de l'air à saturation. Ainsi, lorsque l'humidité de l'air est basse et donc la demande évaporative haute, cette régulation permet la fermeture des stomates afin d'éviter une perte d'eau trop importante (Fletcher *et al.*, 2007). Enfin la transpiration est également modulée par la disponibilité du sol en eau (Couvreur *et al.*, 2014).

b- Prélèvement des nutriments

Les racines et plus précisément les poils racinaires sont le lieu de prélèvement des nutriments. Ce prélèvement est effectué par transport actif grâce à un gradient

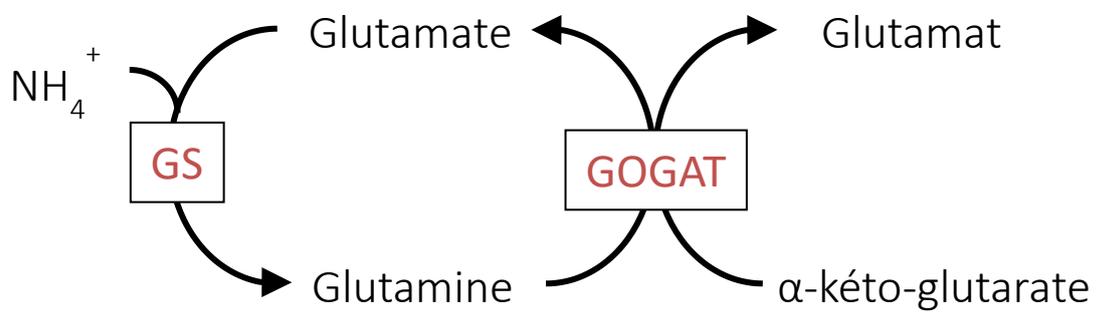


Figure 6 : Assimilation de l'ammonium via le cycle GS/GOGAT.

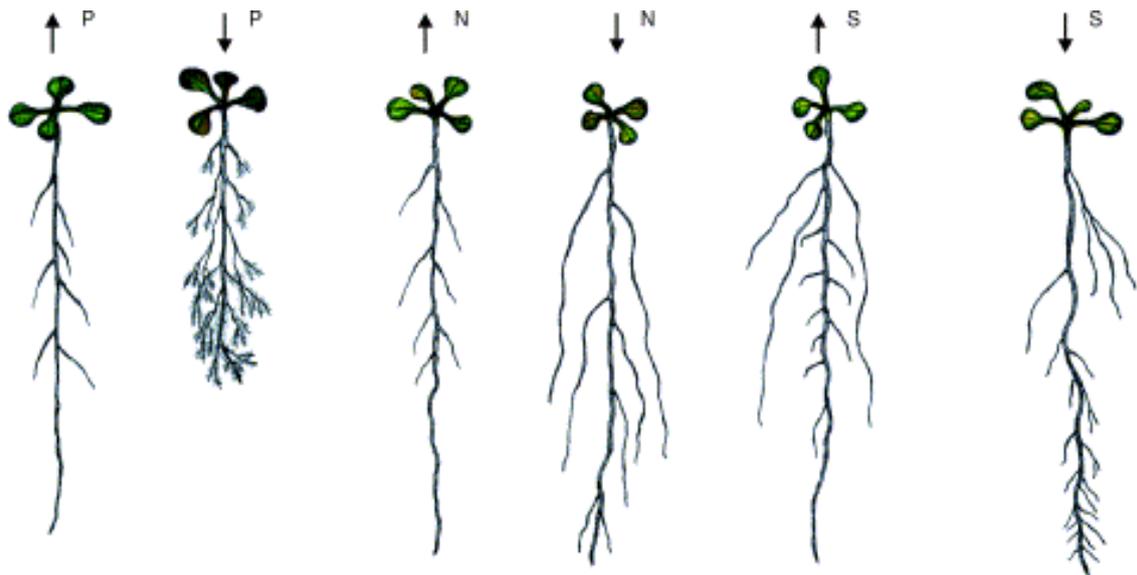
GS : Glutamine synthétase; GOGAT : Glutamine Oxoglutarate AminoTransférase.

électrochimique généré au niveau de la membrane plasmique des poils absorbants principalement par des H⁺-ATPase (Gilroy and Jones, 2000). Différents transporteurs localisés à la membrane plasmique sont ainsi impliqués, que ce soit dans le prélèvement des nutriments (transporteurs au niveau des poils racinaires) ou dans leur transport dans les racines et vers les autres organes (transporteurs au niveau des cellules du phloème) (Chen *et al.*, 2008). Notamment en ce qui concerne les macro-nutriments, PT1 et PT2 (Muchhal *et al.*, 1996), un transporteur de haute affinité permet le prélèvement du phosphate et certains des transporteurs Sultr, des transporteurs de haute affinité sont impliqués dans le prélèvement et le transport du sulfate (Yoshimoto *et al.*, 2002, 2003). De la même manière, différents canaux de potassium ont été décrits tel que AKT1 chez *Arabidopsis thaliana* (Hirsch *et al.*, 1998). Les légumineuses au même titre que les autres plantes prélèvent de l'azote par leurs racines, sous forme de nitrate (NO₃) principalement. On distingue deux familles de transporteurs pour le nitrate, les transporteurs de haute affinité (HATS) avec notamment NRT2, et les transporteurs de basse affinité (LATS) parmi lesquels sont retrouvés NRT1/PTR (Wang *et al.*, 2012). Une fois absorbé, le nitrate peut être soit stocké de manière transitoire dans la vacuole, soit être exporté vers le xylème, soit être réduit en ammonium. Cette réduction implique deux enzymes, la nitrate réductase puis la nitrite réductase. Une fois réduit en ammonium, ce dernier est assimilé sous forme de glutamine via le complexe GS/GOGAT (Figure 6).

L'efficacité du prélèvement de l'eau par les racines est également dépendante de l'architecture du système racinaire (Tron *et al.*, 2015). Cette dernière peut en effet constituer un levier d'amélioration, lorsque les conditions hydriques de milieu sont limitantes par exemple. Le prélèvement des nutriments est lui aussi dépendant de l'architecture racinaire (Li *et al.*, 2016) mais cette dernière est également modulée par la disponibilité des différents nutriments dans le sol (Lopez-Bucio *et al.*, 2003).

3- L'architecture racinaire et sa modulation en réponse à l'environnement

L'architecture racinaire regroupe toutes les caractéristiques du système racinaire. Cela inclut la typologie du système, c'est-à-dire le type de racines (primaire versus latérales) et leur morphologie (longueur, diamètre, etc.), mais également la topologie du système, c'est-à-dire l'agencement des racines dans l'espace comme par exemple l'ordre topologique des racines (primaire, secondaire, tertiaire, ...), leur niveau de ramification, ou encore leur angle



Current Opinion in Plant Biology

Figure 7 : Modification de l'architecture racinaire chez *Arabidopsis* en réponse à différentes disponibilités en nutriments du milieu (d'après Lopez-Bucio *et al.*, 2003).

Les systèmes racinaires ont été cultivés dans des milieux riches en nutriments avec ou sans phosphore (P), azote (N) ou soufre (S). Les flèches vers le haut signifient un apport de cet élément et donc des conditions non limitantes et les flèches vers le bas signifie une carence pour cet élément.

d'insertion.

a- Déterminisme génétique de l'architecture racinaire

Des QTLs (quantitative trait loci) associés à différents traits d'architecture racinaire ont été identifiés chez différentes espèces et notamment chez le maïs (Li *et al.*, 2015) et chez le pois (Bourion *et al.*, 2010). Il existe en effet une grande variabilité d'architecture racinaire chez le pois (McPhee, 2005). Ces QTLs peuvent ainsi être utilisés en sélection variétale pour des traits d'architectures identifiés comme favorables. Un des gènes clés de la régulation de l'architecture racinaire est le gène DRO1. Il a été mis en évidence chez le riz par Uga *et al.*, (2013) et est régulé négativement par l'auxine. Il induit une modification de l'angle d'insertion des racines latérales permettant ainsi une exploration plus en profondeur. DRO1 a par la suite été mis en évidence chez d'autres espèces telles que *Arabidopsis* ou *Prunus* (Guseman *et al.*, 2017).

b- Modulation de l'architecture par l'environnement

L'architecture racinaire est déterminée génétiquement mais aussi en interaction avec l'environnement (Malamy, 2005; Hodge *et al.*, 2009). Ainsi le nombre, le positionnement ainsi que la direction de la croissance des racines est variable selon l'environnement. L'architecture racinaire est fortement influencée par la structure du sol et les stress biotiques et abiotiques (par exemple, attaque de ravageurs, stress hydrique, stress salin, fortes / faibles températures, ...) (Malekpoor Mansoorkhani *et al.*, 2014). Cette grande plasticité, qui passe notamment par des modifications de la croissance des racines, de la formation des racines latérales ainsi que du développement des poils racinaires. Les racines collectent ainsi les signaux environnementaux et adaptent en conséquences leur croissance et leur développement (Malamy, 2005). En effet, les racines agissent comme capteurs dans la rhizosphère et détectent les quantités d'eau et des différents nutriments dans le sol, et peuvent modifier leur architecture afin de s'adapter (López-Bucio *et al.*, 2003; Jongrunklang *et al.*, 2014; Malekpoor Mansoorkhani *et al.*, 2014). Des modifications de cette architecture ont été décrites chez *Arabidopsis thaliana* en réponse à la disponibilité de certains nutriments dans le milieu (López-Bucio *et al.*, 2003). Par exemple, alors qu'une carence en azote entraîne une augmentation de la longueur des racines latérales, une carence en phosphore induit

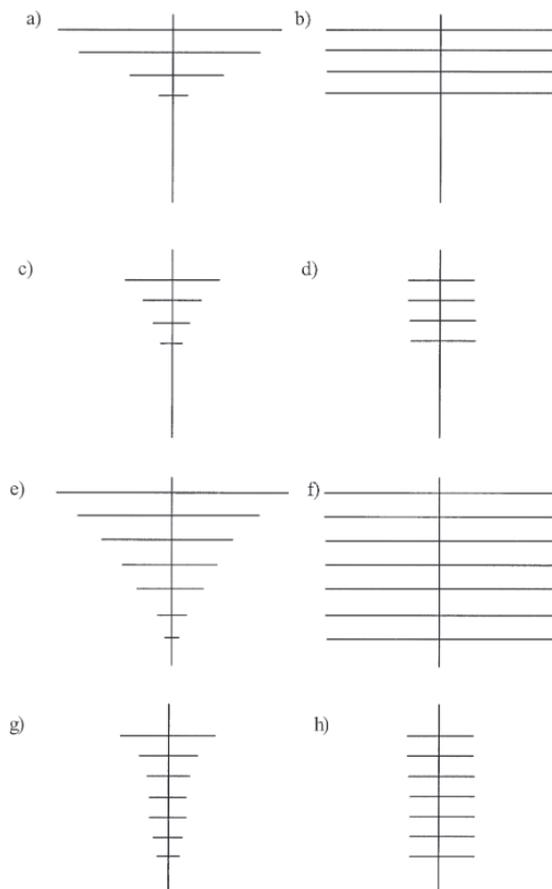


Figure 8 : Représentation graphique d'un système de description proposé par McPhee (1992) de l'architecture des racines de pois, en huit classifications de formes générales possibles croisées.

Système triangulaire (a, c, e, g) et rectangulaire (b, d, f, h), à distribution proximale (a, b, c, d) et distale (e, f, g, h) des racines latérales le long de la racine pivot et avec une longueur radiculaire latérale longue (a, b, e, f) et courte (c, d, g, h)

quant-à-elle une augmentation du niveau de ramification du système racinaire (López-Bucio *et al.*, 2003, Figure 7)

c- Importance de l'architecture pour définir l'efficacité de prélèvement des racines

L'architecture du système racinaire définit en partie l'efficacité d'exploration du sol et de captation de l'eau et des nutriments (Comas *et al.*, 2013; Tron *et al.*, 2015; Hochholdinger, 2016). En effet, c'est elle qui va définir la taille et la forme de la zone d'exploration (en surface, en profondeur, ...) ainsi que la densité racinaire de cette zone. L'importance de l'architecture racinaire a notamment été soulignée dans la tolérance au stress hydrique (Zenis *et al.*, 2016). Par exemple, la capacité à augmenter l'élongation racinaire lorsque la quantité d'eau dans le sol est faible a été associée à une meilleure tolérance au stress hydrique (Garay and Wilhelm, 1983). Il n'y a cependant pas d'architecture racinaire parfaite qui soit adaptée à tous les environnements, l'architecture racinaire la plus favorable variant selon les caractéristiques du milieu. Ainsi, une architecture racinaire peut être parfaitement adaptée à un environnement donné mais être associée à une très mauvaise efficacité de prélèvement dans un environnement différent (Tron *et al.*, 2015). Par exemple, une architecture développée dans les premiers centimètres de sol est adaptée à un sol avec une forte capacité de rétention mais peut être très défavorable pour un sol avec une faible capacité de rétention. De ce fait, il existe une grande diversité d'architectures racinaires, chacune associée à des niveaux d'efficacité de prélèvement variables selon les environnements (Tron *et al.*, 2015, Figure 8).

Différents traits d'architecture racinaire ont cependant été proposés pour une meilleure acquisition des ressources. Il a depuis longtemps été prouvé qu'un système racinaire fortement ramifié et développé en profondeur était associé à une meilleure efficacité de prélèvement de l'eau et des nutriments (Kramer, 1969; Price and Tomos, 1997). En effet, un système racinaire plus dense via un nombre de racines latérales plus important permet d'augmenter la surface racinaire et permet une meilleure efficacité de prélèvement (Tron *et al.*, 2015). Cependant, la mise en place de ces racines représente un coût carboné important. Un compromis entre le nombre de racines mises en place et le coût que cela représente pour la plante demeure un enjeu afin de permettre une bonne efficacité de prélèvement pour un coût en C limité (Tron *et al.*, 2015; Hochholdinger, 2016). De plus, il a été proposé que des

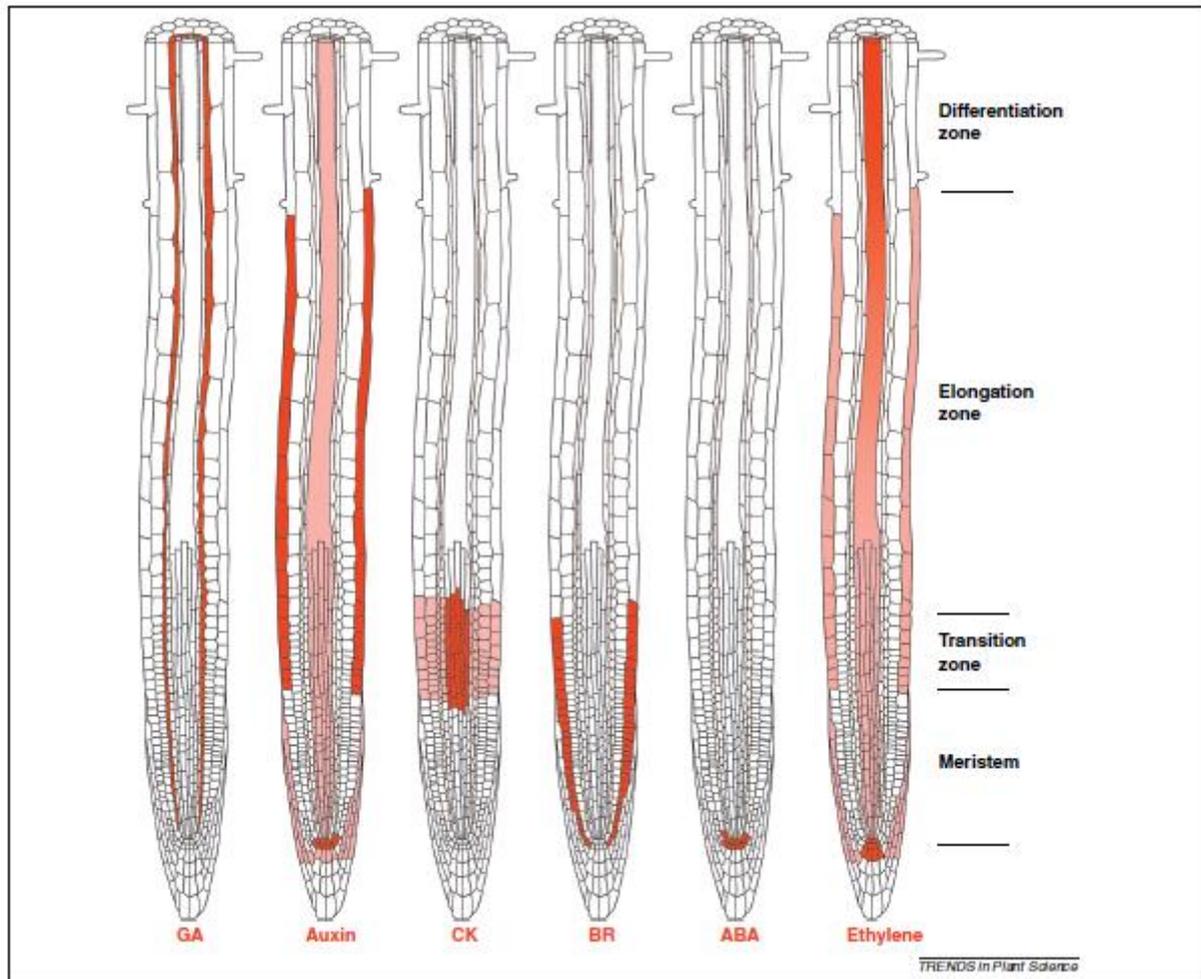


Figure 9 : Représentation schématique de l'action de différentes hormones sur les différents tissus et régions racinaires chez *Arabidopsis* (d'après Ubeda-Tomás *et al.*, 2012).

Le rouge montre les tissus ciblés directement par les hormones et le rose les tissus ciblés indirectement.

GA : gibérelines, CK : cytokinines, BR : brassinostéroïdes, ABA : acide abscissique.

ajustements cellulaires avec moins de cellules mais plus grosses, et ainsi des racines moins coûteuses à produire (Lynch, 2015) permettraient d'augmenter la surface racinaire pour un moindre coût. La surface racinaire peut également être augmentée *via* des modifications à l'échelle de la racine, afin d'augmenter la surface spécifique, avec notamment un diamètre racinaire inférieur et un nombre de poils racinaires supérieur (Comas *et al.*, 2013). Enfin, la profondeur du système racinaire peut être augmentée en réduisant les angles d'insertion des racines dans le sol et avec une longueur racinaire plus importante (Araki *et al.*, 2002; Lynch, 2015).

4- Régulation hormonale du développement racinaire

Le développement des racines et la croissance racinaire sont principalement gouvernés par des flux d'auxine (Figure 9).

a- Initiation des racines latérales

Des pics de concentration en auxine sont observés au niveau du site d'initiation des racines latérales (Casimiro *et al.*, 2001). Casimiro *et al.*, (2001) ont également montré qu'un traitement avec un inhibiteur du transport de l'auxine, le N-1-naphthylphthalamic acid (NPA), induisait un arrêt du développement des racines latérales. Ainsi, la régulation de l'initiation des racines latérales repose principalement sur une régulation fine des flux d'auxine au sein de la racine, médiée par des transporteurs d'auxine. Il existe deux types de transporteurs d'auxine : les transporteurs d'influx, qui régulent l'entrée de l'auxine dans la cellule, et les transporteurs d'efflux, qui contrôlent sa sortie. Ces deux types de transporteurs sont nécessaires à la génération de maxima d'auxines permettant la formation des racines latérales. AUX1 (AUXIN RESISTANT1) est impliqué dans l'influx, alors que les transporteurs PINs (PINFORMED) sont impliqués dans l'efflux. En effet, AUX1 de par sa régulation positive par l'auxine permet l'obtention d'un flux additionnel d'auxine générant ainsi une large accumulation d'auxine nécessaire au développement d'une nouvelle racine latérale (Laskowski *et al.*, 2008). Les transporteurs PINs permettent un transport polarisé de l'auxine, notamment via leur relocalisation, et sont également nécessaires à la création de ce pool d'auxine (Grieneisen *et al.*, 2007). Ce réarrangement dynamique des transporteurs d'auxine, en particulier la translocation du transporteur PIN1 implique différents acteurs du trafic membranaire tels que le VPS29 (vacuolar protein sorting 29) (Jaillais *et al.*, 2007). Les motifs

de distribution de l'auxine, notamment via la position des différents transporteurs PINs, déterminent également la position des racines latérales créées et donc l'architecture racinaire (Laskowski *et al.*, 2008).

Ainsi, le développement et la croissance des racines sont principalement régulés par les flux d'auxine. Cependant, d'autres phytohormones peuvent également participer à la formation des racines ainsi qu'à leur croissance. Les cytokinines et l'ABA ont notamment un rôle dans l'initiation des racines latérales notamment en agissant en interaction avec les flux d'auxine. En effet, plusieurs études ont mis en évidence une inhibition de la formation des racines latérales par les cytokinines. Celles-ci interagissent avec le transport d'auxine en perturbant l'expression de gènes PINS dans les racines, empêchant la mise en place du gradient d'auxine nécessaire à la formation de ces racines (Laplaze *et al.*, 2007). Bien que l'ABA ait un rôle de régulateur négatif de la croissance racinaire, en limitant le transport d'auxine chez *Arabidopsis*, (Rowe *et al.*, 2016), il a aussi un rôle positif chez les légumineuses (Bensmihen, 2015). En effet, l'ABA favorise la formation des primordia racinaires et le développement des racines latérales, notamment au stade de pré-émergence (Gonzalez *et al.*, 2014).

b- Croissance racinaire

Plusieurs phytohormones ont également été montrées comme régulateurs positifs de la croissance racinaire. En effet, cette croissance est notamment modulée par un contrôle de la division cellulaire et de l'élongation cellulaire par les gibbérellines (Tanimoto, 2005; Ubeda-Tomás *et al.*, 2008, 2009) et les brassinostéroïdes (Müssig *et al.*, 2003). L'ABA a quant-à-lui un rôle dans le maintien des cellules méristématiques favorisant ainsi la croissance racinaire (Zhang *et al.*, 2010). Enfin, l'éthylène est un régulateur positif de la biosynthèse de l'auxine d'une part (Stepanova, 2007) et de l'élongation des poils racinaires d'autre part (Tanimoto *et al.*, 1995).

III- Les nodosités, lieu de la symbiose rhizobienne chez les légumineuses

L'association bénéfique entre les bactéries du genre *Rhizobium* et les légumineuses se met en place au sein de structures racinaires, les nodosités. Cette symbiose est initiée par la légumineuse lorsque celle-ci se trouve en condition de carence azotée (Hirsch, 1992). Cette association requiert une reconnaissance spécifique entre le rhizobium (*Rhizobium*

leguminosarum bv viciae) et la légumineuse. Il existe une large diversité de souches de rhizobium pouvant s'associer avec le pois. Le succès de la mise en place de cette symbiose dépend notamment du niveau de compétitivité de la souche de rhizobium, c'est-à-dire sa capacité à dominer les autres bactéries présentes dans le sol (Toro, 1996). Par ailleurs, toutes les souches de rhizobium ne possèdent pas la même efficacité de fixation de l'azote (Bourion *et al.*, 2018). Il n'existe d'ailleurs pas de lien entre compétitivité de la souche de rhizobium et son efficacité de fixation de N₂.

On distingue deux types de nodosités qui se distinguent par la présence ou non d'un méristème persistant. Les nodosités à croissance déterminée sont sphériques et possèdent un méristème transitoire dont l'activité cesse peu de temps après la mise en place de la nodosité. Les nodosités à croissance indéterminée sont plus allongées et cylindriques en raison d'une activité méristématique continue tout au long de la vie de la nodosité (Hirsch 1992 ; Masson-Boivin *et al.*, 2009 ; Ferguson *et al.*, 2010). Les légumineuses dites « tropicales » comme le pois chiche ou le soja produisent des nodosités déterminées, alors que chez les légumineuses dites « tempérées » comme le pois, les nodosités sont de type indéterminé (Brewin, 1991).

La formation des nodosités requiert l'initiation de deux processus : l'infection par les bactéries et l'organogenèse nodulaire. Ces processus sont distincts mais se mettent en place de manière synchronisée afin de permettre le développement des nodosités, leur croissance, leur maturation jusqu'à les rendre efficaces donc fixatrices de l'azote, puis leur sénescence. Ces processus ont une localisation cellulaire différente dans les tissus racinaires. L'infection implique l'induction d'une voie locale au niveau du site d'infection sur l'épiderme alors que l'organogenèse implique une succession de divisions plus en profondeur au niveau des cellules corticales. Une coordination précise de l'infection et de l'organogenèse est nécessaire afin d'obtenir des nodosités fonctionnelles.

1- Mise en place, développement des nodosités

L'initiation de la symbiose implique des échanges de signaux entre les deux partenaires permettant une reconnaissance spécifique entre la plante hôte et les bactéries. La plante sécrète, au niveau racinaire, des molécules signal de types flavonoïdes afin d'attirer les bactéries par chimiotactisme (Gaworzewska and Carlile, 1982, Figure 10, étapes 1 et 2). Une

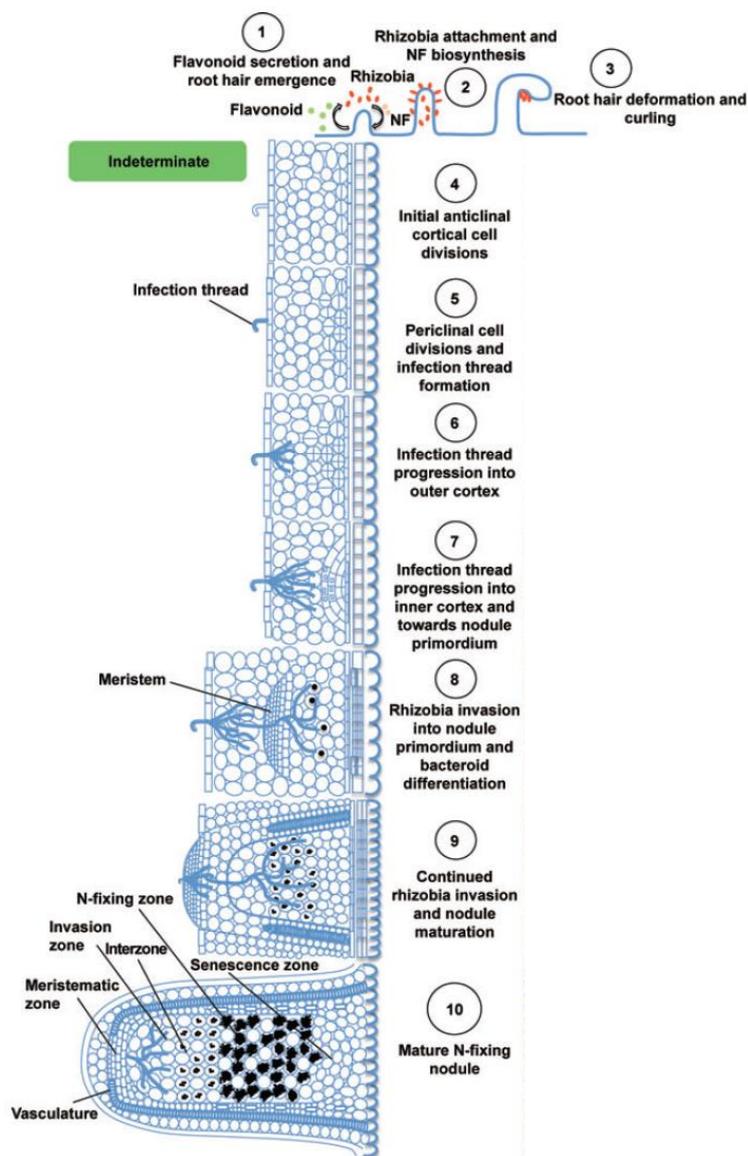


Figure 10 : Stades de développement des nodosités de légumineuses indéterminés (d'après Ferguson *et al.*, 2010).

Ils sont illustrés avec les nodosités de pois (indéterminées). Les poils racinaires exsudent des flavonoïdes, qui attirent les rhizobia compatibles et induisent la synthèse des facteurs nod (NF). Les poils absorbants se déforment en crosse de berger et forment une poche dans laquelle les rhizobia sont piégés. Des structures de cordon d'infection s'initient dans la poche permettant aux rhizobia d'entrer dans la plante. Les divisions cellulaires sont d'abord observées dans le cortex interne pour les nodules indéterminés ou dans la couche cellulaire sous-épidermique pour les nodules déterminés. Des couches de cellules supplémentaires se divisent ensuite, ce qui conduit à la formation du primordium de la nodosité. Les cordons d'infection progressent vers ce primordium et libèrent les rhizobia où ils se différencient en bactéroïdes fixateurs d'azote. Au sommet du primordium des nodosités indéterminées, se développe un méristème qui donne continuellement naissance à de nouvelles cellules. Au fur et à mesure que ces nouvelles cellules se différencient, ce qui entraîne des zones d'invasion et de différenciation des rhizobiums au sein de la nodosité. En revanche, les nodosités déterminées ne développent pas de méristème persistant et leurs cellules sont donc dans une phase de développement similaire. Les différents stades de développement, types de tissus et zones de nodulation sont légendés.

fois perçues par les bactéries, ces molécules signal se lient au régulateur transcriptionnel bactérien NodD qui va induire l'expression de gènes de nodulation rhizobiens, requis pour la synthèse de molécules lipo-chito-oligosaccharidiques nommés Facteurs Nods (FNod) (Dénarié *et al.*, 1996), molécules essentielles pour l'induction des réponses de la plante.

Le processus d'infection de la plante par la bactérie a lieu dans une zone située entre la pointe racinaire et la zone d'élongation et est appelée zone de susceptibilité. Il y a tout d'abord adhésion des bactéries à la surface du poil absorbant racinaire entraînant ainsi sa déformation par un recourbement dit en « crosse de berger » (Figure 10, étape 3). Cela permet de piéger les bactéries par la formation d'une chambre d'infection afin d'obtenir une micro-colonie. Ces modifications morphologiques sont associées à une réorganisation du cytosquelette d'actine et de tubuline (Timmers *et al.*, 1999). Cette chambre d'infection subit une expansion radiale puis une croissance polarisée permettant la formation d'un compartiment apoplastique de forme tubulaire appelé cordon d'infection (Figure 10, étapes 4 et 5). Il est ainsi initié par la plante et va permettre la pénétration des bactéries dans la racine (Gage, 2004). La croissance du cordon d'infection va se poursuivre à travers les cellules entraînant une dégradation localisée de la paroi cellulaire puis ce cordon va progressivement se ramifier (Figure 10, étapes 6-7). Le cytosquelette, et principalement les filaments d'actines va jouer un rôle important dans cette croissance (Timmers *et al.*, 1999).

En parallèle de ce processus d'infection, un processus d'organogenèse se met en place dans les tissus racinaires internes. Les premières divisions ont lieu dans le péricycle quelques heures après l'infection (Timmers *et al.*, 1999; Xiao *et al.*, 2014) et par la suite des divisions anticlines et périclines sont initiées dans le cortex afin de permettre la formation du futur méristème et du primordium nodulaire (Xiao *et al.*, 2014). Les cellules du primordium nodulaire sont alors pénétrées par les cordons d'infection en provenance de l'épiderme et les bactéries sont libérées via un mécanisme proche de l'endocytose (Ivanov *et al.*, 2012). Les bactéries sont entourées d'une membrane d'origine végétale appelée membrane pér bactéroïde, formant ainsi des symbiosomes. Chaque symbiosome contient un grand nombre de bactéries dans son cytoplasme pouvant aller jusqu'à plusieurs milliers (Udvardi and Day, 1997). Enfin, l'activité méristématique permet la croissance des nodosités et des processus de différenciation des cellules végétales et des bactéries permettent l'obtention de bactéroïdes capables de convertir le N_2 en NH_3 et donc l'obtention de nodosités matures,

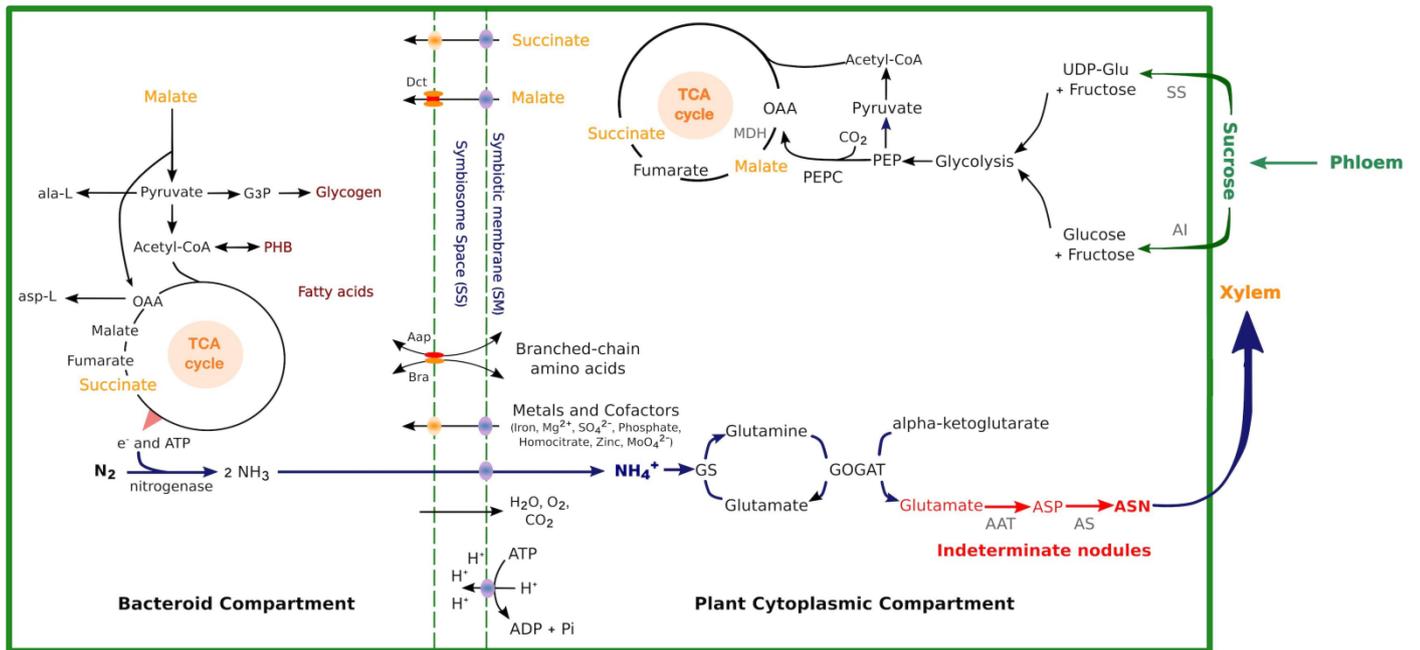


Figure 11 : Schéma des voies métaboliques du carbone et de l'azote avec les enzymes, métabolites et transporteurs clés dans les nodosités indéterminées. (d'après Liu *et al.*, 2018).

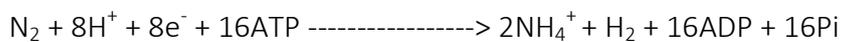
Le saccharose dans le cytosol végétal est divisé en glucose et en fructose par la AI ou en UDP-Glc et en fructose par la SS, qui est ensuite catabolisé par glycolyse en PEP. Le carbone du PEP et de l'acide carbonique est détourné vers l'OAA puis le malate par la PEPC et la MDH, respectivement. L'OAA peut ensuite être converti en succinate ou fumarate. Les sources de carbone sont transportées à travers les membranes péri-bactéroïdes et bactéroïdes et entrent dans le cycle TCA du bactéroïde pour être métabolisées. Le transport des ions inorganiques et des cofacteurs requis pour la SNF à travers la membrane symbiotique est indiqué. L'ammoniac produit par la SNF est transporté à la plante et assimilé dans Gln et Glu par GS et GOGAT (flèches bleues). Dans les nodules indéterminés, Glu et Gln sont ensuite convertis en Asp et Asn par AAT et AS, respectivement (flèches rouges).

AI, invertase alcaline; UDP-Glc, UDP-glucose; SS, saccharose synthase; PEP, phosphoénolpyruvate; OAA, oxaloacétate; PEPC, PEP-carboxylase; MDH, malate déshydrogénase; PHB, polyhydroxybutyrate; AAT, aspartate aminotransférase; AS, asparagine synthétase; ASP, aspartate; ASN, asparagine ; SNF, fixation symbiotique de l'azote

fixatrices (Figure 10, étapes 8 à 10). Une nodosité mature est composée de 4 zones différentes, dans le cas de nodosités indéterminées : la **zone I** correspondant à la zone méristématique nodulaire, ne contenant pas de bactérie, la **zone II** constituant la zone d'infection par les bactéries, la **zone III** fixatrice d'azote qui contient les bactéroïdes et la **zone IV** zone de sénescence de la nodosité (Vasse *et al.*, 1990).

2- Fonctionnement de la fixation symbiotique

La différenciation cellulaire au sein des nodosités permet de mettre en place des conditions appropriées pour la fixation de l'azote, et les bactéroïdes vont ainsi convertir, le diazote atmosphérique (N₂) en ammonium grâce à l'enzyme nitrogénase selon la réaction :



L'ammonium ainsi produit est excrété dans le cytoplasme de la plante où il est converti en glutamine par la glutamine synthase, cette glutamine étant à son tour convertie en glutamate par la glutamate synthase (Udvardi and Day, 1997). Le glutamate et la glutamine sont alors transformés en aspartate et asparagine avant d'être transportés par le xylème afin de pouvoir être utilisés par la plante pour la synthèse des différents composés azotés nécessaires à son métabolisme tels que des acides aminés ou des acides nucléiques. En contrepartie, les bactéries reçoivent des photosynthétats de la part de la plante hôte (Kouchi and Yoneyama, 1984; Martin *et al.*, 2017). Le carbone est alloué aux nodosités via le phloème sous forme de saccharose. Il est alors dégradé par l'action de différentes enzymes telles que la sucrose synthase, l'invertase alcaline (AI) et les enzymes de la voie de glycolyse afin d'être fourni aux bactéries, majoritairement sous forme de malate et de succinate (Lodwig *et al.*, 2003). Tous ces échanges entre la plante et les bactéries se déroulent à travers la membrane du symbiosome ou membrane péri-bactéroïde, grâce à l'activité de différents transporteurs (Day *et al.*, 2001, Figure 11).

La nitrogénase est extrêmement sensible à l'oxygène qui l'inactive de manière irréversible (Layzell and Hunt, 1990; Castillo *et al.*, 1992). Il est donc nécessaire de maintenir la concentration en oxygène à un niveau très bas. Cependant, l'oxygène est nécessaire pour que les bactéroïdes puissent fonctionner, afin d'assurer leur activité respiratoire mais également pour assurer une synthèse d'ATP suffisante et ainsi obtenir l'énergie nécessaire à la fixation. Pour pallier cela, la concentration nodulaire de l'oxygène est finement régulée afin de

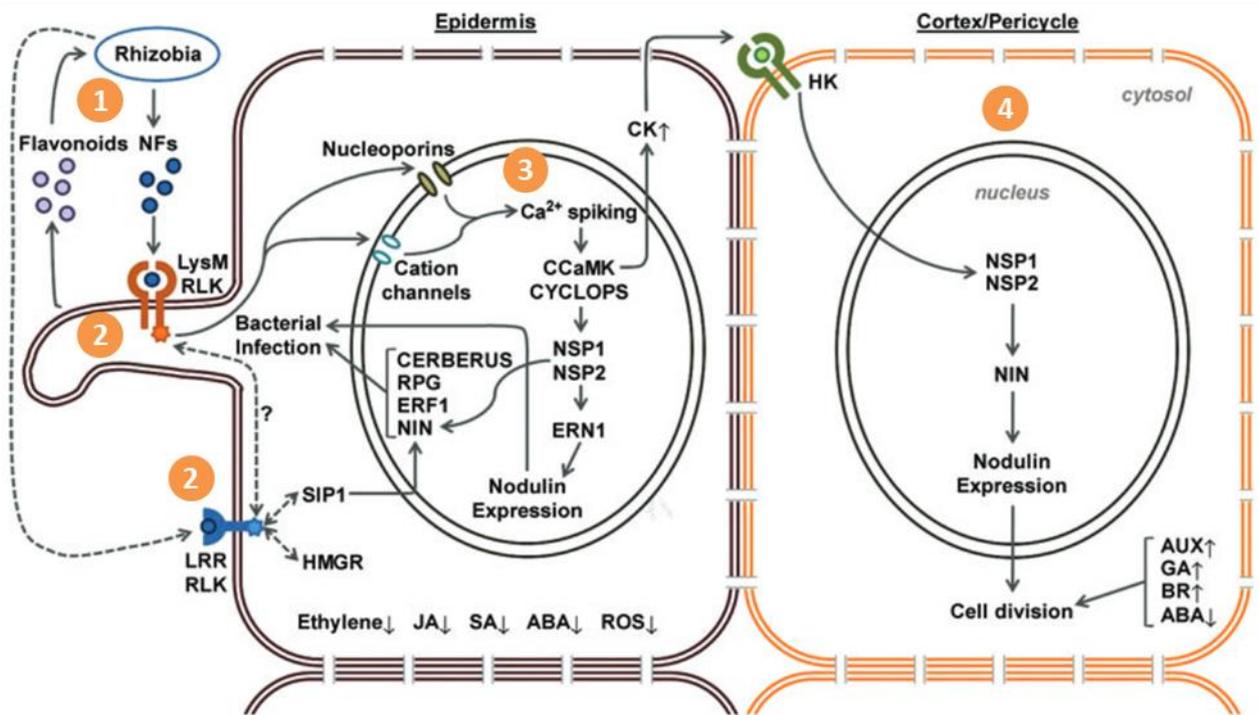


Figure 12 : Événements moléculaires associés aux premiers stades de la nodulation (d'après Ferguson *et al.*, 2010).

1 : production des facteurs de nodulation, 2 : reconnaissance par des récepteurs, 3 : cascade de signalisation au niveau de l'épiderme (pic de Ca²⁺, etc) 4 : cascade de signalisation au niveau du cortex

NFs : facteurs de nodulation, LRR RLK : leucin rich repeated recepteur-like kinase, LysMRLK : recepteur-like kinase à domaine LysM, JA : acide jasmonique, SA : acide salicylique, ABA : acide abscissique, CK : cytokinines, AUX : auxine, GA : gibbérélines, BR : brassinostéroïdes, ROS : formes actives de l'oxygène, HK : histidine kinase.

maintenir une concentration en oxygène faible dans la zone centrale de la nodosité, où se trouvent les bactéroïdes fixateurs, mais tout en permettant à la respiration de s'effectuer. Cette régulation est assurée d'une part grâce au parenchyme nodulaire, qui constitue une barrière physique permettant de réduire la diffusion de l'oxygène, et d'autre part grâce à la leghémoglobine, une enzyme produite dans les cellules infectées et qui possède une très haute affinité pour l'oxygène. La leghémoglobine se lie à l'oxygène afin de tamponner sa concentration à l'intérieur de la nodosité et afin de faciliter son transport pour la respiration bactérienne (Appleby, 1984; Layzell and Hunt, 1990).

3- Déterminisme génétique du développement et du fonctionnement des nodosités

Comme mentionné précédemment, la mise en place de la symbiose repose sur une communication moléculaire entre la plante hôte et le partenaire bactérien. La plante sécrète des flavonoïdes qui vont permettre l'expression de gènes de nodulation *nod*, *nol* et *noe* permettant la synthèse des facteurs de nodulation (FNod) (Figure 12-1). La perception de ces FNod et les voies qui en découlent (infection, organogenèse, fixation) sont très finement régulées par la plante.

a- Perception des facteurs de nodulation

Les facteurs de nodulation (FNod) sont perçus par la légumineuse au niveau de la membrane plasmique grâce à des récepteurs LysM-RLKs (Lysin Motif Receptor-Like Kinase) (Figure 12-2). Ces récepteurs sont constitués d'un domaine extracellulaire composé de plusieurs motifs lysine (LysM) responsable de la perception, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine kinase intracellulaire impliqué dans la traduction du signal. Chez le pois, deux gènes codant ces LysM-RLK ont été identifiés : *PsSYM2A* et *PsSYM10*, leurs orthologues étant *MtLYK3* et *MtLYK4* chez *Medicago truncatula* et *LjNFP1* et *LjNFP5* chez le Lotier (Madsen *et al.*, 2003; Radutoiu *et al.*, 2003; Limpens *et al.*, 2003; Zhukov *et al.*, 2008). Un autre récepteur de type RLK possédant cette fois-ci un domaine riche en leucine et un domaine sérine/thréonine kinase (LRR-RLK) a également été identifié comme impliqué dans la perception des FNod. Il est codé par le gène *PsSYM19/MtDMI2/LjSYMRK* (Endre *et al.*, 2002; Stracke *et al.*, 2002). Cette perception des FNod mène à des modifications au niveau de l'actine du cytosquelette du poil racinaire conduisant à sa déformation (Cárdenas *et al.*, 1998).

b- Cascade de signalisation au niveau de l'épiderme

La perception de ces FNod par la plante induit toute une cascade de signalisation au niveau des cellules de l'épiderme (Figure 12-3). Tout d'abord, des canaux calciques sont activés et induisent un influx rapide d'ions Ca^{2+} . Ce flux de calcium est suivi par un efflux des ions Cl^- et K^+ (Felle *et al.*, 1999). Le pic de calcium est ensuite perçu par une protéine kinase dépendante du calcium et de la calmoduline (CCaMK) codée par le gène *PsSYM9/MtDMI3/LjCCaMK* (Lévy *et al.*, 2004; Tirichine *et al.*, 2006). L'activation de cette kinase entraîne l'activation de plusieurs facteurs de transcription parmi lesquels NSP1 et NSP2 (Nodulation Signaling Pathway), ERN1 et ERN2 (Ethylene Responsive Factor Required for Nodulation) et NIN (Nodule INception) (Oldroyd and Downie, 2004; Middleton *et al.*, 2007; Ferguson *et al.*, 2010; Geurts *et al.*, 2016; Cerri *et al.*, 2016). Ces différents facteurs de transcription initient et coordonnent la transcription de gènes de nodulation précoces (*ENOD*) ou nodulines tels que *ENOD11* qui est impliqué dans le remodelage de la paroi cellulaire requis lors de la croissance du cordon d'infection (Andriankaja *et al.*, 2007).

c- Cascade de signalisation au niveau du cortex

La perception des FNod par la plante induit également une cascade signalétique au niveau des cellules du cortex permettant l'activation d'un récepteur kinase de cytokinines appelé CRE1 chez *Medicago* (Gonzalez-Rizzo *et al.*, 2006, Figure 12-4). L'activation du domaine kinase induit l'expression de différents facteurs de transcription, notamment NIN, ERN1 et NSP2 qui sont nécessaires à l'initiation des divisions cellulaires permettant le développement du primordium nodulaire (Frugier *et al.*, 2008; Plet *et al.*, 2011).

d- Différenciation des nodosités

D'autres acteurs interviennent dans le développement des nodosités et dans leur différenciation en nodosités fixatrices de l'azote. C'est notamment le cas des NCR (Nodule specific Cystein Rich Peptides), des peptides riches en cystéines spécifiques des nodosités. Ces petits peptides, apparentés aux défensines, participent à la différenciation de l'endosymbionte en bactéroïde fixateur. Les NCR montrent une expression différentielle dans différentes zones et à différents stades de développement de la nodosité (Maróti *et al.*,

2015).

e- Fonctionnement des nodosités

Chez le pois, 5 isomères de leghémoglobines ont été identifiés, parmi lesquels deux formes majoritaires (Lb I et Lb IV) et trois formes minoritaires (Uheda and Syōno, 1982). Ces différentes protéines semblent avoir différents rôles comme le supposent leurs différences d'affinité pour l'O₂ ainsi que leurs différences de régulation. Ainsi les leghémoglobines montrant une meilleure affinité pour l'O₂, semblent jouer un rôle plus important dans la fixation de l'azote que celles de type B (Kawashima *et al.*, 2001).

Par ailleurs, les gènes bactériens occupent également une place centrale dans la régulation de la fixation de N₂. La nitrogénase, complexe enzymatique responsable de l'étape de fixation est composée d'une protéine homodimérique Fe (fer) codée par le gène *nifH* et d'une protéine tétradimérique MoFe (molybdène-fer) codée par les gènes *nifD* et *nifK* qui contient le cofacteur MoFe (Mylona *et al.*, 1995). En plus des gènes *nif*, les gènes *fix* sont également importants de par leur implication dans la régulation et le métabolisme de l'oxygène (Black *et al.*, 2012).

4- La régulation de la formation des nodosités

a- Coût en carbone associé à la symbiose fixatrice de N₂

Les nodosités constituent un puits important pour le carbone. En effet, le carbone est nécessaire à la fois pour **i)** la mise en place des nodosités et leur croissance, **ii)** leur maintien, et notamment la respiration des bactéries, **iii)** la fixation de l'azote en tant que telle et la production des différents composants moléculaires nécessaires à ce processus (leghémoglobine, nitrogénase,...) et **iv)** l'exportation des composés azotés formés (Warembourg, 1983).

Au sein de la plante, la répartition du carbone dépend en grande partie de la capacité de chacun des compartiments ou puits à attirer les assimilats (Jeuffroy and Warembourg, 1991). La répartition du carbone dans les différents organes varie donc au cours du développement. Par exemple, chez le pois le pourcentage de photosynthétats alloué au système racinaire nodulé passe de 45 % à 7 % de la photosynthèse nette entre le stade végétatif et le stade de

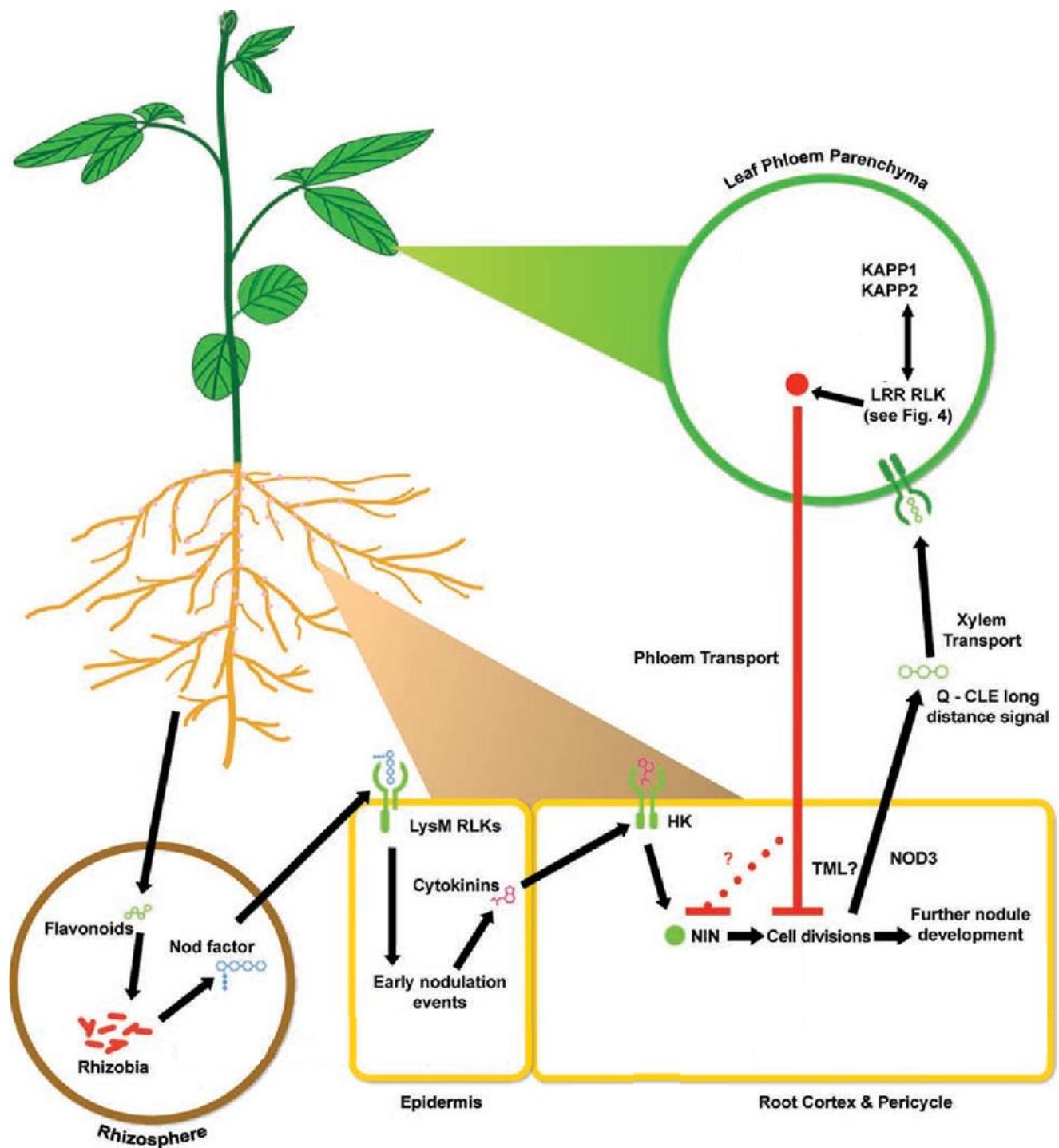


Figure 13 : La voie d'autorégulation de la nodulation (AON) (d'après Ferguson *et al.*, 2010).

Les *Rhizobia* régulent de manière systémique la nodulation en déclenchant la production d'un signal, appelé Q, à un certain stade de la division cellulaire. De récentes études indiquent que ce signal Q est hautement similaire aux peptides CLE (CLAVATA3/ESR). Ce signal est transporté jusqu'aux feuilles où il est perçu par un récepteur LRR RLK (leucine-rich repeat receptor-like kinase) (codé par GmNARK/LjHAR1/MtSUNN) et induit la production d'un facteur transporté dans les racines et qui empêche d'autres événements de nodulation dans la racine.

remplissage des graines (Voisin *et al.*, 2003b). Le développement et la croissance des nodosités peuvent se faire au détriment du reste de la plante. Voisin *et al.*, (2003a) ont montré que la croissance des nodosités se faisait au détriment de celle de la partie aérienne et de la partie racinaire au stade végétatif, mais seulement au dépend de la croissance racinaire à floraison. Ainsi, bien que les racines et les nodosités soient complémentaires pour l'acquisition de l'azote, ces deux compartiments sont néanmoins en compétition vis-à-vis de l'utilisation du carbone. De manière générale, le système racinaire d'une légumineuse dont la nutrition azotée ne repose que sur la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique *via* les nodosités est moins développé, notamment dans les 20-30 premiers centimètres du sol, que celui d'une légumineuse obtenant la majeure partie son azote sous forme d'azote minéral *via* les racines (Jensen, 1986; Voisin *et al.*, 2002a). Cela peut s'expliquer par le fait qu'il n'y a pas de différence d'allocation de carbone, en termes de pourcentage de photosynthèse nette alloué au système racinaire, entre le système racinaire d'une plante de pois nodulée et celui d'une plante de pois non nodulée, entraînant ainsi une disponibilité en photosynthétats plus faible pour les racines en présence de nodosités (Voisin *et al.*, 2003c).

b- Une régulation de la nodulation par le statut azoté de la plante

En l'absence d'azote dans le sol, les premières nodosités sont initiées lorsque les réserves azotées de la graine sont épuisées (Mohd-Radzman *et al.*, 2013). La nodulation se poursuit ensuite par vagues lorsque le nombre de nodosités en place n'est plus suffisant pour répondre aux besoins azotés de la plante et que la teneur en azote des parties aériennes diminue rapidement (Voisin *et al.*, 2010). Durant la phase végétative, la nodulation est régulée de manière systémique par rapport à la croissance de la plante. Ainsi, le nombre et la biomasse des nodosités sont positivement corrélés à la biomasse aérienne (Dobert and Blevins, 1993; Voisin *et al.*, 2010). Cette régulation est également retrouvée au niveau fonctionnel, l'activité de fixation des nodosités étant proportionnelle, dans un premier temps à la mise en place des nodosités, puis à la croissance de la plante et par conséquent à ses besoins azotés (Voisin *et al.*, 2002b). De plus, une étude menée en système « split-root » par Jeudy *et al.*, (2010) chez *Medicago truncatula* montre une régulation locale mais aussi systémique de la nodulation par rapport au statut azoté de la plante. On observe ainsi une baisse de la croissance des nodosités dans la partie du système racinaire subissant la carence

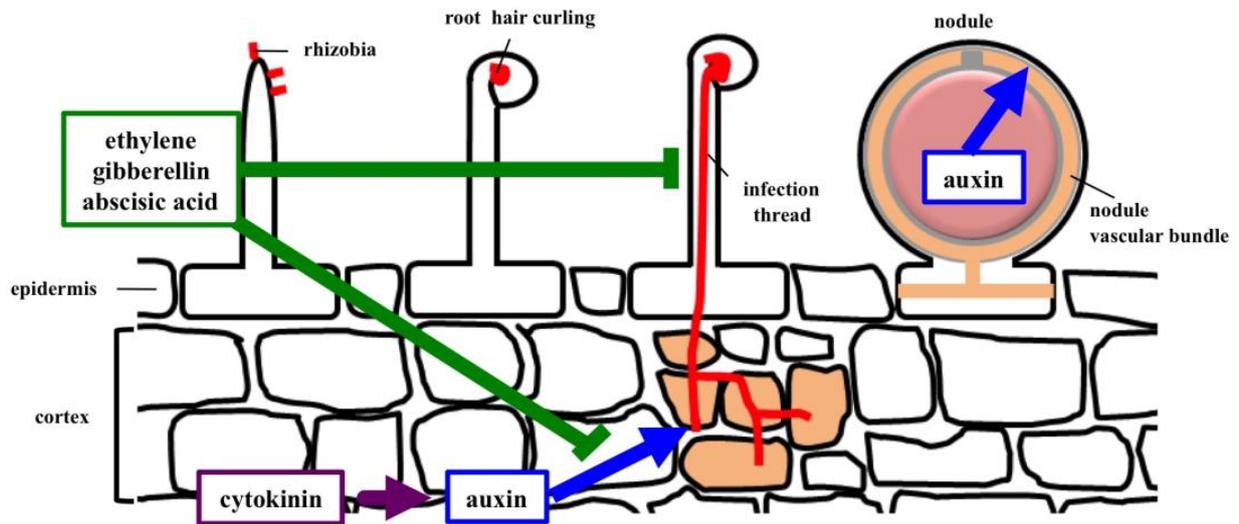


Figure 14 : Effets des phytohormones sur la nodulation des légumineuses (d'après Nagata et Suzuki 2013).

L'auxine et la cytokininine sont nécessaires pour la division des cellules corticales et l'auxine agit en aval de la signalisation de la cytokininine. L'éthylène, la gibbérelline et l'acide abscissique inhibent les divisions des cellules corticales et l'infection rhizobienne.

azotée correspondant à la réponse locale. Dans la partie restante du système racinaire (n'ayant pas subi la carence), on observe une augmentation de la croissance des nodosités ainsi que de l'acquisition de l'azote (70 %). Cette augmentation de l'acquisition de l'azote est due, non pas à une augmentation de l'activité de fixation de l'azote, mais à une augmentation de la croissance des nodosités déjà existantes puis à l'initiation de nouvelles nodosités (Ruffel *et al.*, 2008). Néanmoins, une baisse temporaire de la teneur en azote ainsi que de la croissance de la plante a été constatée due au délai nécessaire au développement et à la maturation des nouvelles nodosités (Jeudy *et al.*, 2010). Chez le pois par exemple, lors de l'initiation d'une vague de nodosités, il faut en moyenne une semaine avant l'obtention de nodosités efficaces fixant l'azote atmosphérique (Tricot *et al.*, 1997; Voisin *et al.*, 2010).

c- Une régulation fine du nombre et de l'activité des nodosités via l'autorégulation systémique de la nodulation (AON)

Il y a une régulation fine du nombre et de l'activité des nodosités initiées par la plante probablement liée au coût carboné associé à la nodulation.

Il existe une régulation systémique via une signalisation longue distance entre les nodosités et la partie aérienne appelée autorégulation de la nodulation (AON : Autoregulation Of Nodulation) (Kosslak and Bohlool, 1984; Li *et al.*, 2009, Figure 13). Elle permet à la plante de réguler et limiter le nombre de nodosités initiées afin d'éviter la formation d'un nombre trop important de nouvelles nodosités au sein du système racinaire. Les mutants défectueux pour l'AON présentent un phénotype hypernodulant (Nishida and Suzaki, 2018). D'un point de vue moléculaire, cette régulation implique une boucle de rétroaction négative : un signal dérivé des racines (signal Q) est transporté jusque dans les feuilles et induit alors la production d'un second signal dérivé des feuilles (SDI : Shoot Derivated Inhibitor) qui est à son tour transporté dans les racines et inhibe alors la formation de nouvelles nodosités (Suzaki *et al.*, 2015). Le signal Q est constitué de deux petits peptides, MtCLE12 et MtCLE13 chez *Medicago*, et LjCLE RS1 et LjCLE RS2 chez le Lotier, qui sont produits dans les racines suite à l'infection bactérienne (Okamoto *et al.*, 2009; Mortier *et al.*, 2010; Reid *et al.*, 2011; Nishida *et al.*, 2016). Ces peptides CLE, dont la production est sous le contrôle du facteur de transcription NIN (Mortier *et al.*, 2012; Ferguson *et al.*, 2019), sont ensuite transportés jusqu'à la partie aérienne via le xylème puis perçus par un récepteur complexe (Mortier *et al.*, 2010; Reid *et*

al., 2011). Il s'agit d'un récepteur LRR-RLK (Leucin-Rich Repeat–Receptor-Like Kinase) codé par MtSUNN (Super Numeric Nodules) chez *Medicago*, PsSym29 chez le pois et LjHAR1 (Hypernodulation aberrant root) chez le lotier (Krusell *et al.*, 2002; Oka-Kira *et al.*, 2005; Schnabel *et al.*, 2005). La perception des peptides CLE au niveau de la partie aérienne régule la production du signal SDI dont la nature n'a jusque-là pas été clairement identifiée malgré différents candidats proposés tels que les cytokinines (Sasaki *et al.*, 2014) ou la protéine F-box LjTML (Too Much Love) (Takahara *et al.*, 2013).

d- Le rôle des hormones dans la régulation de la nodulation

Les hormones végétales jouent un rôle important dans la régulation à la fois systémique et locale de la nodulation. L'initiation de la nodulation entraîne des modifications au niveau de leur synthèse, de leur transport ainsi que de leur perception. Ces hormones peuvent avoir un rôle positif ou négatif et interviennent à différents stades de l'interaction symbiotique (pour revue voir Ferguson and Mathesius, 2014).

L'auxine et les cytokinines sont deux hormones centrales du développement et ont un rôle de régulateur principalement positif dans l'initiation et le développement des nodosités (Figure 14). Ces deux phytohormones sont toutes deux impliquées dans l'induction des divisions cellulaires corticales lors de la formation des primordia nodulaires. En effet, les FNod induisent la production de cytokinines qui, une fois perçues par le récepteur MtCRE1 chez *M. truncatula* induisent l'expression de transporteurs d'auxine PIN, conduisant à une accumulation locale d'auxine et permettant l'initiation du primordium nodulaire (Plet *et al.*, 2011). Les cytokinines sont notamment nécessaires à l'activation de facteurs de transcription clés liés à la nodulation tels que MtNIN, MtERN1, MtNSP2 via le récepteur MtCRE (Plet *et al.*, 2011; Mortier *et al.*, 2012). Frugier *et al.*, (2008) ont d'ailleurs montré une corrélation positive de la concentration en cytokinines avec la nodulation. Les cytokinines ont également été proposées comme signal permettant la coordination de l'infection prenant lieu au niveau de l'épiderme avec l'organogenèse initiée quant-à-elle dans les cellules du cortex (Oldroyd, 2007). Enfin, en plus de leur rôle dans le développement du primordium nodulaire, les cytokinines peuvent également avoir un rôle de régulateur négatif au niveau de l'épiderme, lors de l'infection bactérienne (Boivin *et al.*, 2016), permettant ainsi de réduire la zone de susceptibilité via le facteur de transcription MtNIN (Frugier *et al.*, 2008). L'auxine est quant à

elle un régulateur positif du processus d'infection et est impliquée dans le contrôle de la progression des cordons d'infection (Boivin *et al.*, 2016).

Les phytohormones liées au stress telles que l'éthylène, l'acide salicylique (SA), l'acide jasmonique (JA) ou l'acide abscissique (ABA) jouent le rôle de régulateur négatif de la nodulation. L'application exogène d'éthylène affecte plusieurs étapes de l'interaction symbiotique. L'éthylène bloque les oscillations calciques induites par les FNod et, inhibe la formation et la progression des cordons d'infection (Oldroyd *et al.*, 2001). Au niveau du cortex racinaire, il a également été montré comme inhibiteur de l'accumulation des CKs induites par les FNod, inhibant de cette façon l'initiation des primordia nodulaires (van Zeijl *et al.*, 2015). Le SA a un rôle bien caractérisé dans la réponse aux interactions biotiques, où sa production augmente fortement. De plus, lors d'une interaction biotique, il y a normalement accumulation de SA mais les FNod suppriment cette accumulation lors de l'infection, ce qui est essentiel pour faciliter la formation de primordia nodulaires (Martínez-Abarca *et al.*, 1998). L'ABA inhibe l'expression des gènes précoces de la nodulation tels que ENOD11 et RIP1, le pic calcique induit par les facteurs de nodulation en inhibant l'infection mais elle diminue également les divisions corticale médiées par les cytokinines inhibant ainsi le développement des nodosités (Ding *et al.*, 2008). Le JA a un rôle bien établi dans les défenses des plantes et les réponses aux blessures, mais il semble également intervenir dans la régulation de la nodulation. Son rôle n'a cependant pas encore bien été identifié. En effet, le JA a été montré comme étant à la fois un régulateur positif et négatif de la nodulation (Ferguson and Mathesius, 2014). Chez *Medicago truncatula*, un traitement exogène avec du JA supprime la formation des nodosités en interférant avec la mise en place de la signalisation calcique ainsi qu'avec l'expression de certains gènes de la nodulation tels que *MtENOD11* et *MtRIP1* (Rhizobium-induced peroxidase 1) (Sun *et al.*, 2006). Au contraire, chez le lotier, l'ajout de JA augmente la formation des cordons d'infection et la nodulation (Suzuki *et al.*, 2011).

Les brassinostéroïdes (BR) et les gibbérellines (GA) semblent également intervenir dans la régulation de la nodulation bien que leur rôle ne soit pas clairement caractérisé. Le rôle des BR semble plutôt positif car les mutants pour la biosynthèse ou la perception des BR chez le pois possèdent un nombre plus faible de nodosités (Ferguson *et al.*, 2005). En ce qui concerne les GA, leur effet peut être positif ou négatif en fonction de la dose. En effet, il a été montré

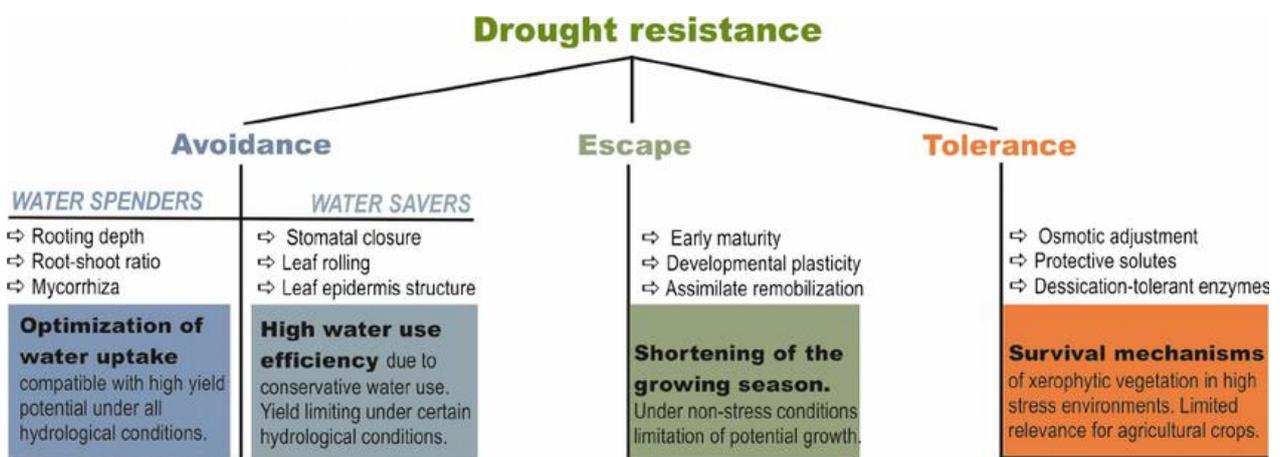


Figure 15 : Stratégies d'adaptation au stress hydrique (d'après Bodner *et al.*, 2015).

chez le pois qu'en faible quantité elles augmentent la nodulation, mais l'inhibent en forte quantité (Ferguson *et al.*, 2005). Chez *Medicago truncatula*, la régulation négative de la nodulation par les GA, et notamment de l'induction de certains gènes par les facteurs Nod, a été montrée comme étant médiée par les protéines DELLA. Les GA sont perçus par un récepteur GID1 (Gibberellin-Insensitive Dwarf-1) qui interagit alors avec les protéines DELLA et entraîne leur dégradation (Davière and Achard, 2013). Or, ces protéines ont été montrées comme régulant positivement la nodulation en interagissant avec plusieurs facteurs de transcription clés tels que NSP2 et ERN1 (Fonouni-Farde *et al.*, 2016) et en favorisant la formation du complexe CCaMK (Jin *et al.*, 2016).

Une signalétique croisée entre racines et nodosités

Les mécanismes de formation et développement des racines et des nodosités sont tous deux finement régulés par les phytohormones. Cependant, bien que la plupart de celles-ci (auxine, cytokinines, ABA et éthylène) aient un rôle dans le développement de chacun de ces organes, leur rôle peut être antagoniste (Bensmihen, 2015). En effet, en dehors de l'auxine qui a un rôle de régulateur positif à la fois pour les racines et les nodosités, les cytokinines régulent positivement la nodulation mais négativement le développement racinaire. L'éthylène et l'ABA ont au contraire un rôle négatif dans la nodulation mais plutôt positif dans le développement des racines. Le développement des nodosités influence le développement des racines et inversement (Desbrosses and Stougaard, 2011). Ainsi, les ratios entre ces différentes phytohormones peuvent finalement participer à la régulation et au compromis entre l'initiation des racines et de nodosités.

IV- Les effets du stress hydrique et la récupération post-stress

Parce que les plantes ne sont pas en mesure de se déplacer, elles ont développé de nombreuses réponses adaptatives destinées à supporter les contraintes biotiques et abiotiques qu'elles rencontrent, leur permettant ainsi d'assurer leur survie et leur reproduction. Les principaux stress biotiques comprennent les maladies, les insectes ravageurs et les mauvaises herbes tandis que les principales contraintes abiotiques rencontrées par les plantes regroupent les changements importants d'eau dans le sol (sécheresse ou excès en eau), les températures extrêmes (stress thermique ou gélif) ou les carences en nutriments. Le manque d'eau représente un des problèmes majeurs en

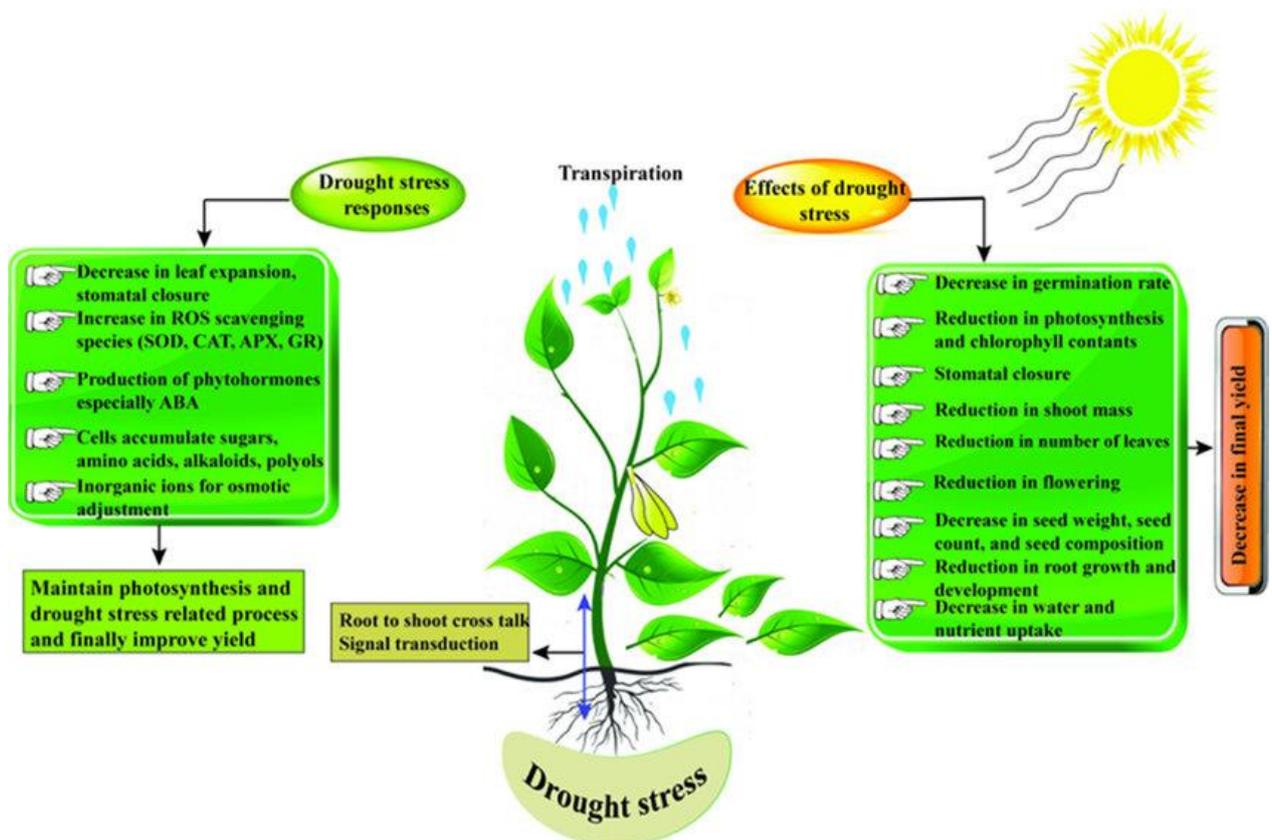


Figure 16 : Effets du stress hydrique sur les plantes et réponses possibles (d'après Nadeem *et al.*, 2019).

agriculture et est décrit comme le facteur abiotique majeur limitant la production agricole en conditions naturelles (Boyer, 1982).

Le « stress hydrique » peut être défini comme un déséquilibre entre la quantité d'eau disponible dans le sol et la demande évapotranspirative de la plante, liée aux conditions environnementales (Tardieu *et al.*, 2011). Ce manque d'eau peut être classé en trois catégories selon son impact sur la plante. On distingue ainsi **i)** le déficit hydrique, pour lequel le potentiel hydrique des feuilles n'est pas modifié, **ii)** la contrainte hydrique, où le potentiel hydrique commence à baisser, et enfin **iii)** le stress hydrique à proprement parlé, pour lequel les valeurs de potentiel hydrique sont encore plus basse et qui s'accompagne de modifications de l'état physiologique de la plante, les ajustement osmotiques n'étant alors plus suffisants pour maintenir la turgescence et la teneur relative en eau des feuilles.

Les mécanismes mis en place en réponse au manque d'eau ont largement été décrits dans la littérature, qu'il s'agisse de modifications morphologiques, physiologiques, biochimiques ou moléculaires. Cependant, même si des réponses générales à un stress hydrique peuvent être observées, elles varient selon l'intensité, la durée et le stade d'application du stress (Chaves *et al.*, 2009; Tardieu, 2012) mais également selon les espèces et les génotypes étudiés (Rauf and Sadaqat, 2008; Casadebaig *et al.*, 2008). Les réponses mises en place par la plante peuvent être divisées en 3 catégories (Figure 15) correspondant à différents types de stratégies d'adaptation :

- l'échappement, qui est un raccourcissement du cycle afin de le terminer avant l'apparition d'un stress. Les plantes modulent leur développement, végétatif et reproductif, notamment via un développement phénologique plus rapide et grâce à une certaine plasticité développementale.

- l'évitement correspondant à la mise en place de mécanismes empêchant la baisse du potentiel hydrique de la plante. Cela peut passer par une augmentation du prélèvement de l'eau notamment via une augmentation de la croissance racinaire, ou par une diminution des pertes en eau notamment via une réduction de la transpiration.

- la résistance / tolérance, qui consiste en des adaptations permettant un maintien de la croissance, malgré la baisse du potentiel hydrique de la plante. Cela passe notamment par des ajustements osmotiques permettant de maintenir la turgescence cellulaire et par la production de composés permettant de protéger les membranes et les enzymes tels que des

composés osmo-protecteurs ou antioxydants.

Ces catégories ne sont cependant pas exclusives et peuvent se combiner (Basu *et al.*, 2016).

1- Mécanismes généraux de résistance / tolérance des plantes à un déficit hydrique du sol

En condition hydrique limitante, la plante ne peut plus prélever une quantité d'eau suffisante, ce qui induit une baisse de son potentiel hydrique de feuille. Cette diminution entraîne des réponses adaptatives ayant lieu au sein des différents organes de la plante, et s'opérant à différents pas de temps (Chaves *et al.*, 2003). Ces réponses permettent soit de minimiser la perte en eau de la plante et/ou de maximiser le prélèvement en eau (Figure 16).

a- La fermeture stomatique

Les plantes peuvent être classées en deux catégories selon leur comportement en cas de stress hydrique. Alors que les plantes isohydriques vont tendre à maintenir un potentiel hydrique minimum via une régulation stomatique, les plantes anisohydriques vont maintenir l'ouverture stomatique afin de maintenir la photosynthèse en condition hydrique limitante, entraînant une baisse du potentiel hydrique avec l'augmentation de la demande évaporative (Tardieu and Simonneau, 1998). Ainsi, pour les espèces isohydriques telles que le pois, l'une des premières réponses observées chez les plantes face à un déficit hydrique édaphique est la fermeture des stomates entraînant ainsi une baisse de la conductance stomatique (Chaves *et al.*, 2003; Anjum *et al.*, 2011). Cette fermeture a été montrée comme étant médiée par l'acide abscissique qui module les flux d'ions K^+ permettant une sortie de K^+ hors des cellules de garde diminuant de ce fait leur turgescence et réduisant l'ouverture du pore stomatique (Kim *et al.*, 2010). Cela permet une réduction des pertes hydriques et un maintien, dans une certaine mesure, du potentiel hydrique de la plante (Schulze *et al.*, 1987).

b- La réduction de l'élongation foliaire

Cette diminution des pertes en eau est renforcée par une inhibition de l'expansion foliaire. Chez le pois, on observe ainsi une baisse du nombre et/ou de la taille des cellules au niveau des feuilles (Lecoeur and Sinclair, 1996). Cette adaptation permet de limiter la surface foliaire transpirante et donc la perte en eau (Casadebaig *et al.*, 2008; Erice *et al.*, 2010).

c- Inhibition de la photosynthèse

La fermeture des stomates réduit les pertes en eau mais elle entraîne également une réduction de la diffusion du CO₂, entraînant donc une diminution de l'activité photosynthétique (Chaves *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2010). La baisse de la photosynthèse est d'autant plus importante que le stress hydrique entraîne également une baisse de l'activité de différentes enzymes, parmi lesquelles la Rubisco, la pyruvate phosphokinase (PPDK) et la phospho-énol pyruvate carboxylase (PEPCase) (Chaves *et al.*, 2009; Farooq *et al.*, 2009). Cette baisse de l'assimilation du carbone peut affecter négativement la croissance des plantes. Il existe ainsi un compromis au sein de la plante entre le maintien de son état hydrique et le maintien de sa croissance.

d- Réduction de la croissance

La diminution de croissance lors d'un déficit hydrique modifie la répartition de la biomasse entre les organes de la plante. La croissance racinaire est en général favorisée (croissance maintenue voire stimulée) au détriment de celle de la partie aérienne entraînant une baisse du ratio « Shoot : Root » (Xu *et al.*, 2010; Prudent *et al.*, 2016; Kunert *et al.*, 2016).

e- Modification de l'efficacité d'utilisation en eau

La fermeture des stomates peut ne pas être complète, la transpiration est alors plus réduite que ne l'est l'assimilation nette par la photosynthèse du CO₂ atmosphérique. On observe alors une augmentation de l'efficacité d'utilisation en eau (WUE : Water Use Efficiency, c'est-à-dire le ratio de biomasse produite par volume d'eau prélevé) (Maury *et al.*, 2011). Cette modification de la WUE en réponse à un stress hydrique a été reportée dans de multiples études et une WUE élevée est couramment associée à une meilleure tolérance au stress hydrique (Chaves *et al.*, 2003, 2009; Siopongco *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2010; Anjum *et al.*, 2011; Erice *et al.*, 2011).

f- L'ajustement osmotique

Le maintien du potentiel hydrique de la plante passe également par des ajustements osmotiques permettant à la plante de maintenir une certaine turgescence cellulaire

essentielle à la croissance cellulaire (Frechilla *et al.*, 2000; Siopongco *et al.*, 2006; Charlton *et al.*, 2008; Aranjuelo *et al.*, 2013). Ainsi, l'accumulation de certains composés permet de maintenir un équilibre osmotique au niveau cellulaire. Plusieurs études soulignent l'augmentation de différents osmolytes tels que des acides aminés (proline), des sucres (saccharose, raffinose, galactose), des polyols et de la glycine bêtaïne (Popp and Smirnoff, 1995; Bogeat-Triboulot *et al.*, 2006; Charlton *et al.*, 2008; Larrainzar *et al.*, 2009; Mafakheri *et al.*, 2011; Maury *et al.*, 2011; Aranjuelo *et al.*, 2013; Nasr Esfahani *et al.*, 2014).

g- Accumulation de molécules de défense / protection

Certains composés sont également produits / accumulés en réponse à un stress hydrique. Tout d'abord différentes protéines impliquées dans la protection des structures cellulaires, telles que les protéines LEA (Late Embryogenesis Abundant), dont les déhydrines, des HSP (Heat-Shock Proteins) et des protéines chaperonnes (Ingram and Bartels, 1996; Maury *et al.*, 2011). Ces protéines permettent de protéger les structures cytoplasmiques et chloroplastiques de la déshydratation (Maury *et al.*, 2011). Par ailleurs, le stress hydrique induit l'apparition d'un stress oxydatif dû à la baisse de la photosynthèse causant une réduction excessive de la chaîne de transfert d'électrons photosynthétique. Cela entraîne la production de formes actives de l'oxygène (ROS) pouvant provoquer la dénaturation des protéines et enzymes ainsi que des dommages au niveau des lipides membranaires (Smirnoff, 1998). Ainsi, afin de limiter les conséquences du stress oxydatif, différentes molécules sont produites afin de piéger les radicaux libres et de détoxifier les cellules (Bogeat-Triboulot *et al.*, 2006; Maury *et al.*, 2011; Nasr Esfahani *et al.*, 2014). Un métabolite largement décrit pour son rôle d'antioxydant est le glutathion (Galant *et al.*, 2011) qui participe notamment à réprimer les formes actives de l'oxygène et à l'élimination des peroxydes via son implication dans le cycle ascorbate - glutathion (Noctor and Foyer, 1998). La production de différentes enzymes anti-oxydantes a été mise en évidence en réponse au stress hydrique chez le pois (Mittler and Zilinskas 1994) et notamment l'augmentation du contenu en catalase qui permet de protéger les membranes de la peroxydation des lipides et d'autres dommages oxydatifs (Mafakheri *et al.*, 2011)

2- La spécificité des légumineuses : des modifications structurales et fonctionnelles au sein du système racinaire nodulé lors d'un stress hydrique

Les racines sont le premier organe détectant le stress hydrique (Hochholdinger, 2016) mais dans le cas des légumineuses, il s'agit également du lieu de mise en place de la symbiose avec les bactéries fixatrices de N₂ au sein des nodosités. Du fait de la compétition pour le carbone qui existe entre ces deux organes (voir paragraphe 1-3), le système racinaire nodulé représente un compartiment clé dans la réponse au stress hydrique. Ainsi, en conditions limitantes, un compromis peut être nécessaire avec un investissement du carbone soit pour développer des structures, soit pour alimenter leur fonction ou bien de manière restreinte pour les deux. En effet, une plante peut être définie comme un ensemble de structures assurant différentes fonctions. Si on prend l'exemple de l'acquisition du carbone développé dans la partie précédente, nous avons notamment souligné des modifications de la structure permettant cette acquisition avec une limitation de l'expansion foliaire et des modifications de la fonction avec une baisse de l'activité photosynthétique.

a- Modifications structurales

Comme présenté précédemment, le stress hydrique induit une réduction de la croissance globale de la plante et on assiste à des modifications de la répartition de la biomasse au sein des différents organes de la plante. Mais dans le cas des légumineuses, la répartition de biomasse entre racines et nodosités est également modifiée. En particulier, la croissance racinaire est favorisée par rapport à la croissance nodulaire en réponse au stress hydrique (Mahieu *et al.*, 2009; Prudent *et al.*, 2016). Cette diminution de biomasse nodulaire peut être liée soit à diminution du nombre de nodosités (Sinclair *et al.*, 1988; Fenta *et al.*, 2012), soit à une diminution de la taille des nodosités, soit à une combinaison des deux. Une étude conduite sur le pois par Prudent *et al.*, (2016) a mis en évidence une baisse de la biomasse nodulaire totale, sans qu'il n'y ait de modification du nombre de nodosités. Cela signifie donc que le même nombre de nodosités a été mis en place, mais que ces dernières sont plus petites. Des mécanismes d'adaptation de la taille des nodosités par rapport à leur nombre ont également été montrés notamment chez le soja avec un génotype tolérant possédant un nombre de nodosités inférieur mais des nodosités plus grosses en condition de stress hydrique (King and Purcell, 2001).

Bien que la croissance racinaire ait tendance à être faiblement impactée par le stress hydrique, en comparaison avec d'autres organes de la plante, de nombreuses modifications de l'architecture racinaire ont été mises en évidence en réponse au stress hydrique.

Ces modifications, bien qu'elles dépendent de l'espèce / du génotype étudiés, concernent principalement une augmentation de la profondeur d'exploration du sol et une augmentation de la surface du système racinaire (Sánchez-Blanco *et al.*, 2014). Ces deux caractères architecturaux sont en effet liés à un meilleur prélèvement de l'eau et permettent une meilleure tolérance du stress hydrique (Wasaya *et al.*, 2018). Pour un même coût en carbone, l'augmentation de la profondeur d'exploration permet d'atteindre des niveaux inférieurs pour lesquels les réserves en eau peuvent être plus importantes, et l'augmentation de la surface racinaire permet une augmentation de la surface d'échange et donc le prélèvement de l'eau (Tron *et al.*, 2015).

La surface racinaire est liée à la fois à la longueur des racines et au nombre de racines latérales, la profondeur des racines étant quant-à-elle liée à la longueur des racines et à leur angle d'insertion. Ainsi, en réponse au stress hydrique, une augmentation de la longueur totale du système racinaire a été observée (Hoogenboom *et al.*, 1987) ainsi qu'une augmentation de la surface racinaire, notamment en profondeur (Schenk and Jackson, 2002; Jongrungsklang *et al.*, 2014). Ces changements peuvent également être accompagnés d'une augmentation du volume racinaire et du diamètre des racines comme observé chez certains génotypes de cacahuète (Jongrungsklang *et al.*, 2014). Une étude conduite sur *Arabidopsis thaliana*, a également mis en évidence le développement de racines plus profondes avec un angle d'insertion plus important aboutissant à des racines plus verticales lorsque la plante est soumise à un stress hydrique et thermique (Rellán-Álvarez *et al.*, 2015).

Cependant, alors qu'une augmentation du nombre de racines latérales pourrait permettre d'augmenter la surface d'échange, c'est au contraire une diminution du nombre de racines latérales initiées qui a été observée en réponse à un stress hydrique chez *Arabidopsis* (van der Weele *et al.*, 2000; Deak and Malamy, 2005). Cette modification peut être perçue, dans un contexte de compromis pour le carbone entre l'augmentation de la longueur des racines déjà établies et l'initiation de nouvelles racines, comme une priorisation du prélèvement d'eau en profondeur. Cette réduction de ramification illustrée par une diminution de la densité des

racines latérales a également été montrée comme étant bénéfique pour la tolérance au stress hydrique chez le maïs (Zhan *et al.*, 2015).

b- Modifications fonctionnelles

Concernant le prélèvement en eau par les racines, et la circulation de l'eau dans la plante, le stress hydrique entraîne la production de protéines membranaires permettant d'ajuster la conductivité hydraulique au sein de la plantes : les aquaporines (Maurel and Chrispeels, 2001; Alexandersson *et al.*, 2010). On observe ainsi des modifications de l'abondance de ces aquaporines mais également de leur activité (Kapilan *et al.*, 2018).

Le stress hydrique entraîne également une baisse du prélèvement des nutriments par les racines ainsi que leur transport au sein de la plante (da Silva *et al.*, 2011). Cela induit de ce fait une réduction de la teneur en azote (N) et en phosphate (P) notamment (He and Dijkstra, 2014; Bista *et al.*, 2018). En condition de stress hydrique, une diminution de l'efficacité de prélèvement de multiples nutriments a été mise en évidence chez le pois chiche (Gunes *et al.*, 2006). Une étude conduite chez l'orge, le maïs et le Barbon de Gerard (*Andropogon gerardi*) souligne en effet une baisse du contenu en P et en N en réponse au stress hydrique. Cette baisse est due à une diminution de la concentration, pour le P ou l'activité, pour le N et P (g de N et P / g de racines) des protéines majeures responsables de leur prélèvement, le NRT1 et l'AMT1 pour le nitrate et l'ammonium, les deux sources principales en azote de la plante, et le PHT1 pour le phosphore (Bista *et al.*, 2018).

Au sein des nodosités, une baisse de la fixation symbiotique de N₂ est observée lors d'un stress hydrique (Serraj *et al.*, 1999; Prudent *et al.*, 2016). Cette diminution est en partie due à un impact structural du stress hydrique (baisse de la biomasse des nodosités décrite précédemment), mais également à un impact fonctionnel c'est-à-dire à une baisse de l'activité spécifique de fixation de l'azote (SNFa) (Streeter, 2003; Prudent *et al.*, 2016) dans des proportions qui dépendent du stade d'application du stress, de son intensité et de sa durée (Serraj *et al.*, 1999; Prudent *et al.*, 2016).

Trois hypothèses ont été formulées en ce qui concerne la limitation de l'activité spécifique de fixation symbiotique d'azote atmosphérique en condition de stress hydrique (Figure 17):

(1) une baisse de l'allocation carbonée vers les nodosités (González *et al.*, 1998; Galvez,

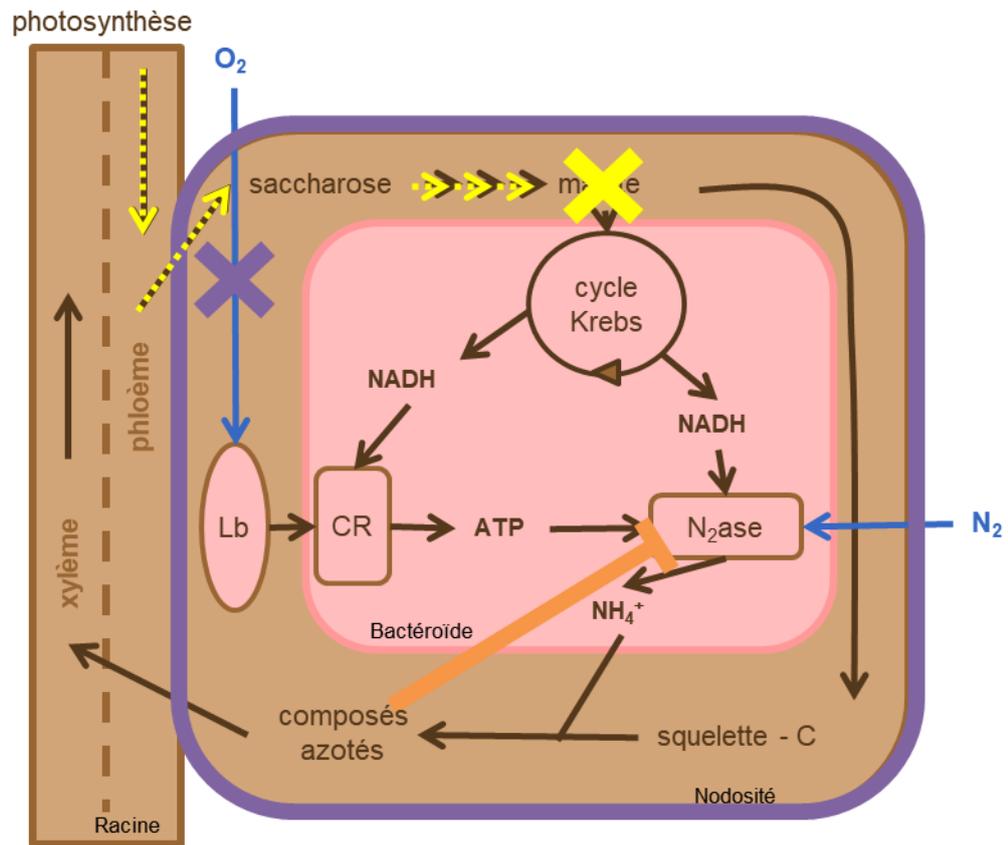


Figure 17 : Limitation de l'activité de fixation de l'azote (Sulieman, 2009).

Trois hypothèses ont été formulées pour expliquer la limitation de l'activité de fixation de l'azote : une baisse de l'allocation carbonée (en jaune), un feedback négatif par des composés azotés (en orange) et une limitation de la disponibilité en oxygène (en violet)

CR : chaîne respiratoire ; Lb : Leg-hémoglobine ; N₂ase : nitrogénase

2005).

En effet, une des premières hypothèses est que la baisse de la SNFa est due à une baisse de la photosynthèse (Huang *et al.*, 1975). Chez le pois, il a notamment été observé, en réponse au stress hydrique, une baisse de l'activité de la sucrose synthase dans les nodosités (González *et al.*, 1995, 1998) qui mène à une réduction de la disponibilité en malate, substrat nécessaire à la respiration bactérienne (Galvez 2005; Ladrera *et al.*, 2007),

(2) un feedback négatif de l'activité nitrogénase (enzyme responsable de la fixation) par des composés azotés, notamment l'aspartate, l'asparagine, le glutamate et la glutamine pour les espèces méditerranéennes, telles que le pois, et les uréides pour les espèces tropicales (Neo and Layzell, 1997; Serraj *et al.*, 1999; Vadez *et al.*, 2000; King and Purcell, 2001; Larrainzar *et al.*, 2009),

(3) une limitation de l'O₂ disponible pour la production d'ATP nécessaire à la fixation, due à une baisse de la perméabilité et de la diffusion de l'O₂ dans les nodosités et/ou une diminution de l'accumulation de leghémoglobine (Durand *et al.*, 1987; Gonzalez *et al.*, 2001; Naya *et al.*, 2007). Cette dernière semble se produire de manière synchronisée avec la baisse de l'activité de fixation du N₂ (Gonzalez *et al.*, 2001).

Ces trois hypothèses ne sont pas mutuellement exclusives et cette limitation de l'activité de fixation de l'azote peut très certainement être due à une combinaison de plusieurs de ces hypothèses (González *et al.*, 2001; Marino *et al.*, 2006; Nasr Esfahani *et al.*, 2014).

3- Les hormones et les facteurs de transcription, éléments régulateurs clés de ces réponses adaptatives

a- Les hormones

Plusieurs hormones sont associées aux stress abiotiques, notamment au stress hydrique, telles que l'acide abscissique (ABA), les cytokinines, l'acide salicylique (SA) et l'éthylène (Peleg and Blumwald, 2011).

L'hormone centrale dans la réponse au stress hydrique est l'ABA. Son accumulation dans les tissus augmente grandement en condition de stress hydrique du fait d'une augmentation de sa biosynthèse et/ou d'une diminution de sa dégradation (Bray, 1997). Elle est synthétisée

dans les racines et dans les parties aériennes et est notamment responsable de la fermeture des stomates et de la régulation de l'expression de nombreux gènes de réponse au stress (Chaves *et al.*, 2003). Le stress hydrique induit une augmentation du contenu en ABA mais une diminution de celui des cytokinines (CK) (Peleg and Blumwald, 2011). Ces deux hormones ont des rôles antagonistes vis-à-vis de la régulation de l'ouverture des stomates ; l'ABA induit leur fermeture alors que les CK, quand appliquées de manière exogène, participent à leur ouverture (Chaves *et al.*, 2003; Peleg and Blumwald, 2011). En effet, la baisse des CK (biosynthèse et transport) induite par le stress hydrique mène à une hypersensibilité à l'ABA et donc une régulation positive des gènes répondant à l'ABA (Ha *et al.*, 2012). Chez *Arabidopsis thaliana*, un contenu plus faible en CK a par ailleurs été montré comme augmentant la croissance racinaire permettant une meilleure tolérance au stress hydrique notamment via un meilleur prélèvement des nutriments et de l'eau (Werner *et al.*, 2010).

Il y a un « cross-talk » important entre les CK et l'ABA et le ratio ABA/CK semble important dans la réponse au stress hydrique. Nishiyama *et al.*, (2011) ont par ailleurs montré, via l'utilisation de plante d'*Arabidopsis thaliana* déficientes en CK, qu'une augmentation du ratio ABA/CK apparait favorable à une meilleure tolérance au stress hydrique. Cette amélioration de la tolérance est notamment liée à un maintien de l'intégrité des membranes cellulaires et à l'augmentation la croissance racinaire.

Cependant, l'ajout exogène de cytokinines induit une augmentation de la transpiration et de la densité stomatique et peut permettre une augmentation de la tolérance au stress hydrique (Farber *et al.*, 2016). En effet, les cytokinines ont été montrées comme permettant un maintien de la photosynthèse et de l'acquisition de l'azote lors d'un stress hydrique et donc permettant une meilleure tolérance (Reguera *et al.*, 2013).

Plusieurs études montrent le SA comme un régulateur positif de la tolérance au stress hydrique de par son rôle positif contre le stress oxydatif, en agissant comme régulateur du statut Rédox et en limitant la peroxydation des lipides membranaires (Faroo *et al.*, 2009; Kang *et al.*, 2013; La *et al.*, 2019). En effet, l'application exogène de SA permet d'augmenter la transcription des gènes du cycle Ascorbate – Gluthation, permettant d'augmenter leur biosynthèse et donc leur contenu dans la plante chez le blé (Kang *et al.*, 2013). Le SA a

également été montré comme ayant un rôle positif sur l'accumulation des composés compatibles et sur le métabolisme de la proline, contribuant ainsi au maintien de la turgescence de la plante comme cela a pu être montré chez le riz et le chou chinois (Farooq, Basra, *et al.*, 2009; La *et al.*, 2019). Ces modifications peuvent ainsi diminuer l'inhibition de la croissance en réponse au stress, en améliorant l'intégrité des membranes cellulaires et en facilitant le maintien de la photosynthèse et du métabolisme général (Farooq, *et al.*, 2009). Le SA a par ailleurs été montré comme empêchant les effets négatifs d'un stress salin sur l'activité de la nitrogénase et sur la biomasse de nodosités (Palma *et al.*, 2013).

L'auxine a un rôle clé dans la réponse au stress hydrique de par sa fonction de régulateur de la croissance racinaire (Partie II-1-d). Ainsi, la plasticité développementale des racines en conditions de stress est principalement régulée par l'auxine. Les changements de concentration en auxine sont principalement dus à des modifications de son transport, via la relocalisation ou l'internalisation de certains transporteurs tels que PIN2, mais également à des régulations de sa biosynthèse et de sa conjugaison à d'autres composés (Korver *et al.*, 2018). Le rôle de l'auxine reste cependant complexe, cette hormone ayant à la fois été rapportée comme ayant un rôle positif et négatif dans les réponses au stress hydrique. En effet, chez le riz, la surexpression d'un gène codant une indole-3-acetic acid (IAA)-amino synthetase, induisant une baisse du contenu en auxine libre, via l'augmentation de la conjugaison de l'IAA avec des acides aminés, a été montré comme associée à une meilleure tolérance au stress hydrique notamment en facilitant l'accumulation de protéines LEA (Zhang *et al.*, 2009). De la même manière, l'auxine est connue pour réguler négativement l'expression de DRO1, un gène contrôlant l'angle d'insertion des racines et montré comme associé à une meilleure tolérance (Uga *et al.*, 2013). Cependant, l'auxine a également été montrée comme régulant positivement l'expression de gènes relatifs aux stress abiotiques tels que les facteurs de transcription *DREB2A* et *DREB2B*, et en affectant positivement le métabolisme des ROS via une régulation positive de l'activité de certaines enzymes anti-oxydantes (Shi *et al.*, 2014).

D'autres hormones peuvent également être impliquées dans la réponse au stress hydrique telles que l'éthylène dont la synthèse est inhibée dans les nodosités et les racines lors d'un stress hydrique (Larrainzar *et al.*, 2014) ou les gibbérellines, hormones dont la diminution en condition de stress hydrique est associée à une inhibition de la croissance de la plante

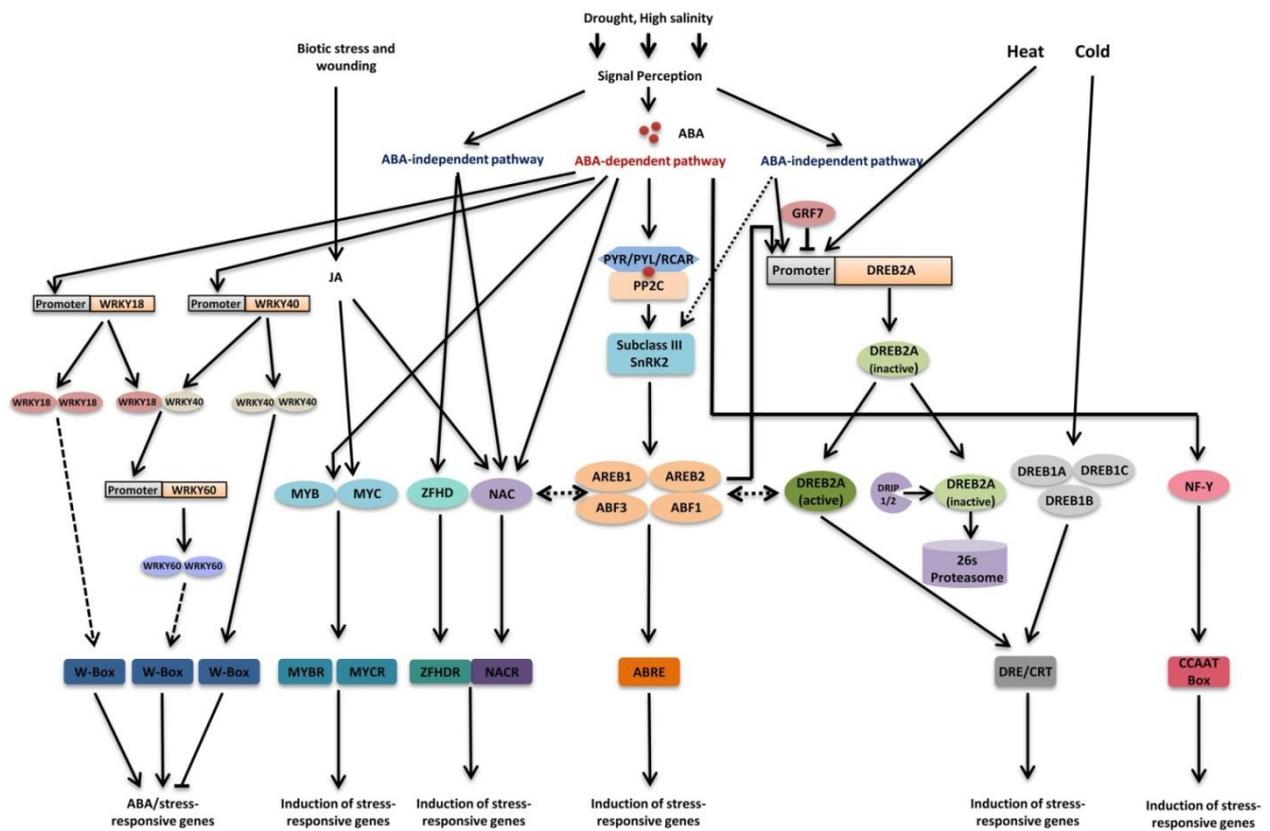


Figure 18 : Réseau de régulation transcriptionnelle majeur des facteurs de transcription impliqués dans les réponses au stress hydrique (d'après Singh et Laxmi, 2015)

La perception du stress hydrique active une voie dépendante de l'ABA et une voie indépendante de l'ABA.

Les signaux de perception de sécheresse mène a l'activation des deux voies ABA dépendant et indépendant. Dans la voie ABA dépendant, l'accumulation de l'ABA mène notamment à l'activation de 4 facteurs de transcription(FT) ABRE (ABA-responsive element), AREB1, AREB2 (ABRE binding protein 1 et 2), ABF3 (ABRE binding factor 3) et ABF 1. Ces FT régulent les gènes en se fixant aux éléments ABRE-cis présent dans leur promoteur. Additionnellement à cela, l'ABA régule également l'activité de FT de la famille des MYB/MYCs, NACs, WRKYs, et NF-Y. Les FT MYC2 et NAC sont également impliqués dans la signalisation de l'acide jasmonique (JA). La perception du signal de l'ABA mène également à l'induction de WRKY18 WRKY40 capables de se lier la W-box présente en WRKY60 et ainsi l'induire.

DREB2A joue un rôle pivot dans la régulation de l'expression des gènes ABA-indépendant en conditions de stress hydrique. L'expression du gène *DREB2A* est régulée par GRF7 dans des conditions normales. De plus, les DRIPs régulent les niveaux de protéine DREB2A en conditions normales. DREB2A participe également dans la régulation de l'expression de gènes en stress thermique. Certains facteurs de transcription NAC régulent également l'expression de gène de la voie ABA indépendant. Il a été récemment démontré que les deux voies ABA dépendant et indépendant interagissent en conditions de stress hydrique. Certaines observations récentes suggèrent qu'une interaction entre les NACs et AREB/ABFs serait possible. Les ellipses colorées représentent les facteurs de transcription et les DNA-binding proteins. Les lignes en pointillées indiquent de possibles interactions non confirmées pour l'heure.

(Colebrook *et al.*, 2014)

Les réponses au stress hydrique sont ainsi régulées par une balance hormonale complexe avec un équilibre entre les hormones favorisant et les hormones inhibant la croissance.

b- Facteurs de transcription

Les facteurs de transcription sont des protéines pouvant se lier à l'ADN et permettant ainsi de moduler directement l'expression de gènes via leur liaison à des séquences régulatrices spécifiques au niveau du promoteur. Plusieurs familles de facteurs de transcription ont été décrites comme jouant un rôle dans la régulation des réponses au stress hydrique (Janiak *et al.*, 2016; Joshi *et al.*, 2016). Il existe deux voies de régulation de l'expression des gènes en réponse au stress hydrique : l'une dépendante de l'ABA et l'autre indépendante de l'ABA (Figure 18).

De nombreux gènes régulés par l'ABA présentent dans leur région promotrice des éléments cis spécifiques permettant la régulation de leur transcription par différents facteurs de transcription, tels que des MYB (MYeloBlastosis oncogen) ou bZIP (basic leucine zipper). La voie la mieux étudiée implique des éléments cis de type ABRE (ABA- responsive element). Les facteurs de transcription se fixant sur ces séquences appartiennent à la famille des bZIP et sont communément appelés protéines AREB (« ABRE-binding protein ») ou ABF (« ABRE-binding factor ») (Maruyama *et al.*, 2012). Chez *Arabidopsis*, le riz et le soja, la sur-expression de AREB1 améliore la tolérance au stress hydrique (Oh *et al.*, 2005; Barbosa *et al.*, 2013; Yoshida *et al.*, 2015). D'autres facteurs de transcription de type bZip sont également impliqués dans la tolérance au stress hydrique. Chez *Arabidopsis*, la sur-expression de TabZIP60 améliore la tolérance au stress hydrique (Zhang *et al.*, 2015). Chez *Arabidopsis*, MYB96 est induit par le stress hydrique via un signal ABA et régule l'élongation des racines latérales (Seo *et al.*, 2009).

Concernant les mécanismes de régulation indépendants de l'ABA, deux familles de facteurs de transcription ont notamment été décrites comme étant impliqués dans les réponses au stress hydrique : les NAC (pour NAM, ATAF1 et ATAF2, CUC2) et les AP2/ERF (APETALA2/Eth response element binding factor), notamment les sous-groupes des ERF et des DREB (Dehydration responsive element binding protein). Chez le riz, OsERF71 est induit par le stress

hydrique et permet une croissance radiale des racines via la régulation positive de gènes associés à la paroi cellulaire et la lignine. Ceci permet une meilleure tolérance via une diminution des pertes en eau au niveau des racines (Lee *et al.*, 2016). Les DREB se fixent sur des motifs DRE (dehydration responsive element) et induisent l'expression d'une large gamme de gènes cibles appartenant notamment aux familles des LEA, particulièrement les déhydrines, des protéines chaperonnes mais également codant pour des enzymes de détoxification (Kidokoro *et al.*, 2015). La sur-expression de *TaNAC2* et de *OsNAC9* permettent tous deux une meilleure tolérance au stress hydrique notamment via un allongement des racines pour *TaNAC2* (Mao *et al.*, 2012) et via une augmentation du diamètre racinaire pour *OsNAC9* (Redillas *et al.*, 2012). Chez le peuplier, *PtabZIP1-like*, principalement exprimé dans les racines et répondant à l'auxine, est impliqué dans l'augmentation du nombre de racines latérales en réponse au stress hydrique, participant de ce fait à sa résistance au stress (Dash *et al.*, 2017).

4- La récupération après un stress : un ensemble de mécanismes encore peu exploré

D'après Hodgson *et al.*, (2015) la capacité d'une plante à survivre et maintenir ses fonctions face à une perturbation extérieure représente la capacité de **résilience** de la plante. Cette résilience englobe à la fois la **résistance**, qui regroupe les mécanismes mis en place lors du stress pour répondre à la perturbation extérieure, et la **récupération**, c'est-à-dire les processus endogènes ayant lieu après le stress qui ramènent le système perturbé vers l'équilibre. Ce concept est, à la base, issu de l'écologie ainsi que de l'étude des écosystèmes.

Cette période de récupération est restée peu étudiée et peu prise en compte dans les analyses de réponse au stress, et notamment au stress hydrique, pendant de longues années. Cependant, ces dernières années, plusieurs études ont souligné l'importance de la période de récupération suivant le stress dans la résilience aux stress. Striker (2012) dans son étude sur la tolérance à l'excès d'eau met en évidence le fait qu'une plante peut moins bien résister au stress qu'une autre (pendant le stress) mais avoir une meilleure récupération (après le stress) et ainsi être tout aussi résiliente. Il est donc crucial de prendre en compte la capacité de récupération d'une plante dans l'estimation de sa résilience à un stress. Dans ce sens, Chen *et al.*, (2016) soulignent une forte relation entre la résilience du maïs au stress hydrique et sa capacité de récupération après un stress hydrique. Pour cela, 10 génotypes différents ont été

utilisés et leurs capacités de résistance, récupération et résilience ont été calculées sur la base de la croissance relative durant respectivement la période de stress, la période de ré-arrosage et de l'ensemble de ces deux périodes. Cette relation montre que, dans la résilience d'une plante, sa capacité de récupération après un stress peut jouer un rôle plus important que sa capacité de résistance durant le stress. L'efficacité de la récupération dépend cependant de la durée et de l'intensité du stress hydrique appliqué (Xu *et al.*, 2010; Prudent *et al.*, 2016) ainsi que des réponses mises en place pendant la période de stress (Siopongco *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2010). Une autre étude souligne la variabilité génétique de la récupération. En étant menée sur deux génotypes de psoralée bitumineuse (*Bituminaria bituminosa* var. *albomarginata*, une légumineuse pérenne) et un génotype de luzerne (*Medicago sativa*), tous identifiés comme tolérants au stress hydrique, cette étude souligne que la mise en place de stratégies de récupération différentes chez la psoralée bitumineuse en comparaison avec la luzerne entraîne à maturité physiologique des rendements contrastés (Foster *et al.*, 2015).

Après un stress hydrique, la période de récupération peut permettre une restauration complète de la croissance et/ou du rendement de la plante chez différentes espèces telles que le maïs (Sun *et al.*, 2016), *Medicago* (Yousfi *et al.*, 2015), le pois chiche (Yaqoob *et al.*, 2013) et le pois (Prudent *et al.*, 2016). La récupération peut également entraîner une surcompensation de la croissance de la plante et ainsi surpasser les plantes contrôles n'ayant pas subi de stress (Xu *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2016).

La récupération s'effectue à des vitesses différentes selon les processus et voies métaboliques impliquées : production d'énergie, protection osmotique, signalisation (Sun *et al.*, 2016). En effet, cette récupération peut passer par des modifications fonctionnelles (activité enzymatique, synthèse de métabolites, ...) qui peuvent être réalisées dans un temps relativement court, mais également par des modifications ou compensations structurales, qui nécessitent une durée plus importante. Ainsi, après un stress hydrique, la récupération de la photosynthèse s'effectue en quelques jours avec notamment la réouverture des stomates et la synthèse *de novo* de la Rubisco (Chaves *et al.*, 2009; Erice *et al.*, 2011), alors que la récupération structurale *via* par exemple, un grossissement des nodosités chez le pois (Prudent *et al.*, 2016) nécessite un temps plus important. Ainsi, plusieurs études réalisées après un temps très court depuis la fin de la période de stress ne laissent potentiellement pas

assez de temps pour une possible récupération complète.

De plus, les différentes voies métaboliques peuvent ne pas initier une récupération de manière synchronisée. Dans l'étude menée par Larrainzar *et al.*, (2009) sur *Medicago truncatula*, une récupération après un stress hydrique a été observée après seulement 2 jours de ré-arrosage et a mis en évidence un décalage dans l'initiation de la récupération entre l'accumulation de protéines impliquées dans la photosynthèse et dans celles impliquées dans l'acquisition d'azote (seulement la fixation pas le métabolisme azoté). Ainsi après le stress hydrique, le métabolisme semble ici centré sur la reprise de croissance et la relance de la fixation symbiotique de l'azote, mais l'assimilation de cet azote n'arrive que plus tard

A notre connaissance, les études s'étant intéressées à la période de récupération se sont limitées à la caractérisation d'un unique point au cours du ré-arrosage, positionné de quelques jours à plusieurs semaines après la fin du stress hydrique. Elles soulignent malgré tout l'importance de l'aspect dynamique de la récupération, afin de pouvoir pleinement évaluer les mécanismes sous-jacents à la récupération des plantes après un stress hydrique, et de comprendre la chronologie de leur mise en place.

Chapitre 2 :

Caractérisation écophysiological de la réponse au stress hydrique et au ré-arrosage de deux génotypes de pois ayant une capacité de résilience contrastée

I- Objectif et démarche

En tant que légumineuse, le pois met en place une symbiose avec des bactéries fixatrices de l'azote atmosphérique au sein de structures racinaires, les nodosités. Cela lui offre une seconde voie d'acquisition de l'azote. Cependant, la formation des nodosités, leur maintien ainsi que leur fonctionnement représentent un coup important en carbone pour la plante et peut se faire au détriment du développement et de la croissance d'autres organes, notamment au détriment des racines. Or, les racines, en plus d'être le lieu de mise en place des nodosités, sont également responsables du prélèvement de l'eau et des nutriments. Elles ont de ce fait un rôle crucial, d'autant plus en conditions de stress hydrique. C'est donc un enjeu majeur que d'étudier cette interaction pois - rhizobium en réponse au stress hydrique. Cependant, la réponse des plantes au stress englobe à la fois de la réponse des plantes pendant le stress (la tolérance) mais également de la réponse des plantes après ce dernier (la récupération). Cette seconde période, bien que très importante a été négligée pendant des années puis étudiée de manière ponctuelle. Or, la récupération se caractérise à travers différents paramètres cinétiques : le temps de latence avant l'initiation de la récupération, la vitesse à laquelle s'effectue la récupération, l'état atteint par les plantes à la fin de la récupération et l'écart entre cet état et celui qu'auraient des plantes n'ayant pas subies le stress.

L'objectif de l'étude présentée dans ce chapitre a ainsi été de caractériser de manière dynamique les réponses de 2 géotypes, contrastés pour leur résilience, lors d'un épisode de déficit hydrique et au cours de la période de ré-arrosage qui suit afin d'identifier des mécanismes associés à une meilleure résilience au manque d'eau. Pour cela, 2 expérimentations ont été conduites sur la plateforme de phénotypage à haut débit 4PMI de Dijon. Durant ces expérimentations, les plantes des 2 géotypes ont été soumises, au cours de la période végétative, à un déficit hydrique de 2 semaines suivi d'un de ré-arrosage optimal. Lors de la première expérimentation, une cinétique de prélèvements a été réalisée lors de la période de déficit hydrique et au cours des 2 premières semaines de ré-arrosage qui ont suivi afin de caractériser les réponses des 2 géotypes. Ces analyses seront principalement centrées sur l'étude des processus d'acquisition et d'utilisation du carbone, de

l'azote et de l'eau et sur les flux trophiques entre la plante et le rhizobium, cela grâce à l'utilisation d'un cadre conceptuel d'analyse de type structure-fonction centré sur les flux de carbone, d'azote et d'eau au sein du continuum plante-atmosphère-sol. Lors de la seconde expérimentation, 2 épisodes de marquage isotopique au ^{13}C et $^{15}\text{N}_2$ ont été réalisés à des temps précis (à la fin de la période de déficit hydrique et après une semaine de ré-arrosage) afin d'obtenir une lecture précise du prélèvement du carbone et de l'azote par la plante ainsi que sa répartition/son allocation au sein des différents compartiments.

II- Quelle stratégie utiliser pour favoriser une meilleure résilience à la sécheresse ? Une comparaison de 2 génotypes de pois grâce à l'utilisation d'un cadre d'analyse écophysiological de type structure-fonction

Ce travail se réfère à un article intitulé : « Pea efficiency of post-drought recovery relies on the strategy to fine-tune nitrogen nutrition ».

Cet article a été publié dans la revue *Frontiers in plant science*.

Couchoud M, Salon C, Girodet S, Jeudy C, Vernoud V and Prudent M (2020) Pea Efficiency of Post-drought Recovery Relies on the Strategy to Fine-Tune Nitrogen Nutrition. *Front. Plant Sci.* 11:204. doi: 10.3389/fpls.2020.00204

Pea efficiency of post drought recovery relies on the strategy to fine-tune nitrogen nutrition

Mégane Couchoud¹, Christophe Salon¹, Sylvie Girodet¹, Christian Jeudy¹, Vanessa Vernoud^{1*},
Marion Prudent^{1*}

¹Agroécologie, AgroSup Dijon, INRAE, Univ. Bourgogne, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F-21000 Dijon, France

* Correspondence:

Equal contributions, corresponding authors:

Emails: Vanessa.Vernoud@inrae.fr; Marion.Prudent@inrae.fr

Keywords: Agroecology, Water deficit, Grain legumes, *Pisum sativum*, Resilience, Roots, Symbiotic nitrogen fixation, Yield stability.

Abstract

As drought is increasingly frequent in the context of climate change it is a major constraint for crop growth and yield. The ability of plants to maintain their yield in response to drought depends not only on their ability to tolerate drought, but also on their capacity to subsequently recover. Post-stress recovery can indeed be decisive for drought resilience and yield stability. Pea (*Pisum sativum*), as a legume, has the capacity to fix atmospheric nitrogen through its symbiotic interaction with soil bacteria within root nodules. Biological nitrogen fixation is highly sensitive to drought which can impact plant nitrogen nutrition and growth. Our study aimed at dynamically evaluating whether the control of plant N status after drought could affect nodulated pea plant's ability to recover.

Two pea genotypes, Puget and Kayanne, displaying different drought resilience abilities were compared for their capacity to tolerate to, and to recover from, a 2-weeks water deficit period applied before flowering. Physiological processes were studied in this time-series experiment using a conceptual structure-function analysis framework focusing on whole plant carbon, nitrogen and water fluxes combined to two ¹³CO₂ and ¹⁵N₂ labelling experiments.

While Puget showed a yield decrease compared to well-watered plants, Kayanne was able to maintain its yield. During the recovery period, genotype-dependent strategies were observed.

The analysis of the synchronisation of carbon, nitrogen and water related traits dynamics during the recovery period and at the whole plant level, revealed that plant growth recovery was tightly linked to N nutrition. In Puget, the initiation of new nodules after water deficit was delayed compared to control plants, and additional nodules developed, while in Kayanne the formation of nodules was both rapidly and strictly re-adjusted to plant growth needs, allowing a full recovery.

Our study suggested that a rapid re-launch of N acquisition, associated with a fine-tuning of nodule formation during the post-stress period is essential for efficient drought resilience in pea leading to yield stability.

1- Introduction

Pea (*Pisum sativum* L.) produces seeds rich in proteins (about 25%, Reichert and MacKenzie, 1982), which can be used for both feed and food. Like other legumes, pea does not require nitrogen fertilizer for its growth, making it an economic and environmental friendly crop that can play an important role in sustainable agriculture (Graham, 2003; Jensen and Hauggaard-Nielsen, 2003). This particular feature is due to legumes' unique ability to fix atmospheric dinitrogen (N₂) thanks to a symbiosis with soil bacteria (type Rhizobia) inside specific root structures called nodules. The symbiotic nitrogen fixation (SNF) process relies on structural components (nodule number and size), and on functional characteristics (N₂ fixation thanks to the nodule nitrogenase enzyme). Photosynthetic carbon arising from shoots sustains nodules formation, nodule maintenance and N₂ fixation activity (Kouchi and Yoneyama, 1984) at the expense of both shoot growth and root growth and functioning (Salon et al., 2001; Voisin et al., 2003a, b). The nodulation process is thus strictly adjusted to plant growth and is controlled by both local control mechanisms and a systemic regulation process known as "autoregulation of nodulation" (Reid et al., 2011) which presumably depends on the nitrogen status of the plant (Ruffel et al., 2008; Jeudy et al., 2010). This results in the induction of synchronous and transient waves of nodulations in the root system.

In the current context of climate change, we are witnessing an increase in the heterogeneity of rainfall with alternating periods of heavy rainfall and drought (Bernstein et al., 2007; Dai, 2013), causing plant yield and seed protein content instability, and contributing as an example

to the decrease in the cultivated area of pea in Europe (Cernay et al., 2015). One of the first responses observed under water deficit, which contributes to plant tolerance is stomatal closure mediated by abscisic acid (ABA), leading to a decrease in stomatal conductance (Chaves et al., 2003; Anjum et al., 2011). While stomatal closure reduces water loss, it can also decrease plant photosynthesis and thus reduce biomass accumulation (Chaves et al., 2003; Xu et al., 2010). Water deficit also modulates biomass partitioning among the different plant compartments of legumes: root growth is maintained or even increased at the expense of shoot growth (Xu et al., 2010; Prudent et al., 2016; Kunert et al., 2016) while nodule growth is reduced (Mahieu et al., 2009; Prudent et al., 2016). SNF is highly sensitive to environmental constraints (Salon et al., 2001) and particularly to water deficit (Zahran, 1999). The specific nitrogen fixation activity (sNFA) is greatly decreased by water deficit (Serraj et al., 1999; Streeter, 2003; Prudent et al., 2016) as a result of several factors including O₂ partial pressure within nodules, N feedback regulation and carbon limitation (Larrainzar et al., 2009). Thus, increasing occurrences of drought will exacerbate the negative impact of water deficit on SNF (Vadez et al., 2012), which is detrimental to legumes nitrogen nutrition under water deficit conditions, and thus to yield stability.

When a plant faces a stress, its tolerance to the stress and its recovery after the stress constitute two different processes which contribute to its resilience. Hodgson et al., (2015) define resilience as the outcome of tolerance and recovery, the tolerance being “the impact of exogenous disturbance” and the recovery being all “endogenous processes that pull the disturbance system back towards an equilibrium”. Post-stress recovery corresponds to an important part of resilience of ecosystems (Lake, 2013) which has not been yet extensively studied as compared to plant tolerance. Plant performance during a stress is not necessarily correlated to its ability to recover post-stress (Striker, 2012). This highlights the importance of taking into consideration the mechanisms underlying plant recovery to improve crop stress resilience.

Plant’s ability to recover from a stress is essential for its survival and yield establishment, especially after a drought period (Chaves et al., 2009). In maize it has been suggested that drought recovery could play a more important role in plant resilience than drought resistance (Chen et al., 2016). A complete recovery after water deficit has been observed in different species such as maize (Sun et al., 2016), Medicago (Yousfi et al., 2015), chickpea (Yaqoob et

al., 2013) and pea (Prudent et al., 2016). Although post-drought recovery is being increasingly studied, the available studies have generally focused only on a single harvest after the re-watering period, which lasted from a few days to weeks (da Silveira et al., 2001; Naya et al., 2007; Larrainzar et al., 2009; Nasr Esfahani et al., 2014; Prudent et al., 2016; Prudent et al., 2020). Such time points of observation and lack of dynamics are not sufficient to fully assess the mechanisms underlying plant recovery as it presumably comprises a diversity of structural and functional responses, leading to either partial, complete or over compensatory recoveries. The recovery of a process after a disturbance can be explained by various parameters such as the latency time to initiate the recovery, the rate of the process's response, the time taken to reach a stable state, and the gap (Δ) between the value of the process in a disturbed situation and in the control condition (Hodgson et al., 2015). As such it is essential to consider the dynamic dimension of the recovery. Moreover, a time-series study of post-drought recovery in the model legume *Medicago truncatula* suggested that the nutritional status of the plant could also shape its ability to recover (Lyon et al., 2016). Lastly, the importance of the source of legume N nutrition (nitrate-fed *versus* SNF) in recovery dynamics was also highlighted as nodulated plants recovered faster than nitrate-fed plants after drought (Staudinger et al., 2016). We thus decided to explore whether the control of plant N status after drought could affect plant ability to recover, when plant N nutrition relies only on SNF. We hypothesized that a quick and strict adjustment of the number of N₂-fixing structures (i.e nodules) to plant growth needs is a key trait for an efficient post-drought recovery.

To that aim, we characterized N nutrition during drought and subsequent recovery in two pea genotypes displaying contrasted drought resiliences. In order to assess mechanisms involved in both tolerance and recovery mechanisms, pea plant responses during water deficit and subsequent re-watering were dynamically analysed in two independent experiments, the second involving two successive plant labelling experiments. Because N nutrition is tightly linked at the whole plant level to carbon and water nutrition (especially under drought), and specifically for nodules (Liu et al., 2018), physiological processes were studied using a conceptual structure-function analysis framework focusing mainly on plant C, N and water fluxes.

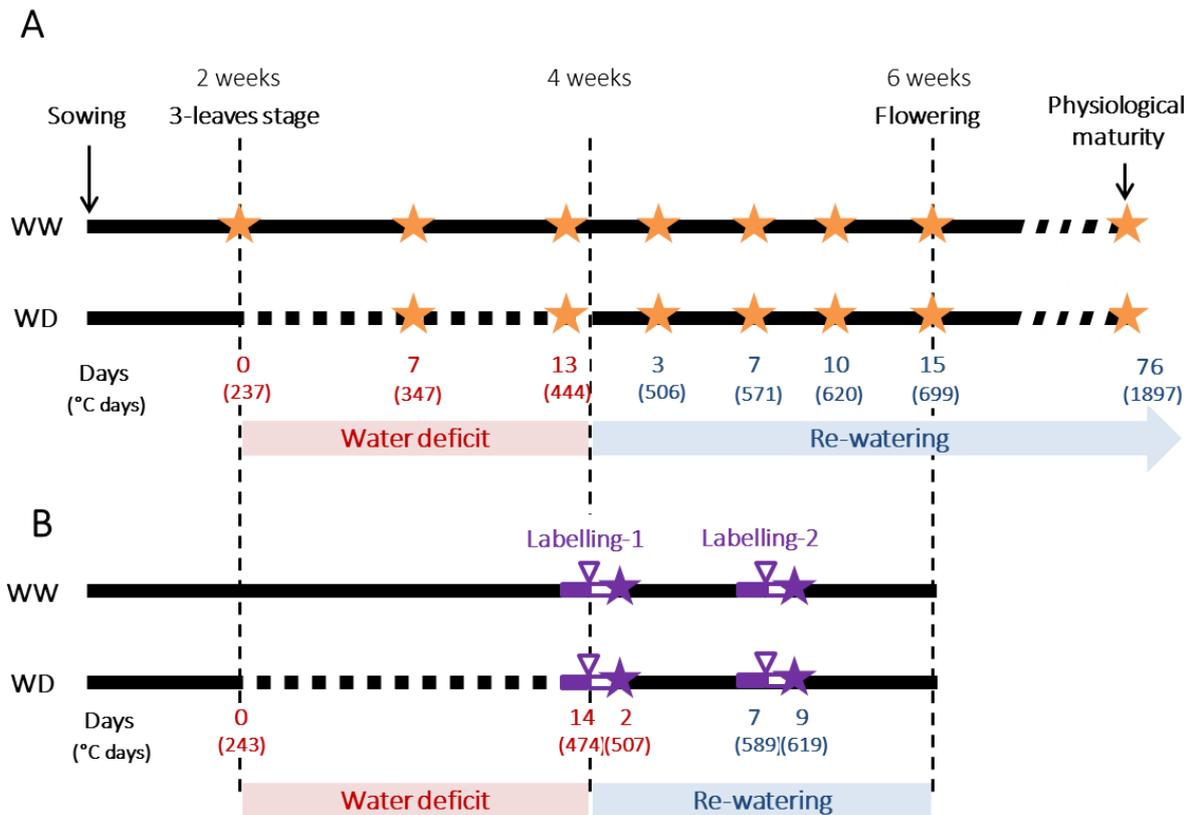


Figure 19: Experimental design used to characterize plant responses to water deficit and subsequent re-watering.

(A) Description of the kinetic experiment. Water deficit was imposed during the vegetative stage for 2 weeks and followed by a re-watering period. WW corresponds to well-watered plants and WD corresponds to plant subjected to water deficit, orange stars indicate harvests. Time is expressed in days and degree days. (B) Description of the $^{13}\text{CO}_2$ and $^{15}\text{N}_2$ labelling experiments. Full purple line indicates acclimation period, purple arrowhead indicates labelling, empty purple line indicates chase period and purple stars indicate harvests.

2- Materials and methods

2.1- Plant growth conditions

Two genotypes of *Pisum sativum* L. were used: Kayanne, an *afila* spring pea cultivar (obtained from KWS Momont, Mons-en-Pévèle, France) and Puget, a leaflet garden pea cultivar (obtained from Graines-LORAS, La Tour de Salvagny, France). Both cultivars have a semi-determinate growth habit. Seeds were calibrated and pre-germinated at 21 °C in the dark during four days. After being transplanted in 2-liter pots filled with a mixture of perlite:sand (3:1, v:v) seedlings were inoculated with 1 ml of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, strain P221 (MIAE01212, 10^8 bacteria.ml⁻¹). Plants were transferred in a greenhouse of the Plant Phenotyping Platform for Plant and Microorganism Interactions (4PMI) at INRA in Dijon (France) one week after sowing. Mean day/night temperatures were 20/16 °C and the photoperiod was 16h. Artificial light (PAR of 280 $\mu\text{mol. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$) was supplied by sodium lamps (MACS 400W; Mazda, Dijon, France) to complement natural light during the photoperiod.

During the first two weeks, plants were automatically watered 4 times a day with a N-free nutritive solution to reach 100 % of substrate water-holding capacity (Figure 19). Substrate water-holding capacity was gravimetrically estimated before each watering (for more details, see Supplementary Material Figure S1). Plants of each genotype were then split in two groups: half of the plants (Well-Watered plants, hereafter referred as WW) was maintained until physiological maturity under optimal water conditions corresponding to 100 % of substrate water-holding capacity. The other half of plants (Water-Deficit plants, hereafter referred as WD plants) was subjected to a water deficit period of two weeks by withholding water until pots reached 40% of substrate water-holding capacity (Supplementary Material Figure S1), corresponding to a predawn plant water potential of 0.9 MPa. WD plants were then re-watered to reach 100 % of substrate water-holding capacity until physiological maturity (Supplementary Material Figure S1).

For the labelling experiment, plant growth conditions were similar, except than individual air-tight PVC 2-liter pots were used to allow shoot-root atmosphere separation. Mean day/night temperatures were set at 20/17.5 °C and artificial light (PAR of 250 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) was supplied by sodium lamps (MACS 400W; Mazda, Dijon, France) to complement natural light during the photoperiod.

2.2- Experimental design and sampling

For the first kinetic experiment (Figure 19A), six plants per genotype and per water treatment were harvested at seven different times corresponding to the beginning, the middle (1 week) and the end (2 weeks) of the water deficit period, and to 3, 7, 10 and 15 days of re-watering (Figure 19A). For each harvest, six plants per condition were sampled. Shoots and roots were separated. Leaves and stem from shoots were separated during the vegetative period and additionally pods and seeds were harvested during the reproductive stage. The nodulated root system was gently washed, and nodules were manually removed from the root system, as soon as they were visible at the naked eye, and counted. At physiological maturity, ten to twelve plants per condition were harvested.

For the second experiment involving labelling, carbon and nitrogen were labelled with $^{13}\text{CO}_2$ and $^{15}\text{N}_2$ respectively at two periods during plant growth, the first at the end of the water deficit period and the second after seven days of re-watering (Figure 19). For each labelling experiment, six pots of each condition and genotype were transferred two days before labelling from the greenhouse (see above) to a transparent air-tight labelling chamber made of Plexiglas for acclimation. Shoot and root atmospheres were controlled using DasyLab software (SM2i, Villiers St Frédéric, France), and temperature and humidity were regulated by using an air conditioning unit (Voilot, Dijon, France). Mean day/night temperatures were 21/17.5 °C and the photoperiod was 10h supplied by lamp (Osram, Dulux L, 55W 954) leading to an average PAR of 535 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

The day of labelling, PVC pots were closed and air tightness was ensured using physiological moulding material (Qubitac, Qubit system inc., Kingston, Canada) and silicone rubber (RTV 65RTV3428-1, Zundel Kohler, France). Shoots were exposed to a $^{13}\text{CO}_2$ -enriched atmosphere for 10 hours, with an air CO_2 concentration of 380 ppm and a $^{13}\text{CO}_2$ enrichment of 10 Atom %. During this period, air CO_2 concentration and $^{13}\text{CO}_2$ enrichment were continuously measured with an infrared gas analyser (IRGA S710, Sick Maihak AG, Hamburg, Germany) and maintained by automatic injection of a mixture of $^{13}\text{CO}_2$ and $^{12}\text{CO}_2$. Nodulated roots were simultaneously exposed to a $^{15}\text{N}_2$ -enriched atmosphere by direct injection of $^{15}\text{N}_2$ (5% $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) into air-tight pots for 24h (simultaneously to the 10 hours of $^{13}\text{CO}_2$ shoot exposure and the following night). The amount of $^{15}\text{N}_2$ to be injected was determined at the outset by

measuring the mean air volume in the container. To obtain an accurate measurement of $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ enrichment in each pot, aliquots were sampled 30 minutes, 10h and 24h after $^{15}\text{N}_2$ injection with 5 replicates per sampling.

To study C and N isotope partitioning among plant parts, labelling was followed by a 2 days chase period where plants were exposed to an atmosphere with natural C and N enrichment and then harvested similarly to the kinetics experiment.

2.3- Measurement and calculation

Our framework of analysis was structure-function based and enriched the version of Moreau et al., (2012) by adding nodule N acquisition and water fluxes (Supplementary Material, Figure S2). It considered “structural variables”, characterizing plant growth including plant, shoot, nodulated root, nodule and root biomass, leaf area, nodule number, plant nitrogen amount and concentration and evapotranspiration. These variables are linked together by “functional variables”, characterizing plant capacity to uptake and use resources (carbon, nitrogen and water): nitrogen use efficiency (NUE), radiation use efficiency (RUE), specific nitrogen fixation activity (sNFA), water use efficiency (WUE), specific root water uptake (sRWU).

Evapotranspiration (gH_2O) was gravimetrically determined, based on the daily water loss from each pot, by calculating the difference between pot weight before and after each watering. Stomatal conductance ($\text{mmol water}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) was measured with a diffusion porometer (AP4; Delta T device, Cambridge, UK) on a stipule of the last fully expanded leaf.

For each harvest, all plant compartments (root, nodule, leaf, stem and pod and seed) were dried for 48h in an oven at 80°C . Biomass (BM) of each dried part was measured and then dried tissues were ground into a fine powder and analysed with an elemental analyser (Thermo Electron NC2500, Courtaboeuf, France) in order to estimate C and N concentration in each tissue.

For each plant, shoot/nodulated root ratio corresponding to the ratio of above-ground biomass (leaves and stem) over total below-ground dry biomass (roots and nodules) were calculated. The nodule/nodulated root ratio corresponding to nodule biomass divided by total below-ground biomass, was also calculated.

For leaf area measurement, leaves were spread out and scanned on a scanner (EPSON GT20000, Model J151A, Japan), and leaf area was measured using the WinRhizo software (Regent Instruments Canada Inc, 2012b version).

The Nitrogen Nutrition Index (NNI) was calculated as the ratio between shoot N concentration and the critical N concentration (Nc), following: $Nc = 4.756 \text{ BM}^{-0.088}$ (Voisin et al., 2015).

Radiation Use Efficiency (RUE) between date t_1 and t_2 was calculated as the ratio of the plant biomass (BM) accumulated during this period over the integrated leaf area between t_1 and t_2 and is expressed in g.cm^{-2} :

$$\text{RUE} = \frac{BM_{t_2} - BM_{t_1}}{\int_1^2 \text{leaf area} .dt}$$

Nitrogen Use Efficiency (NUE) between date t_1 and t_2 was calculated as the ratio of the plant biomass (BM) over the plant nitrogen amount (QN) accumulated during this period and is expressed in g.gN^{-1} :

$$\text{NUE} = \frac{BM_{t_2} - BM_{t_1}}{QN_{t_2} - QN_{t_1}}$$

Water Use Efficiency (WUE) between date t_1 and t_2 was calculated as the ratio of the plant biomass (BM) accumulated over the amount of water evapotranspirated by the plant during this period (QH_2O) and is expressed in $\text{g. gH}_2\text{O}^{-1}$:

$$\text{WUE} = \frac{BM_{t_2} - BM_{t_1}}{QH_2O_{t_2} - QH_2O_{t_1}}$$

The specific Root Water Uptake (sRWU) between date t_1 and t_2 was calculated as the ratio of the amount of water evapotranspired by the plant (QH_2O) over the integrated root dry weight (BM_{root}) between t_1 et t_2 and is expressed in $gH_2O[gBM_{root} \text{ day}^{-1}]^{-1}$:

$$sRWU = \frac{QH_2O_{1 \rightarrow 2}}{\int_1^2 BM_{root} \cdot dt}$$

2.4- ^{13}C and ^{15}N content and enrichment determination

For each harvest, all plant compartments (root, nodule, leaf, stem) were dried for 48h in an oven at 80°C. The biomass of each part was measured and then dried tissues were ground into a fine powder. Aliquots were analysed for their C and N concentrations with an elemental analyser (EA, VarioMicroCube, Elementar) and their ^{13}C and ^{15}N enrichment determined with an online isotope ratio mass spectrometer (irm-EA/MS, Isoprime/Elementar).

2.5- Isotopic calculations for the labelling experiments

Calculations were done according to the isotopic dilution principle. The percentage of C or N allocated to the different compartments during the labelling period was calculated as the ratio of C or N incorporated in the compartment i (QCl_i or QNI_i) during the labelling experiment over the total amount of C or N incorporated in plant (QCl_{plant} or QNI_{plant}) during this period:

$$\text{C allocation to compartment } i = \left(\frac{QCl_i}{QCl_{plant}} \right) \times 100$$

$$\text{N allocation to compartment } i = \left(\frac{QNI_i}{QNI_{plant}} \right) \times 100$$

where QCl and QNI can be calculated as:

$$QCl = BM \times (\%C / 100) \times \left(\frac{(AC_{organ} - AC_{control})}{(AC_{source} - AC_{control})} \right)$$

$$QNI = BM \times (\%N / 100) \times \left(\frac{(AN_{organ} - AN_{control})}{(AN_{source} - AN_{control})} \right)$$

where AC_{organ} and AN_{organ} are the ^{13}C and ^{15}N abundances, respectively, of the plant organ of the labelled plant or non-labelled control plants; AC_{source} and AN_{source} are the ^{13}C and ^{15}N enrichment, respectively, of the labelled shoot and root atmosphere; BM is biomass and $\%C$ and $\%N$ are the percentages of C and N in biomass (w/w), respectively.

sNFA ($gN.gBM_{nodule}^{-1}.day^{-1}$) was calculated as the ratio of total amount of N incorporated in plant during the labelling experiment in plant (QNI_{plant}) over nodule biomass (BM_{nodule}):

$$sNFA = \frac{QNI_{plant}}{BM_{nodule}}$$

Photosynthesis during the labelling day ($gC.gBM_{shoot}^{-1}.day^{-1}$) was calculated as the ratio of total amount of C incorporated in plant (QCI_{plant}) during the labelling experiment over shoot biomass (BM_{shoot}):

$$\text{Photosynthesis} = \frac{QCI_{plant}}{BM_{shoot}}$$

The labelling technique used for measuring net carbon photosynthetic input into plant tissue is much more precise than relying on a “budget method” (ie weighting plants and measuring the increment of stable ^{12}C content). The tracer which here is labelled $^{13}CO_2$ is introduced at a known enrichment far above the natural one (around 1,1%) and precise IRMS measurements allow assessing the contribution of unlabeled ^{12}C previously incorporated in plants vs the ^{13}C provided to plants during the labeling period.” Advantages of isotopic labeling and fluxomics have been reviewed in Salon et al. (2017).

2.6- Statistical analyses

All statistical analyses were performed with R software, version 3.5.3. An analysis of variance was performed using “aov” function and significant differences among conditions were determined by SNK test (“SNK.test” function from “agricolae” Package, version 1.3.1). Results from the analysis of variance are shown in Supplementary Material Table S1. For efficiency and activity variables, a bootstrap sampling method was used.

Student’s t-tests were performed for each genotype to test for water treatment effect (“t.test” function). Only differences at the 0.05 probability level were considered.

3- Results

3.1- Kayanne and Puget which have contrasted plant architecture display different resilience abilities towards water deficit.

Two pea genotypes were studied: Puget is a leaflet genotype while Kayanne is a genotype with the *afila* allele which transforms leaflets into tendrils (Supplementary Material, Figure S3). This leads to a lower leaf area in Kayanne than in Puget. However, the shoot-to-root ratio of Puget is lower than that of Kayanne, due to the greater development of its root system (Supplementary Material, Table S1).

Two-week old Kayanne and Puget plantlets were subjected to a moderate and progressive water deficit after which plants were optimally re-watered allowing a period of recovery until harvest (Figure 19A). The effect of water deficit on both genotypes was evaluated at physiological maturity by measuring plant yield and yield components. Water deficit decreased Puget’s plant and seed biomasses, while Kayanne was not significantly affected (Figure 20A). The lower yield in Puget resulted from less seeds (-15%, Figure 20B) rather than from a decrease in individual seed weight. This indicates that Kayanne was more resilient towards a moderate 2-week water deficit applied during the vegetative phase than Puget.

Stress tolerance and recovery capacities of both genotypes were compared during the water deficit period (3 sampling dates), and during the first two weeks of the re-watering phase (4

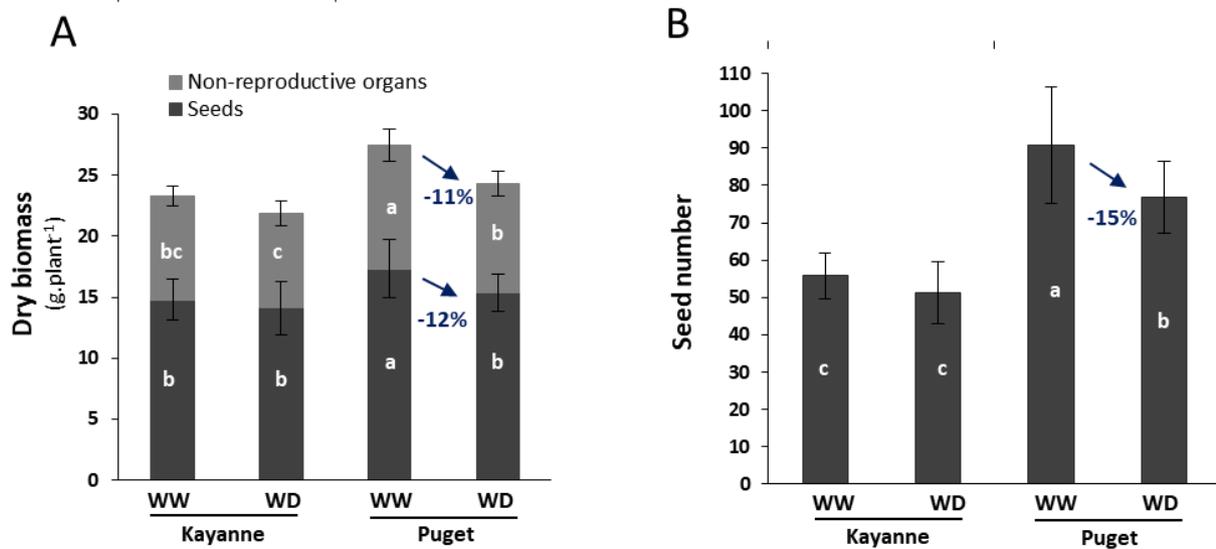


Figure 20: Plant yield and yield components at physiological maturity are affected by water deficit applied during the vegetative stage followed by a period of re-watering.

(A) Total plant biomass was divided into seed biomass (dark grey) and non-reproductive organ biomass (light grey). (B) Number of seeds per plant. Values are means, bars represent standard deviations (n = 12). Different letters indicate statistically significant differences between treatments (ANOVA followed by SNK test, p < 0.05).

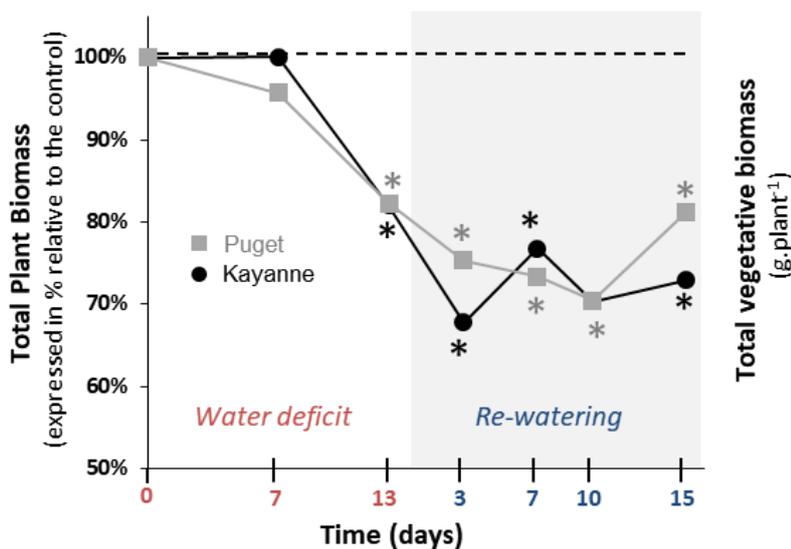


Figure 21: Plant growth during water deficit and subsequent re-watering.

Total plant biomass was measured during the water deficit period (0, 7, 13 days) and after 3, 7, 10 and 15 days of re-watering. For each genotype, data are presented as a percentage relative to the control plants. Asterisks indicate Student's t-test significant differences between control and water deficit plants for a given genotype (black asterisk for Kayanne, grey asterisk for Puget; p < 0.05, n=6).

Primary data are available in Supplementary Material, Table S1.

sampling dates, Figure 19A). Two types of plant variables were evaluated during this kinetics experiment: “structure variables” including plant biomass, plant leaf area and plant N amount, and “functional variables” characterizing the plants’ capacity to uptake and use carbon, nitrogen and water resources, such as RUE, NUE and WUE. These variables were linked together in a conceptual structure-function framework of plant functioning that was the basis of our analysis (Supplementary Material, Figure S2). Each variable was measured or calculated for each sampling date, condition and genotype and will be presented in the manuscript as a percentage relative to the control plants. Primary data are available in Supplementary Material, Table S1.

3.2- Plant growth was similarly impacted during water deficit whatever the genotype while plant growth recovery initiation was genotype dependent.

Total plant biomass is at the centre of our conceptual framework (Figure S2). Whatever the genotype, total plant biomass of WD plants, was reduced at the end of the stress period by around 18% as compared to WW plants (Figure 21). During re-watering, the sequence of Puget and Kayanne recoveries differed. The initiation of recovery, illustrated by an increase of the total plant biomass when expressed relative to the control, occurred between 3 and 7 days in Kayanne and between 10 and 15 days for Puget. After two weeks of re-watering, plant biomass did not fully recover, as compared to WW plants, for either genotype (Figure 21).

3.3- Water deficit affects water fluxes in both genotypes

Biomass accumulation and water management are intimately linked and rely on plant ability to both uptake and use water (Supplementary Material, Figure S2). The effects of water deficit and subsequent re-watering on plant water fluxes were thus evaluated by measuring stomatal conductance, evapotranspiration, sRWU and WUE (Figure 22). After 7 days of water deficit, stomatal conductance was reduced by 38% and 44% in Kayanne and Puget, respectively (Figure 22A). By the end of the water deficit period, stomatal conductance of WD Kayanne had decreased by 56 % compared to the WW plants, while stomatal conductance of WD Puget returned to values similar to the control. This complete stomatal conductance recovery occurred 3 days post-stress in Kayanne (Figure 22A). In terms of evapotranspiration,

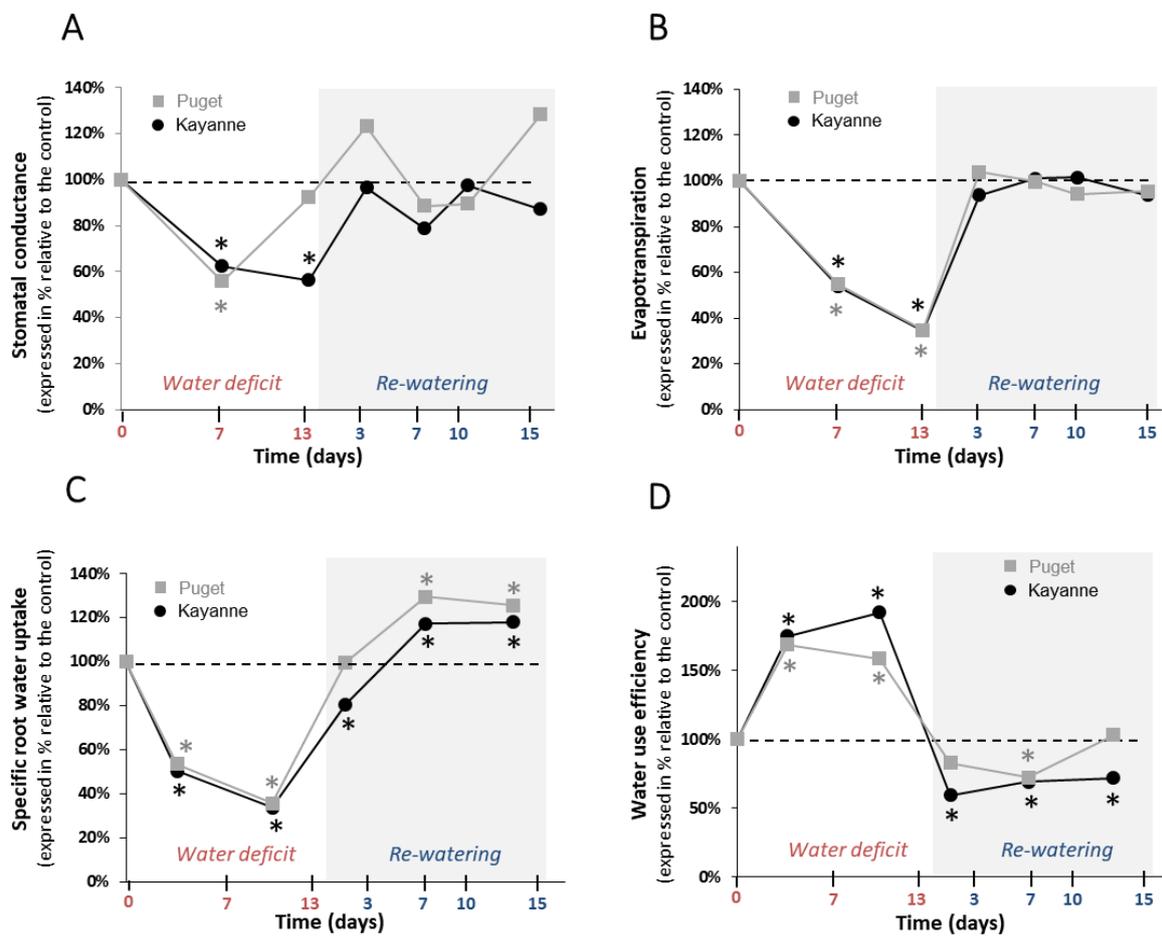


Figure 22: Water fluxes during water deficit and subsequent re-watering.

(A) Stomatal conductance and (B) evapotranspiration were measured during the water deficit period (0, 7, 13 days) and after 3, 7, 10 and 15 days of re-watering. (C) Specific root water uptake and (D) water use efficiency were calculated between two successive harvests. Genotype Kayanne is in black and Puget in grey. For each genotype, data are presented as a percentage relative to the control plants. Asterisks indicate Student's t-test significant differences between control and water deficit plants for a given genotype (black asterisk for Kayanne, grey asterisk for Puget; $p < 0.05$, $n=6$).

Primary data are available in Supplementary Material, Table S1.

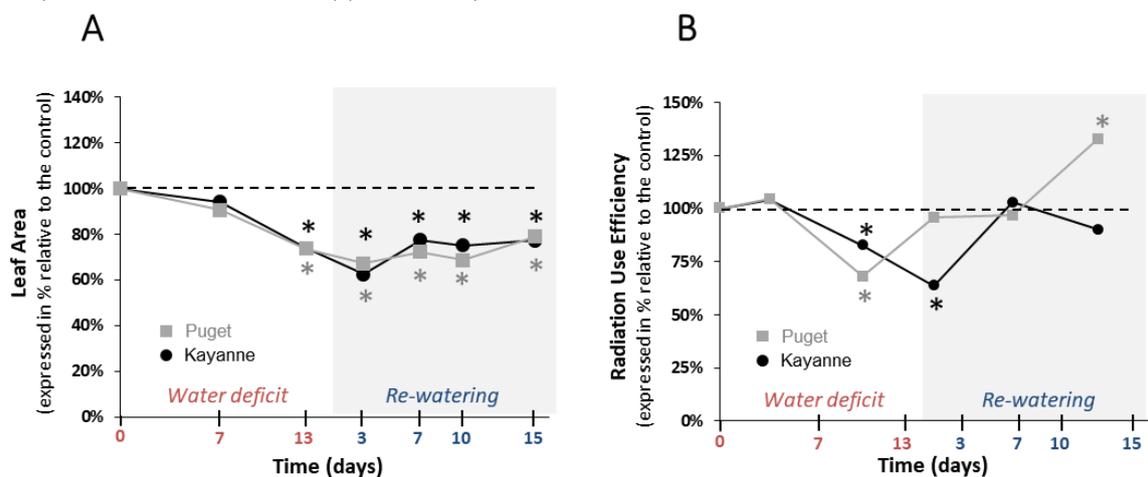


Figure 23: Leaf area and radiation use efficiency during water deficit and subsequent re-watering.

(A) Leaf area was measured during the water deficit period (0, 7, 13 days) and after 3, 7, 10 and 15 days of re-watering. (B) Radiation use efficiency was calculated between two successive harvests. Kayanne is in black and Puget in grey. For each genotype, data are presented as a percentage relative to the control plants. Asterisks indicate Student's t-test significant differences between control and water deficit plants for a given genotype (black asterisk for Kayanne, grey asterisk for Puget; $p < 0.05$, $n=6$). Primary data are available in Supplementary Material, Table S1.

both genotypes behaved similarly, with a great reduction during water deficit (-65%) and a rapid and complete recovery observable at 3 days of re-watering (Figure 22B). Synchronized with the decrease in evapotranspiration during the WD period, a major reduction of about 60% of the sRWU for both genotypes was observed. Following WD release, sRWU rapidly increased and even exceeded that of WW plants and this was maintained throughout the 2-week re-watering period (Figure 22C). WUE increased in response to water deficit by 75% and 68% for Kayanne and Puget respectively. During the re-watering period, WUE of WD plants decreased below that of control plants. After two weeks of re-watering, while WD plants of Puget displayed WUE similar to that of control plants, the WUE of WD plants of Kayanne was still 28% lower than that of WW plants (Figure 22D). Altogether these data show (i) a complete recovery for all the functional variables related to water fluxes for both genotypes, except for the WUE of the WD Kayanne plants and (ii) a delayed recovery for water uptake and use in Kayanne compared to Puget.

3.4- Shoot functional but not structural components recovered fully after two weeks of re-watering

Accumulation of biomass depends on structural components including leaf area which supports several functions such as photosynthesis and conversion of light radiation to biomass, called RUE (Supplementary Material, Figure S2). In response to water deficit, leaf areas of both genotypes were similarly decreased as compared to WW plants at the end of the water deficit period (by about 26%) and after two weeks of re-watering (by 23% and 21 % for Kayanne and Puget, respectively) (Figure 23A). RUE was decreased by 20 % and 31 % for Kayanne and Puget respectively during water deficit (Figure 23B). During the re-watering period, RUE quickly and completely recovered after 1 and 7 days for Puget and Kayanne, respectively. However, while RUE was maintained similar to WW values in Kayanne, RUE of Puget overcompensated and was 33 % higher than the control plants after two weeks of re-watering (Figure 23B). These results underline that shoot structural and functional components were negatively impacted by water deficit but that only functional components fully recovered after two weeks of re-watering. Results also demonstrate that Kayanne's shoot functional recovery occurred later than for Puget.

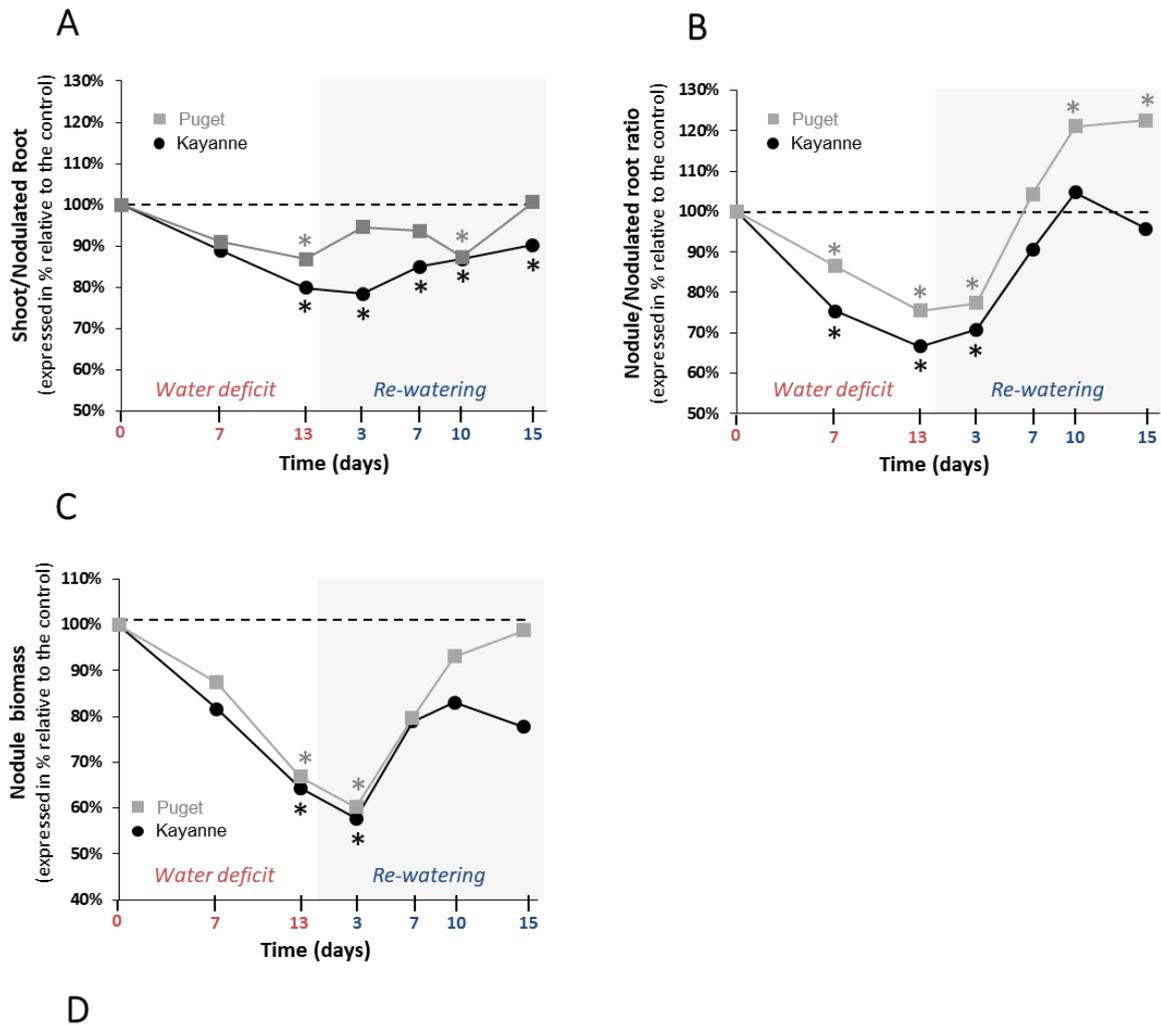


Figure 24: Biomass partitioning during water deficit and subsequent re-watering.

(A) Shoot to root ratio, (B) nodule to nodulated root ratio and (C) nodule biomass were calculated and measured during the water deficit period (0, 7, 13 days) and after 3, 7, 10 and 15 days of re-watering. Genotype Kayanne is in black and Puget in grey. For each genotype, data are presented as a percentage relative to the control plants. (D) Evolution of the nodule number during water deficit and re-watering. A delay in the establishment of the second wave of nodulation is shown for Puget WD plants during the re-watering period (double arrowhead) compared to Puget WW and Kayanne WW and WD plants (arrowhead). WW=well-watered, WD= water deficit. Data are means \pm SD (n=6). Asterisks indicate Student's t-test significant differences between control and water deficit plants for a given genotype (black asterisk for Kayanne, grey asterisk for Puget; $p < 0.05$, n=6). Primary data are available in Supplementary Material, Table S1.

3.5- Water deficit and subsequent re-watering triggered changes in biomass allocation towards the nodule compartment in a genotype-dependent manner

We next determined how water deficit and subsequent re-watering affected biomass partitioning between above- and below-ground organs. The evolution of the shoot/nodulated root biomass ratio is presented in Figure 24A. At the end of the water-deficit period, this ratio was lower for Kayanne plants subjected to WD by 20 % when compared to the WW plants. This trend was maintained during the re-watering period and could be explained by a maintenance of root growth together with a decrease of shoot growth (see Supplementary Material, Table S1 for individual values of roots and shoot biomasses). On the contrary, the shoot/nodulated root ratio of Puget recovered quickly during the re-watering period (Figure 24A).

Within the nodulated root system, biomass allocation in nodules decreased during the water deficit period as revealed by the reduction of the nodule/nodulated root ratio for both Kayanne (-33% after 13 days of stress) and Puget (-24%) (Figure 24B). This mainly resulted from decreased growth of pre-existing nodules (Figure 24C), as the total number of nodules was not (Puget) or only slightly (Kayanne) affected (Figure 24D). After water deficit release, the nodule/nodulated root ratio of the rehydrated plants progressively re-increased for both genotypes reaching the control level after one week of re-watering (Figure 24B). Interestingly, while in Kayanne this ratio was maintained similar to that of WW plants during the second week of re-watering, it continued to increase in Puget, reaching a 23% higher value in WD plants compared to WW plants (Figure 24B). This overcompensation resulted from an increased nodule number: after 15 days of re-watering, rehydrated Puget roots developed about 45 % more nodules than control plants (Figure 24D).

A marked increase in nodule number was observed between 3 and 7 days of re-watering and corresponded to the initiation of a second wave of nodulation for the control plants of both genotypes, and for the WD plants of Kayanne (Figure 24D). Interestingly in WD Puget plants, this increase occurred between 7 and 10 days of re-watering.

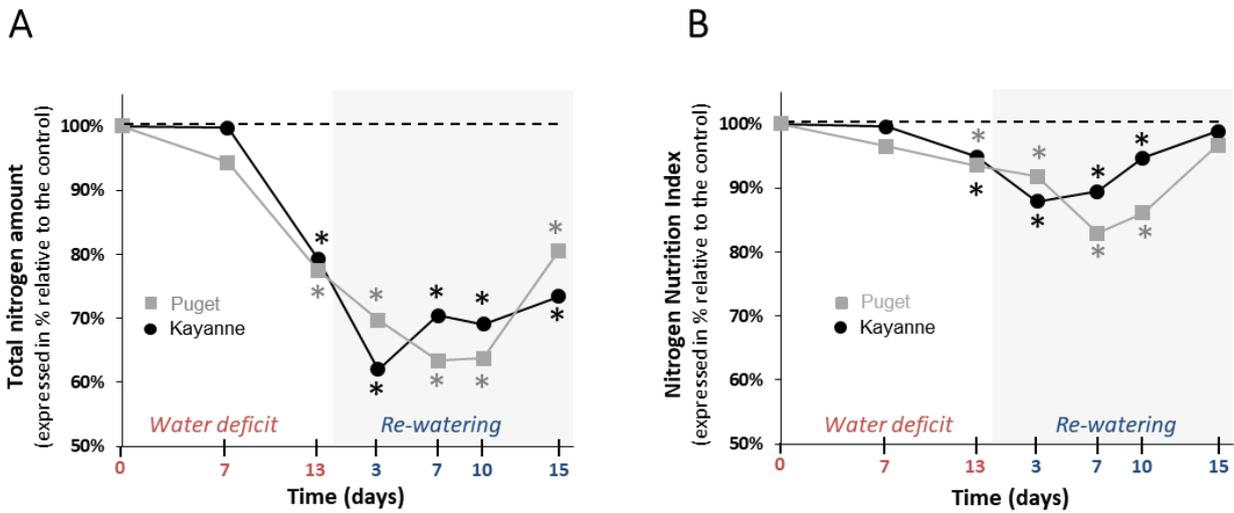


Figure 25: Plant nitrogen status during water deficit and subsequent re-watering.

(A) Total nitrogen amount and (B) nitrogen nutrition index (NNI) were determined during the water deficit period (0, 7, 13 days) and after 3, 7 and 15 days of re-watering. Genotype Kayanne is in black and Puget in grey. For each genotype, data are presented as a percentage relative to the control plants. Asterisks indicate Student's t-test significant differences between control and water deficit plants for a given genotype (black asterisk for Kayanne, grey asterisk for Puget; $p < 0.05$, $n=6$). Primary data are available in Supplementary Material, Table S1.

Table 1: Photosynthesis and symbiotic nitrogen fixation activity (sNFA) after two weeks of water deficit and one week of re-watering.

WW: well-watered plants, WD: plants subjected to water deficit. Values are means and SD standard deviations ($n = 6$). When differences between control and water deficit plants for a given genotype were significant (Student's t-test; $p < 0.05$), the relative WD impact was calculated as $(WD-WW) \cdot 100 / WW$. *ns*, not significant.

	Photosynthesis			sNFA		
	$(\text{gC} \cdot \text{g}_{\text{shoot}}^{-1} \cdot \text{day}^{-1})$			$(\text{gN} \cdot \text{g}_{\text{module}}^{-1} \cdot \text{day}^{-1})$		
	<i>mean</i>	<i>SD</i>	<i>WD impact</i>	<i>mean</i>	<i>SD</i>	<i>WD impact</i>
Water deficit						
Kayanne						
WW	0.040	± 0.002		0.100	± 0.014	
WD	0.036	± 0.002	-23%	0.079	± 0.018	<i>ns</i>
Puget						
WW	0.047	± 0.001		0.100	± 0.014	
WD	0.044	± 0.002	-8%	0.085	± 0.010	<i>ns</i>
Re-watering						
Kayanne						
WW	0.032	± 0.002		0.103	± 0.019	
WD	0.031	± 0.002	<i>ns</i>	0.118	± 0.035	<i>ns</i>
Puget						
WW	0.043	± 0.003		0.127	± 0.013	
WD	0.039	± 0.003	<i>ns</i>	0.099	± 0.008	-22%

3.6- Plant nitrogen status was negatively impacted by water deficit then completely recovered, but with a different timing depending on the genotype.

Having shown that biomass allocation towards the nodule compartment was differently affected in Puget and Kayanne, particularly during post-stress recovery, we next examined whether this had an impact on plant nitrogen status. In both genotypes, the total nitrogen amount accumulated in plants was significantly impacted by water deficit (-23 %), decreased to the same extent during the re-watering period (-38 %), and partially recovered at the end of the two-week re-watering period (Figure 25A). However, a difference in the timing of recovery was observed between genotypes: while it started after 3 days of re-watering in Kayanne, 10 days were required to initiate the recovery in Puget (Figure 25A). This difference in kinetics between the two genotypes was also observed for the plant nitrogen concentration (Supplementary Material, Figure S4A), and for the plant N status, which was estimated by calculating the Nitrogen Nutrition Index (NNI, Figure 25B). In contrast to the total N amount, NNI fully recovered at the end of the two-week re-watering period in both genotypes.

Nitrogen Use Efficiency (NUE) was calculated in order to evaluate plant's ability to use accumulated N for biomass production (Supplementary Data, Figure S4B). NUE was maintained for Puget and Kayanne during water deficit, but increased during the first days of the re-watering period up to 44% for Kayanne and 20% for Puget. Then NUE decreased to finish lower than that of control plants in both genotypes, but it occurred after 15 days of re-watering for Kayanne and 13 days for Puget (Supplementary Material, Figure S4B).

3.7- Combined $^{13}\text{CO}_2$ and $^{15}\text{N}_2$ labelling experiment highlighted different C and N uptake activities and allocations depending on the genotype

Labelling experiments were performed in order to accurately assess how C and N uptake, and their allocation in the various plant organs were impacted during the water deficit period and after re-watering. The use of $^{13}\text{CO}_2$ allowed to measure precisely C acquired by the plant through photosynthesis and its partitioning in the plant organs. Labelling plants with $^{15}\text{N}_2$ provided us with a precise measurement of daily SNF activity for each of the labelling experiment. The first labelling was performed at the end of the water deficit period and the

Table 2: Carbon and nitrogen allocations after two weeks of water deficit and one week of re-watering.

WW: well-watered plants, WD: plants subjected to water deficit. Values are means and SD standard deviations (n = 6). When differences between control and water deficit plants for a given genotype were significant (Student's t-test; p < 0.05), the relative WD impact was calculated as (WD-WW)*100/WW. ns, not significant.

		Carbon allocation (%)				Nitrogen allocation (%)			
		Shoot		Nodule		Shoot		Nodule	
	impact	Mean ± SD	WD	Mean ± SD	WD	Mean ± SD	WD	Mean ± SD	WD
			impact		impact		impact		impact
Water deficit									
Kayanne									
WW		92.68 ± 1.47		4.34 ± 1.00	1.16 ± 0.27	94.5 ± 1.12		4.02 ± 1.33	3.3 ± 0.61
WD	ns	89.89 ± 2.75	43%	6.19 ± 0.76	0.77 ± 0.07	93.04 ± 0.78	ns	7.34 ± 2.80	2.77 ± 0.32
									83%
Puget									
WW		87.88 ± 1.23		12.74 ± 2.92	2.24 ± 0.27	85.02 ± 3.06		8.16 ± 1.06	3.96 ± 0.20
WD	ns	88.11 ± 1.30		15.3 ± 1.06	1.83 ± 0.18	82.88 ± 1.14	ns	8.21 ± 1.47	3.68 ± 0.53
									ns
Re-watering									
Kayanne									
WW		91.66 ± 0.78		3.63 ± 0.53	1.54 ± 0.29	94.84 ± 0.74		3.95 ± 0.97	4.4 ± 0.41
WD	1%	92.8 ± 0.74		3.18 ± 0.59	1.35 ± 0.21	95.47 ± 0.59	ns	3.08 ± 0.67	4.12 ± 0.67
									ns
Puget									
WW		88.78 ± 1.10		12.39 ± 1.76	2.89 ± 0.31	84.72 ± 1.77		6.27 ± 1.17	4.95 ± 0.83
WD	ns	87.29 ± 0.70		11.37 ± 1.44	4.65 ± 0.55	83.98 ± 1.12	ns	5.15 ± 0.70	7.56 ± 0.35
									61%
									-18%
									53%

second after one week of re-watering (Figure 19B).

Water deficit decreased plant photosynthesis by 23% and 8% for Kayanne and Puget, respectively, but there was a complete recovery for both genotypes after one week of re-watering (Table 1). The specific nitrogen fixation activity (sNFA) was not significantly impacted at the end of the water deficit, neither for Puget nor for Kayanne (Table 1). After one week of re-watering, sNFA was 23% lower in WD plants than in WW plants only for Puget (Table 1).

The C and N labelling experiment allowed to compare C and N allocations to the different plant organs (shoot, root and nodules) between the two genotypes (Table 2). In Kayanne only, water deficit increased C and N allocations to roots by 43% and 83%, respectively. However, C allocation to nodules was decreased for both genotypes, by 34% for Kayanne and 18% for Puget. After one week of re-watering, C and N allocations to roots and nodules of rehydrated Kayanne plants were similar to those of the control plants. For Puget, N allocations to roots was significantly reduced as compared (18%) to the control plants without any changes of C allocations. Regarding the nodule compartment, C and N allocations of water deficit plants reverted to values similar to those of control plants for Kayanne, but became higher than that of control plants (61% and 53% higher respectively) for Puget. This was in agreement with the evolution of the shoot/nodulated root ratio and the nodule/nodulated root ratio measured during the kinetics experiment (Figure 24).

In conclusion water deficit and subsequent re-watering caused changes in carbon and nitrogen allocations to the nodulated root system in a genotype-dependent manner.

4- Discussion

Our study aimed at evaluating whether plant N nutrition could affect nodulated pea plant's ability to recover after a drought period. Two pea genotypes displaying contrasted resilience abilities after a 2-week water deficit were studied: one (Kayanne) was able to maintain yield to the level of well-watered plants, while the other (Puget) was less resilient, showing a 12% decrease of yield in WD conditions (Figure 20). The major difference between the two genotypes under optimal watering conditions was that Kayanne allocated less biomass to underground organs (roots and nodules) than Puget (Supplementary Material, Table S1),

suggesting that different mechanisms in resource allocation and use could be established during drought tolerance and post-drought recovery.

4.1- Similar tolerance levels to water deficit between the two genotypes but different mechanisms involved

The level of tolerance of each genotype to water deficit was estimated by measuring the overall plant growth at the end of the water deficit period (Figure 21). Because both genotypes were negatively affected to a similar extent, as illustrated by a similar decrease in the most integrative trait that is total plant biomass (Figure 21), we considered that Kayanne and Puget displayed the same level of tolerance to water deficit. This decrease in biomass acquisition induced by drought, classically observed in the literature, could be explained by a reduced carbon uptake arising from coordinated plant structural and functional changes, including a reduction of leaf area and a decrease in photosynthetic activity and radiation use efficiency (Figure 23 and Table 1), although we cannot exclude a higher respiration or root exudation (not measured in the present study). Carbon partitioning within the plant was modified and the nodule compartment was the most severely plant organ affected by water deficit (Figure 24, Table 2). This resulted in a decrease in SNF, a lowered Nitrogen Nutrition Index (NNI) and nitrogen concentration (Figure 25 and Supplementary Material, Figure S2). Altogether, these results are consistent with previous studies in pea (Lecoeur and Sinclair, 1996; Mahieu et al., 2009; Prudent et al., 2016) and other legume crops (Chaves et al., 2003, 2009). This decrease of SNF was not attributed to its functional component (nodule specific activity, sNFA Table 1), but rather to its structural component (nodule biomass, Figure 24C). Such strategy has already been observed in *Medicago truncatula*, when Jeudy et al. (2010) characterized structural rather than functional changes in SNF, in split root systems where a local suppression of SNF was applied through a partial root deprivation of N₂ (Ar/O₂ instead of air). This could illustrate the optimization of plant N supply at a lower carbon cost during a water deficit period.

Although the two genotypes displayed a similar level of tolerance towards water deficit on a plant biomass basis, our results showed that the mechanisms involved were distinct. One of the most significant differences between the two genotypes concerned the maintenance of water status during water deficit. This was revealed by a decrease in stomatal conductance

for Kayanne over a longer period than Puget, together with a greater increase in water use efficiency (Figure 22). Moreover, Kayanne favoured root growth at the expense of nodule growth while Puget only slightly decreased nodule growth while maintaining C allocation to the root system (Figure 24 and Table 2). The decrease in nodule biomass was explained by a reduction in individual nodule biomass, which was associated with a decrease in nodule number for Kayanne only (Figure 24D). This feature illustrates the genotype-dependent responses of nodules to water deficit in pea, and extends observations showing a concomitant decrease in the number and the size of the determinate nodules of soybean during water deficit (Fenta et al., 2012 ; Sinclair et al., 1988). To our knowledge, such legume intra-specific differences in adaptive responses to water deficit (relative to water status and C allocation to nodule compartment) have never been reported so far.

4.2- Contrasted strategies between genotypes during the re-watering period might explain differences in recovery efficiency and ultimately resilience

Although the two genotypes had similar reduced growth at the end of the water deficit, their yield were differentially affected at physiological maturity (Figure 20), suggesting that the resilience of each genotype could depend on the efficiency to recover during the re-watering period. The use of our conceptual structure-function framework linking C, N and water fluxes at the whole plant level allowed us to compare the dynamics of recovery of each process with respect to the dynamics of plant biomass recovery, and to identify key processes which could explain a better recovery efficiency (Figure 26). To that aim, and for each trait, we considered various parameters such as the latency time to initiate the recovery, the rate of the process's response and the gap (Δ) between the value of the process under WD and WW conditions (Figure 26A).

Based on plant total biomass, which is at the centre of our conceptual framework (Figure 26B), there was no complete recovery after two weeks of re-watering. Nevertheless, a recovery response was initiated in both genotypes but with different latency times: after 3 to 7 days in Kayanne and after 10 to 15 days in Puget. Because the latency time to initiate a recovery response for plant growth was not synchronized with the latency time to initiate a recovery for C-related traits (leaf area, photosynthesis, RUE), this suggests that other processes underlie overall plant recovery. Water fluxes, even if they were affected by re-

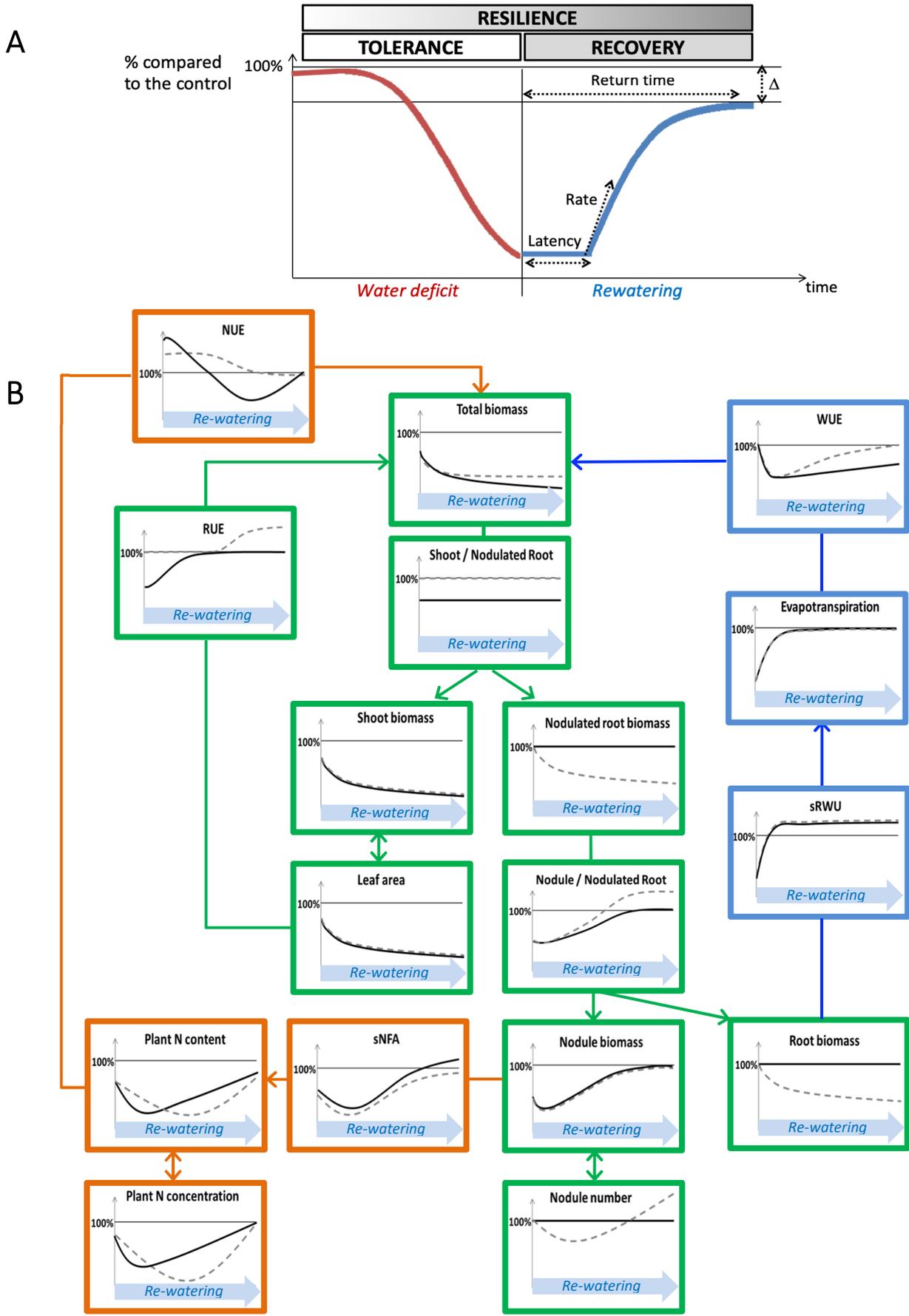


Figure 26 : Theoretical and conceptual frameworks for the analysis of plant drought resilience.

(A) Theoretical framework of plant resilience ability. The resilience process can be divided into drought tolerance and post-stress recovery. The curve represents the value of a given physiological process expressed as a percentage relative to the control plants, which decreases during water deficit, and recovers during the re-watering period until it reaches a plateau. The ability to recover can be characterized through four variables which are: the latency time to initiate a recovery, the rate of recovery, the return time to reach the plateau and delta (Δ), the difference of the value of the trait at the plateau between the well-watered plants and the plants subjected to water deficit.

(B) Conceptual structure-function ecophysiological framework of plant recovery after water deficit. Variables related to carbon fluxes are in green, variables related to water fluxes are in blue, variables related to nitrogen fluxes are in orange. Kayanne genotype is in black and Puget genotype is in grey dotted line. Curves represent schematic data of plants having experienced a water deficit, and are expressed in percentage relative to the control plants. Variables shown in this study to play a major role in post-stress recovery in pea are framed with bold lines.

NUE: Nitrogen Use Efficiency; sNFA: specific Nitrogen Fixation Activity; RUE: Radiation Use Efficiency; WUE: Water Use Efficiency; sRWU: specific Root Water Uptake

watering, could neither explain differences between genotypes because they were not synchronized with the plant growth recovery response. A fast and complete recovery of evapotranspiration, associated with a lower WUE could reflect a delay between the reactivation of water uptake and the reactivation of water use for metabolism after re-watering, similarly to the delay observed between the reactivation of N uptake and N metabolism after a drought event in *Medicago truncatula* (Larrainzar et al., 2009).

The genotype-dependent dynamics of recovery of overall plant N status (Nitrogen Nutrition Index, Figure 25B; plant N concentration, Supplementary Material, Figure S4) were very close to that of total biomass, suggesting that N acquisition could be a key process underlying plant recovery after water deficit in pea. This is consistent with the study from Lyon et al. (2016), which focused on metabolome and proteome responses of nodulated *Medicago truncatula* plants during drought and recovery and which suggested that the availability of an amino acids pool is essential for enabling a drought recovery, thus highlighting the tight link between N compound availability and biomass recovery. The relaunch of N acquisition through SNF could be explained by an increase in the intrinsic ability of the nodule to fix N_2 (sNFA) or/and an increase of nodule biomass (which could result from increased nodule growth or increased nodule number). In our study, from a functional point of view, although sNFA was not significantly decreased at the end of the water deficit for both genotypes, it was lower after 7 days of re-watering for WD Puget plants when compared to WW plants but not for Kayanne. This can either mean that sNFA of WD Kayanne plants was maintained at a level similar to that of WW plants throughout the follow-up period, or that the sNFA decreased but rapidly recovered after 7 days of re-watering contrary to what was observed for Puget. This latter

hypothesis is favoured when looking at *i)* the dynamics of plant nitrogen concentration and total nitrogen amount and *ii)* because sNFA can recover rather quickly despite being sensitive to water deficit (Naya et al., 2007; Nasr Esfahani et al., 2014).

From a structural point of view, structural components of N₂ fixation such as the nodule proportion in the nodulated root system fully recovered after re-watering, as previously reported for changes of plant N status (Jeudy et al., 2010; Prudent et al., 2016). Specifically, for Puget, a delay in the initiation of the second nodulation wave was observed, as well as an overcompensation for the nodule proportion in the nodulated root system explained by a higher number of nodules initiated during the second wave of nodulation for the WD plants (Figure 24D). We previously showed that in pea cv Caméor, the intensity of nodule initiation following drought was driven by the value of the Nitrogen Nutrition Index (NNI) after drought (Prudent et al., 2016). Because N status in Puget was more impaired by drought and during a longer time than in Kayanne (NNI, Figure 25B), probably because this genotype favoured C acquisition with a quick restoration of RUE together with a lesser C allocation to nodulated roots, it is tempting to speculate that Puget initiated an intensive nodule formation to offset its N deficiency. Over-compensatory recovery has already been reported by Xu et al. (2010) for mild water deficit in grass species, but only concerned traits related to C acquisition. Our study suggests that over-compensatory C allocation towards nodules during recovery in Puget was detrimental for the overall plant growth. Indeed, there is usually a trade-off for C use between roots and nodules to reach an optimal equilibrium between benefits related to SNF and C cost for nodule formation and functioning without impairing root development (Hacin et al., 1997; Tricot et al., 1997). In some cases, such as in hypernodulating mutants for which the autoregulation of the nodulation is disrupted (see the review from Mortier et al., 2012), many pleiotropic effects including shoot growth and yield depression have been reported (Novak et al., 2011). Our data suggest that a finely tuned nodule number initiation during the post-stress period is critical to ensure optimal N nutrition without excessive C costs (case of Kayanne), leading to plant growth recovery and contributing the N pool available for remobilisation to the seeds later on during the reproductive period (Schiltz et al., 2005; Zeiher et al., 1982).

Thus, two different recovery strategies can be distinguished with *i)* Kayanne which initiates its nitrogen nutrition recovery early, gradually leading to a complete growth recovery and *ii)*

Puget which initiates first its water status and RUE recoveries, then its nitrogen nutrition, in a later but faster manner, with some detrimental overcompensations with high carbon cost, finally leading to loss of yield. Altogether these results support our original working hypothesis, that a quick and strict adjustment of the number of nodules to plant growth needs is a key trait for an efficient post-drought recovery.

4.3- Conclusion

The capacity of legume plants to be resilient when they face water deficit comprises their ability to tolerate the stress but also to efficiently recover post-stress. Our study highlights a genotype-dependent drought resilience of pea plants and contributes to the identification of key traits which could help in the design of pea ideotypes better adapted to fluctuating soil water conditions. Although the processes related to C, N and water fluxes did not display similar kinetics of recovery, we observed a synchronized recovery of plant growth and plant N nutrition. Our results emphasized for the first time that a quick recovery initiation of N acquisition, associated with a fine-tuning of nodule formation which allows benefits from SNF at low C cost, could be essential for yield stability after drought. As such, this study thus deepens our knowledge on post drought recovery. It demonstrates that a strategy relying on maintaining its nitrogen status confers legume plant a better ability to post-drought recover than if the plant was addressing first its water and carbon status changes before its nitrogen status.

5- Acknowledgements

Authors would like to thank Vincent Durey, Nadia Rossin, Morgane Dourneau, Baptiste Serbource and the members from the High Throughput Phenotyping Platform 4PMI for their excellent technical support during plant growth and harvests. Authors also extend thanks to GISMO Platform (<http://gismo-solutions.fr/en/home/>) for isotopic measurements in plant tissues, Pascal Tillard from the Laboratoire de Biochimie et de Physiologie Moléculaire des Plantes (UMR BPMP, Montpellier, France) for isotopic measurements in gas samples and to Richard Thompson for correction and improvement of English in the manuscript. This work was supported by Terres Inovia, and the European Union under the FP7 Program “LEGATO”

[project n°613551]. Mégane Couchoud obtained a Ph.D. grant from BAP-INRAE Department, Région Bourgogne-Franche-Comté and Groupe Roullier.

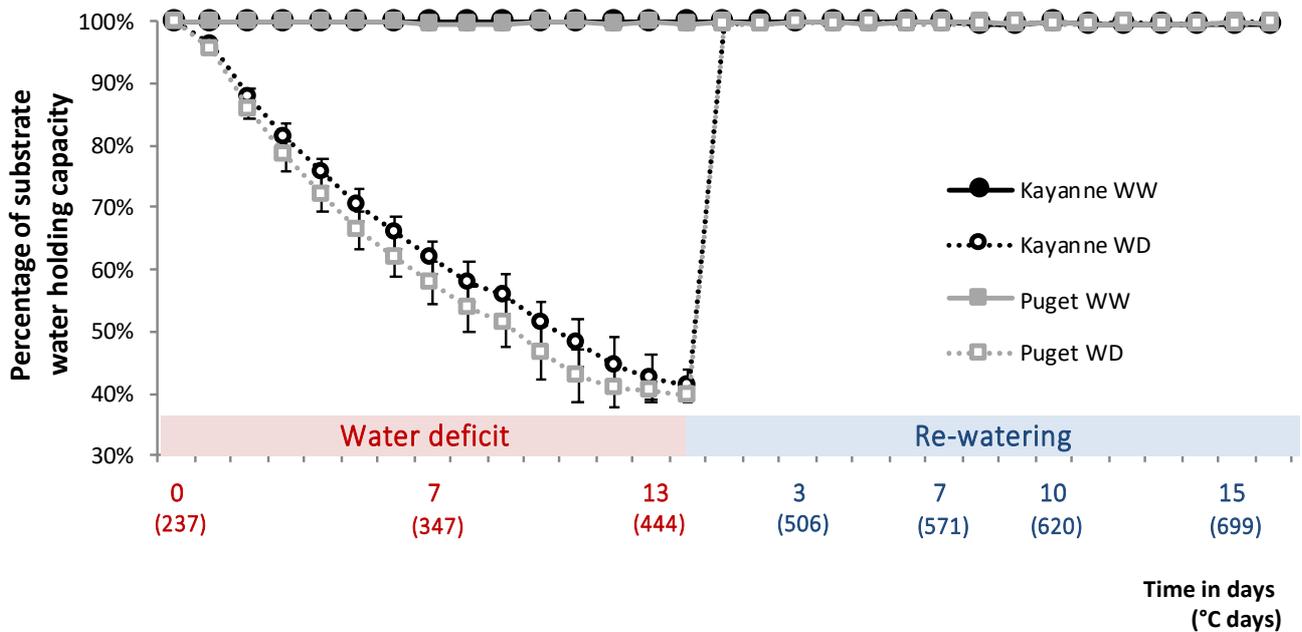
6- Author Contributions Statement

CS, MP and VV conceived the project. CJ, CS, MC, MP, SG and VV performed the experiments and MC analysed the data. CS, MC, MP and VV wrote the publication. All authors contributed to the writing and approved the final manuscript.

7- Supplementary material

Supplementary Figure S1:

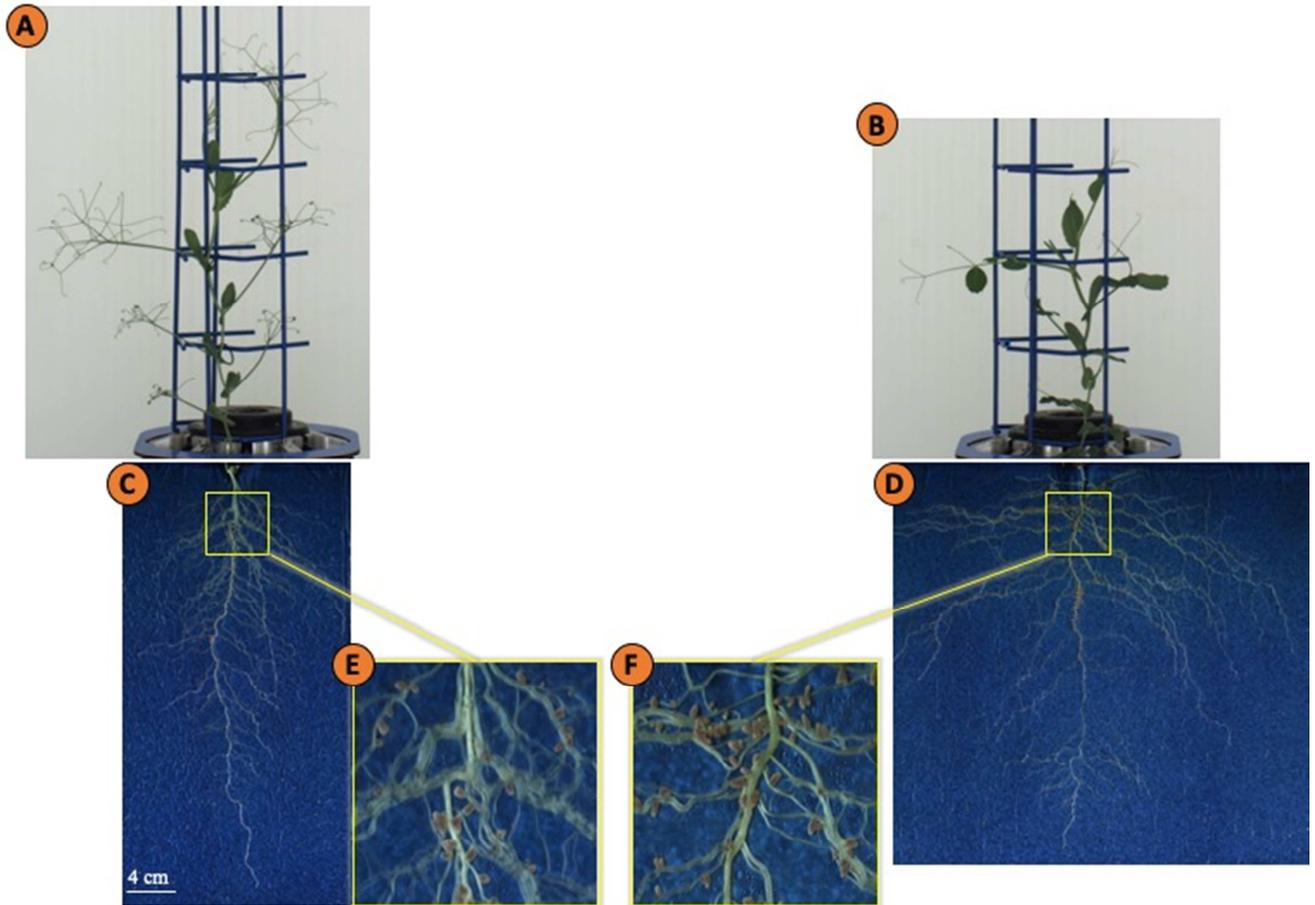
Evolution of the percentage of the water holding capacity of the substrate during the water deficit and subsequent re-watering.



The water holding capacity of the substrate was estimated on 10 substrate aliquots by saturating the substrate with water and drying 7 days at 110°C. Then, because each pot was weighted before each of the four daily waterings, the evolution of the water holding capacity of the substrate was calculated for each pot, four times a day.

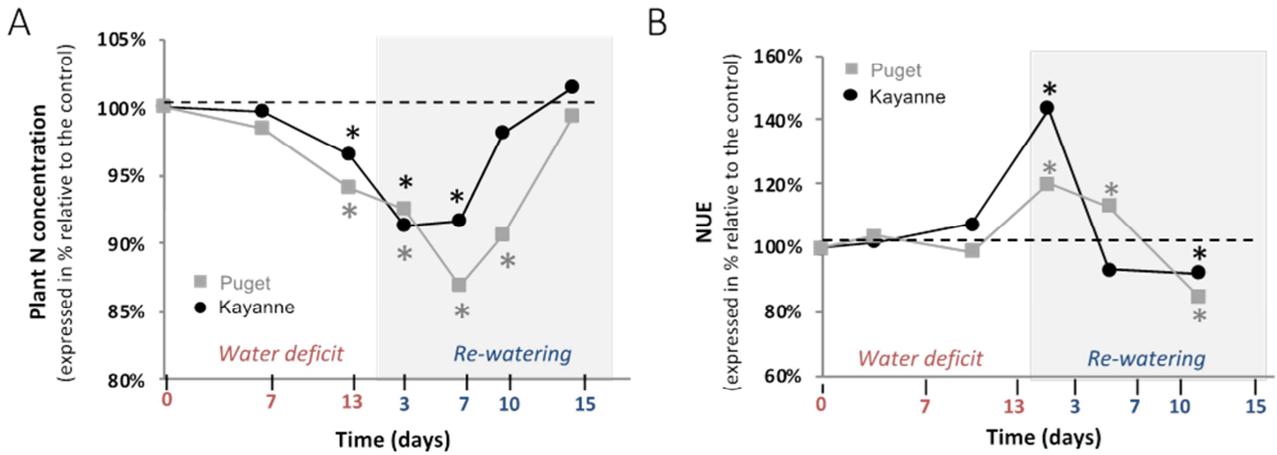
Supplementary Figure S3

Pictures of shoots from genotypes Kayanne (A) and Puget (B) and nodulated roots from Kayanne (C, E) and Puget (D, F) after four-weeks growth.



Supplementary Figure S4:

Effect of water deficit and subsequent re-watering on plant nitrogen related traits.



(A) Plant nitrogen concentration was determined during the water deficit period (0, 7, 13 days) and after 3, 7 and 15 days of re-watering and (B) Nitrogen Use Efficiency (NUE) was calculated between two successive harvests. Kayanne is in black and Puget in grey. For each genotype, data are presented as a percentage relative to the control plants. Asterisks indicate Student's t-test significant differences between control and water deficit plants for a given genotype (black asterisk for Kayanne, grey asterisk for Puget; $p < 0.05$, $n=6$).

III- Conclusion du chapitre

De nombreuses études se sont intéressées à la tolérance des légumineuses au stress hydrique. En revanche, peu de travaux ont jusqu'ici été menés sur la période de récupération qui suit un épisode de stress hydrique. De plus, ces études se limitent régulièrement à un unique point d'analyse après une période de ré-arrosage, sans prendre en compte la dynamique de réponse.

A-Synthèse des principaux résultats

L'application d'un déficit hydrique a permis de mettre en évidence un niveau de tolérance au manque d'eau similaire pour les 2 géotypes de pois étudiés. Une baisse de la biomasse totale de la plante due à une baisse du prélèvement de carbone a ainsi été observée, le compartiment nodulaire correspondant au compartiment le plus fortement affecté. Bien que les impacts soient de même niveau, des différences de mécanismes entre géotypes ont tout de même été mises en évidence au niveau du maintien du statut hydrique de la plante d'une part - Puget retournant à un statut hydrique similaire à celui des plantes contrôles durant la période de stress contrairement à Kayanne - et de la gestion des allocations carbonées au système racinaire nodulé d'autre part - Kayanne favorisant l'allocation aux racines au dépend des nodosités Puget ne faisant que diminuer l'allocation aux nodosités.

Des réponses contrastées lors de la période de récupération ont également été soulignées et pourraient en partie expliquer les inégalités de niveau de résilience observés entre les deux géotypes, le rendement étant négativement affecté par le déficit hydrique uniquement pour le géotype Puget. En effet, l'analyse dynamique de la récupération nous a permis de mettre en évidence une variabilité dans la cinétique de récupération, principalement en ce qui concerne le statut azoté de la plante. Des différences au niveau du temps de latence avant l'initiation de la récupération, au niveau de la vitesse à laquelle s'effectue la récupération ainsi qu'au niveau de l'écart entre l'état atteint et celui des plantes n'ayant pas subi le stress. Nous avons notamment une récupération de l'indice de nutrition azoté complète après deux semaines de ré-arrosage pour les deux géotypes mais initiée plus précocement et s'effectuant plus progressivement pour le géotype Kayanne que pour le géotype Puget. De la même manière, un retard dans l'initiation de la seconde vague de nodulation par rapport

aux plantes contrôles ainsi qu'une surcompensation du nombre de nodosité est observée pour le génotype Puget.

Deux stratégies ont donc ainsi pu être distinguées, celle du génotype Kayanne, qui initie sa récupération de manière précoce et qui permet un retour progressif à un état similaire à celui des plantes contrôles, et celle du génotype Puget, qui initie sa récupération plus tard mais de manière plus rapide et qui va jusqu'à une surcompensation.

B- Conclusion

Cette étude renforce tout d'abord la nécessité de prendre en compte la période de récupération après un stress hydrique dans l'évaluation de la résilience au manque d'eau.

Ces résultats mettent également en évidence l'importance de la gestion de la nodulation et de la fixation de l'azote atmosphérique lors du ré-arrosage pour permettre un maintien du rendement. Ainsi, la capacité à réajuster rapidement et rigoureusement la formation de nodules à ses besoins de croissance semble être un avantage permettant une complète récupération. En revanche, l'initiation de nouveaux nodules après un déficit en eau retardée par rapport aux plantes contrôle et en quantité plus importante pourrait représenter un coût énergétique trop important et se faire au détriment de la croissance de la plante et finalement avoir un impact négatif sur le rendement.

Chapitre 3 :

Identification des bases moléculaires sous-jacentes à la récupération au sein du système racinaire nodulé du pois

I- Objectif et démarche

Dans les chapitres précédents, nous avons analysé les réponses écophysologiques de deux génotypes de pois, Kayanne et Puget lors d'un déficit hydrique suivi d'une période de ré-arrosage. Nous avons alors pu mettre en évidence que les deux génotypes présentaient une capacité de résilience contrastée, expliquée en partie par la cinétique de récupération post-stress de certains processus clés impliqués dans la nutrition azotée. Nous avons montré que Kayanne initiait la récupération de manière plus précoce que Puget, et de manière progressive, induisant un retour à un état similaire à celui des plantes contrôles. Le génotype Puget, quant à lui, initie sa récupération plus tardivement mais de manière plus rapide et intense, entraînant un phénomène de surcompensation du nombre de nodosités formées. Ceci implique un coût en carbone important et peut se faire au détriment de la croissance des autres organes impactant de ce fait le rendement. Nous en avons donc déduit que pour avoir une meilleure stabilité du rendement à maturité physiologique, il fallait que la plante initie rapidement sa récupération après un déficit hydrique, pour l'acquisition d'azote, en ajustant avec précision la quantité de nouvelles nodosités mises en place. Dans ce troisième chapitre, afin de mieux caractériser les bases moléculaires de la récupération des racines nodulées après un déficit hydrique, nous avons choisi de caractériser et comparer les processus moléculaires mis en place par les deux génotypes à la fin de la période de déficit hydrique et lors de la période de ré-arrosage.

Le développement de nouvelles technologies permettant de mesurer, à grande échelle, l'activité cellulaire au niveau du transcriptome, du protéome ou du métabolome a permis l'émergence des données dites « omiques » c'est-à-dire de vastes ensemble de données à des échelles biologiques différentes. La disponibilité des génomes a permis le développement de ces technologies d'analyse à haut débit et la récente publication du génome du pois (Kreplak *et al.*, 2019), nous donne l'opportunité de réaliser ces études multi-échelles sur cette légumineuse cultivée. En particulier, les études transcriptomiques par séquençage d'ARN (RNA-seq) sont ainsi facilitées, puisque les lectures issues du séquençage peuvent être directement alignées sur le génome, et ne sont plus assemblées *de novo*.

Cependant, les mécanismes allant de la transcription de gènes à l'accumulation de métabolites, sont très complexes du fait des nombreuses régulations qui existent à

différentes étapes (transcriptionnelles, traductionnelles, post-traductionnelles, au niveau des activités enzymatiques, transport de métabolites, ...). Ainsi, l'objectif est d'intégrer les informations de ces différents niveaux d'études pour produire une vision globale des mécanismes de régulation. Ainsi, l'acquisition de données quantitatives à haut débit allant de l'expression de gènes (transcriptomique), à l'accumulation de protéines (protéomique) ou de métabolites (métabolomique) et l'intégration de différents types de données peut être une aide puissante pour identifier de nouveaux candidats (gènes, protéines, métabolites, etc.) impliqués dans le développement des plantes ou leur adaptation aux contraintes environnementales.

Ces approches « multi-omiques » ont largement été utilisées afin de comprendre les réponses des plantes au stress hydrique (pour revue voir (Parreira *et al.*, 2016). La combinaison en particulier de données transcriptomique et métabolomique a largement été utilisée dans l'étude du stress hydrique chez différentes espèces telles que le peuplier (Hamanishi *et al.*, 2015), le tournesol (Moschen *et al.*, 2017) ou encore l'astragale, une légumineuse (X Jia *et al.*, 2016). Cette approche multi-omique a également été utilisée dans deux études récentes s'intéressant aux réponses au stress hydrique ainsi qu'à la période de ré-arrosage qui suit ; une première chez une graminée, *Panicum virgatum* (Meyer *et al.*, 2014) a permis de mettre en évidence une forte modification de l'expression des gènes au cours des premières heures de ré-arrosage ainsi que des relations non linéaires entre l'expression génique, l'abondance des métabolites et la physiologie de la plante. Une seconde étude chez *Medicago truncatula* (Zhang *et al.*, 2014) a quant-à-elle permis de mettre en évidence la participation du myo-inositol et de la proline dans la tolérance à la sécheresse.

Bien que la combinaison d'approches la plus largement retrouvée dans la littérature intègre des données de transcriptomique avec des données de métabolomique ou protéomique, les phytohormones constituent un acteur clé du développement et du fonctionnement de la plante (Klee *et al.*, 2011) et de sa réponse aux stress (Verma *et al.*, 2016). Les phytohormones occupent également un rôle important dans le développement des racines et lors de la mise en place de la symbiose ainsi que dans la régulation du nombre de nodosités chez les légumineuses (Chapitre 1, Section III-4-d). De plus, le rôle de certaines de ces phytohormones est antagoniste vis-à-vis de l'organogénèse des racines et des nodosités, comme par exemple les cytokinines qui régulent positivement la nodulation mais négativement

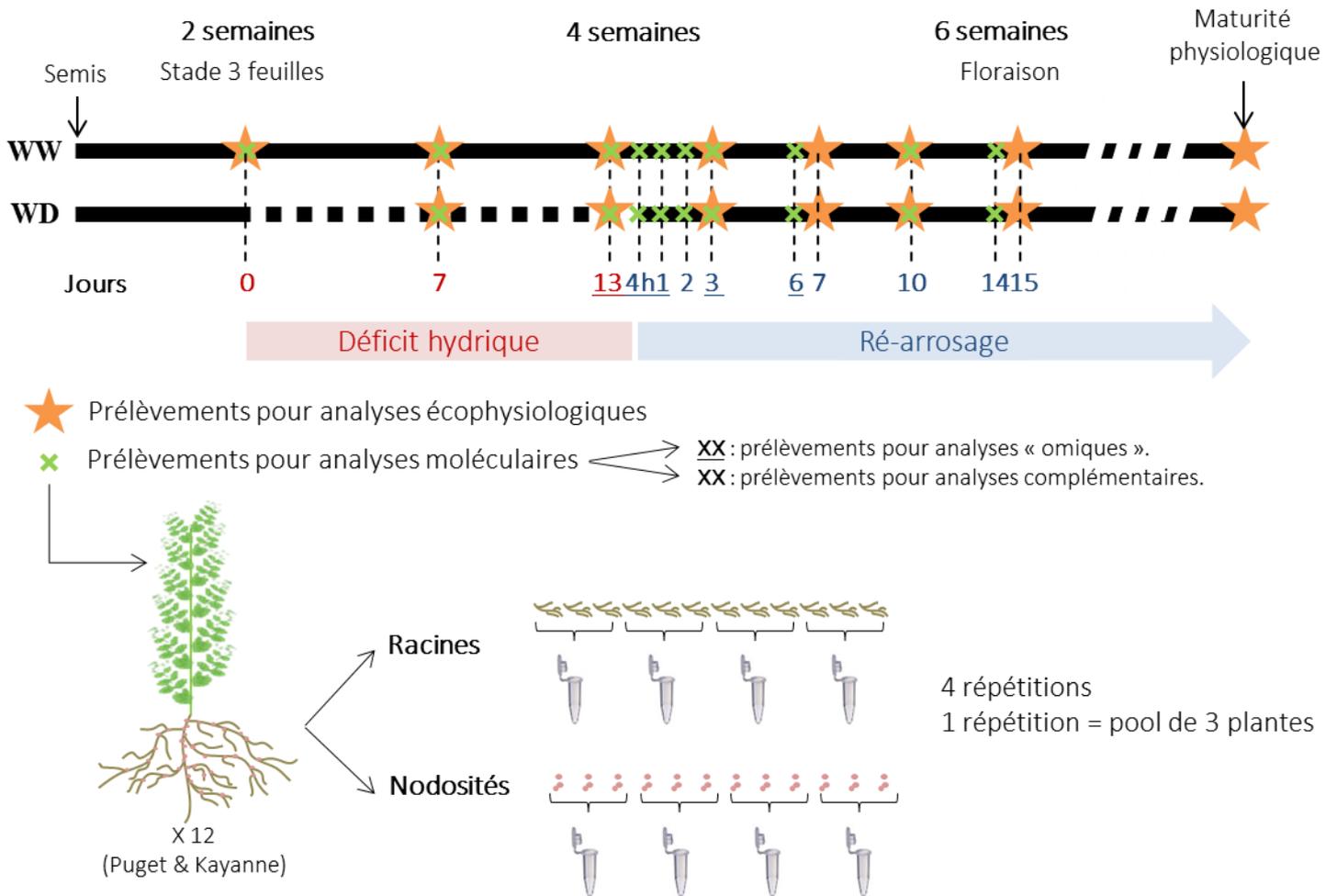


Figure 27 : Design expérimental utilisé pour analyser les réponses au déficit hydrique et au ré-arrosage.

L'expérience a été réalisée avec deux génotypes, Kayanne et Puget. Le déficit hydrique (WD) a été appliqué lors de la période végétative (stade 3 feuilles) durant 2 semaines. Les plantes sont ensuite ré-arrosées normalement jusqu'à maturité physiologique. Les étoiles oranges indiquent les prélèvements effectués pour caractériser les réponses écophysiological (Chapitre 2) et les croix vertes indiquent les prélèvements utilisés pour caractériser les mécanismes moléculaires sous-jacents. Pour chaque date de prélèvement et chaque génotype, les racines et les nodosités de 12 plantes ont été prélevées puis poolées en 4 répétitions. Cinq dates de prélèvement ont été choisies pour des analyses transcriptomique (RNA-seq), métabolomiques (GC-MS) et d'accumulation de phytohormones (LC-MS). (fin de période de stress hydrique, 4h de ré-arrosage, 1 jour, 3 jours et 6 jours de ré-arrosage ; dates soulignées). Les échantillons correspondants aux autres prélèvements sont conservés à -80°C pour des analyses complémentaires.

le développement racinaire (Chapitre 1, Section III-4-d). Ainsi, il nous a paru essentiel de les intégrer dans une approche « multi-omique ».

Les objectifs de ce chapitre étaient de comparer les réponses moléculaires des géotypes Kayanne et Puget, en réponse au déficit hydrique et au ré-arrosage afin d'identifier des voies métaboliques/gènes régulés de manière différente entre géotypes et qui pourraient permettre d'expliquer les différences de réponses mises en évidence dans le Chapitre II. Ces différences concernant principalement l'acquisition de l'azote, nous nous sommes focalisés sur les nodosités et les racines. Pour ce faire, une étude du transcriptome (par RNA-seq), du métabolome (non ciblée, par GC-MS) et de l'accumulation des phytohormones (ciblée, par LC-MS) a été réalisée sur les racines et les nodosités à la fin de la période de déficit hydrique et lors d'une cinétique fine pendant les deux semaines de ré-arrosage post-déficit hydrique (Figure 27). Cette cinétique nous a permis d'analyser : **i)** la réponse racinaire et nodulaire en réponse au déficit hydrique, **ii)** les réponses très précoces (après 4 heures et 1 jour de ré-arrosage), **iii)** les réponses précoces (après 3 jours de ré-arrosage) et **iv)** les réponses plus tardives (après 6 jours de ré-arrosage) mises en place lors de la phase de récupération chez les deux géotypes (Figure 27).

II. Matériels et méthodes

A- Conditions de culture des plantes et prélèvements

Les prélèvements de racines et de nodosités destinés aux analyses « omiques » ont été réalisés lors de l'expérimentation de caractérisation écophysio-logique de la réponse au déficit hydrique et au ré-arrosage présentée dans le chapitre 2. Les conditions de culture et le traitement hydrique appliqués sont donc identiques à ceux présentés dans la partie « matériels et méthodes » du chapitre 2 (cf page 81).

La cinétique des prélèvements réalisés est présentée sur la Figure 27. Au total, 10 prélèvements ont été effectués avec 3 prélèvements lors de la période de déficit hydrique (0, 7 et 13 jours de déficit hydrique) et 7 prélèvements lors de la période de ré-arrosage, correspondant à 4 heures et 1, 2, 3, 6, 10 et 14 jours de ré-arrosage (Figure 27). Pour chacune de ces dates, 12 plantes par géotype et par condition hydrique ont été prélevées. La partie racinaire a été séparée de la partie aérienne puis installée sur une plaque en acier inoxydable

refroidie au préalable à l'azote liquide. Un maximum de nodosités, a été prélevé en 10 minutes afin d'éviter la dégradation des ARNs. Tous les types de nodosités ont été prélevés, à savoir les nodosités jeunes et non fixatrices (caractérisées par leur forme ronde et leur couleur blanche), les nodosités fixatrices (allongées et de couleur rose dû à la présence de la leghémoglobine) et les nodosités sénescents, non fixatrices (notamment lors des prélèvements les plus tardifs, de couleur verte en raison de la dégradation de la leghémoglobine conduisant à la formation de biliverdine). Ces nodosités ainsi que les racines dénudées sont ensuite congelées dans de l'azote liquide avant d'être stockées à -80°C. Lorsque le temps ne permettait pas un retrait de toutes les nodosités en 10 min (notamment lors des stades les plus avancés de développement), les prélèvements ont été effectués de manière homogène au sein du système racinaire afin d'avoir une représentation globale des nodosités présentes, et seule la partie du système racinaire complètement dénudée a été prélevée.

Pour chaque prélèvement, les 12 plantes ont été regroupées en 4 pools de 3 plantes (Figure 27). Ces pools ont ensuite été broyés à l'azote liquide jusqu'à obtenir une poudre fine, et stockés à -80°C. Pour des questions de dimensionnement de l'expérimentation, les analyses RNA-seq, GC-MS et LC-MS ont été effectuées sur 3 des 4 pools disponibles et cela pour 5 des 10 prélèvements réalisés (Fin de stress, 4h, 1J, 3J et 6J de ré-arrosage, Figure 27), soit un total de 120 échantillons (3 répétitions x 5 prélèvements x 2 organes x 2 génotypes x 2 traitements hydriques). Les mêmes poudres ont été utilisées à la fois pour les analyses transcriptomique, métabolomique et les dosages de phytohormones. Les prélèvements destinés à ces analyses ont été sélectionnés afin de nous fournir des données de fin de période de déficit hydrique et sur la mise en place de la récupération. Les différences de cinétique de récupération entre les deux génotypes mises en évidence dans le chapitre 2 étant situées entre 3 et 7 jours de ré-arrosage (Chapitre 2, Figure 24) nous avons choisi comme dernier point d'analyse le prélèvement à 6 jours de ré-arrosage afin de nous permettre d'identifier les bases moléculaires sous-jacentes à ce décalage.

B- Dosage de phytohormones

L'analyse LC-MS (Liquide Chromatography - Mass Spectrometry) des échantillons a été réalisée sur la Plateforme de Chimie / Métabolisme / Métabolome de l'Observatoire du végétal, à l'INRA de Versailles-Grignon.

1- Extraction

Pour chaque échantillon, 30 mg de poudre fraîche ont été extraits avec 0,8 ml d'une solution acétone/eau/acide acétique (80/19/1 ; v/v/v). L'acide abscissique, l'acide salicylique, l'acide jasmonique, l'acide indole-3-acétique et les isotopes marqués stables de cytokinines, utilisés comme étalons internes, ont été préparés comme décrit dans Le Roux *et al.*, (2014). Un ng de standard de chaque hormone et 0,5 ng de standard cytokinines ont été ajoutés à l'échantillon. L'extrait est vigoureusement agité pendant 1 minute, traité aux ultrasons pendant 1 min à 25 Hz, agité pendant 10 minutes à 10 °C dans un Thermomixer (Eppendorf®), puis centrifugé (8000 g, 10 °C, 10 min). Le surnageant est collecté et le culot est ré-extrait deux fois avec 0,4 ml de la même solution d'extraction. Après centrifugation, les 3 surnageants sont poolés et séchés (volume final 1,6 ml).

2- Analyse et quantification

Chaque extrait sec a été dissous dans 100µL d'une solution d'acétonitrile / eau (50/50 ; v/v), filtré et analysé à l'aide d'un chromatographe liquide ultra performant Waters Acquity couplé à un spectromètre de masse quadripolaire Waters Xevo TQS (UPLC-ESI-MS). Les composés ont été séparés sur une colonne en phase inverse (Uptisphere C18 UP3HDO, granulométrie 100 * 2,1 mm * 3 µm; Interchim, France) avec un débit de 0,4 mL.min⁻¹ et un gradient binaire : (A) acide acétique à 0,1 % dans l'eau (v/v) et (B) acétonitrile avec 0,1 % d'acide acétique, la température de la colonne était de 40 °C. Pour l'acide abscissique, l'acide salicylique, l'acide jasmonique et l'acide indole-3-acétique les gradients binaires suivant ont été utilisés (durée, % A) : (0 min, 98 %), (3 min, 70 %), (7,5 min, 50 %), (8,5 min, 5 %), (9,6 min, 0 %) (13,2 min, 98 %), (15,7 min, 98 %) et pour les cytokinines (durée, % A): (0 min, 95 %), (13 min, 40 %), (16 min, 0 %), (16,5 min, 95 %). La spectrométrie de masse a été réalisée en électrospray et en mode balayage avec surveillance des réactions multiples (mode MRM), en mode ion positif pour l'acide indole-3-acétique et en mode ion négatif pour les autres hormones. Les paramètres instrumentaux sont les suivants : capillaire de 1,5 kV (mode négatif), température du bloc source et du gaz de dissolution à 130 °C et à 500 °C, respectivement. Pour chacun des échantillons, la quantification de phytohormone a été normalisée par la biomasse de poudre fraîche utilisée.

3- Analyse statistique

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R, version 3.5.3. L'effet du traitement hydrique sur le dosage des différentes phytohormones a été testé pour chaque organe, pour chaque génotype et à chaque prélèvement. Pour cela des tests de Student ont été effectués (fonction « t.test ») et seules les différences avec un p-value inférieure à 0.05 sont considérées comme significatives.

C- Analyse métabolomique par GC-MS

L'analyse GC-MS (Gaz Chromatography - Mass Spectrometry) des échantillons a été réalisée sur la Plateforme de Chimie / Métabolisme / Métabolome de l'Observatoire du végétal, à l'INRA de Versailles-Grignon. Les étapes de ce protocole sont issues des travaux de Fiehn (2006) et Fiehn *et al.*, (2008).

1- Extraction

Pour chaque échantillon, 50 mg de poudre congelée ont été remis en suspension dans 1 ml d'une solution d'eau : acétonitrile : isopropanol (2 : 3 : 3) à -20°C contenant du ribitol à 4 µg/ml et extraits pendant 10 minutes à 4 °C sous agitation à 1400 tr/min. La matière insoluble est séparée par centrifugation à 20 000 g pendant 5 minutes et 50 µl sont prélevés et séchés pendant une nuit à 35 °C à l'aide d'un Speed-Vac.

2- Dérivation

Dix µl de méthoxyamine à 20 mg/ml dans de la pyridine ont été ajoutés aux échantillons et la réaction a été réalisée pendant 90 minutes à 28 °C sous agitation continue dans un mélangeur thermomécanique Eppendorf. Cinquante µl de N-méthyl-N-triméthylsilyl-trifluoroacétamide (MSTFA, Sigma M7891) ont ensuite été ajoutés et la réaction a été poursuivie pendant 30 minutes à 37 °C. Après refroidissement, 45 µl ont été transférés dans un flacon d'Agilent pour injection.

3- Analyse

Quatre heures après la dérivation, 1 µl d'échantillon a été injecté en modes « *Splitless* » et

« Split » (1:30) dans un chromatographe en phase gazeuse Agilent 7890A couplé à un spectromètre de masse Agilent 5977B. La colonne utilisée est une colonne Rxi-5SilMS de Restek. Le revêtement (Restek #20994) a été changé avant chaque série d'analyse de 24 échantillons. La rampe de température du four était de 70 °C pendant 7 minutes, puis augmentait de 10 °C/minute jusqu'à 330 °C pendant 5 minutes (38 minutes au total), avec un débit d'hélium constant de 0,7 mL/min. Les températures étaient les suivantes : injecteur : 250 °C, conduite de transfert : 290 °C, source : 250 °C et quadripole 150 °C. Cinq balayages par seconde ont été acquis sur une plage de 50 à 600 Da. Les échantillons ont été randomisés. Quatre contrôles de qualité différents ont été injectés au début et à la fin de l'analyse pour surveiller la stabilité de la dérivation. Un mélange d'alcanes (C10, C12, C15, C19, C22, C28, C32, C36) a été injecté au milieu de la file d'attente pour calibration externe. Cinq scans par seconde ont été acquis. Une injection en mode « split » avec un rapport de 1:30 a été systématiquement réalisée dans les conditions suivantes : 70 °C pendant 2 minutes puis une augmentation de 30 °C par minute jusqu'à 330 °C pendant 5 minutes, avec un débit constant d'hélium à 1 mL/min. Trois dérivations indépendantes du contrôle de qualité ont été injectées au début, au milieu et à la fin de la série.

4- Traitement des données

Les fichiers de données Agilent bruts ont été convertis au format NetCDF et analysés avec AMDIS (<http://chemdata.nist.gov/mass-spc/amdis/>). L'identification des métabolites a été réalisée à partir d'une banque d'indices de rétention/spectre de masse construite à partir des bases de données NIST (<https://www.nist.gov/pml/atomic-spectra-database>), Fiehn (<https://fiehnlab.ucdavis.edu/projects/softwaredev>) et Golm (<http://gmd.mpimp-golm.mpg.de>) et à partir de composés standards. Les surfaces des pics ont été déterminées à l'aide du logiciel Targetlynx (Waters) après conversion du fichier NetCDF au format masslynx. Les données AMDIS et Target Lynx en modes Splitless et Split 30, ont été compilés dans un seul fichier Excel à des fins de comparaison. Après soustraction de la moyenne du blanc, les surfaces de pic ont été normalisées avec un standard interne, le ribitol, ainsi que par la biomasse de poudre fraîche utilisée.

5- Quantification absolue

Un coefficient de réponse a été déterminé sur 4 ng pour 80 métabolites, et pour la même quantité de ribitol. Ce facteur a été utilisé pour donner une estimation de la concentration absolue du métabolite («étalonnage en un point») exprimée en nmol par mg de poids frais (nmol/mg FW, Fresh Weight). Pour les autres métabolites, les concentrations sont exprimées en Unité Arbitraire par mg de poids frais (UA/mg FW).

6- Analyses statistiques

Pour chaque métabolite et pour les 3 réplicats de chaque prélèvement, l'écart à la moyenne a été calculé comme suit : $(R_n - \text{MoyR}_{1-3}) / \text{MoyR}_{1-3}$; R correspondant à la valeur du réplicat, n au numéro du réplicat et MoyR₁₋₃ à la moyenne des trois réplicats. Tous les réplicats avec un écart à la moyenne supérieur à 50 % ont été retirés. Pour chaque condition (génotype x traitement hydrique x prélèvement) seules les données pour lesquelles le métabolite a été détecté dans au moins deux réplicats sur trois ont été conservées.

Les métabolites différentiellement accumulés en réponse au déficit hydrique ou au ré-arrosage ont été identifiés par une ANOVA à un facteur (p-value < 0.05). Les analyses présentées dans ce chapitre ont été effectuées sur ces métabolites différentiellement accumulés. Des clustering hiérarchiques des données d'accumulation des métabolites, visualisés grâce à des heatmap, ont été réalisés grâce à la fonction pheatmap (package pheatmap, version 1.0.12) afin d'identifier des groupes (ou clusters) de métabolites présentant des profils d'accumulation similaires. Une analyse des voies métaboliques associées à ces différents clusters a ensuite été effectuée en utilisant MetaboAnalyst (<https://www.metaboanalyst.ca>). La bibliothèque de référence utilisée est celle d'*Arabidopsis thaliana* (KEGG) et l'analyse de sur-représentation utilise le test exact de Fisher (p < 0.001).

Pour l'analyse ciblée de la fixation symbiotique dans les nodosités (Figure 46) et du métabolisme du carbone et de l'azote dans les racines (Figure 47), l'effet du déficit hydrique et du ré-arrosage a été testé via un test-T (p-value < 0.05) pour chaque génotype et à chaque prélèvement.

D- Analyse transcriptomique par séquençage d'ARN (RNA-seq)

1- Extraction des ARN totaux

Les ARNs totaux ont été extraits à partir de 100 mg de poudre fraîche de nodules ou de racines en utilisant le kit d'extraction Spectrum Plant Total RNA Kit (SIGMA). Un traitement avec une DNase (On-Column DNase | Digest Set, SIGMA) a été effectué afin d'éliminer toute trace d'ADN génomique. La quantification des ARNs a été réalisée en utilisant un spectrophotomètre NanoDrop™2000 (ThermoFisher Scientific) et la qualité des ARN a été évaluée avec un Bioanalyseur (Agilent Technologies).

2- Séquençage ARN

Au total 120 échantillons d'ARNs ont été séquencés sur la plateforme Genome et Transcriptome (GeT) du GenoToul de Toulouse. Les banques d'ARN-seq ont été préparées à l'aide du kit de préparation d'échantillons d'ARNm Illumina TruSeq Stranded, conformément aux instructions du fabricant (Illumina). Les ARNm ont été sélectionnés en utilisant des billes poly-T, puis fragmentés pour générer un ADNc double brin, avant d'être liés à des adaptateurs afin d'être séquencés. Onze cycles de PCR ont été appliqués pour amplifier les banques. Leur qualité a été évaluée à l'aide d'un analyseur de fragments (Agilent Technologies) et elles ont été quantifiées par qPCR à l'aide du kit de quantification de banque Kapa (Roche). Le séquençage a été effectué sur un séquenceur Illumina HiSeq3000 en paired-end (chaque fragment est séquencé à la fois dans le sens 5' et dans le sens 3') de 2x150 pb avec les kits de séquençage Illumina HiSeq3000.

3- Traitement bio-informatique des données de séquençage, alignement sur le génome et comptage

Le traitement bio-informatique des données de séquençage ainsi que l'alignement sur le génome et le comptage ont été effectués par les bio-informaticiens du laboratoire (M. Térézol et J. Kreplak) comme suit. La qualité des séquences a été évaluée à l'aide du logiciel FastQC v0.11.2 (Andrews, 2010) et les données brutes ont été corrigées à l'aide du logiciel de correction d'erreur basé sur l'utilisation des k-mers, Rcorrector (-k 31) (Song et Florea, 2015; MacManes, 2015). Les données ainsi corrigées ont été nettoyées pour retirer les séquences

	Nombre de paires de lectures	Nombre de lectures	Nombre de lectures alignées	%	Nombre de lectures alignées de manière unique	%	Nombre de lectures alignées de manière multiple	%	Nombre de lectures non alignées	%
RACINES										
Moyenne	20 865 764	41 731 528	39 567 329	95%	34 287 613	82%	5 279 716	13%	2 164 199	5%
Minimum	16 682 489	33 364 978	31 835 451	86%	27 734 759	73%	4 100 692	12%	1 529 527	4%
Maximum	30 088 389	60 176 778	57 108 223	96%	49 442 334	83%	7 665 889	13%	7 108 897	14%
NODOSITES										
Moyenne	20 998 461	41 996 923	39 996 771	95%	32 160 906	77%	7 835 864	19%	2 000 152	5%
Minimum	13 922 197	27 844 394	26 550 255	90%	21 470 842	71%	5 079 413	13%	1 294 139	4%
Maximum	28 370 000	56 740 000	54 282 282	96%	43 503 667	83%	11 029 992	21%	4 241 570	10%

Tableau 3 : Statistiques d'alignement des lectures sur le génome pour les échantillons issus des racines et des nodosités.

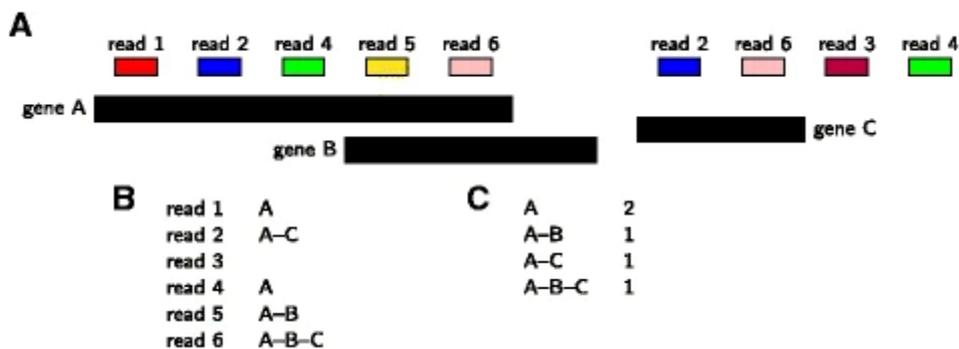


Figure 28 : Explication de la méthode de comptage Mmquant avec un exemple (d'après Zytnecki 2017).

(A) Configuration test, constituée de trois gènes A, B et C (en noir) avec A et B se chevauchant partiellement.. Six lectures sont alignées sur le génome et certaines (lectures 2, 4 et 6) s'alignent à deux positions. Si une lecture s'aligne de manière unique (ex : lecture 1), le gène sur lequel elle s'aligne lui est attribué (gène A). Si une lecture, comme la lecture 2, s'aligne sur deux gènes différents, un « supergène » est créé, ici A-C, et ce gène est associé à la lecture. Si une lecture ne s'aligne avec aucun gène, elle n'est pas utilisée. Si une lecture, comme la lecture 4, s'aligne sur un gène (gène A) et sur une région intergénique, elle est uniquement associée au gène. Si une lecture (lecture 5) s'aligne sur deux gènes qui se chevauchent, la lecture est attribuée au « supergène » (gène A-B). De manière similaire, si une lecture (lecture 6) s'aligne sur deux gènes se chevauchant et un autre gène, les trois gènes sont combinés (A-B-C). La table B donne les gènes attribués à chaque lecture. (C) Tableau de comptage qui serait obtenu par mmquant dans cette configuration. Les gènes sont classés par ordre alphabétique.

de faible qualité et pour éliminer les séquences correspondant aux adaptateurs en utilisant Trimmomatic v0.32 (Bolger *et al.*, 2014) avec les paramètres suivants : ILLUMINACLIP:TruSeq3PE2:2:40:15, LEADING/TRAILING:2, SLIDINGWINDOW:4:15 et MINELN:25. Les lectures d'une longueur inférieure à 25pb ou non appariées ne sont pas conservées. La qualité des séquences a été évaluée une seconde fois après nettoyage et correction des données toujours à l'aide du logiciel FastQC v0.11.2 (Andrews, 2010).

Les lectures corrigées et nettoyées ont été alignées sur le génome de référence de pois à l'aide du programme d'alignement HISAT2 v2.0.5 (Kim *et al.*, 2015). La version v1c du génome du pois a été utilisée. Elle correspond à la version V1a de Kreplak *et al.*, (2019) enrichie avec les gènes de Henriot *et al.*, (2019) et de Vernoud *et al.*, (non publiés). La profondeur de séquençage obtenue est d'en moyenne 21 millions de paires de lectures pour chaque échantillon pour les racines comme pour les nodosités (Tableau 3). Les résultats d'alignement montrent que pour chaque échantillon, seule une faible proportion des lectures ne s'est pas alignée sur le génome (en moyenne 5 % pour chacun des organes), et que plus de 70 % des lectures ont pu être alignées de manière unique (Tableau 3). En revanche, en moyenne 13 % (racines) et 19 % (nodosités) des lectures étaient alignées de manière multiple (Tableau 3). Ces pourcentages étant plus importants que ceux obtenus lors d'expériences similaires réalisées sur feuilles ou jeunes graines de pois (Henriot *et al.*, 2019, Vernoud *et al.*, données non publiées), nous avons décidé de prendre en compte ces lectures alignées de manières multiples. Pour cela les lectures ont été attribuées au génome de référence de pois v1c à l'aide de l'outil de comptage *mmquant* (Zytnicki, 2017) qui permet de prendre en compte à la fois les paires de lectures alignées sur le génome de manière unique et multiple (ces dernières étant éliminées avec les outils de comptage classiques). L'outil détecte les 2 gènes (ou plus) sur lesquels la lecture s'aligne et les fusionne afin de créer un « super-gène », et les comptages correspondant à ces lectures sont attribués au « super-gène » créé (Figure 28). La matrice de comptage générée par *mmquant* pour chaque organe a été utilisée pour la normalisation des données et l'analyse différentielle.

4- Analyse différentielle

Seuls les gènes ayant un nombre de comptage total supérieur à 10 ont été inclus dans l'analyse. La normalisation des niveaux d'expression, les analyses en composantes principales

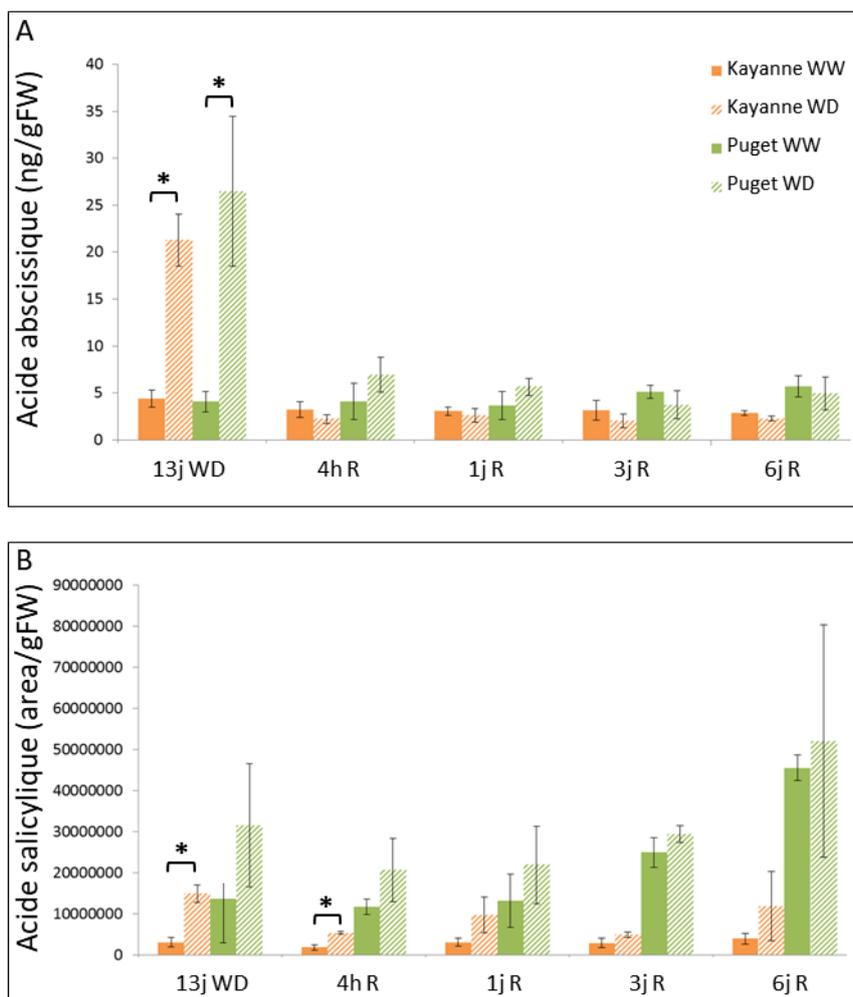


Figure 29 : Effet du déficit hydrique et du ré-arrosage sur l'accumulation d'acide abscissique (A) et d'acide salicylique (B) dans les racines.

Le génotype Kayanne est en orange et le génotype Puget en vert; les barres pleines correspondent aux plantes contrôles (WW) et les barres hachurées aux plantes stressées (WD). Les valeurs sont moyennées, les barres verticales représentent les écart-types. Les astérisques indiquent une différence significative entre les plantes contrôles et les plantes stressées pour chaque génotype et chaque prélèvement (test-T, p-value < 0.05, 3 réplicats biologiques/prélèvement/génotype). Les différents prélèvements correspondent à 13 jours de déficit hydrique (13j WD), 4h de ré-arrosage (4hR) et 1, 3 et 6 jours de ré-arrosage (1jR, 3jR et 6jR).

(ACP) et les analyses différentielles ont été effectuées avec le package DESeq2 (version 1.22.2, Love *et al.*, 2014). Pour les ACP, la méthode de normalisation VST a été utilisée car préconisée pour l'analyse des jeux de données avec un nombre d'échantillons important (supérieur à 30). Une première ACP a été réalisée sur les données d'expression de tous les échantillons et a mis en évidence 5 échantillons dits « hors types » (données non montrées). Ainsi 3 échantillons de racines (Kayanne - WD à 4h de ré-arrosage, Kayanne - WW à 6j de ré-arrosage et Puget - WW à 1j de ré-arrosage) et 2 échantillons de nodosités (Kayanne - WD à 4h de ré-arrosage et Kayanne - WW à 6j de ré-arrosage) ont été supprimés du jeu de données. Les ACP et analyses différentielles présentées dans ce chapitre ont donc été réalisées sur 115 échantillons.

En ce qui concerne l'analyse différentielle, l'étape de normalisation est intégrée à la fonction d'analyse (méthode de normalisation par la médiane des ratios). Les gènes sont considérés comme différentiellement exprimés quand la p-value ajustée est inférieure ou égale à 0.05. Des clustering hiérarchiques des données d'expression, visualisés grâce à des heatmap du FoldChange, ont été réalisés grâce à la fonction pheatmap (package pheatmap, version 1.0.12).

L'analyse des enrichissements en termes de Gène Ontologie (GO) a été réalisée en utilisant le package R TopGO (version 2.34.0; Alexa and Rahnenfuhrer, 2018), avec la méthode *Elim* et le test exact de Fisher. Pour le cas des « super-gènes », les gènes les composant ont été préalablement séparés afin d'être pris en compte lors de l'analyse.

III. Résultats et discussion

A- Effet du déficit hydrique et du ré-arrosage sur l'accumulation de phytohormones dans les racines et les nodosités

L'effet du déficit hydrique et du ré-arrosage sur l'accumulation des phytohormones dans les racines et les nodosités a été analysé. Seuls l'acide abscissique (ABA) et l'acide salicylique (SA) ont pu être détectés et quantifiés dans les racines de pois. Dans les nodosités, l'ABA, le SA, l'acide jasmonique (JA) et 4 formes de cytokinines (l'isopentenyladénosine monophosphate, l'isopentenyladénosine, la zéatine riboside monophosphate et la zéatine riboside) ont été identifiées et dosées. L'auxine (acide indole-3-acétique) a également été identifiée mais en trop faible quantité pour permettre une quantification que ce soit dans les racines ou les nodosités (quantité en dessous du seuil de détection). Les phytohormones ont pu être

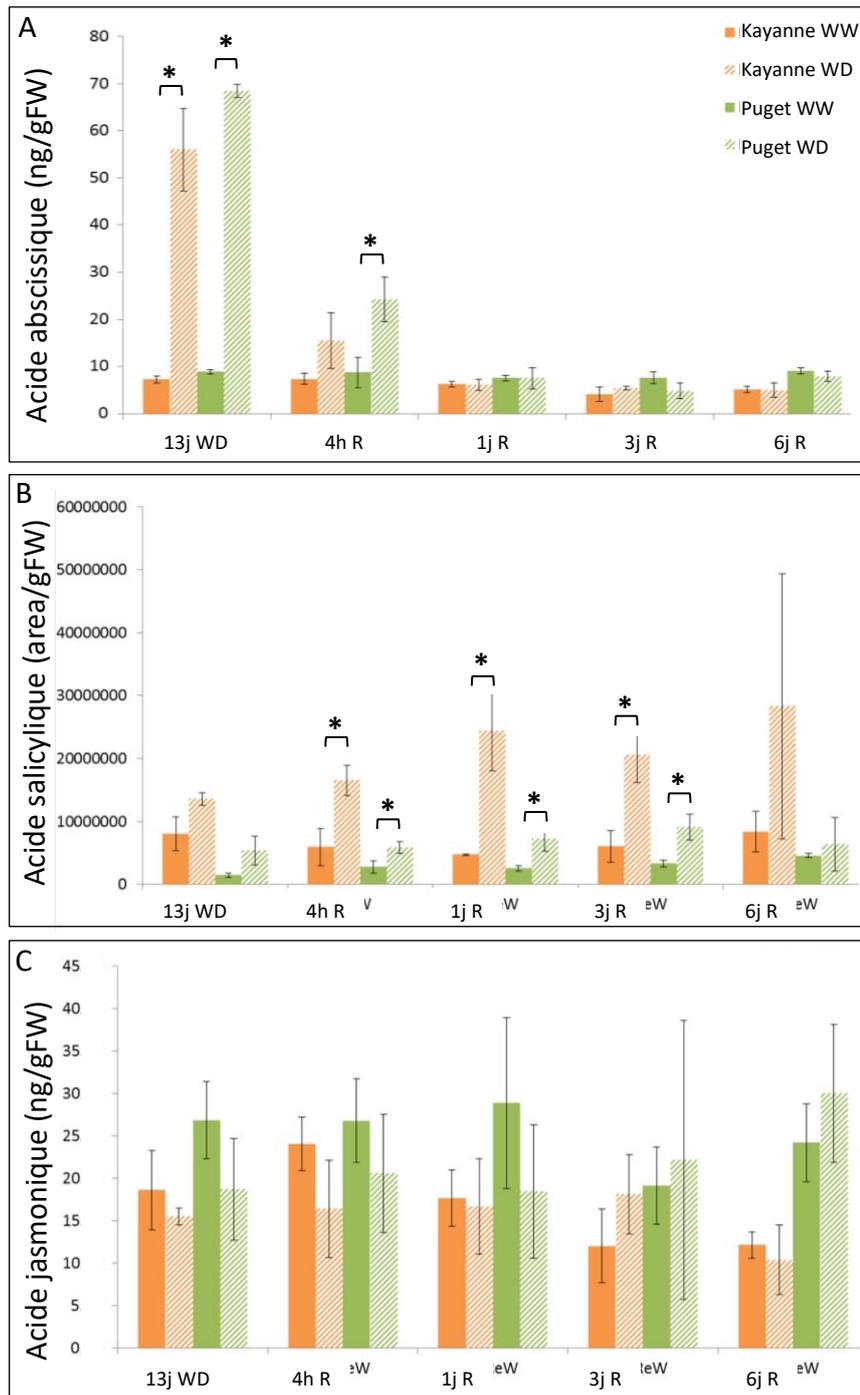


Figure 30 : Effet du déficit hydrique et du ré-arrosage sur l'accumulation d'acide abscissique (A), d'acide salicylique (B) et d'acide jasmonique (C) dans les nodosités.

Le géotype Kayanne est en orange et le géotype Puget en vert; les barres pleines correspondent aux plantes contrôles (WW) et les barres hachurés aux plantes stressées (WD). Les valeurs sont moyennées, les barres verticales représentent les écart-types. Les astérisques indiquent une différence significative entre les plantes contrôles et les plantes stressées pour chaque géotype et chaque prélèvement (test-T, p-value < 0.05, 3 réplicats biologiques/prélèvement/géotype). Les différents prélèvements correspondent à 13 jours de déficit hydrique (13j WD), 4h de ré-arrosage (4hR) et 1, 3 et 6 jours de ré-arrosage (1jR, 3jR et 6jR).

quantifiées de manière absolue et sont exprimées en ng par g de matière fraîche (ng/gFW) à l'exception du SA exprimé en aire sous la courbe par gFW. En effet, une asymétrie du pic chromatographique due à la présence d'une forme de contamination a empêché la quantification absolue de cette hormone.

La quantification de l'ABA dans nos échantillons de racines et de nodosités montre, pour les deux organes, une forte augmentation de la quantité de cette hormone chez les plantes stressées par rapport au contrôle après 2 semaines de déficit hydrique, et ce pour les deux géotypes (augmentation de 4.8 fois pour Kayanne et 6.5 fois pour Puget, 13j WD dans les racines, Figure 29A et augmentation de presque 8 fois par rapport au contrôle bien arrosé dans les nodosités, Figure 30A). L'ABA retourne à un niveau similaire à celui des plantes contrôle dès le premier jour de ré-arrosage pour les deux géotypes dans les racines (Figure 29A) et les nodosités (Figure 30A). Cette accumulation d'ABA en réponse au déficit hydrique, classiquement observée dans les racines (Bray, 1997) a déjà également été mise en évidence dans les nodosités chez le soja (Prudent *et al.*, 2016). L'ABA a par ailleurs été montré comme ayant un rôle de régulateur négatif de l'initiation et de la croissance des nodosités (Ding *et al.*, 2008) mais aussi de leur fonctionnement. En effet chez le pois l'application exogène d'ABA entraîne une baisse de l'activité de fixation de N₂, *via* une diminution de la teneur en leghémoglobine (Gonzalez *et al.*, 2001). Au contraire, l'application d'un inhibiteur de la synthèse de l'ABA a été montré comme entraînant une augmentation de cette activité chez le lotier (Gonzalez *et al.*, 2001; Tominaga *et al.*, 2009). Dans notre expérience, l'augmentation de la teneur en ABA en réponse au déficit hydrique pourrait entraîner une diminution de la croissance des nodosités comme le traduit la diminution de biomasse totale de nodosités chez les plantes stressées des deux géotypes par rapport aux plantes contrôles (Chapitre 2, Tableau S1. En revanche, l'accumulation d'ABA dans les nodosités n'est sans doute pas suffisante pour entraîner une baisse de l'activité de fixation, aucune différence significative n'ayant été observée à la fin de la période de déficit hydrique entre les plantes stressées et les plantes contrôles (Chapitre 2, Tableau 1).

En ce qui concerne la quantité de SA dans les racines, elle augmente significativement en réponse au déficit hydrique uniquement pour le géotype Kayanne, avec une augmentation de plus de 2 fois par rapport aux plantes contrôles (Figure 29B). Il y a ensuite retour à des valeurs similaires à celles des plantes contrôles après 1 jour de ré-arrosage (Figure 29B). Au

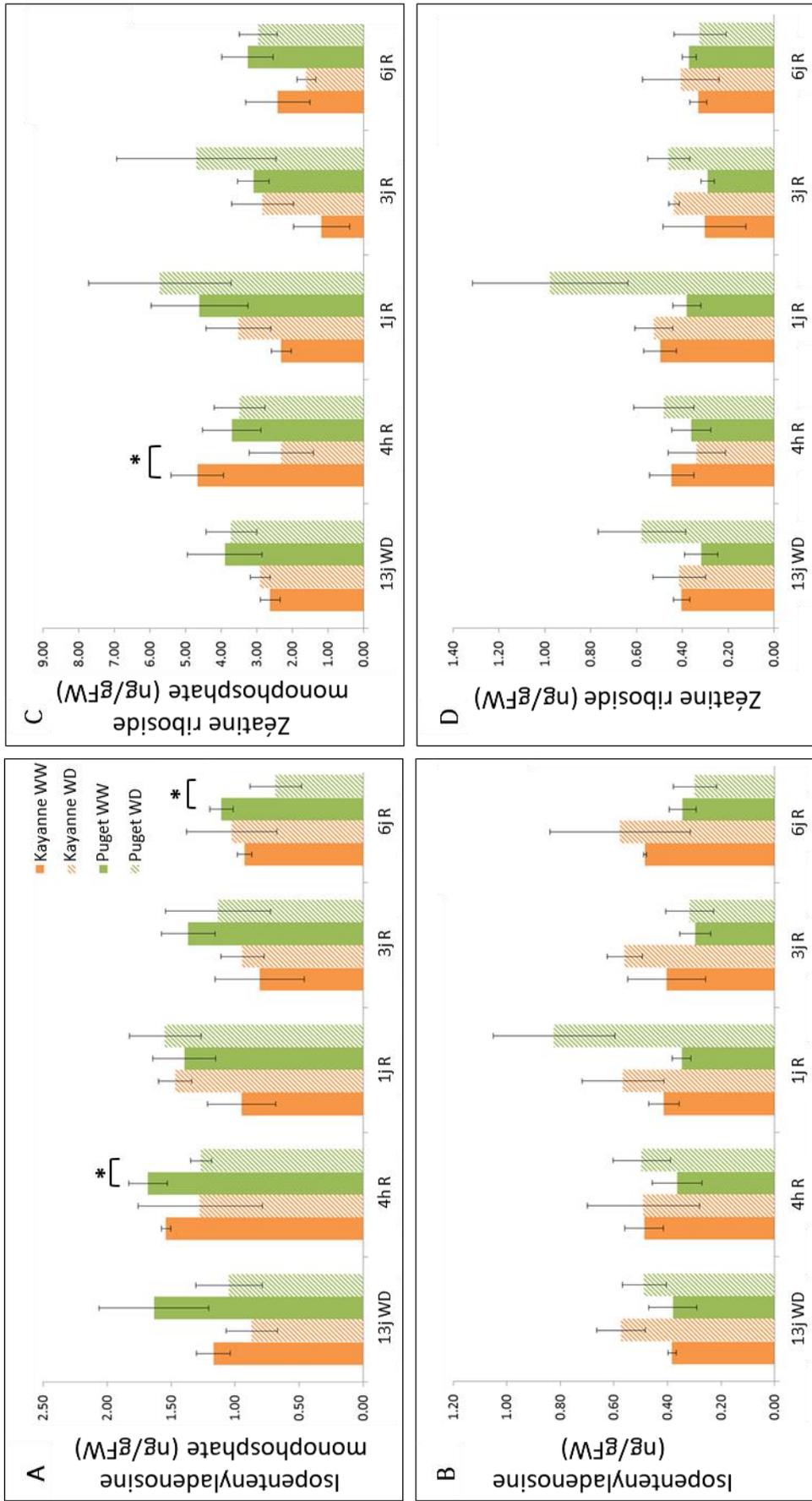


Figure 31 : Effet du déficit hydrique et du ré-arrosage sur l'accumulation de cytokines dans les nodosités L'isopentenyladenosine monophosphate (A), l'isopentenyladenosine (B), la zéatine monophosphate (C) et la zéatine (D) ont été dosées dans les nodosités du génotype Kayanne (en orange) et du génotype Puget (en vert). Les barres pleines correspondent aux plantes contrôles (WW) et les barres hachurées aux plantes stressées (WD). Les valeurs sont moyennées et les barres verticales représentent les écart-types. Les astérisques indiquent une différence significative entre les plantes contrôles et les plantes stressées pour chaque génotype à chaque prélèvement (Test-t, $p < 0.05$, $n = 4$). 13j WD : 13j de déficit hydrique, 4h R, 1j R, 3j R et 6j R : 4h, 1j, 3j et 6j de ré-arrosage.

niveau des nodosités, bien que la quantité relative de SA augmente chez les plantes WD des deux génotypes dès la fin du déficit hydrique, cette variation n'est significative que dès les premières heures de ré-arrosage (Figure 30B). Cette augmentation est maintenue dans les nodosités ré-arrosées par rapport aux nodosités contrôles pendant les 3 premiers jours de ré-arrosage, avant de revenir à une valeur non significativement différente du contrôle après 6 jours de ré-arrosage, bien qu'une tendance soit toujours observable. De plus, cette augmentation est plus importante pour le génotype Kayanne comparé au génotype Puget (Figure 30B). Le SA est une phytohormone dont le rôle dans les réponses de défense aux stress biotiques a largement été décrit (Loake and Grant, 2007), mais qui a également un rôle dans la réponse aux stress abiotiques tels que le stress osmotique ou les fortes températures (Horváth *et al.*, 2007). A notre connaissance, aucune étude n'a jusqu'à présent dosé le niveau de SA endogène en réponse au stress hydrique, les analyses pour étudier le rôle du SA dans les réponses au stress hydrique reposant plutôt sur un ajout de SA exogène ou une modulation du niveau endogène de SA via l'application d'inhibiteur ou l'utilisation de mutants. L'application exogène de SA chez la luzerne inhibe l'initiation des nodosités et retarde leur apparition (Martínez-Abarca *et al.*, 1998). De manière cohérente avec cela, il a été montré qu'une diminution du contenu en SA dans les racines de *Medicago truncatula* via la surexpression de la salicylate hydroxylase, stimulait la nodulation (Stacey *et al.*, 2006). Cependant, chez la luzerne, un pré-traitement des plantules avec du SA diminue l'effet négatif d'un stress salin sur les racines et sur les nodosités (Palma *et al.*, 2013). En effet, le SA, appliqué de manière exogène induit l'activité d'enzymes anti-oxydantes permettant de protéger l'intégrité cellulaire (Kang *et al.*, 2013). De ce fait, il y a un meilleur maintien de la croissance de la plante mais également un meilleur maintien de l'activité de fixation de l'azote lorsque les plantes sont pré-traitées avec du SA avant application du stress salin (Palma *et al.*, 2013; Kang *et al.*, 2013). Cet effet bénéfique du SA en condition de stress semble être en adéquation avec les données obtenues dans le chapitre 2. En effet, cette accumulation de SA observée uniquement dans les racines du génotype Kayanne pourrait participer au maintien de la croissance des racines de ce génotype lors du déficit hydrique (Chapitre 2, Tableau 2). De plus, l'augmentation de SA dans les nodosités étant plus importante lors du ré-arrosage pour les plantes WD du génotype Kayanne, aucune baisse significative de l'activité de fixation de l'azote par rapport aux plantes contrôles étant observée pour le génotype Kayanne seulement après 7 jours de ré-arrosage, une hypothèse pourrait être que l'accumulation de



Figure 32 : Diagramme de Venn représentant le nombre de métabolites identifiés et quantifiés dans les racines et les nodosités. (A) nombre de métabolites total, (B) nombre de métabolites connus.

SA dans les nodosités lors du ré-arrosage participerait au maintien de l'activité de fixation de l'azote (Chapitre 2, Tableau 1). Le contenu en SA des plantes WD étant similaire à celui des plantes WW à la fin de la période de déficit hydrique, il ne serait cependant pas responsable du maintien de l'activité de fixation de l'azote durant cette période (Chapitre 2, Tableau 1).

La biosynthèse de l'acide jasmonique (JA) a été montrée comme induite dans les feuilles en réponse au stress hydrique (Du *et al.*, 2013) et l'application exogène de JA est associée à une meilleure tolérance au stress hydrique (Ahmad *et al.*, 2016). Bien que peu de données sur le JA dans les nodosités soient disponibles, nous aurions pu nous attendre à une augmentation de la teneur en JA. Cependant l'analyse de nos données ne montre pas d'effet du déficit hydrique ou du ré-arrosage sur les quantités de cette hormone dans les nodosités, et ce pour les deux génotypes (Figure 30C).

En ce qui concerne les cytokinines, 4 formes ont été détectées et quantifiées dans les nodosités (Figure 31). Les cytokinines sont divisées en 3 groupes majoritaires : les formes actives, les formes de transport et les formes de stockage, inactives. Enfin, les formes phosphatées correspondent, quant-à-elles, aux précurseurs de ces cytokinines et il n'est pas encore clairement défini si elles possèdent une fonction propre (Sakakibara, 2010). Les 4 cytokinines dosées ici correspondent à deux précurseurs (l'isopentenyladénoside monophosphate et la zéatine riboside monophosphate), une forme de transport (la zéatine riboside) et une forme active (l'isopentényladénosine).

L'isopentenyladenoside monophosphate ainsi que la zéatine riboside monophosphate ne sont pas affectées par le déficit hydrique pour les deux génotypes (Figure 31A et 31C). Cependant, une diminution significative est observée chez les plantes ré-arrosées par rapport aux plantes contrôles après 4 heures de ré-arrosage, pour la zéatine riboside monophosphate chez le génotype Kayanne, et pour l'isopentenyladenoside monophosphate chez le génotype Puget (Figure 31A et 31C). Ces diminutions sont transitoires avec un retour à des valeurs similaires à celles des plantes contrôles à 1 jour de ré-arrosage. Une seconde diminution de l'isopentenyladenoside monophosphate, chez les plantes ré-arrosées par rapport aux plantes contrôles, est cependant visible après 6 jours de ré-arrosage toujours pour le génotype Puget uniquement (Figure 31A). L'analyse des données relatives à l'isopentenyladénoside ainsi que la zéatine riboside ne montre pas d'effet du déficit hydrique ou du ré-arrosage sur les

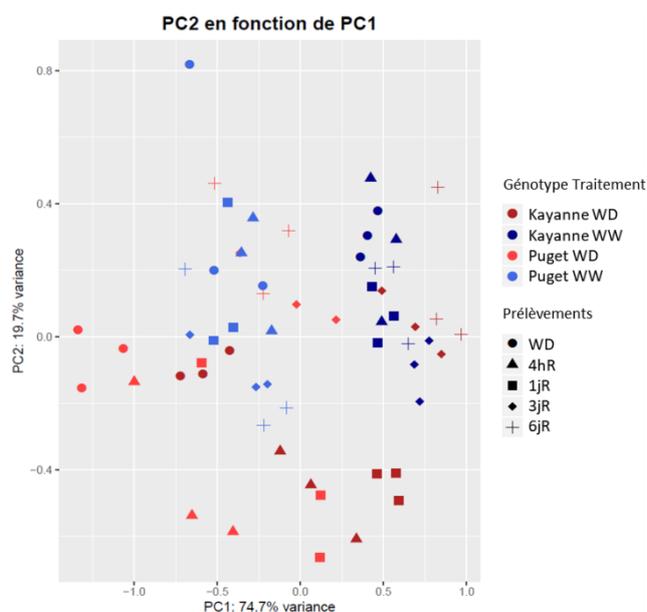


Figure 33 : Analyse en composantes principales des données métabolomique obtenues pour les échantillons de racines. L'analyse a été réalisée sur les données de quantification de l'ensemble des métabolites dosés. Les symboles rouges correspondent aux échantillons stressés (WD) et les bleus aux échantillons contrôles bien arrosés (WW) ; les symboles foncés correspondent au génotype Kayanne et les clairs au génotype Puget. Les différents symboles correspondent aux différents prélèvements effectués (WD : 13j de déficit hydrique ; 4hR : 4h de ré-arrosage ; 1jR, 3jR et 6jR : 1, 3 et 6 jours de ré-arrosage).

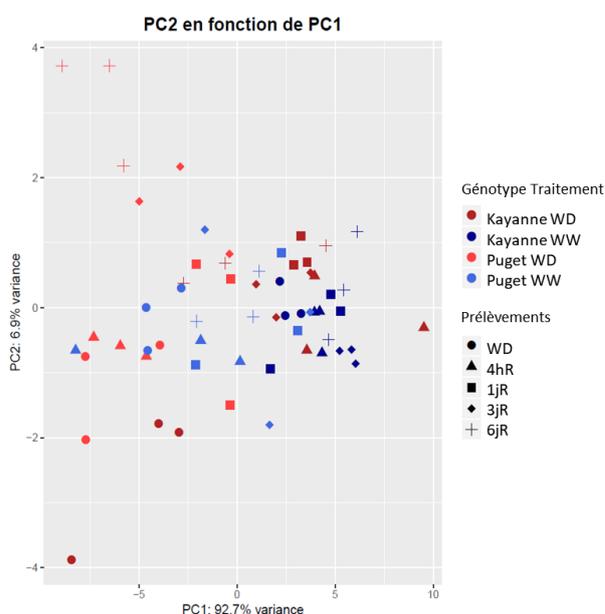


Figure 34 : Analyse en composantes principales des données métabolomique obtenues pour les échantillons de nodosités. L'analyse a été réalisée sur les données de quantification de l'ensemble des métabolites dosés. Les symboles rouges correspondent aux échantillons stressés (WD) et les bleus aux échantillons contrôles bien arrosés (WW) ; les symboles foncés correspondent au génotype Kayanne et les clairs au génotype Puget. Les différents symboles correspondent aux différents prélèvements effectués (WD : 13j de déficit hydrique ; 4hR : 4h de ré-arrosage ; 1jR, 3jR et 6jR : 1, 3 et 6 jours de ré-arrosage).

quantités de ces hormones dans les nodosités quel que soit le génotype (Figure 31B et 31D). Ainsi, malgré le rôle important des cytokinines dans le développement des nodosités (Ferguson and Mathesius, 2014), les quantités des différentes formes dosées, et notamment la forme active, ne sont pas impactées par le déficit hydrique et le ré-arrosage et toutes restent globalement stables (Figure 31). Jusqu'à présent, les modifications de l'accumulation des cytokinines en réponse aux stress abiotiques et notamment au stress hydrique ont été mises en évidence au niveau aérien, avec une baisse de la quantité de cytokinines (biosynthèse et transport) (Peleg and Blumwald, 2011; Ha *et al.*, 2012).

En conclusion, nous avons donc montré que les quantités d'ABA et de SA sont modulées par le déficit hydrique et le ré-arrosage dans les racines et les nodosités. Cependant, alors que l'évolution de l'ABA est similaire quel que soit l'organe ou le génotype, la quantité de SA augmente à la fin de la période de déficit hydrique et uniquement pour le génotype Kayanne dans les racines (Figure 48) alors qu'elle augmente lors du ré-arrosage et pour les deux génotypes dans les nodosités (Figure 49).

B - Analyse du métabolome de racines et de nodosités de pois en réponse au déficit hydrique et au ré-arrosage

Une analyse par GC-MS a été réalisée afin d'identifier les métabolites associés au déficit hydrique et au ré-arrosage dans les racines et les nodosités et de caractériser leurs variations lors de ces deux périodes. Il est important de noter que les échantillons de nodosités analysés en métabolomique comprennent les métabolites des cellules racinaires de la nodosité et des bactéries qui n'ont pu être séparées pour analyse différentielle.

1- Analyse exploratoire du jeu de données

Au total, 341 métabolites ont été identifiés et quantifiés avec 205 retrouvés dans les racines (dont 115 métabolites connus) et 315 dans les nodosités (dont 143 métabolites connus). Parmi ces 341 métabolites, 179 (dont 112 métabolites connus) sont retrouvés à la fois dans les racines et les nodosités (Figure 32).

Les données issues des prélèvements racinaires et nodulaires ont été traitées séparément. Une analyse en composante principale a été effectuée pour les racines (Figure 33) et pour les nodosités (Figure 34) afin d'obtenir une vue d'ensemble du jeu de données ainsi que de sa

structuration générale. Les deux premières composantes expliquent 94.4 % de la variabilité pour les racines et 99.6 % pour les nodosités.

De manière similaire pour les deux organes, la première composante (74.7 % pour les racines et 92.7 % pour les nodosités) permet une séparation des génotypes, exceptés les échantillons de fin de période de déficit hydrique du génotype Kayanne (ronds rouge foncé) qui se regroupent avec les échantillons Puget (Figures 33 et 34). Ceci suggère que les deux génotypes seraient plus proches dans leur réponse au déficit hydrique que dans leur réponse au ré-arrosage. Cette séparation des génotypes est cependant plus marquée pour les racines que pour les nodosités.

La seconde composante de l'ACP « racines » (19.7 %) permet une séparation en fonction du traitement hydrique. Cependant les échantillons ré-arrosés des derniers prélèvements, correspondant à 3 et 6 jours de ré-arrosage (losanges et croix rouges) sont groupés avec les échantillons contrôles (Figure 33). Cela suggère un profil d'accumulation de métabolites proche de celui des plantes contrôles pour les plantes stressées après 3 jours de ré-arrosage et donc une récupération potentielle.

En ce qui concerne les nodosités, la seconde composante (6.9 %) permet une séparation des échantillons WD du dernier prélèvement (6 jours de ré-arrosage : croix rouges) du reste des échantillons pour le génotype Puget uniquement (Figure 34). Cette séparation traduit un profil d'accumulation particulier de métabolites et pourrait être liée à la mise en place d'un processus spécifique à ce génotype.

Afin d'identifier les métabolites différenciellement accumulés en réponse au déficit hydrique et/ou au ré-arrosage dans les racines ou les nodosités, une ANOVA à un facteur (p -value < 0.05) a été réalisée pour chacun des organes. Ainsi, 103 métabolites (dont 64 métabolites connus) ont été identifiés comme différenciellement accumulés en réponse au déficit hydrique et/ou au ré-arrosage dans les racines et 189 métabolites (dont 99 métabolites connus) dans les nodosités. La liste de ces métabolites ainsi que leur accumulation dans les différents échantillons sont données dans le tableau supplémentaire 2. Pour la suite de l'analyse, nous avons choisi de nous focaliser sur les métabolites connus.

2- Analyse des différents profils d'accumulation de métabolites en réponse au déficit hydrique et au ré-arrosage

Afin d'analyser les profils d'accumulation des métabolites en réponse au déficit hydrique et/ou au ré-arrosage dans les racines et les nodosités, un clustering hiérarchique des données de quantification des métabolites différentiellement accumulés a été réalisé pour chaque organe et visualisé grâce à une heatmap (Figure 35 pour les racines et Figure 36 pour les nodosités). La sur-représentation de certaines voies métaboliques dans les différents clusters obtenus a ensuite été examinée grâce à l'outil MetaboAnalyst et les résultats sont présentés dans le tableau 4.

Le clustering des **données « racines »** a permis d'identifier 6 clusters (Figure 35). Le cluster 1 (6 métabolites) et le cluster 3 (4 métabolites) regroupent des métabolites moins accumulés chez les plantes WD à la fin de la période de déficit hydrique. Alors que les métabolites du cluster 1 sont toujours moins accumulés après 6 jours de ré-arrosage chez les plantes ré-arrosées en comparaison des plantes contrôles, ceux du cluster 3 retournent à un niveau similaire à celui des plantes WW. De plus, les métabolites du cluster 1 sont plus fortement accumulés chez les plantes WW du génotype Puget comparé au génotype Kayanne. Le cluster 2 permet d'isoler le glutarate qui s'accumule chez les plantes WD à 3 et 6 jours de ré-arrosage pour le génotype Kayanne mais à 1 et 3 jours de ré-arrosage pour le génotype Puget alors qu'il n'est que faiblement accumulé en condition contrôle à la fin de la période de ré-arrosage. Les métabolites du cluster 4 (4 métabolites) sont très fortement accumulés chez les plantes WD à la fin de la période de déficit hydrique pour le génotype Kayanne uniquement puis accumulés dans les plantes WD des deux génotypes lors de la période de ré-arrosage. Il est à noter qu'il y a un retour à des niveaux similaires aux plantes WW après 6 jours de ré-arrosage pour le génotype Puget uniquement. Enfin, les clusters 5 (38 métabolites) et 6 (11 métabolites) regroupent les métabolites plus accumulés en réponse au déficit hydrique chez les deux génotypes. Lors du ré-arrosage, les métabolites du cluster 5 retournent à un niveau similaire aux plantes WW pour les deux génotypes, bien que cette récupération soit plus rapide pour Kayanne (entre 1 et 3 jours de ré-arrosage) que pour Puget (entre 3 et 6 jours de ré-arrosage). Les métabolites du cluster 6 en revanche retournent à un niveau similaire aux plantes WW uniquement pour le génotype Kayanne.

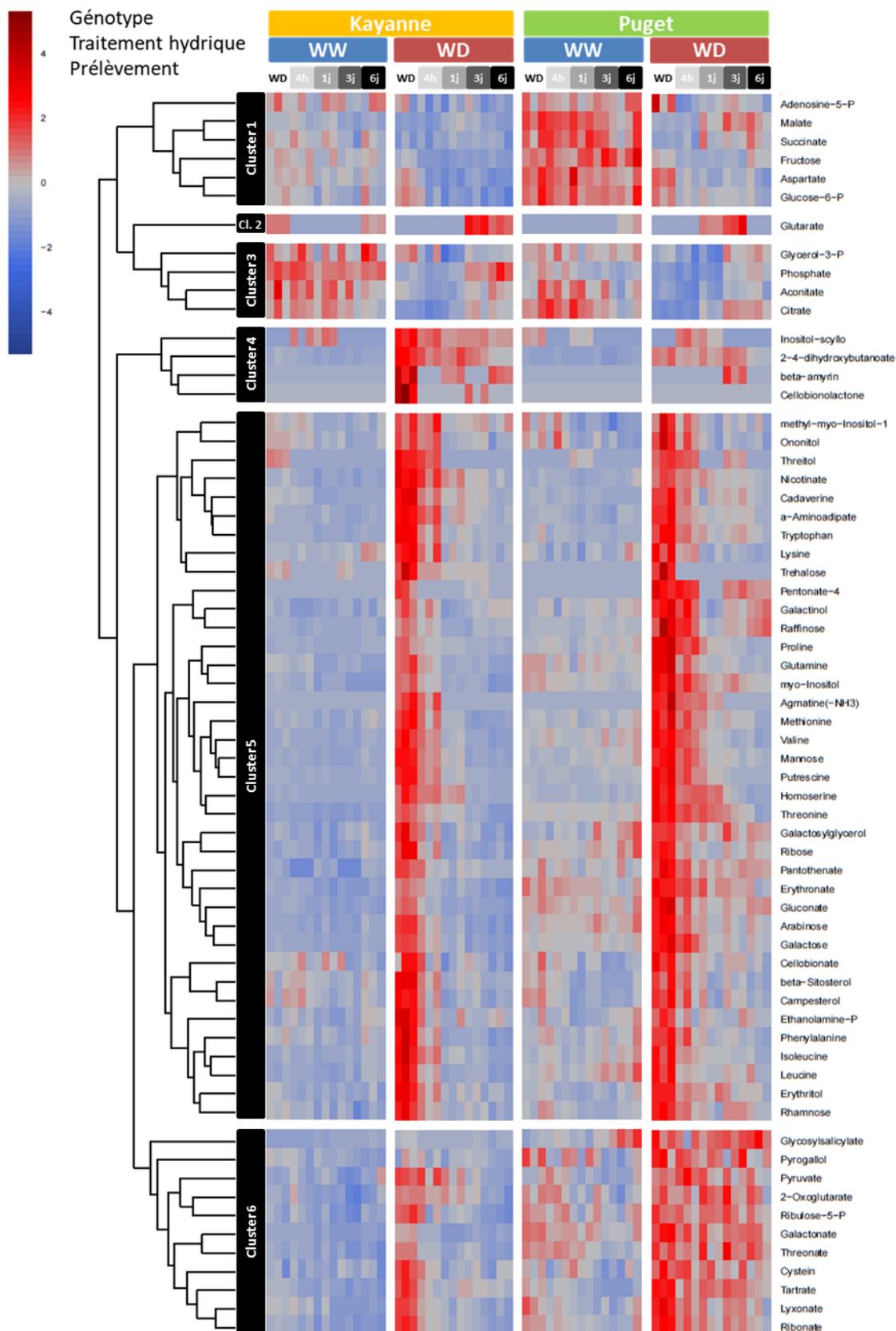


Figure 35 Analyse par clustering hiérarchique des profils d'accumulation des métabolites différentiellement accumulés dans les racines en réponse au déficit hydrique et au ré-arrosage chez Kayanne et Puget. Les quantités des différents métabolites (en nmol/mg FW ou UA/mg de FW) sont centrées réduites. WW correspond aux échantillons contrôles bien arrosés et WD aux échantillons stressés. Les différents prélèvements correspondent à 13 jours de déficit hydrique (WD), 4h de ré-arrosage (4h) et 1, 3 et 6 jours de ré-arrosage (1j, 3j et 6j). Il y a 3 répétitions par condition. Les métabolites différentiellement accumulés en réponse au déficit hydrique ou au ré-arrosage sont identifiés par une ANOVA à un facteur (p -value < 0.05).

Le clustering des **données « nodosités »** a quant-à-lui permis d'identifier 5 clusters (Figure 36). Le cluster 1 (29 métabolites) et le cluster 2 (31 métabolites) regroupent les métabolites significativement plus accumulés en réponse au déficit hydrique principalement chez Kayanne pour le cluster 1 et chez les deux génotypes pour le cluster 2. Alors qu'il y a un retour à un niveau similaire à celui des plantes WW dans le cluster 2, la majorité des métabolites du cluster 1 restent plus fortement accumulés dans les plantes WD en comparaison des plantes WW après 6 jours de ré-arrosage chez le génotype Kayanne. A l'inverse, les métabolites des clusters 3 (23 métabolites) et 5 (10 métabolites) sont moins accumulés dans les plantes WD à la fin de la période de déficit hydrique. Il est à noter que, en condition WW, les métabolites du cluster 3 sont plus fortement accumulés chez Kayanne et que ceux du cluster 5 le sont plus fortement chez Puget. De plus, lors du ré-arrosage, alors qu'il y a un global retour à une accumulation similaire à celles des plantes contrôles pour les deux génotypes pour le cluster 3, cette récupération n'est observée que pour Kayanne dans le cluster 5. Enfin, le cluster 4 (6 métabolites) isole des métabolites plus fortement accumulés dans les plantes WD, principalement en fin de période de déficit hydrique pour Kayanne mais durant le ré-arrosage pour Puget.

L'analyse des voies métaboliques sur-représentées dans ces différents clusters est présentée dans le tableau 4. Que ce soit dans les racines ou dans les nodosités, les clusters pour lesquels les métabolites sont plus faiblement accumulés en réponse au déficit hydrique (clusters 1 et 3 pour les racines et 3 et 5 pour les nodosités) sont enrichis en métabolites associés au cycle TCA (Tricarboxylic Acid Cycle). Cela traduit une baisse de l'activité métabolique au niveau des racines et des nodosités. En effet, le cycle TCA, avec la glycolyse, constituent une source importante d'énergie servant à maintenir diverses fonctions physiologiques dans la plante (Fernie *et al.*, 2004). Dans les nodosités, une accumulation de glucose et le saccharose est observée principalement pour Kayanne (cluster 4). Cela pourrait également traduire une baisse de la glycolyse et serait cohérent avec une diminution de l'activité métabolique.

Dans les nodosités (cluster 5) une partie de ces métabolites est également impliquée dans le métabolisme de l'alanine, l'aspartate et le glutamate. Le glutamate étant la forme préférentielle au sein de laquelle est intégré l'ammonium après la fixation symbiotique (Nagatani *et al.*, 1971; Udvardi and Day, 1997), la baisse de son accumulation dans les nodosités pourrait indiquer une baisse de l'assimilation de l'azote. Une récupération, c'est-à-

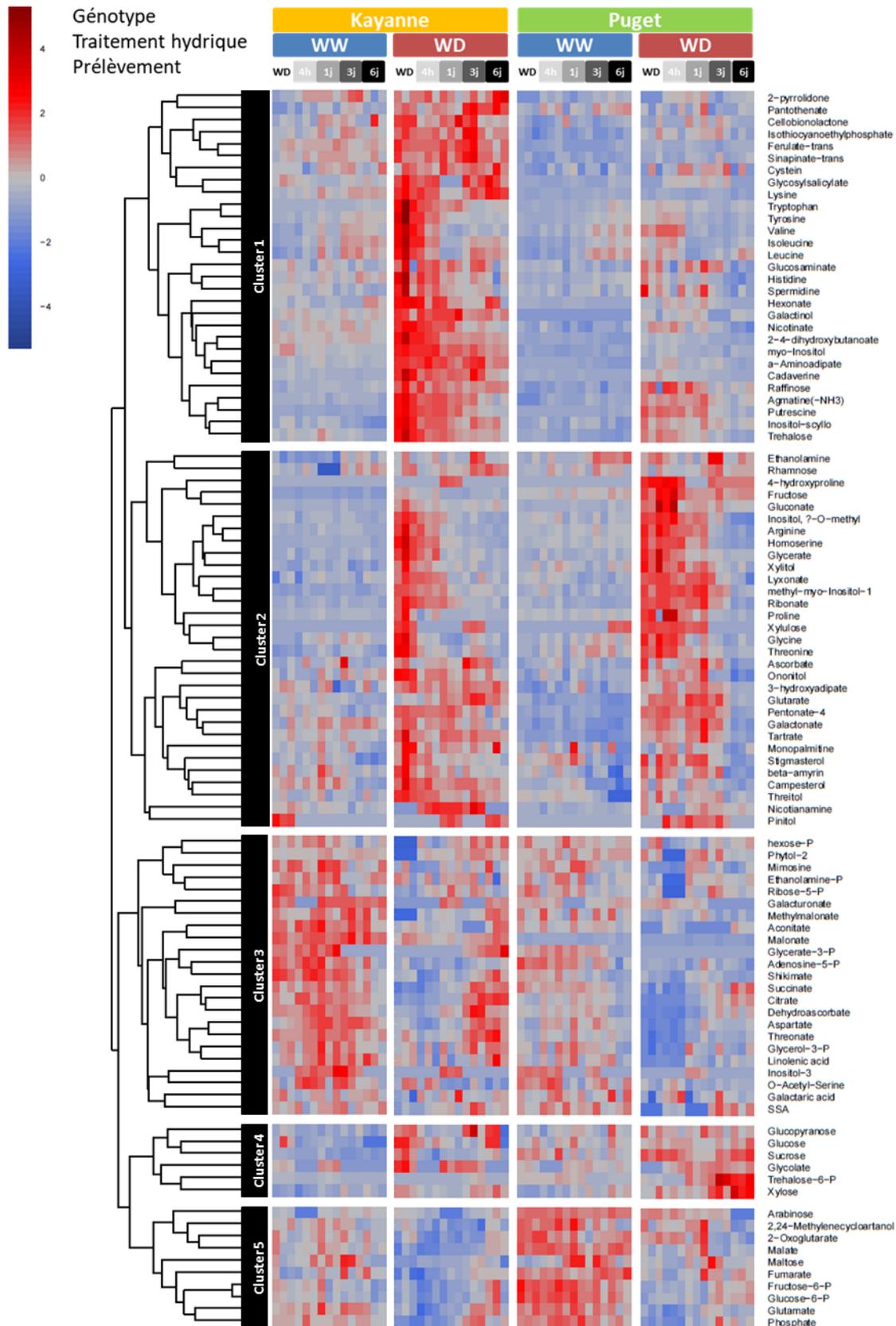


Figure 36 : Analyse par clustering hiérarchique des profils d'accumulation des métabolites différentiellement accumulés dans les nodosités en réponse au déficit hydrique et au ré-arrosage chez Kayanne et Puget. Les quantités des différents métabolites (en nmol/mg FW ou UA/mg de FW) sont centrées réduites. WW correspond aux échantillons contrôles bien arrosés et WD aux échantillons stressés. Les différents prélèvements correspondent à 13 jours de déficit hydrique (WD), 4h de ré-arrosage (4h) et 1, 3 et 6 jours de ré-arrosage (1j, 3j et 6j). Il y a 3 répétitions par condition. Les métabolites différentiellement accumulés en réponse au déficit hydrique ou au ré-arrosage sont identifiés par une ANOVA à un facteur (p -value < 0.05).

dire une ré-augmentation de ces métabolites jusqu'à un retour à un niveau similaire aux plantes WW, n'est observée que pour le génotype Kayanne. Ainsi l'assimilation de l'azote reprendrait plus tôt chez Kayanne que chez Puget ce qui serait cohérent avec la récupération plus précoce du statut azoté mis en évidence dans le chapitre 2 (Figure 33). Les métabolites plus fortement accumulés dans les plantes WD par rapport aux plantes WW, que ce soit dans les racines (cluster 5) ou dans les nodosités (cluster 1) sont quant-à-eux en grande majorité des acides aminés et leur augmentation peut traduire une baisse de leur utilisation (baisse de la traduction) ou de leur export vers les parties aériennes dû à un flux transpiratoire réduit par exemple.

Dans les nodosités, il y a une augmentation en fin de période de déficit hydrique de l'accumulation des métabolites du cluster 1 principalement pour les plantes WD du génotype Kayanne. Ce cluster est enrichi en métabolites qui ressortent comme étant impliqués dans le métabolisme du glutathion, un composé ayant un rôle d'antioxydant (Galant *et al.*, 2011). Quatre métabolites sont trouvés associés à cette voie (Tableau 4) : la cystéine, précurseur du glutathion mais également 3 polyamines (putrescine, spermidine et cadaverine). Les polyamines ont été montrées comme augmentant, tout comme le glutathion, en réponse au stress hydrique. Elles agissent comme antioxydant chez le tabac (Seo *et al.*, 2019), en éliminant les formes actives de l'oxygène (ROS) induites par le stress hydrique. La production de différentes enzymes à rôle antioxydant a par ailleurs été mise en évidence chez le pois en réponse à un stress hydrique (Mittler and Zilinskas, 1994). Au niveau des racines, une augmentation, en réponse au déficit hydrique, de l'accumulation de la cystéine et du pyruvate chez les plantes WD en comparaison des plantes WW a également été mis en évidence (cluster 6). Ces métabolites sont notamment liés au métabolisme de la cystéine et la méthionine donc au métabolisme soufré. Ces résultats concernant le glutathion, les polyamines sont donc en accord avec la littérature qui indique leur rôle important dans la tolérance au stress hydrique (Chan *et al.*, 2013). De manière intéressante, il y a, pour les métabolites de ce cluster, un retour à des niveaux d'accumulation similaires aux plantes WW uniquement pour le génotype Kayanne ce qui peut traduire un maintien des mécanismes de défense mis en place lors de la période de stress lors de la récupération chez Puget. La concentration de métabolites du métabolisme du galactose augmente aussi en réponse au déficit hydrique pour les deux génotypes dans les racines (cluster 5). Certains sucres tels que

A	Cluster	Voie métabolique	Total	Retrouvé	P-value	Métabolites
Cluster 1		Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	17	2	9,69E-04	Succinate - Malate
		Citrate cycle (TCA cycle)	20	2	1,35E-03	Succinate - Malate
		Carbon fixation in photosynthetic organisms	21	2	1,49E-03	Malate - Aspartate
		Alanine, aspartate and glutamate metabolism	22	2	1,64E-03	Aspartate - Succinate
Cluster 2		_(1)	_(1)	_(1)	_(1)	
Cluster 3		Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	17	2	4,88E-04	Aconitate - Citrate
		Citrate cycle (TCA cycle)	20	2	6,81E-04	Aconitate - Citrate
Cluster 4		_(2)	_(2)	_(2)	_(2)	
Cluster 5		Aminoacyl-tRNA biosynthesis	67	10	6,75E-07	Phénylalanine - Glutamine - Methionine - Valine - Lysine - Isoleucine - Leucine - Threonine - Tryptophane - Proline - Methionine - Phenylalanine -
		Glucosinolate biosynthesis	54	6	9,25E-04	Tryptophane - Isoleucine - Valine - Leucine
		Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	26	4	2,20E-03	Threonine - Leucine - Isoleucine - Valine
		Galactose metabolism	26	4	2,20E-03	Raffinose - Galactose - Mannose - Myo-inositol
Cluster 6		Cysteine and methionine metabolism	34	2	1,31E-02 ⁽³⁾	Cystéine - Pyruvate
		C5-Branched dibasic acid metabolism	4	1	2,16E-02 ⁽³⁾	Pyruvate
B	Cluster	Voie métabolique	Total	Retrouvé	P-value	Métabolites
Cluster 1		Aminoacyl-tRNA biosynthesis	67	8	1,02E-06	Histidine - Cystéine - Valine - Lysine - Isoleucine - Tryptophane - Leucine - Tyrosine
		Glutathione metabolism	26	4	3,30E-04	Cystéine - Putrescine - Cadaverine - Spermidine
		Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	26	3	4,88E-03	Leucine - Isoleucine - Valine
		Glucosinolate biosynthesis	54	4	5,46E-03	Tryptophane - Isoleucine - Valine - Leucine
Cluster 2		Glycine, serine and threonine metabolism	30	3	1,14E-02	Glycine - Glycerate - Threonine - Homoserine
		Aminoacyl-tRNA biosynthesis	67	4	2,05E-02	Arginine - Glycine - Threonine - Proline
Cluster 3		Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	17	3	5,04E-04	Succinate - Aconitate - Citrate
		Citrate cycle (TCA cycle)	20	3	8,31E-04	Succinate - Aconitate - Citrate
Cluster 4		Galactose metabolism	26	2	2,29E-03	Sucrose - Glucose
		Starch and sucrose metabolism	30	2	3,06E-03	Sucrose - Glucose
Cluster 5		Citrate cycle (TCA cycle)	20	2	3,31E-03	Malate - Fumarate
		Alanine, aspartate and glutamate metabolism	22	2	4,01E-03	Glutamate - Fumarate

Tableau 4 : Voies métaboliques surreprésentées dans chaque cluster des heatmap issues des données de racines (A) et de nodosités (B). Seules les voies métaboliques associées à une p-value < 1,00E-03 sont gardées. (1) cluster ne comprenant qu'un métabolite, (2) métabolites non référencés dans les données de références rendant l'analyse impossible, (3) p-value seuil abaissée à 1,00E-02

le galactose sont impliqués dans l'ajustement osmotique (Jia *et al.*, 2016).

Au niveau des racines, les modifications du métabolome en réponse au déficit hydrique et au ré-arrosage sont similaires chez les deux génotypes avec d'une part, une augmentation de l'accumulation de nombreux acides aminés et de métabolites liés au métabolisme du galactose et au métabolisme soufré, et d'autre part une baisse de l'accumulation des métabolites du cycle TCA et du métabolisme du glutamate. La différence majeure entre les deux génotypes est le retour de l'accumulation des métabolites associés au métabolisme soufré à des niveaux similaires aux plantes WW qui ne se produit que pour le génotype Kayanne lors de la période de ré-arrosage (Figure 48).

Au niveau des nodosités, les réponses métaboliques au déficit hydrique et au ré-arrosage sont plus contrastées entre les deux génotypes. Il y a d'une part des différences au niveau de la cinétique avec notamment une récupération en ce qui concerne les métabolites du cycle TCA et du métabolisme du glutamate qui n'est observée que chez Kayanne et ce après 6 jours de ré-arrosage. D'autre part, l'accumulation de composés antioxydants tels que les polyamines est observée chez les plantes WD du génotype Kayanne uniquement (Figure 49).

C- Analyse du transcriptome de racines et de nodosités de pois en réponse au déficit hydrique et au ré-arrosage

1- Analyse exploratoire du jeu de données

Dans un premier temps, une ACP a été effectuée sur les données de comptages normalisées des 115 échantillons afin de hiérarchiser les effets des différentes conditions sur le transcriptome (Figure 37). La première composante (78.8 %) permet une claire séparation des échantillons en fonction de l'organe dont ils sont issus (racines vs nodosités). La seconde composante (10.5 %) sépare quant-à-elle les échantillons en fonction du génotype (Kayanne et Puget). En raison de la séparation très marquée des échantillons selon l'organe dont ils sont issus, nous avons décidé de traiter séparément les données transcriptomiques obtenues pour les racines et pour les nodosités. Les échantillons issus des deux génotypes sont quant-à-eux restés regroupés afin de pouvoir les comparer. Les deux jeux de données ainsi obtenus ont été re-normalisés et ont révélé que parmi les 29 777 transcrits identifiés : 28 953 des transcrits sont exprimés dans les échantillons racinaires, 28 030 sont exprimés dans les échantillons de nodosités et 27 206 transcrits sont communs aux deux organes.

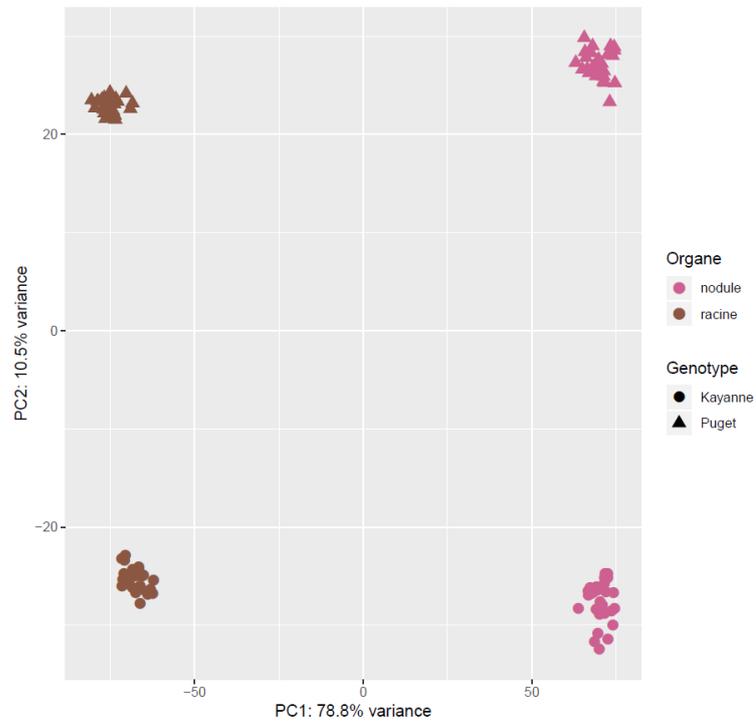


Figure 37 : Analyse en composantes principales des données transcriptomiques obtenues à partir des échantillons de racines et de nodosités. L'analyse a été réalisée sur les données d'expression de l'ensemble des gènes (115 échantillons). Les ronds correspondent au génotype Kayanne et les triangles au génotype Puget. La couleur rose indique les échantillons issus des nodosités et la couleur marron ceux issus des racines.

Deux ACP ont été réalisées, une première avec les données « racines » (Figure 38) et la seconde avec les données « nodosités » (Figure 39). Toutes deux montrent une séparation nette des échantillons en fonction du génotype par la première composante (58.6 % pour les racines et 56.3 % pour les nodosités, Figures 38A et 39A).

Pour chacun des génotypes, la combinaison des composantes 2 et 3 permet d'une part une certaine séparation des différentes dates de prélèvement et d'autre part une séparation des échantillons de la condition contrôle bien arrosée WW (en bleu) des échantillons stressés WD (en rouge), exceptés pour les deux derniers points de prélèvement (3j et 6j de ré-arrosage, losanges et croix rouges) qui se regroupent avec certains échantillons WW (Figures 38B et 39B). Cependant, alors que pour les racines, les échantillons ré-arrosés à 6j sont groupés avec les échantillons WW du même stade de prélèvement, pour les nodosités ils sont groupés avec les échantillons WW correspondant à la fin du déficit hydrique et au début du ré-arrosage (4h et 1j de ré-arrosage, ronds et triangles bleus), donc à un stade plus précoce. Ainsi, cela suggère pour les racines, un profil transcriptomique proche de celui des plantes contrôles pour les plantes stressées après 6 jours de ré-arrosage et donc une potentielle récupération. Pour les nodosités, le profil transcriptomique des plantes stressées après 3 jours de ré-arrosage étant proche de celui de plantes contrôles plus « jeunes », cela suggère qu'une potentielle récupération a lieu dans les nodosités, et qu'elle pourrait être associée à un retard de leur croissance ou de leur développement.

Dans les racines, la troisième composante (5.4 %) sépare nettement les échantillons WD à 4h de ré-arrosage (triangle rouge) du reste des échantillons WD. Cela met en évidence une modification transitoire et très précoce de la transcription de certains gènes et pourrait traduire la mise en place d'une réponse transcriptionnelle initiant la récupération dès les premières heures de ré-arrosage.

2- Analyse différentielle en réponse au déficit hydrique et au ré-arrosage

Afin d'étudier comment le transcriptome des racines et des nodosités était affecté par le déficit hydrique et le ré-arrosage chez Kayanne et Puget, une analyse d'expression différentielle entre les conditions WW et les conditions WD a été réalisée pour chaque génotype à chaque date de prélèvement indépendamment. Les gènes présentant un différentiel d'expression significatif ($p\text{-adjust} \leq 0.05$) sont listés dans le tableau

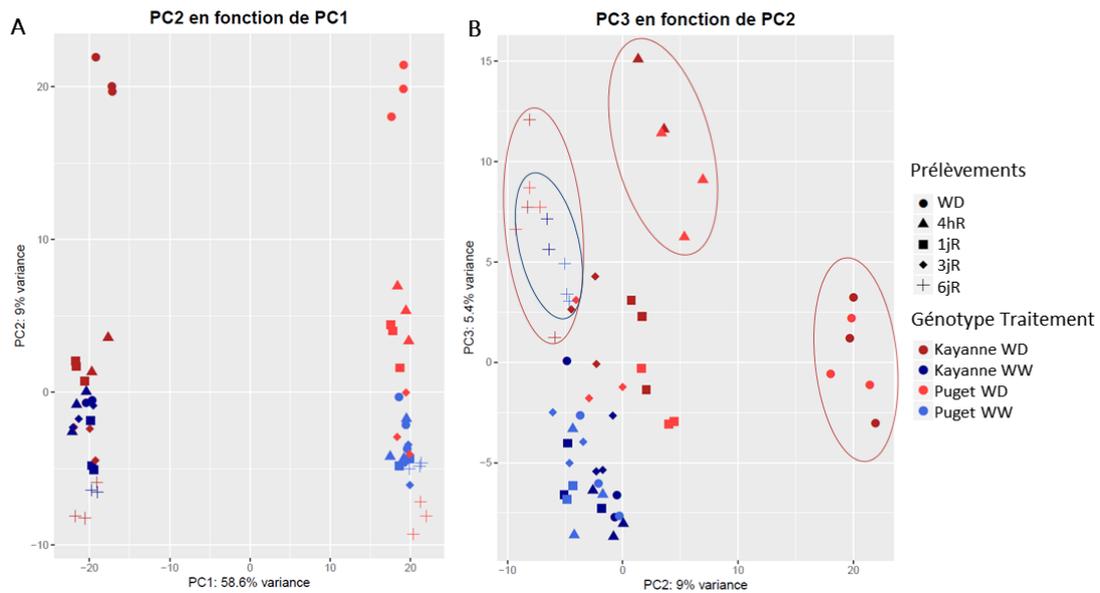


Figure 38 : Analyse en composantes principales des données transcriptomiques obtenues à partir des échantillons de racines. Les symboles rouges correspondent aux échantillons stressés (WD) et les bleus aux échantillons contrôles bien arrosés (WW). Les symboles foncés correspondent au génotype Kayanne et les clairs au génotype Puget. Les différents symboles correspondent aux différents prélèvements effectués (WD : 13j de déficit hydrique ; 4hR : 4h de ré-arrosage ; 1jR, 3jR et 6jR : 1, 3 et 6 jours de ré-arrosage). L'analyse a été réalisée sur les données d'expression de l'ensemble des gènes issus des données racines (57 échantillons).

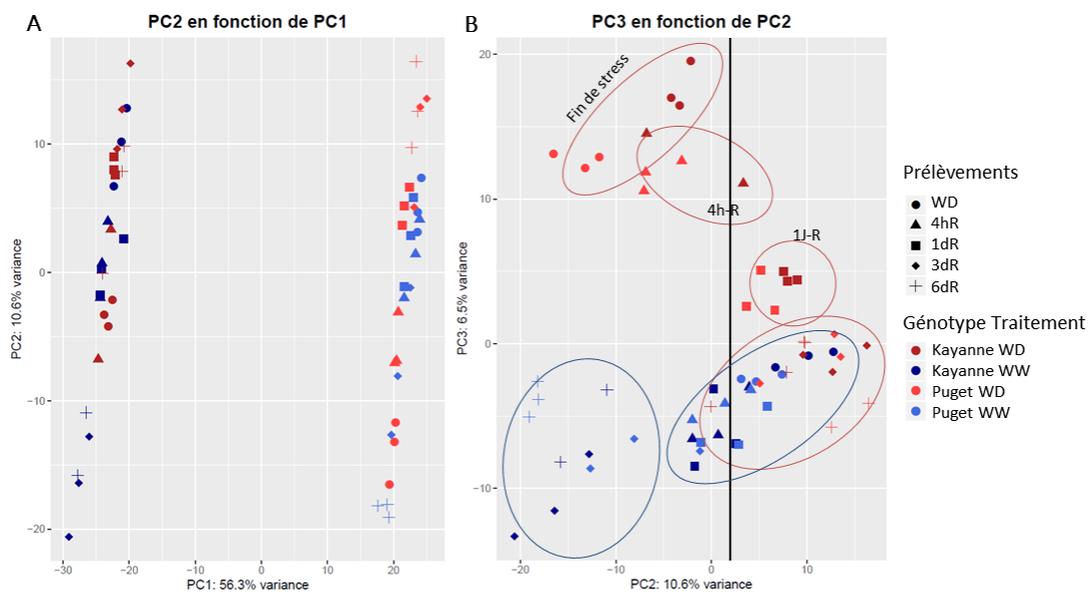


Figure 39 : Analyse en composantes principales des données transcriptomiques obtenues à partir des échantillons de nodosités. Les symboles rouges correspondent aux échantillons stressés (WD) et les bleus aux échantillons contrôles bien arrosés (WW). Les symboles foncés correspondent au génotype Kayanne et les clairs au génotype Puget. Les différents symboles correspondent aux différents prélèvements effectués (WD : 13j de déficit hydrique ; 4hR : 4h de ré-arrosage ; 1jR, 3jR et 6jR : 1, 3 et 6 jours de ré-arrosage). L'analyse a été réalisée sur les données d'expression de l'ensemble des gènes issus des données nodosités (58 échantillons).

supplémentaire 3. **Dans les racines**, 11 470 gènes ont été identifiés comme différentiellement exprimés à au moins une date de prélèvement et pour au moins l'un des deux génotypes. Parmi ces gènes, 5 843 sont communs aux deux génotypes, 2 812 sont spécifiques à Kayanne et 2 815 sont spécifiques à Puget (Figure 40A). **Dans les nodosités**, 12 767 gènes ont été identifiés comme différentiellement exprimés, 6 722 étant communs aux deux génotypes, 2 278 étant spécifiques à Kayanne et 3 767 à Puget (Figure 40C). Ces résultats montrent la mise en place d'une régulation transcriptionnelle commune mais également spécifique aux deux génotypes, que ce soit en réponse au déficit hydrique ou lors du ré-arrosage (Figures 40B et 40D).

Nous avons ensuite comparé le nombre de gènes sur- ou sous-exprimés en réponse au déficit hydrique ou au ré-arrosage pour chaque date de prélèvement. Dans les racines comme dans les nodosités, pour les deux génotypes, le nombre de gènes régulés positivement et négativement en réponse au déficit hydrique et au ré-arrosage est du même ordre de grandeur (Figure 41). Dans les racines (Figure 41A et 41C), le nombre de gènes différentiellement exprimés (DE) est maximum à 13 jours de déficit hydrique pour les deux génotypes, et diminue progressivement au cours de la période de ré-arrosage, suggérant que le transcriptome des racines de plantes ré-arrosées revient à un état proche de celui des plantes contrôles. Cependant pour le génotype Puget on observe une ré-augmentation du nombre de gènes DE après 6 jours de ré-arrosage qui pourrait traduire la mise en place d'une seconde vague de réponse transcriptionnelle dans les racines des plantes ré-arrosées, et potentiellement l'initiation d'un mécanisme spécifique à ce génotype (Figure 41C). De manière intéressante, le profil du nombre de gènes DE en fonction du stade de prélèvement dans les nodules est différent de celui des racines (Figures 41B et 41D). Le nombre de gènes DE à 13 jours de déficit hydrique est relativement proche pour les 2 génotypes (4 047 pour Kayanne, 4 642 pour Puget), puis diminue jusqu'à atteindre un minimum d'environ 1000 gènes DE après un jour de ré-arrosage pour les 2 génotypes. Cependant, une ré-augmentation du nombre de gènes DE entre les nodosités de plantes contrôles et de plantes ré-arrosées se produit ensuite pour les deux génotypes, traduisant probablement la mise en place d'une seconde réponse transcriptionnelle, plus forte que celle observée en fin de période de déficit hydrique, et décalée dans le temps entre Puget et Kayanne (Figures 41B et 41D). Mais elle pourrait également traduire un décalage dans le développement des

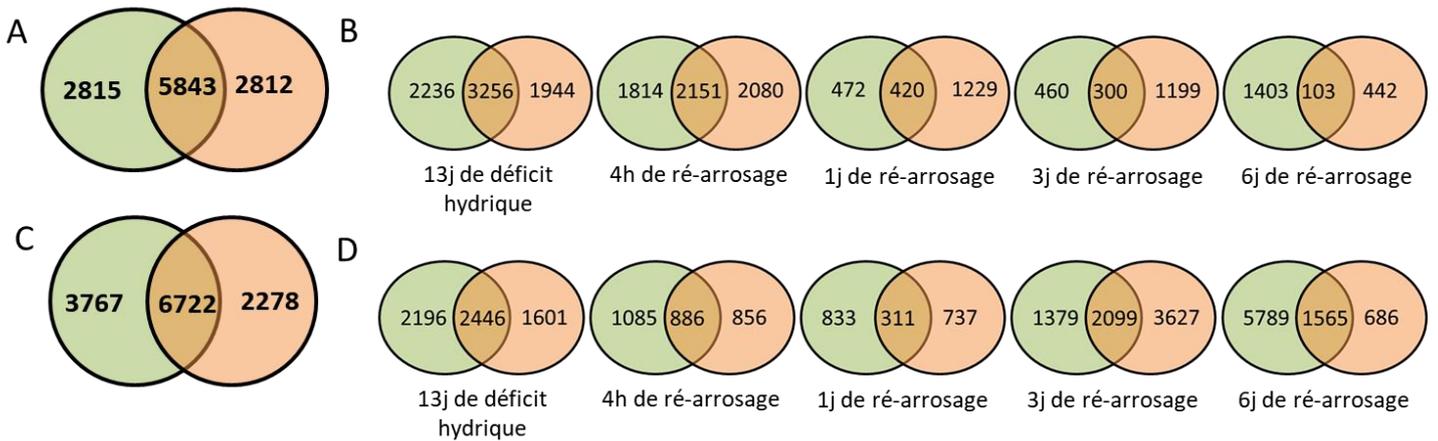


Figure 40 : Diagramme de Venn représentant le nombre de gènes différentiellement exprimés (DE) en réponse au déficit hydrique ou au ré-arrosage dans les racines (A et B) et les nodosités (C et D) des génotypes Kayanne et Puget. Le génotype Kayanne est en orange et le génotype Puget en vert. (A, C) Nombre total de gènes DE. (B, D) Nombre de gènes DE pour chaque point de prélèvement.

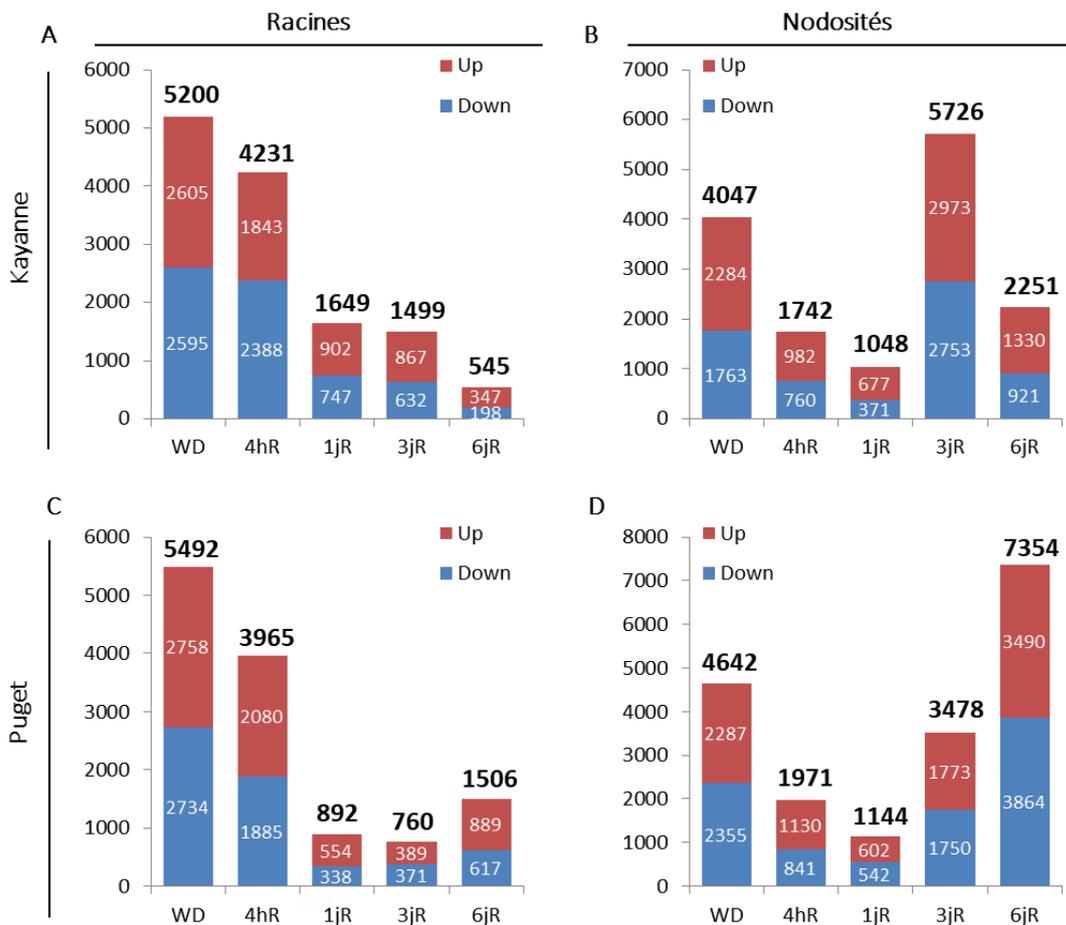


Figure 41 : Nombre de gènes sur-exprimés (UP) et sous-exprimés (DOWN) en réponse au déficit hydrique et au ré-arrosage dans les racines (A et C) et les nodosités (B et D) pour les génotypes Kayanne (A et B) et Puget (C et D). Le nombre total de gènes différentiellement exprimés est indiqué en gras au-dessus de chaque barre pour chacun des prélèvements (WD : 13j de déficit hydrique ; 4hR : 4h de ré-arrosage ; 1jR, 3jR et 6jR : 1, 3 et 6 jours de ré-arrosage).

nodosités ce qui serait cohérent avec l'ACP précédemment présentée où les échantillons WD des derniers prélèvements étaient groupés avec les échantillons WW des premiers prélèvements (4h et 1j de ré-arrosage, Figure 39B).

3- Analyses des gènes différentiellement exprimés chez les deux génotypes en réponse au déficit hydrique et au ré-arrosage

Dans un premier temps nous nous sommes intéressés aux mécanismes moléculaires mis en place à la fois chez Puget et chez Kayanne en réponse au WD et au ré-arrosage. Pour cela une première analyse a été effectuée sur les gènes différentiellement exprimés communs aux deux génotypes (5843 gènes dans les racines, Figure 40A et 6722 gènes dans les nodosités, Figure 40C). Pour chaque organe, un clustering hiérarchique basé sur le log₂ des ratios d'expression (WD/WW) des gènes et combinant les données des deux génotypes a été réalisé et visualisé sur une heatmap afin d'identifier des clusters regroupant les gènes avec des profils de régulation similaires (Figures 42 et 43). Une analyse d'enrichissement des termes GO (Gene Ontology) des gènes présents dans chaque cluster a ensuite été réalisée afin de déterminer quels processus biologiques étaient surreprésentés dans ces listes de gènes.

Analyse des données issues des racines

La Figure 42 montre les résultats obtenus pour les échantillons « racines ». Au total 5 clusters ont été identifiés. Le cluster 1, composé de 1604 gènes fortement sous-exprimés à la fin de la période de déficit hydrique, est enrichi en gènes impliqués dans la traduction, la réplication de l'ADN et les mouvements dépendants des microtubules. Ces processus semblent se rapporter à la mitose, les microtubules ayant été montré comme important dans la division cellulaire (Forth and Kapoor, 2017). Cela pourrait ainsi traduire un ralentissement de la croissance racinaire. De plus, les gènes associés au terme GO « reconnaissance du pollen » (GO:0048544) sont en réalité des kinases traduisant une régulation négative de la signalétique et donc de l'activité métabolique. L'enrichissement en gènes liés au catabolisme des amines (GO:0009310) pourrait traduire une régulation négative de ce processus et ainsi permettre un maintien du statut azoté de la plante. La liste des gènes de ce cluster est également enrichie en gènes impliqués dans le catabolisme de la phénylalanine (gènes codant des phénylalanine ammonia-lyases). Cet acide aminé aromatique est particulièrement connu pour son rôle de précurseur de nombreux composés du métabolisme secondaire tels que la

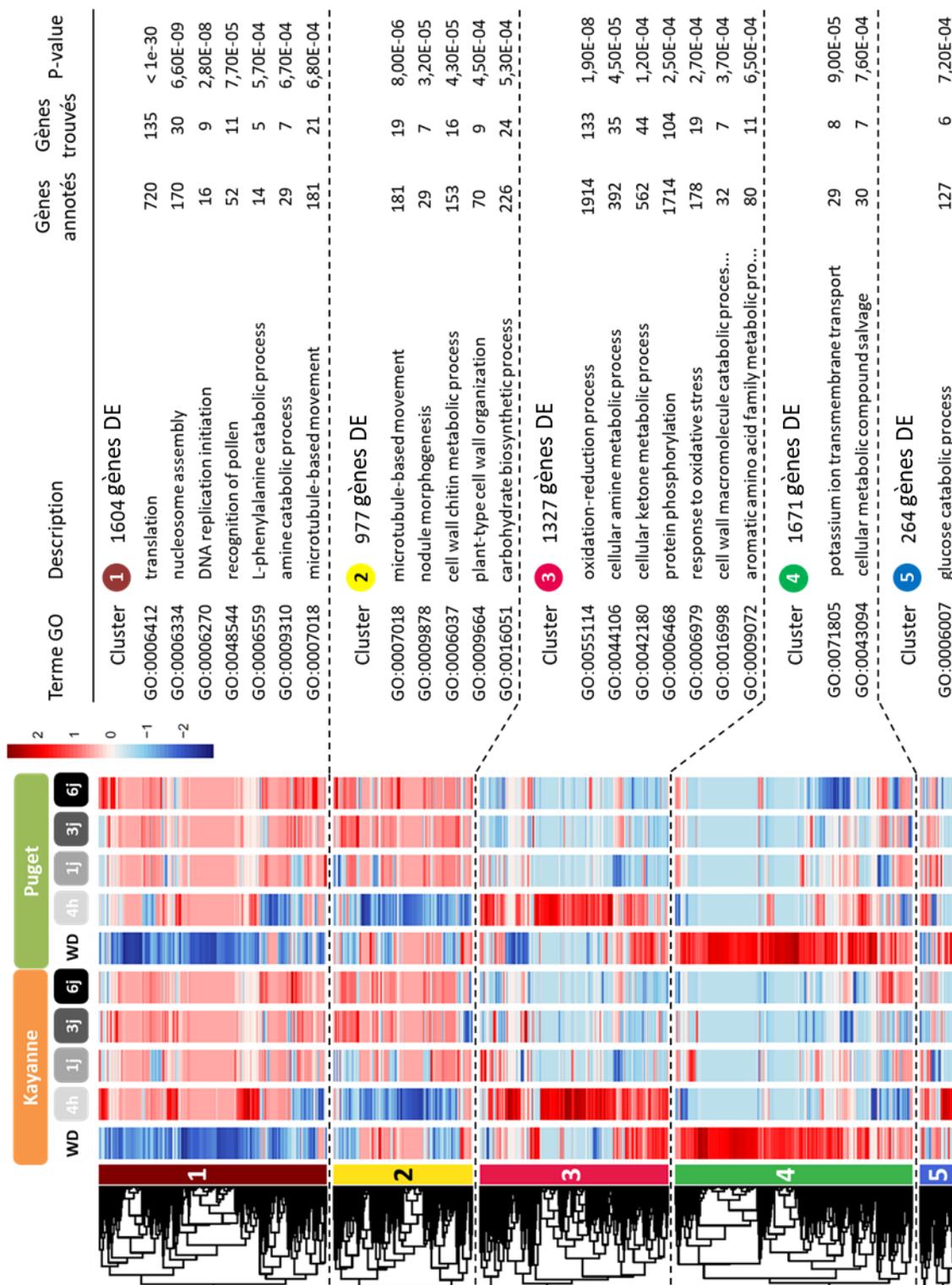


Figure 42 : Analyse par clustering hiérarchique des gènes différentiellement exprimés (DE) à la fois chez Kayanne et chez Puget dans les racines. Le log2 du ratio d'expression (WD/WW) a été utilisé afin de construire la heatmap et les données sont centrées réduites. Le clustering est basé sur les distances euclidiennes entre les différents gènes. Les différents prélèvements correspondent à 13 jours de déficit hydrique (WD), 4h de ré-arrosage (4h) et 1, 3 et 6 jours de ré-arrosage (1j, 3j et 6j). Pour chaque cluster, un enrichissement en termes GO (Gene Ontology) a été réalisé (Elim Fisher, $p < 0.001$, catégorie « Biological Process »). Pour chaque terme GO, le nombre de gènes associés à ce terme dans le génome (« Gènes annotés ») et dans le cluster (« Gènes trouvés ») sont donnés.

lignine, les flavonoïdes ainsi que l'acide salicylique (Pascual *et al.*, 2016; Parthasarathy *et al.*, 2018).

Le cluster 4, composé de 1671 gènes, correspond à des gènes sur-exprimés en conditions de WD et est enrichi en gènes impliqués dans le transport transmembranaire du potassium (GO:0071805). En condition de stress hydrique, une baisse du prélèvement et du transport de potassium dans les racines a récemment été mis en évidence et une surexpression des gènes codant pour des transporteurs de potassium a par ailleurs été proposée afin d'améliorer la tolérance au stress hydrique chez le pommier (Qi *et al.*, 2019). En effet, le potassium occupe une place centrale dans la réponse au stress hydrique puisqu'il participe au pilotage de l'ouverture et la fermeture des stomates en réponse à l'ABA (Daszkowska-Golec and Szarejko, 2013). La régulation de son prélèvement par les racines est donc centrale dans la réponse au déficit hydrique. Il est cependant à noter que même si un nombre important de gènes compose le cluster 4 (1671 gènes), seulement 2 GO termes ont été retrouvés enrichis dans cette liste de gènes (pour $p < 0.001$), soit seulement 15 gènes associés, suggérant que de nombreux processus biologiques variés seraient régulés positivement sans pour autant qu'un processus ne soit plus régulé qu'un autre.

Les clusters 2 et 3 regroupent des gènes respectivement sous- et sur-exprimés après 4h de ré-arrosage. Le cluster 2, composé de 977 gènes, est particulièrement enrichi en gènes liés au processus précoces de morphogénèse des nodosités (GO:0009878), à l'organisation et au métabolisme de la paroi cellulaire (GO:0009664) ainsi qu'aux mouvements dépendants des microtubules (GO:0007018). La sous-expression de gènes associés à ces processus pourrait traduire une régulation négative de l'initiation de nouvelles nodosités. Des gènes associés au GO:0009878 (nodule morphogenesis) codent notamment pour des peptides NCR. Bien que ces peptides aient principalement été décrits comme intervenant dans la différenciation des bactéroïdes fixateurs (Maróti *et al.*, 2015), une étude conduite sur *Medicago* indique que certains de ces peptides sont également produits lors des étapes précoces de développement des nodosités (Nallu *et al.*, 2013). De la même manière, des gènes codant différentes expansines et pectine estérases sont notamment associés au GO:0006037 (Cell wall chitin metabolic process). Or différents gènes codant pour des membres de ces deux familles de protéines liées à la paroi cellulaire ont été montrés comme associés à la formation des nodosités chez *Medicago* (Yahyaoui *et al.*, 2004). Par exemple, le gène *GmEXPB2* codant pour



Figure 43 : Analyse par clustering hiérarchique des gènes différentiellement exprimés (DE) à la fois chez Kayanne et chez Puget dans les nodosités. Le log₂ du ratio d'expression (WD/WW) a été utilisé afin de construire la heatmap et les données sont centrées réduites. Le clustering est basé sur les distances euclidiennes entre les différents gènes. Les différents prélèvements correspondent à 13 jours de déficit hydrique (WD), 4h de ré-arrosage (4h) et 1, 3 et 6 jours de ré-arrosage (1j, 3j et 6j). Pour chaque cluster, un enrichissement en termes GO (Gene Ontology) a été réalisé (Elim Fisher, $p < 0.001$, catégorie « Biological Process »). Pour chaque cluster, le nombre de gènes associés à ce terme dans le génome (« Gènes annotés ») et dans le cluster (« Gènes trouvés ») sont donnés.

une β -expansine facilite la formation et le développement des nodosités chez le soja en entraînant des modifications racinaires notamment via une augmentation de la taille de la zone pilifère ainsi que densité des poils racinaires (X Li *et al.*, 2015). Le cluster 3, composé de 1327 gènes, est quant-à-lui enrichi en gènes associés au métabolisme des amines, des cétones et des acides aminés aromatiques ce qui suggère une relance du métabolisme primaire mais aussi secondaire de la plante. Ce cluster est aussi enrichi en gènes liés aux processus d'oxydoréduction (GO:0055114) ainsi qu'aux réponses au stress oxydatif (GO:0006979) suggérant que la plante serait encore stressée à ce stade.

Enfin, le cluster 5 est composé de 264 gènes qui sont régulés positivement après 4h de ré-arrosage pour Kayanne mais en fin de période de déficit hydrique pour Puget. Ce cluster est notamment enrichi en gènes impliqués dans le catabolisme du glucose, une voie métabolique permettant de fournir de l'énergie.

Analyse des données issues des nodosités

Le clustering des gènes DE issus des nodosités a permis d'identifier 5 clusters suivant leur profil de régulation (Figure 43). Le cluster 1 et le cluster 2, regroupent 1718 et 1463 gènes, respectivement, qui sont régulés positivement à la fin de la période de déficit hydrique mais négativement en fin de période de ré-arrosage. Le cluster 1 est particulièrement enrichi en gènes impliqués dans les modifications post-traductionnelles (GO:0043687) ainsi que dans la biosynthèse des glycosides et le métabolisme du fructose-6-phosphate. Le cluster 2 est quant-à-lui enrichi en gènes liés d'une part aux processus d'oxydo-réduction (GO:0055114) et d'autre part aux réponses aux autres organismes (GO:0051707) ce qui souligne une régulation de gènes associés au stress.

A l'inverse des clusters 1 et 2, les clusters 3 et le cluster 4 sont composés de 2647 et 387 gènes, respectivement, sous-exprimés à la fin de la période de déficit hydrique mais sur-exprimés en fin de période de ré-arrosage. L'enrichissement en termes GO des clusters 3 et 4 fait ressortir de nombreux gènes associés à la division cellulaire, au cycle cellulaire, à la réplication de l'ADN ainsi qu'à la traduction mais aussi à l'organisation de la paroi cellulaire et du cytosquelette, ce qui pourrait traduire un processus de croissance. De manière intéressante, on observe pour ces quatre premiers clusters, un décalage cinétique entre Puget et Kayanne. En effet, les dérégulations observées lors du ré-arrosage sont maximum à 3

jours de ré-arrosage pour Kayanne mais à 6 jours pour Puget. Ainsi, la croissance des nodosités serait inhibée durant la période de déficit hydrique puis relancée lors du ré-arrosage avec cependant un décalage entre les génotypes, ces gènes étant sur-exprimés chez Kayanne plus précocement que chez Puget.

Enfin, le dernier cluster (cluster 5) est composé de 507 gènes régulés positivement après 3 jours de ré-arrosage pour les deux génotypes mais également après 6 jours de ré-arrosage pour Puget uniquement. La liste de gènes de ce cluster est particulièrement enrichie en gènes impliqués dans la traduction, ainsi une forte réponse traductionnelle semble être mise en place de manière synchronisée entre les deux génotypes, après 3 jours de ré-arrosage. Cependant cette régulation se poursuit et s'intensifie uniquement pour le génotype Puget après 6 jours de ré-arrosage.

En conclusion, une grande partie des gènes différentiellement exprimés en réponse au déficit hydrique et au ré-arrosage sont communs aux deux génotypes. Alors que les dynamiques de régulation de ces gènes sont proches dans les racines, un décalage est observé dans les nodosités lors de la période de ré-arrosage. Ainsi, nous retrouvons notamment des gènes associés à la croissance qui sont régulés positivement dès 3 jours de ré-arrosage pour Kayanne contre 6 jours pour Puget.

4- Analyses des gènes différentiellement exprimés spécifiquement chez chacun des génotypes en réponse au déficit hydrique et au ré-arrosage

Comme nous l'avons vu précédemment, l'analyse différentielle a montré des réponses transcriptionnelles communes entre les deux génotypes, mais également des réponses spécifiques à l'un ou à l'autre des génotypes, et ce pour chaque date de prélèvement (Figure 40). Afin de mettre en évidence les processus biologiques associés à ces réponses spécifiques, les gènes sur- ou sous-exprimés en réponse au déficit hydrique ou au ré-arrosage ont été identifiés dans les racines (Figure supplémentaire 4A) et dans les nodosités (Figure supplémentaire 4B) pour Puget et Kayanne. Une analyse d'enrichissement des termes GO des gènes présents dans les différents groupes a ensuite été réalisée (Figures 44 et 45).

Analyses des données issues des racines

La liste des gènes sous-exprimés au début du ré-arrosage spécifiquement chez Kayanne est

notamment enrichie en gènes impliqués dans le développement et plus précisément dans les mouvements dépendant des microtubules (GO:0007018) ainsi que dans l'initiation de réplication de l'ADN (GO:0006270) et la morphogénèse de nodosités (GO:0009878). Cela pourrait traduire une inhibition dans l'initiation de nouvelles nodosités. Dans cette liste de gènes sous exprimés, on remarque également des gènes impliqués dans le développement (GO:0046274 et GO:0045492) et l'organisation de la paroi cellulaire (GO:0009664), ce qui serait cohérent avec l'hypothèse précédemment proposée.

Dans la Figure 44 on remarque également que la liste des gènes sur-exprimés au début du ré-arrosage spécifiquement chez Kayanne est notamment enrichie en gène du catabolisme des amines et plus spécifiquement celui de la phénylalanine (GO:0006559). Or, cet acide aminé est notamment précurseur de métabolites secondaires tel que les flavonoïdes, métabolites impliqués dans le dialogue moléculaire entre la plante et les bactéries lors de la mise en place de la symbiose. Ces données pourraient ainsi renforcer l'hypothèse d'une inhibition dans le développement de nouvelles nodosités dans les premières heures suivant un ré-arrosage.

De manière intéressante, la liste des gènes sous-exprimés après 6 jours de ré-arrosage uniquement chez Kayanne est particulièrement enrichie en gènes liés au métabolisme et principalement celui des amines (ex : GO:0044106, GO:0009308 et GO:0009309). Ces gènes codent différentes protéines telles que des glutamines synthétase, asparagine synthase, serine hydroxyméthyltransferase. Cette liste est également enrichie en gènes de réponse au stress oxydatif.

Dans les racines, cette analyse fait ressortir les réponses au stress (ex : GO:0009651 et GO:0010043) comme processus biologique enrichi dans la liste des gènes sur-exprimés après 4h de ré-arrosage pour le génotype Puget uniquement. Ces gènes codent en quasi-totalité pour des protéines PR (Pathogenesis-related). L'expression des gènes codant ces protéines a été montrée comme modulée par différents stress abiotiques comme le stress hydrique et le stress salin mais ces protéines restent principalement associées à des réponses de défense face aux pathogènes (Ali *et al.*, 2018). Or il est connu que les réponses de défenses sont antagonistes au développement de la symbiose avec *Rhizobium* et des nodosités comme cela a pu être montré chez *Medicago truncatula* (Chen *et al.*, 2017) et qu'il y a de ce fait, une modulation des réponses de défense de la plante lors de l'interaction légumineuses-

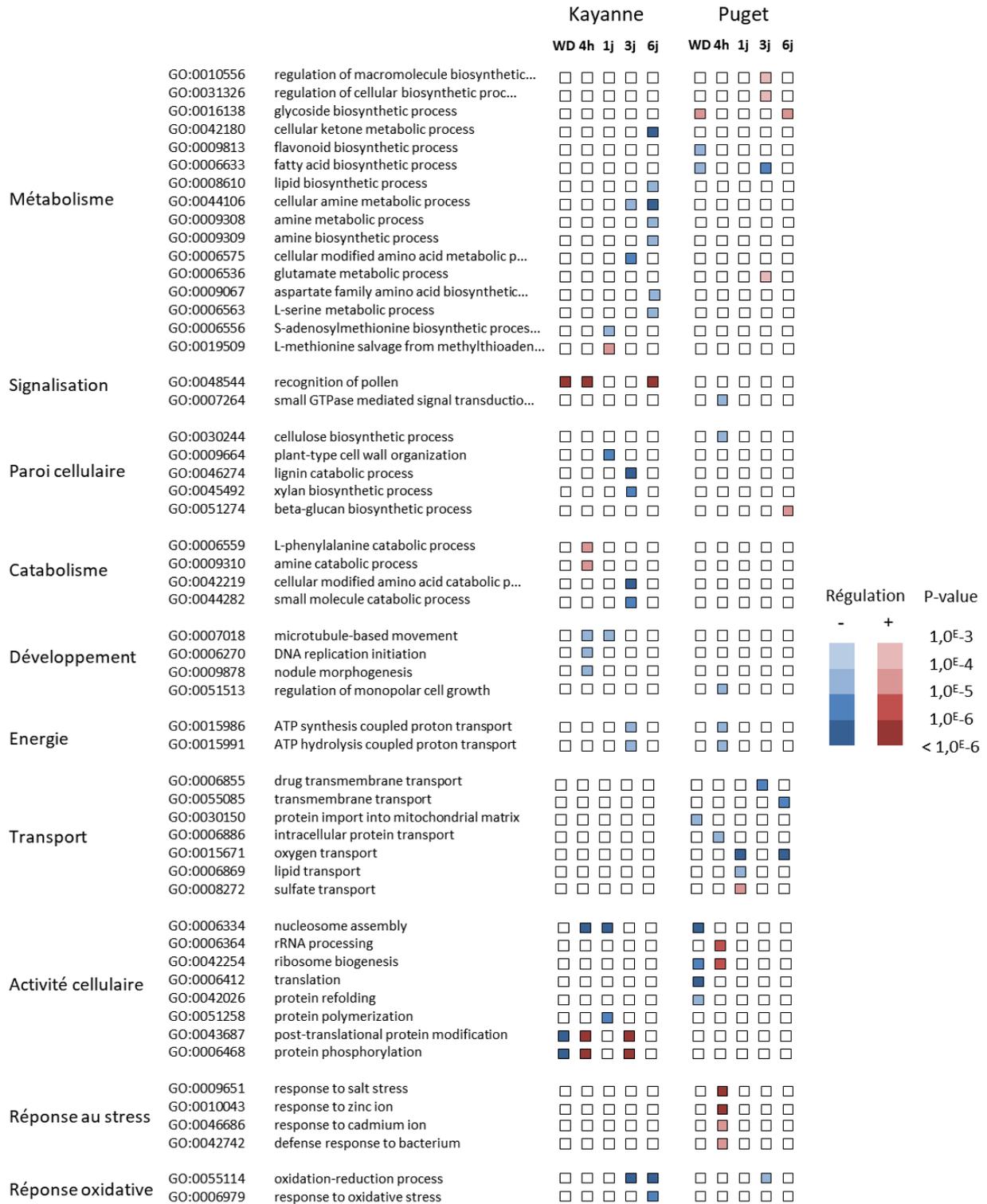


Figure 44 : Analyse des gènes différentiellement exprimés spécifiquement chez Kayanne ou chez Puget dans les racines. Des diagrammes de Venn ont été réalisés afin d'identifier les gènes dérégulés (positivement et négativement) spécifiquement pour l'un ou l'autre des génotypes pour chacun des prélèvements (Figure S4). Un enrichissement en termes de Gene Ontology (GO) a été réalisé pour chacun de ces groupes de gènes (Elim Fisher, p-value < 0.001). Les différents prélèvements correspondent à 13 jours de déficit hydrique (WD), 4h de ré-arrosage (4h) et 1, 3 et 6 jours de ré-arrosage (1j, 3j et 6j).

Rhizobium mais également lors du développement des nodosités (Soto *et al.*, 2009). Peleg-Grossman *et al.*, (2012) ont d'ailleurs mis en évidence chez *Medicago truncatula* une suppression de l'expression de gènes impliqués dans la défense contre les pathogènes lors de l'interaction avec *Rhizobium*.

Pour le génotype Puget uniquement, la liste des gènes régulés négativement, majoritairement lors de la période de ré-arrosage, est particulièrement enrichie en gènes impliqués dans le transport. Seul le transport du sulfate (GO:0008272) est régulé de manière positive après 1 jour de ré-arrosage avec une augmentation de l'expression de trois transporteurs de sulfate (SULTR 1;3, 2;1 et 4;1). SULTR 1;3 et 2;1 ont principalement un rôle dans le transport de sulfate des racines aux parties aériennes et SULTR 4;1 permet quant-à-lui l'efflux du sulfate de la vacuole au cytoplasme (Gigolashvili and Kopriva, 2014) et pourrait permettre de remobiliser le sulfate stocké dans la vacuole, comme cela a pu être montré chez *Medicago truncatula* en condition de carence en soufre (Zuber *et al.*, 2013). Ces différents transporteurs pourraient ainsi permettre de récupérer et transporter du sulfate vers les parties aériennes et ainsi participer à la reprise du métabolisme nécessaire à la croissance.

Analyse des données issues des nodosités

De la même manière que pour l'analyse des gènes dérégulés à la fois chez Puget et Kayanne, un décalage semble être observé entre les deux génotypes en ce qui concerne la régulation de gènes liés au développement (Figure 45). En effet, la liste des gènes sur-exprimés chez les plantes WD après 3 jours de ré-arrosage pour le génotype Kayanne et après 6 jours de ré-arrosage pour le génotype Puget est notamment enrichie en gènes associés au développement, bien que les processus dans lesquels ces gènes soient impliqués ne soient pas exactement les mêmes (mouvements dépendants des microtubules (GO:0007018) pour les deux génotypes, condensation mitotique des chromosomes (GO:0007076) pour Puget et réplication de l'ADN (GO:0006260), prolifération cellulaire (GO:0008283) et régulation de la mitose (GO:0030071) pour Kayanne). De plus, ce décalage est accompagné d'une régulation négative de gènes associés au développement (gènes impliqués dans la régulation de la mitose (GO:0060236) ou l'initiation de la réplication de l'ADN (GO:0006270) notamment), principalement à 4h de ré-arrosage, pour Puget uniquement. Ensuite, une régulation négative des gènes associés à la morphogénèse des nodosités (GO:0009878) est également mise en

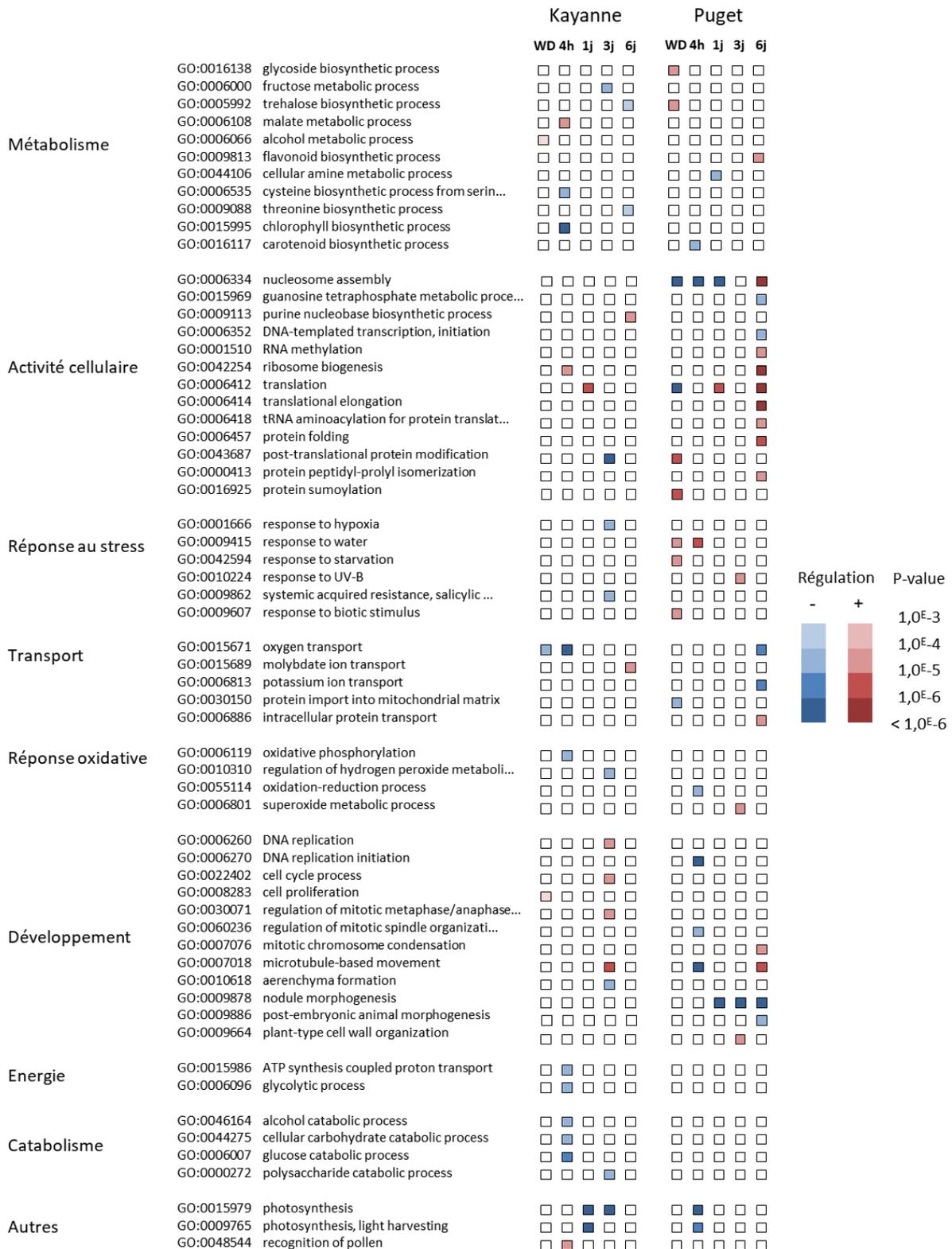


Figure 45 : Analyse des gènes différentiellement exprimés spécifiquement chez Kayanne ou chez Puget dans les nodosités. Des diagrammes de Venn ont été réalisés afin d'identifier les gènes dérégulés (positivement et négativement) spécifiquement pour l'un ou l'autre des génotypes pour chacun des prélèvements (Figure S4). Un enrichissement en termes de Gene Ontology (GO) a été réalisé pour chacun de ces groupes de gènes (Elim Fisher, p-value < 0.001). Les différents prélèvements correspondent à 13 jours de déficit hydrique (WD), 4h de ré-arrosage (4h) et 1, 3 et 6 jours de ré-arrosage (1j, 3j et 6j).

évidence après 1, 3 et 6 jours de ré-arrosage pour le génotype Puget. Il s'agit là de gènes codant pour des nodulines tardives « late nodulines », qui s'accumulent dans les nodosités fixatrices (Govers and Bisseling, 1988; Scheres *et al.*, 1990). Une sous-expression de ces gènes dans les nodosités des plantes ré-arrosées du génotype Puget par rapport aux plantes contrôles pourrait ainsi traduire la présence de nodosités plus jeunes dans les échantillons ré-arrosés. Cette hypothèse semble cohérente avec le décalage observé dans le chapitre 2 concernant l'initiation de la seconde vague de nodulation des plantes WD en comparaison des plantes WW du génotype Puget uniquement traduisant ainsi un retard de développement des nodosités (Chapitre 2, Figure 24C). Chez le génotype Puget, une régulation positive des gènes associés à l'activité cellulaire est observée de manière synchronisée avec la régulation positive des gènes liés au développement après 6 jours de ré-arrosage. Bien que nous n'ayons pas analysé l'expression des gènes « fixateurs », ces gènes étant bactérien, ces résultats pourraient traduire une réactivation forte du fonctionnement des nodosités et seraient ainsi également cohérent avec l'évolution de la récupération de l'acquisition de l'azote mise en évidence dans le chapitre 2, notamment au travers du suivi du contenu en azote de la plante. En effet, la récupération de l'acquisition en azote commence après 10 jours de ré-arrosage pour Puget contre 3 pour Kayanne mais se fait ensuite de manière plus intense (Chapitre 2, Figure 25A). Cela serait aussi en accord avec les hypothèses précédentes au sein des racines, concernant la reprise de la synthèse des amides à partir des acides aminés préalablement accumulés. La liste des gènes sur-exprimés après 4h de ré-arrosage spécifiquement chez Puget est enrichi en gènes de réponse au stress hydrique (GO:0009415) ce qui suggère que les nodosités du génotype Puget sont toujours dans un état de stress après 4h de ré-arrosage. Il s'agit là d'une augmentation de l'expression de gènes de LEA et notamment de déhydrines. Une forte accumulation de ces protéines a en effet été décrite en réponse au stress hydrique ainsi qu'en réponse à l'acide abscissique engendrant une meilleure tolérance au stress de par leur rôle protecteur (Hanin *et al.*, 2011). De plus, le gène *MtCAS31*, codant pour une déhydrine, a été montré comme étant exprimé dans les nodosités chez *Medicago truncatula* et cette déhydrine interagit avec la leghémoglobine MtLb20-1 la protégeant ainsi des dommages dus au stress hydrique (Li *et al.*, 2018).

En conclusion, que ce soit dans les racines ou dans les nodosités, des régulations spécifiques à chacun des génotypes ont été identifiées. Nos données suggèrent que les plantes WD du

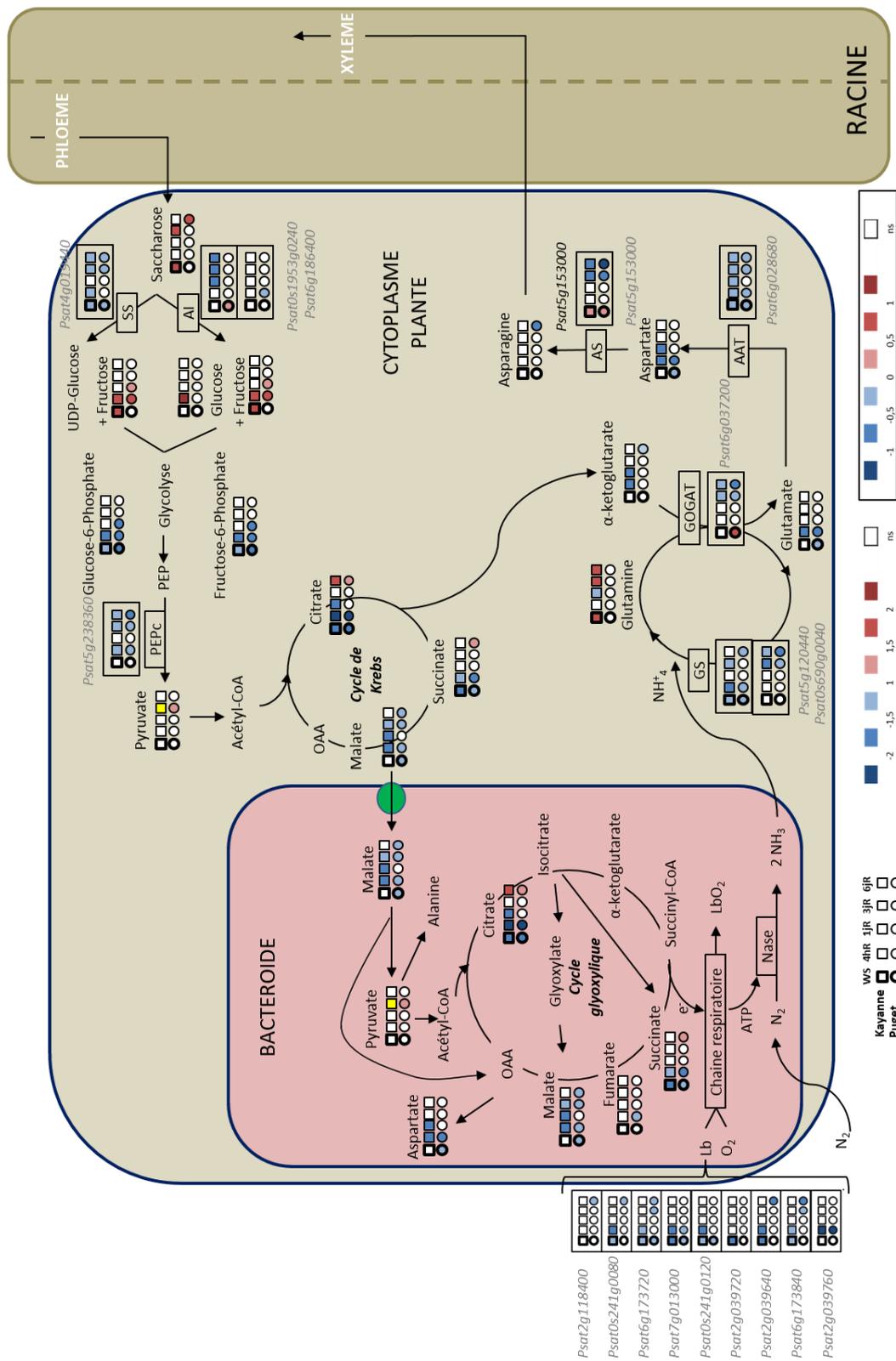


Figure 46. Effet du déficit hydrique et du ré-arrosage sur l'accumulation des métabolites et sur l'expression des gènes codant les enzymes impliqués dans la voie de fixation de l'azote dans les nodosités. Les carrés correspondent au génotype Kayanne et les ronds au génotype Puget. La couleur indique le degré de modification de l'accumulation des métabolites (ratio) et de l'expression des gènes (log2 du ratio) à chaque prélèvement. La couleur jaune indique que le ratio n'a pas pu être calculé. Les données d'expression sont encadrées et les identifiants des gènes indiqués. (WD : 13j de déficit hydrique, 4hR : 4h de ré-arrosage, 1jR, 3jR et 6jR : 1j, 3j et 6j de ré-arrosage). PEP(c) : phosphoénol pyruvate (carboxylase), PEP(c) : aspartate aminotransférase, AAT : aspartate aminotransférase, GS : glutamine synthétase, GOGAT : glutamate synthase, OAA : oxaloacétate, Lb, leghémoglobine.

génotype Puget au début du ré-arrosage sont toujours en « état de stress », que ce soit dans les racines ou dans les nodosités (Figures 48 et 49). De la même manière, la sous-expression de gènes codant pour des nodulines tardives nous suggère la présence de nodosités plus jeunes pour le génotype Puget.

D- Bases moléculaires sous-jacentes à la fixation du N₂ dans les nodosités et à l'interaction entre métabolismes C et N dans les racines.

Dans le but d'analyser en détails l'effet du déficit hydrique et du ré-arrosage sur certaines voies métaboliques ciblées, les modifications d'accumulation des métabolites impliqués dans ces voies ainsi que l'expression des gènes codant les enzymes clés associées ont été suivies en fin de période de déficit hydrique et lors du ré-arrosage. Les gènes ont été sélectionnés en fonction de leur niveau d'expression dans l'organe concerné, le ou les gènes ayant l'expression la plus importante ayant été sélectionnés.

1- La fixation symbiotique de l'azote dans les nodosités

Le stress hydrique est connu pour entraîner une diminution de l'activité de fixation de l'azote atmosphérique (Streeter 2003; Prudent *et al.*, 2016), bien que nous ne l'ayons pas observé lors de notre expérimentation (Chapitre 2, Tableau 1). Trois hypothèses ont été proposées pour expliquer cette limitation : **i)** un feedback négatif de l'activité de la nitrogénase par des composés azotés (Neo and Layzell, 1997; Serraj *et al.*, 1999; King and Purcell, 2001; Larrainzar *et al.*, 2009), **ii)** une baisse de la perméabilité du cortex des nodosités et donc de la diffusion de l'O₂ dans les nodosités entraînant une limitation de l'O₂ disponible pour la production d'ATP nécessaire à la fixation symbiotique l'azote (Durand *et al.*, 1987; Gonzalez *et al.*, 2001; Naya *et al.*, 2007), ou **iii)** une baisse de l'allocation en carbone de la plante vers les nodosités (González *et al.*, 1998; Galvez 2005), voire une combinaison de plusieurs de ces hypothèses (Gonzalez *et al.*, 2001; Marino *et al.*, 2006; Nasr Esfahani *et al.*, 2014). Bien que dans notre expérience, l'activité de fixation soit maintenue durant la période de déficit hydrique, elle baisse significativement lors du ré-arrosage pour le génotype Puget (Chapitre 2, Tableau 1). Ces hypothèses concernant les causes de la limitation de la fixation pendant le stress pourraient aussi expliquer celle qui est observée lors de la période de ré-arrosage. Il peut être ainsi raisonnable de penser qu'une levée de ces limitations puisse permettre une récupération.

Les nodosités sont constituées à la fois d'une structure racinaire (issue de la plante), et d'une structure bactérienne, contenant des bactéries différenciées ou non en bactéroïdes selon les zones (voir Chapitre 1, partie II-2-a). Il est à noter qu'au niveau transcriptomique, seuls les ARNs issus de la plante ont été séquencés. Cependant, au niveau métabolomique, les valeurs obtenues dans les nodosités sont la résultante d'une accumulation dans les structures végétales et dans la structure bactérienne. L'accumulation du saccharose, glucose, glucose-6-phosphate, fructose-6-phosphate, malate, asparagine, aspartate, glutamine, glutamate a pu être quantifiée dans les nodosités de même que celle de la plupart des métabolites impliqués dans le cycle TCA, et le différentiel d'expression des gènes codant l'asparagine synthase (AS), la glutamine amidotransférase (GOGAT), l'alcaline invertase (AI), la sucrose synthase (SS), la phosphoénolpyruvate carboxylase (PEPc), l'aspartate aminotransférase (AAT) et la glutamine synthétase (GS) a été calculé. L'ensemble de ces données a été récapitulé sur la Figure 46.

Rétrocontrôle azoté

Parmi les composés azotés, les acides aminés ont été proposés comme responsables du rétrocontrôle négatif de l'activité de fixation de l'azote et notamment l'aspartate, l'asparagine, le glutamate et la glutamine (Neo and Layzell, 1997; Vadez *et al.*, 2000). Cependant, notre analyse ne montre aucune accumulation de ces composés à la fin de la période de stress hydrique dans les nodosités des plantes WD comparées aux plantes contrôles, à l'exception de la glutamine, pour le génotype Kayanne uniquement. De plus, après 7 jours de ré-arrosage, l'activité de fixation de l'azote des plantes stressées n'est pas différente de celles des plantes contrôles pour ce génotype (Chapitre 2, Tableau 1), or l'accumulation de glutamine est toujours supérieure après 6 jours de ré-arrosage (Figure 46). Un rétrocontrôle azoté local ne semble donc pas être responsable de la baisse de l'activité de fixation observée lors de la période de ré-arrosage chez les plantes WD du génotype Puget. Ces acides aminés pourraient également avoir été exportés dans les parties aérienne et un rétrocontrôle longue distance, des parties aériennes vers les nodosités, pourrait avoir lieu. Il convient donc d'effectuer des mesures au niveau des flux dans le phloème avant d'écarter définitivement cette hypothèse.

Limitation de la disponibilité en O₂

La leghémoglobine est une protéine qui permet le transport de l'oxygène jusqu'aux bactéries

afin d'assurer la respiration (Appleby, 1984; Layzell and Hunt, 1990). Une régulation négative de l'expression de plusieurs gènes codant pour la leghémoglobine à la fin de la période de déficit hydrique et/ou dans les premières heures de ré-arrosage a pu être observée, bien que cela soit plus marqué pour le génotype Kayanne (8 gènes sur 9) que pour le génotype Puget (4 gènes sur 9). Cependant, pour le génotype Puget uniquement, une régulation négative de 5 de ces gènes est également observée en fin de période de ré-arrosage (3 et 6 jours de ré-arrosage). Ainsi, nous pouvons formuler l'hypothèse selon laquelle la diminution de l'accumulation de la leghémoglobine après 3 et 6 jours de ré-arrosage puisse contribuer à la baisse de la fixation de l'azote observée chez Puget après 7 jours de ré-arrosage (Chapitre 2, Tableau 1). De plus, cette baisse de la leghémoglobine entraînant une baisse de la disponibilité en O₂, cela peut mener à une diminution de la production d'ATP et un ralentissement du métabolisme et notamment de la glycolyse pouvant mener à une accumulation des sucres.

Limitation de l'allocation en carbone

La sucrose synthase (SS), qui clive le saccharose en UDP-glucose et fructose, a été montrée, chez le soja en particulier, comme ayant un rôle important dans la fourniture d'hexose aux nodosités au cours de leur développement (González *et al.*, 1995; Gordon *et al.*, 1999). Chez le pois, en réponse au stress hydrique, l'activité de cette enzyme diminue dans les nodosités (González *et al.*, 1995, 1998) entraînant ainsi une réduction de la disponibilité en malate, substrat pour la respiration bactérienne (Galvez, 2005; Ladrera *et al.*, 2007).

En accord avec ces résultats et bien que l'activité de la SS n'ait pas été mesurée dans notre étude, l'expression des gènes codant cette enzyme voient leur expression réduite en réponse à un stress hydrique chez Kayanne ce qui entraîne une accumulation d'hexose dans la cellule et du pool de glutamine. L'activité de la glycolyse réduite par la baisse de fourniture d'énergie (perméabilité du cortex) conduit à une baisse des pools de sucres phosphatés de la glycolyse ainsi que de malate, fourniture en carbone majeure de la bactérie pour son métabolisme énergétique. Ces séquences de réponses sont similaires pour Puget mais décalées dans le temps et moins précoces (fructose, fructose-6-phosphate, glucose-6-phosphate, malate notamment). Ainsi, alors que tous ces métabolites retournent à un niveau similaire à celui des plantes WW après 6 jours de ré-arrosage, le contenu en malate est toujours significativement

moins important chez les plantes WD du génotype Puget. Cette baisse d'accumulation du malate pourrait potentiellement expliquer la baisse significative de l'activité de fixation de l'azote observée dans le chapitre 2 pour le génotype Puget (Chapitre 2, Tableau 1).

Ainsi, nos résultats suggèrent une implication potentielle de la limitation de l'allocation en malate et de la disponibilité en O₂ dans la diminution de l'activité de fixation de l'azote chez les plantes WD du génotype Puget après 7 jours de ré-arrosage.

2- Le métabolisme C : N dans les racines

Afin de mieux appréhender les interactions entre métabolisme carboné et métabolisme azoté dans les racines, les modifications (i) de l'accumulation des principaux métabolites (dont les acides aminés) et (ii) de l'expression des gènes codant les enzymes impliquées dans la glycolyse, la voie des pentoses phosphates et le cycle TCA ont été analysées et sont présentées sur la Figure 47.

De manière générale, à l'exception du glucose et du pyruvate dont l'accumulation augmente chez les plantes WD des deux génotypes, l'accumulation des métabolites de la glycolyse et du cycle TCA est diminuée en réponse au déficit hydrique puis est suivie d'un retour à un niveau équivalent à celui des plantes contrôles lors de la période de ré-arrosage. De la même manière, l'expression des gènes codant les enzymes associés à ces deux voies est majoritairement régulée négativement par le déficit hydrique. L'accumulation des métabolites des pentoses phosphates n'est quand-à-elle pas modifiée en réponse au déficit hydrique et au ré-arrosage. L'accumulation des acides aminés en fin de période de déficit hydrique est globalement plus importante chez les plantes WD en comparaison des plantes WW à l'exception de l'histidine, l'alanine, l'aspartate et l'arginine pour les deux génotypes et la cystéine pour Puget uniquement.

Cette Figure intégrative nous permet de voir que suite au stress hydrique et durant la période de ré-arrosage, Kayanne augmente plus fortement et plus longtemps sa synthèse d'acides aminés que Puget, en particulier pour les acides aminés en amont du TCA. De plus, l'aspartate est le seul acide aminé dont l'accumulation ne bouge pas en réponse au déficit hydrique mais qui diminue dès les premières heures de ré-arrosage pour les deux génotypes. Ainsi, l'équilibre entre l'aspartate et la thréonine, la méthionine, l'asparagine et la lysine est en

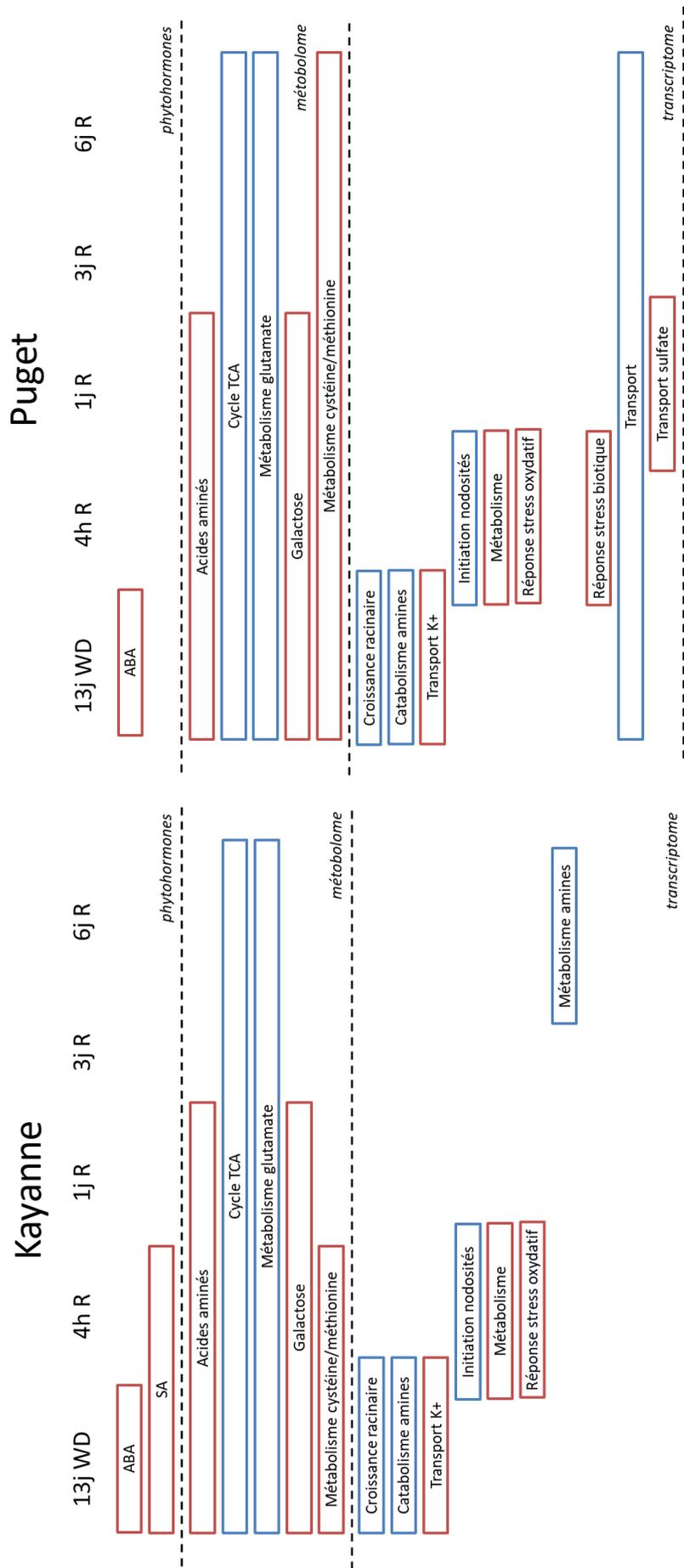


Figure 48 : Comparaison des génotypes Kayanne et Puget pour leurs réponses transcriptionnelle, métabolique et hormonale dans les racines. Les principaux résultats obtenus grâce aux analyses « omiques » sont résumés. Les cadres rouges correspondent à une régulation positive chez les plantes stressées/ré-arrosées par rapport aux plantes contrôles et les cadres bleus correspondent à une régulation négative. 13j WD : 13j de déficit hydrique, 4h R : 4h de ré-arrosage, 1j R, 3j R et 6j R : 1j, 3j et 6j de ré-arrosage.

faveur de ce second groupe. Ensuite, la phénylalanine, la thréonine et l'ensemble des acides aminés à chaîne ramifiée (valine, leucine et isoleucine) restent plus fortement accumulés dans les plantes WD pendant une durée plus longue que la moyenne des autres acides aminés (jusqu'à 3 jours de ré-arrosage contre un retour à niveau contrôle dans la première journée de ré-arrosage). Un maintien de l'accumulation supérieure de ces acides aminés chez les plantes stressées lors du ré-arrosage post-stress hydrique a par ailleurs déjà été observé chez *Arabidopsis* (Huang and Jander, 2017). Cependant les auteurs n'ont pas pu déterminer si cette accumulation était liée à la fonction protectrice de ces acides aminés ou sont simplement un artefact dû à la dégradation des protéines, des recherches supplémentaires sont nécessaires.

En réponse au déficit hydrique, le métabolisme carboné des plantes WD des deux génotypes est globalement diminué alors qu'une augmentation de l'accumulation des acides aminés est observée. Cependant, cette augmentation est plus forte et plus longue pour le génotype Kayanne en comparaison du génotype Puget, pour ce qui est des acides aminés en amont du TCA.

IV- Conclusion

Afin d'obtenir une vision globale des réponses de la plante de pois au déficit hydrique et au ré-arrosage et de synthétiser les principales différences observées entre les deux génotypes, les principaux résultats obtenus pour chaque génotype au cours des analyses hormonales, métabolomiques et transcriptomiques ont été récapitulés dans la Figure 48 pour les racines et dans la Figure 49 pour les nodosités.

Une inhibition de la croissance et de l'assimilation d'azote en réponse au déficit hydrique

Que ce soit dans les racines ou dans les nodosités et pour le génotype Kayanne ou le génotype Puget, une augmentation de l'accumulation de l'ABA (Figures 29A et 29A) ainsi qu'une régulation négative des gènes impliqués dans la croissance cellulaire (Figures 42 et 43) est observée en réponse au déficit hydrique. Ces réponses s'accompagnent au niveau des nodosités d'une surexpression de gènes impliqués dans la réponse aux stress (Figure 43). Cette baisse de croissance est associée à une baisse de l'activité métabolique comme le traduit la diminution de l'accumulation des métabolites du cycle TCA dans les plantes WD par

rapport au plantes WW ainsi qu'une baisse de l'assimilation de l'azote suggéré par la baisse d'accumulation des métabolites impliqués dans le métabolisme du glutamate (Figure 36).

Un décalage dans la régulation de la croissance des nodosités entre Kayanne et Puget en réponse au déficit hydrique et au ré-arrosage

Au niveau des nodosités, l'accumulation de l'ABA (Figure 30A) de même que la sur-expression de gènes de réponse au stress et la sous-expression de gènes de croissance nodulaire (Figure 43) se poursuivent durant les premières heures de ré-arrosage pour Puget alors qu'il y a une récupération immédiate pour Kayanne. Ainsi, les nodosités du génotype Puget semblent être toujours en conditions de stress dans les premières heures de ré-arrosage au contraire du génotype Kayanne. On constate également chez Puget une régulation positive de gènes de réponse aux stress biotiques après 4h de ré-arrosage (Figure 45). Tout cela pourrait induire pour ce génotype l'inhibition de nouvelles nodosités et contribuer au délai d'initiation de nouvelles nodosités mis en évidence dans le chapitre 2 (Chapitre 2, Figure 24C).

Ce décalage dans le temps est également mis en évidence lors de la récupération dans la reprise de la croissance des nodosités. Elle s'initie après 3 jours de ré-arrosage pour Kayanne contre 6 jours pour Puget (Figures 43 et 45). De plus, ce décalage de croissance semble associé à un décalage de reprise de l'activité de fixation de l'azote comme le soulignent d'une part la baisse des métabolites impliqués dans le métabolisme du glutamate - donc potentiellement l'assimilation de l'azote - (Figure 36) et d'autre part la régulation négative des gènes liés au transport de l'oxygène et à la production des nodulines tardives - deux acteurs liés au processus de fixation - (Figure 45). Tout cela est cohérent avec la reprise de l'acquisition de l'azote mise en évidence dans le chapitre 2 de manière plus précoce pour le génotype Kayanne par rapport au génotype Puget.

Cependant, ce décalage est-il dû à des différences de dynamique dans l'expression des gènes impliqués dans le développement et le fonctionnement des nodosités ou est-il dû à la mise en place de mécanismes de récupération concernant d'autres processus qui entraîneraient un retard dans l'activation de ce programme transcriptionnel ? Dans cette étude, nous nous sommes concentrés sur la partie racinaire nodulée, cependant qu'en est-il de la reprise de la photosynthèse ou de l'expansion foliaire notamment ? Ainsi chez Puget, la plante pourrait diriger son énergie non pas vers la récupération au niveau des nodosités mais plutôt au

niveau aérien.

La production de SA et les réponses de protection, des éléments clés pour une meilleure récupération ?

Au niveau racinaire, on remarque notamment une production de SA durant la période de déficit hydrique (Figure 29B) ainsi qu'un maintien du contenu en sucres uniquement pour le génotype Kayanne (Figure 35). Le SA ayant été montré comme induisant une activité antioxydante (Horváth *et al.*, 2007), ces deux éléments semblent cohérents avec le maintien de la croissance racinaire durant la période de déficit hydrique pour le génotype Kayanne observée dans le chapitre 2 (Figure 24A).

Une seconde différence entre les deux génotypes concerne les réponses de protection mises en place. On constate en effet d'une part une accumulation de SA lors du ré-arrosage de manière plus importante dans les nodosités des plantes WD du génotype Kayanne que du génotype Puget (Figure 30B), or, le SA est connu pour notamment induire l'activité d'enzymes antioxydantes (Kang *et al.*, 2013). D'autre part une accumulation de polyamines a été observée uniquement pour les nodosités des plantes WD du génotype Kayanne (Figure 36), ces différents métabolites ayant des rôles importants dans la tolérance au stress hydrique de par leur rôle antioxydant (Seo *et al.*, 2019).

De plus, la croissance nodulaire semble régulée négativement plus longtemps chez le génotype Puget, comme décrit précédemment, et les nodosités des plantes WD de ce génotype ont été montrées comme restant en « état de stress » de manière plus longue que pour le génotype Kayanne, comme le traduit la surexpression de gènes de réponse au stress (Figure 45).

Ainsi une hypothèse pourrait être que la production de composés protecteurs permettrait aux plantes WD du génotype Kayanne une meilleure récupération des nodosités au déficit hydrique leur permettant ainsi une reprise de croissance et d'activité plus rapide que chez le génotype Puget.

Un rôle important du métabolisme soufré ?

Alors qu'il y a une hausse de l'accumulation de métabolites du métabolisme du soufre tels que la cystéine et la méthionine dans les racines des deux génotypes en réponse au déficit

hydrique, il y a une récupération uniquement pour le génotype Kayanne, la cystéine, notamment, restant plus fortement accumulée dans les plantes WD du génotype Puget même après 6 jours de ré-arrosage (Figure 35). De plus, la liste des gènes sur-exprimés après 1 jour de ré-arrosage spécifiquement chez Puget sont enrichis en transporteurs de sulfate (Figure 44). Or, le soufre est un élément minéral central dans la plante, notamment en conditions de stress hydrique, de nombreux composés soufré étant produits et permettant une meilleure tolérance (Chan *et al.*, 2013). Ces différences de régulations entre Kayanne et Puget pourraient traduire des stratégies différentes, Puget maintenant la production de certains composés plus longtemps que Kayanne.

Conclusion générale et perspectives

I - Retour sur les principaux résultats de la thèse

L'objectif de cette thèse était de caractériser les mécanismes permettant à la plante de pois de récupérer après un déficit hydrique, en considérant en particulier la croissance de la plante et son acquisition d'azote. Pour cela, une étude comparative a été conduite sur deux génotypes, Kayanne et Puget, auxquels un déficit hydrique de deux semaines a été appliqué lors du stade végétatif, suivi d'un ré-arrosage en conditions optimales. Il s'agissait dans un premier temps d'identifier et hiérarchiser les mécanismes écophysiologiques mis en jeu, notamment en utilisant un cadre d'analyse écophysiologique de type structure-fonction axé sur les flux de carbone, azote et eau dans la plante et en mesurant de manière précise la photosynthèse et la fixation symbiotique de l'azote lors d'une expérimentation de marquage isotopique.

Dans un second temps l'objectif était de déterminer les composantes moléculaires sous-jacentes à ces mécanismes de récupération en utilisant des approches de type « omiques » (métabolomique, transcriptomique et dosages de phytohormones) dans les compartiments racinaire et nodulaire afin de mettre en évidence les voies métaboliques et les gènes clés impliqués lors de la récupération post-stress.

L'originalité de ce projet a ainsi reposé d'une part sur son sujet d'étude qui s'intéresse à une **caractérisation dynamique** de la période de récupération après un déficit hydrique, et ce sur une période de deux semaines après la fin du stress, et d'autre part sur son **approche pluridisciplinaire** faisant intervenir une analyse du transcriptome, du métabolome et une analyse des réponses phytohormonales. Ces approches complexes peuvent, lorsqu'elles sont utilisées de manière synergique (intégration multi-omiques par exemple), d'une part d'extraire les propriétés émergentes du système à chaque niveau d'intégration (les processus biologiques, les gènes, les métabolites, ...) mais également les relations existantes entre les différents éléments de ce systèmes, au sein des différentes échelles.

1) Les capacités de résilience de Kayanne et Puget sont contrastées et peuvent s'expliquer par la mise en place de stratégies de récupération différentes (Chapitre 2)

Un impact comparable du déficit hydrique pour les deux génotypes : Nous avons observé une réduction similaire de l'accumulation de biomasse chez les plantes des deux génotypes en réponse au déficit hydrique. Cette réduction de biomasse résulte d'une diminution de la surface foliaire et de sa fonction photosynthétique. Au niveau du système racinaire, ce sont les nodosités, structures responsables de l'acquisition de l'azote, qui sont les plus affectées par le déficit hydrique conduisant à une réduction de l'acquisition de l'azote par la plante. Cela se traduit par un contenu total en azote plus faible pour les plantes stressées des deux génotypes ainsi que par la baisse de l'indice de nutrition azote (INN) des plantes.

Cependant, malgré les similarités de réponses au déficit hydrique des deux génotypes observées sur des caractères intégratifs que sont les accumulations de biomasses, des différences d'impacts sur les processus ont pu être mises en évidence concernant le maintien du statut hydrique de la plante : la réduction de la conductance stomatique induite par le déficit hydrique dure plus longtemps chez Kayanne que chez Puget et est associée à une meilleure efficacité d'utilisation de l'eau pour Kayanne que pour Puget. L'allocation de carbone (C) au sein du système racinaire nodulé et en particulier vers les nodosités est réduite pour les deux génotypes alors que l'allocation de C vers les racines est maintenue pour Puget voire augmentée pour Kayanne.

...Mais des stratégies de récupération contrastées lors du ré-arrosage : Chez le génotype Puget, le rendement à maturité physiologique des plantes ayant subi l'épisode de déficit hydrique était inférieur à celui des plantes contrôles contrairement à ce qui a été observé pour le génotype Kayanne. L'impact du déficit hydrique étant comparable chez les deux génotypes, ces différences lors de la période de récupération pourraient expliquer ces différences d'efficacité de résilience. L'étude détaillée des réponses mises en place lors de la période de ré-arrosage suivant le déficit hydrique a reposé sur la dissection de processus liés aux flux de C, N et eau qui ont été résumés dans **un schéma conceptuel de dynamique de récupération** (Chapitre 2, Figure 26). Nous avons pu mettre en évidence **des stratégies de récupération contrastées entre Kayanne et Puget, principalement concernant l'acquisition de l'azote**. En effet, nous avons observé :

- des temps de latence (Chapitre 2, Figure 25, 3 et 7 jours de ré-arrosage) avant l'initiation de la récupération différents entre génotype,
- des vitesses de récupération contrastées (Chapitre 2, Figure 25, 3 et 7 jours de ré-arrosage)
- des écarts entre l'état atteint par les plantes stressées et celui des plantes n'ayant pas subi le stress (Chapitre 2, Figure 24B).

Ainsi, concernant l'acquisition de l'azote, le génotype Kayanne initie sa récupération de manière précoce, après 3 jours de ré-arrosage, et retourne progressivement à un état similaire à celui des plantes contrôles. Le génotype Puget initie quant à lui sa récupération plus tardivement que Kayanne, après 7 jours de ré-arrosage, mais récupère plus rapidement que Kayanne, allant même jusqu'à une surcompensation des baisses préalables observée, notamment concernant la proportion de nodosités au sein du système racinaire. Après 15 jours de ré-arrosage, il n'y a pas de différence entre ces génotypes.

Ce décalage cinétique entre les deux génotypes concernant la modulation de leur statut azoté peut être relié à la croissance et au développement des structures impliquées dans le prélèvement d'azote, les nodosités. On observe uniquement chez Puget un retard dans l'initiation de la seconde vague de nodulation par rapport aux plantes contrôles. De même, le phénomène de surcompensation mentionné plus haut s'explique par la forte augmentation, uniquement chez Puget, du nombre de nodosités des plantes stressées (supérieur de 45 %) par rapport aux plantes contrôles.

La dynamique de récupération du statut azoté (INN) est très proche de celle de la biomasse totale, ce qui souligne l'importance des processus liés à l'acquisition de l'azote dans la récupération après un déficit hydrique chez le pois. Ainsi, la stabilité du rendement à maturité physiologique pourrait être liée à la récupération en termes de reprise de l'acquisition de l'azote et une initiation rapide de cette récupération avec un ajustement précis du nombre de nodosités formé permettrait une meilleure stabilité du rendement. En effet, l'azote étant un élément essentiel de la croissance des plantes et la dynamique de modifications observée sur les composantes de l'acquisition d'azote, structurales (biomasse et nombre) et fonctionnelles (activité spécifique de fixation) pourrait donc expliquer, au moins en partie les modulations observées au niveau de l'accumulation de biomasse.

Cette initiation plus tardive de la seconde vague de nodulation chez Puget par rapport à Kayanne pourrait être liée à des différences dans les règles d'allocation de l'énergie au sein de la plante. En effet, les plantes stressées du génotype Puget initie leur récupération en termes d'efficacité d'utilisation du rayonnement (RUE) plus précocement que celles du génotype Kayanne et vont jusqu'à une surcompensation, avec une RUE supérieure à celles des plantes contrôles. Puget semble ainsi favoriser d'abord la reprise de l'acquisition du carbone puis dans un deuxième temps sa nutrition azotée alors que Kayanne semble faire les deux en même temps.

2) Les analyses des bases moléculaires sous-jacentes à la récupération soulignent des différences de régulation principalement dans les nodosités (Chapitre 3)

Dans le but de mieux caractériser les bases moléculaires sous-jacentes à la récupération, nous avons poursuivi notre étude en utilisant une approche basée sur des analyses « omiques » (transcriptomique, métabolomique, phytohormones). Les modifications du transcriptome et du métabolome des deux génotypes en réponse au déficit hydrique et au ré-arrosage ont ainsi été comparées afin d'identifier les mécanismes moléculaires pouvant expliquer les différences de récupération observées précédemment. Les racines sont le premier organe à ressentir un stress hydrique et donc également à percevoir le ré-arrosage et occupe un rôle clé dans la réponse au stress hydrique notamment de par leur rôle dans le prélèvement de l'eau et des nutriments. Dans le cas des légumineuses, les racines sont également le lieu de développement des nodosités. Or, le stress hydrique est connu pour impacter négativement la fixation de l'azote pouvant conduire à une carence azotée et grandement limiter la croissance et l'établissement de rendement (Zahran, 1999). Ainsi, pour cette étude, nous nous sommes focalisés sur les compartiments racinaire et nodulaire.

Une **diminution de la croissance, racinaire comme nodulaire**, a été soulignée **en réponse au déficit hydrique** (Chapitre 3, Figures 48 et 49), comme peut le traduire la baisse de l'accumulation des métabolites du cycle TCA d'une part et la sous-expression de gènes impliqués dans la croissance et le développement d'autre part. Cette réduction de la croissance est associée à une **diminution de l'assimilation de l'azote**, comme le suggère la réduction de l'accumulation des métabolites impliqués dans le métabolisme du glutamate.

Le **décalage cinétique** concernant la récupération en termes d'acquisition de l'azote **entre Kayanne et Puget**, précédemment observé lors de l'analyse écophysiological, est **retrouvé au**

niveau du transcriptome des nodosités (Chapitre 3, Figure 49). En effet, une sur-expression de gènes liés à la croissance des nodosités est constatée chez les plantes stressées dès 3 jours de ré-arrosage pour Kayanne mais plus tardivement, après 6 jours de ré-arrosage pour Puget. Ce décalage pourrait être dû à une différence dans la dynamique d'expression de certains gènes, ce programme transcriptionnel étant « ré-activé » plus tardivement chez Puget que chez Kayanne après un stress hydrique. Cela pourrait être la conséquence de la mise en place d'autres processus spécifiquement chez Puget, retardant la reprise de croissance des nodosités, la plante favorisant d'abord la reprise de l'acquisition du carbone par exemple. Ce décalage est, par ailleurs, également observé au niveau des métabolites du cycle TCA. L'accumulation de ces métabolites est réduite en réponse au déficit hydrique chez les plantes stressées des deux génotypes et leurs niveaux d'accumulation redeviennent similaires aux plantes contrôle après 6j de ré-arrosage chez Kayanne mais pas encore chez Puget.

Ces analyses « omiques » mettent en lumière une seconde différence entre nos deux génotypes concernant la mise en place, en réponse au déficit hydrique, **de réponses de défense** (osmo-protecteur et antioxydant) **dans les nodosités, spécifiquement chez le génotype Kayanne**. Tout d'abord, nous avons pour les deux génotypes, lors de la période de ré-arrosage, une accumulation d'acide salicylique, hormone impliquée dans l'activation d'enzymes anti-oxydantes (Horváth *et al.*, 2007). Cette accumulation est cependant plus importante pour le génotype Kayanne en comparaison du génotype Puget. Ensuite, nous avons mis en évidence une accumulation de métabolites à rôle antioxydant, tels que des polyamines, spécifiquement chez les plantes stressées du génotype Kayanne dès la fin de période de déficit hydrique et durant la période de ré-arrosage. Tout cela traduit donc la mise en place de réponses protectrices. A l'inverse, une surreprésentation de gènes impliqués dans les réponses au stress observées au sein des gènes surexprimés dans les nodosités à la fin de la période de déficit hydrique pour les deux génotypes, est toujours présente après 4 heures de ré-arrosage pour le génotype Puget uniquement. Cela pourrait traduire **un « état de stress » toujours présent pour les nodosités du génotype Puget**. Ainsi, une hypothèse pourrait être que la cinétique de réponses de défenses mises en place chez Kayanne pourrait permettre aux nodosités de récupérer et ainsi redémarrer leur croissance et activité plus rapidement.

Ainsi, la mise en place de réponses communes aux deux génotypes mais également des réponses spécifiques à chaque génotype a pu être soulignée. Ces différences de réponses nous ont permis d'identifier des processus biologiques impliqués dans la récupération pouvant potentiellement expliquer la différence d'efficacité de récupération observée entre Kayanne et Puget. De ce fait, la régulation de la croissance des nodosités ainsi que les réponses de défense pourraient jouer un rôle clé dans la détermination de l'efficacité de récupération après un déficit hydrique. Nous avons pu acquérir un jeu de données conséquent et en extraire des informations quant-àux processus biologiques pouvant être impliqués, cependant approfondir notre analyse nous permettrait d'identifier un ou plusieurs gènes clés au cœur de ces processus pouvant être utilisés comme candidats dans le développement de nouvelles variétés mieux adaptées aux conditions hydriques fluctuantes.

En conclusion, ce projet de thèse nous a permis d'effectuer une caractérisation de la récupération chez deux génotypes de pois contrastés et ainsi d'ouvrir des pistes concernant l'identification des processus biologiques clés impliqués dans la récupération et pouvant ainsi permettre de mieux récupérer après un déficit hydrique. Nous avons ainsi pu acquérir un large jeu de données multi-échelles constituant une base de réflexion pour la compréhension de la récupération et de sa régulation.

II - Perspectives de recherche

1) Etude de l'architecture racinaire des deux génotypes et de l'effet du déficit hydrique et du ré-arrosage sur cette dernière

Le déficit hydrique est connu pour entraîner des modifications de l'architecture racinaire (modification du nombre de racines latérales, de leur longueur ou de leur angle d'insertion notamment) qui a un impact sur l'acquisition de l'eau et des nutriments. Ces modifications d'architecture peuvent également influencer le développement et la croissance des nodosités ces deux organes étant antagonistes vis-à-vis de l'utilisation du carbone (Hacin *et al.*, 1997; Tricot *et al.*, 1997). Les deux génotypes étudiés possèdent des architectures racinaires contrastées (Annexe 2). Il serait ainsi intéressant d'analyser quelles modifications de l'architecture racinaire sont mises en place lors du déficit hydrique et lors de la période de ré-arrosage chez Kayanne et chez Puget ?

Lors de notre première expérimentation, des plantes ont également été cultivées dans des contenants spéciaux permettant l'analyse racinaire de manière non destructive : les RhizoTubes®. Un phénotypage du système racinaire nodulé a été effectué de manière quotidienne tout au long de l'expérimentation par acquisition d'images. Le développement d'algorithmes permettant d'analyser ces images et d'en retirer des données d'architecture, telles que des mesures de longueur ou de surface racinaire est long et l'obtention des données a été tardive. Elles n'ont ainsi pas pu être analysées pendant le temps imparti pour la thèse.

Il s'agira alors de voir si Kayanne et Puget modulent leur architecture racinaire notamment d'un point de vue de la surface de la zone d'exploration du système racinaire mais aussi de la densité racinaire au sein de cette zone. Il serait également intéressant de regarder si les plantes mettent en place des adaptations morphologiques telle qu'une modification de la surface spécifique des racines (surface / longueur de racine) pouvant ainsi leur permettre de moduler l'efficacité de prélèvement pour un coût carboné réduit. Une hypothèse pourrait être que des modifications de l'architecture racinaire, génotypes spécifiques, participeraient à expliquer les différences de récupération de l'activité spécifique de prélèvement de l'eau, cette dernière étant plus précoce chez Puget par rapport à Kayanne.

Certains traits d'architectures n'ont pu être obtenus avec l'algorithme d'analyses d'images que nous avons et il pourrait être intéressant d'en développer de nouveaux. Il faudrait alors qu'ils puissent mesurer des traits tels que le nombre mais aussi l'angle d'insertion des racines latérales. Il serait également nécessaire de pouvoir obtenir des mesures sur les nodosités et notamment la surface de nodosités présentes, de leurs positions sur les racines.

2) Approfondissement des analyses « omiques »

Les analyses transcriptomiques que nous avons conduites nous ont permis d'identifier des listes de gènes DE en réponse au déficit hydrique et au ré-arrosage pour chacun des génotypes, dans les racines et les nodosités. Des analyses d'enrichissement GO de ces listes de gènes DE nous ont permis d'identifier des processus biologiques communs ou spécifiques à Kayanne et Puget, potentiellement importants pour la récupération. Cependant, le jeu de données obtenu reste grand et il reste difficile d'identifier les gènes clés qui pourraient être déterminants pour une meilleure récupération. En effet, l'identification de gènes pouvant conduire à une meilleure récupération après un déficit hydrique est une voie prometteuse

pour le développement d'idéotypes de pois mieux adaptés aux conditions hydriques fluctuantes, qui pourrait ensuite guider la création ou bien la sélection variétale.

Une approche réseau pour l'identification de gènes clés impliqués dans la récupération

Nous pourrions envisager une approche plus holistique basée sur les réseaux de gènes. Ces réseaux peuvent être construits soit avec l'ensemble des données d'expression obtenues soit sur les gènes DE uniquement. Différents types de réseaux peuvent ensuite être construits tels que des réseaux de co-expression, via la méthode WGCNA par exemple (Langfelder and Horvath, 2008), ou les réseaux de régulation ou d'inférence (via l'utilisation de DynGenie3 par exemple (Huynh-Thu and Geurts, 2018)). Alors que les réseaux de co-expression sont basés sur les similitudes de profils d'expression et mettent en évidence des liens entre gènes, les réseaux de régulation donnent un sens à ces liens permettant de déduire les relations de causalité entre les gènes. Ces réseaux permettent également de regrouper les gènes en modules correspondant à des sous-réseaux de gènes fortement interconnectés entre eux.

L'analyse peut ensuite être poursuivie sur un ou plusieurs modules d'intérêt. Le choix de ces modules peut se faire soit sur la base de fonctions biologiques qui leur serait associées (par des analyses d'enrichissement en termes GO), soit en considérant ceux qui comprennent le plus de gènes répondant au stress étudié. L'analyse que nous avons conduite semble souligner l'importance des réponses au stress et à l'organogenèse des nodosités dans la récupération après un déficit hydrique. Nous pourrions alors nous focaliser sur les modules se rapportant notamment à ces processus, ou d'autres processus d'intérêt en fonction de ce que fera ressortir cette analyse.

Il s'agira ensuite d'identifier au travers de ces réseaux des gènes candidats. Pour cela, nous pourrions **identifier les gènes « hub » de ces modules**. Les gènes « hub » sont des gènes très fortement connectés à d'autres gènes qui sont au centre des modules. De par leur fort niveau de liaison aux autres gènes, ces gènes peuvent avoir des rôles régulateurs centraux. Nous pourrions également **cibler les facteurs de transcription au centre de ces modules**. Les facteurs de transcription, éléments régulateurs clés, constituent des gènes candidats importants dans la modulation de certains processus en réponse à des conditions stressantes. Une autre stratégie d'analyse pourrait consister en une analyse ciblée sur les facteurs de transcription retrouvés au sein des modules d'intérêt. Par exemple, une étude des réponses de racines d'*Arabidopsis* à différentes quantités de nitrate (Canales *et al.*, 2014) basée sur la

construction d'un réseau de co-expression génique a permis l'identification de 11 modules de gènes dont une majorité des gènes répondant au nitrate était répartie sur seulement 4 de ces modules. L'analyse ciblée sur les facteurs de transcription de ces 4 modules particuliers a mis en évidence l'implication potentielle de différents facteurs de type bZIP et Myb dans le contrôle des réponses au nitrate, qu'il restera à valider.

Si, suite à la construction de nos réseaux de gènes, un fort nombre de gènes candidats ressortait de l'analyse, alors il conviendrait de diminuer le nombre de candidats. Pour cela, une combinaison de ces deux approches pourrait être envisagée afin de réduire cette liste importante de gènes candidats. C'est par exemple ce qui a été fait dans l'étude des réponses au stress hydrique du maïs conduite par Miao *et al.*, (2017). Elle a permis l'identification d'un nombre important de 844 gènes hub et la construction d'un sous-réseau centré sur les gènes hub identifiés et sur les facteurs de transcription a permis de mettre en évidence 5 « facteurs de transcription hub », c'est-à-dire des facteurs de transcription fortement liés à un grand nombre de gènes hub précédemment identifiés, constituant des candidats pour la régulation des réponses au stress hydrique (Miao *et al.*, 2017).

Comparer les réseaux des deux génotypes : Afin de pouvoir identifier des gènes candidats pouvant induire une meilleure récupération après un déficit hydrique, il s'agit de pouvoir comparer les réponses de ces deux génotypes. En effet, Kayanne et Puget possédant une capacité de résilience contrastée, une comparaison des réseaux obtenus pour chacun de ces génotypes nous permettrait alors d'identifier des gènes candidats. Cependant, la comparaison de réseaux n'est pas triviale.

- Une première possibilité consisterait (i) à construire des réseaux propres à chaque génotype, qui intègreraient les données transcriptomiques aux variables morpho-physiologiques, puis (ii) à fusionner ces réseaux au sein d'un réseau qui serait alors commun aux deux génotypes. Les liaisons propres à l'un ou l'autre des génotypes, ainsi que les liaisons communes aux deux génotypes pourraient être différenciées, facilitant ainsi la comparaison des génotypes. C'est cette approche qui a été menée par Rengel *et al.*, (2012) lorsqu'ils ont voulu mettre en évidence les modifications transcriptomiques mises en place en réponse à un stress hydrique de durée fixe, par rapport à un stress hydrique d'intensité fixe chez le tournesol. Les auteurs ont réussi à montrer, en utilisant le package MixOmics (méthode SPLS : Sparse Partial Least

Squares), que 83 % des gènes spécifiques à un stress hydrique de durée fixe étaient liés au potentiel osmotique soulignant de ce fait l'importance des ajustements osmotiques dans les réponses au stress hydrique chez le tournesol.

- Une deuxième possibilité consisterait à (i) construire un réseau pour chacun des génotypes et réalisé un clustering afin d'identifier différents modules de gènes, puis (ii) d'effectuer une identification de modules consensuels regroupant des gènes présentant des profils de co-expression similaires, via une mesure de consensus de dissimilarité, basée sur la moyenne pondérée des deux matrices de corrélation. Ceci permettra d'obtenir des modules communs définis de manière robuste pour les deux types génotypes, aidant ainsi à la comparaison des réseaux, les gènes n'étant assignés à aucun de ces modules étant groupés dans un module supplémentaire. C'est cette approche qui a été menée par Sharma *et al.*, (2018) lors de leur étude comparative des réponses transcriptomiques obtenues lors d'un stress hydrique ou d'un stress gélif chez *Arabidopsis thaliana*. Leur utilisation du package WGCNA couplé à des mesures de dissimilarité, leur a permis de montrer que les gènes communs au stress hydrique et gélif étaient notamment impliqués dans le maintien de l'homéostasie des formes actives de l'oxygène et les mouvements des stomates et de constater que plusieurs familles de facteurs de transcription étaient communes aux deux stress et régulaient plusieurs gènes communs, notamment via la voie dépendante de l'ABA.

Nous pourrions alors explorer plus en détails les modules de gènes se rapportant par exemple aux réponses anti-oxydantes ou à la croissance des nodosités.

Comment renforcer ces réseaux via la combinaison des approches multi-omiques et phéno-omiques ?

Dans le cadre de notre étude, nous avons produit des données transcriptomiques et métabolomiques, ainsi que des données phénotypiques. Intégrer ces différents types de données pourrait nous aider à identifier des gènes candidats associés à une meilleure récupération notamment en nous permettant de mettre en évidence des liens entre des modules de gènes et des traits phénotypiques que nous avons identifiés comme importants dans la récupération (l'organogenèse des nodosités par exemple).

L'intégration de données hétérogènes entraîne cependant de nombreuses difficultés comme cela a été décrit récemment dans deux revues (Misra *et al.*, 2019; Pinu *et al.*, 2019). Une des difficultés principales est la méthode utilisée pour normaliser le jeu de ces données hétérogènes i) issues de techniques différentes, mais aussi ii) de nature variable, notamment en termes de taille de jeu de données (30 000 transcrits versus 200 métabolites versus une vingtaine de variables écophysiologicals). Il n'est donc pas simple de trouver une méthode de normalisation adéquate.

Des outils d'intégration sont néanmoins disponibles et différents outils d'intégration ont été décrits en détails par Misra *et al.*, (2019). Cependant, ces outils peuvent s'avérer être très complexes et nécessiter beaucoup de temps pour leur installation puis leur prise en main. Une difficulté supplémentaire est le fait qu'ils reposent sur des langages de programmation différents (R, Matlab, python, java, ...), ce qui complexifie leur utilisation générique et peut entraîner des problèmes de compatibilité. Certains outils plus faciles d'utilisation ont cependant été conçus, mais la réduction de leur complexité s'accompagne souvent d'une baisse du contrôle et de la transparence de l'analyse (type « boîte noire »). Certains outils ont par ailleurs été développés pour des organismes particuliers (humain, levure) et ne sont pour le moment pas utilisables sur d'autres modèles d'étude. D'autres outils, reposant sur les analyses multivariées, sont largement utilisés pour l'intégration de données. Ces méthodes ont l'avantage d'être adaptées aux grands jeux de données, où le nombre de variables est beaucoup plus grand que le nombre d'échantillons, notamment du fait qu'elles permettent de réduire la dimension des données en utilisant des variables dites instrumentales ou composantes correspondant à une combinaison de toutes les variables. C'est notamment le cas de l'outil MixOmics qui fournit une large gamme de méthodes multivariées pour l'exploration mais également pour l'intégration d'ensembles de données biologiques.

Grâce aux analyses que nous avons déjà réalisées, nous avons pu identifier à la fois des gènes différentiellement exprimés et des métabolites différentiellement accumulés en réponse au déficit hydrique et au ré-arrosage, pour chacun de nos géotypes et nous avons également obtenu des données phénotypiques. Nous pourrions ainsi utiliser des méthodes d'analyse de corrélation, tel que la méthode WGCNA, et/ou des méthodes d'analyses multivariées, telle que la méthode DIABLO de l'outil MixOmics, pour intégrer ces différents types de données.

Ces différentes méthodes ont notamment été combinées et utilisée dans l'étude de Ployet *et al.*, (2019) conduite chez *Eucalyptus grandis*, analysant la formation du bois en conditions de disponibilité en eau et de fertilisation en potassium. Lors de ces travaux, ils ont réussi à intégrer des données transcriptomiques, des données métabolomiques ainsi que des données phénotypiques au sein d'un réseau. Parmi les modules mis en évidence, six modules ont ainsi été montrés comme positivement corrélés à la densité de vaisseaux et le rendement de saccharification. Une analyse ciblée sur les facteurs de transcription (FT) de ce sous-réseau a permis l'identification de 16 FT connus pour être impliqués dans la synthèse de la paroi cellulaire, et 32 FT apparaissant comme de nouveaux candidats. Parmi ces FT, EgMYB137, le FT le plus fortement corrélé aux gènes de synthèse de la paroi cellulaire dont l'implication a ensuite été validée via une caractérisation fonctionnelle.

3- Validation fonctionnelle

Une fois des gènes candidats identifiés, il s'agira alors de réaliser une validation fonctionnelle de l'implication de ces gènes dans la récupération. Le pois n'étant pas aisément transformable par *Agrobacterium*, une solution pourrait être de cribler la collection de mutants TILLING pour rechercher des mutations dans nos gènes candidats.

Cette étude s'est limitée à l'analyse de deux génotypes possédant des capacités de résilience contrastée afin d'identifier des différences de réponses entre génotypes. Cela afin de nous permettre de formuler des hypothèses quant-aux processus biologiques impliqués dans la récupération et leurs mécanismes de régulation pouvant permettre une meilleure récupération. Il serait intéressant par la suite d'étendre cette analyse à plus de génotypes afin de confronter nos résultats à la diversité génétique.

Références bibliographiques

- Ahmad P, Rasool S, Gul A, et al., 2016.** Jasmonates: Multifunctional Roles in Stress Tolerance. *Frontiers in Plant Science* **7**.
- Alexa A, Rahnenfuhrer J., 2018.** Gene set enrichment analysis with topGO.
- Alexandersson E, Danielson JÅH, Råde J, et al., 2010.** Transcriptional regulation of aquaporins in accessions of *Arabidopsis* in response to drought stress. *The Plant Journal* **61**: 650–660.
- Ali S, Ganai B, Kamili A, et al., 2018.** Pathogenesis-Related Proteins and Peptides as Promising Tools for Engineering Plants with Multiple Stress Tolerance. *Microbiological Research* **212**.
- Alves-Carvalho S, Aubert G, Carrère S, et al., 2015.** Full-length de novo assembly of RNA-seq data in pea (*Pisum sativum* L.) provides a gene expression atlas and gives insights into root nodulation in this species. *The Plant Journal* **84**: 1–19.
- Andriankaja A, Boisson-Dernier A, Frances L, et al., 2007.** AP2-ERF Transcription Factors Mediate Nod Factor–Dependent Mt ENOD11 Activation in Root Hairs via a Novel cis-Regulatory Motif. *The Plant Cell* **19**: 2866–2885.
- Anjum SA, Xie X, Wang L, Saleem MF, Man C, Lei W. 2011.** Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. : 7.
- Appleby CA. 1984.** Leghemoglobin and Rhizobium Respiration. *Plant Physiology* **35**: 443–478.
- Araki H, Morita S, Tatsumi J, Iijima M. 2002.** Physiol-Morphological Analysis on Axile Root Growth in Upland Rice. *Plant Production Science* **5**: 286–293.
- Aranjuelo I, Tcherkez G, Molero G, Gilard F, Avice J-C, Nogues S. 2013.** Concerted changes in N and C primary metabolism in alfalfa (*Medicago sativa*) under water restriction. *Journal of Experimental Botany* **64**: 885–897.
- Aubert G, Morin J, Jacquin F, et al., 2006.** Functional mapping in pea, as an aid to the candidate gene selection and for investigating synteny with the model legume *Medicago truncatula*. *Theoretical and Applied Genetics* **112**: 1024–1041.
- Barbosa EGG, Leite JP, Marin SRR, et al., 2013.** Overexpression of the ABA-Dependent AREB1 Transcription Factor from *Arabidopsis thaliana* Improves Soybean Tolerance to Water Deficit. *Plant Molecular Biology Reporter* **31**: 719–730.
- Basu S, Ramegowda V, Kumar A, Pereira A. 2016.** Plant adaptation to drought stress. *F1000Research* **5**: 1554.
- Bensmihen S. 2015.** Hormonal Control of Lateral Root and Nodule Development in Legumes. *Plants* **4**: 523–547.
- Bernstein L, Bosch P, Canziani O, et al., 2007.** *Climate Change 2007 : Synthesis Report : An Assessment of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Geneva, Switzerland: IPCC.
- Bista D, Heckathorn S, Jayawardena D, Mishra S, Boldt J. 2018.** Effects of Drought on Nutrient Uptake and the Levels of Nutrient-Uptake Proteins in Roots of Drought-Sensitive and -Tolerant Grasses. *Plants* **7**: 28.
- Black M, Moolhuijzen P, Chapman B, et al., 2012.** The Genetics of Symbiotic Nitrogen Fixation: Comparative Genomics of 14 Rhizobia Strains by Resolution of Protein Clusters. *Genes* **3**: 138–166.

- Bogeat-Triboulot M-B, Brosche M, Renaut J, et al., 2006.** Gradual Soil Water Depletion Results in Reversible Changes of Gene Expression, Protein Profiles, Ecophysiology, and Growth Performance in *Populus euphratica*, a Poplar Growing in Arid Regions. *Plant physiology* **143**: 876–892.
- Boivin S, Fonouni-Farde C, Frugier F. 2016.** How Auxin and Cytokinin Phytohormones Modulate Root Microbe Interactions. *Frontiers in Plant Science* **7**.
- Bodner G, Nakhforoosh A, Kaul H-P. 2015.** Management of crop water under drought: a review. *Agronomy for Sustainable Development* **35**.
- Bourion V, Heulin-Gotty K, Aubert V, et al., 2018.** Co-inoculation of a Pea Core-Collection with Diverse Rhizobial Strains Shows Competitiveness for Nodulation and Efficiency of Nitrogen Fixation Are Distinct traits in the Interaction. *Frontiers in Plant Science* **8**.
- Bourion V, Rizvi SMH, Fournier S, et al., 2010.** Genetic dissection of nitrogen nutrition in pea through a QTL approach of root, nodule, and shoot variability. *Theoretical and Applied Genetics* **121**: 71–86.
- Boyer JS. 1982.** Plant Productivity and Environment. *Science* **218**: 443–448.
- Bray EA. 1997.** Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science* **2**: 48–54.
- Brewin NJ. 1991.** Development of the Legume Root Nodule. *Annual Review of Cell Biology* **7**: 191–226.
- Canales J, Moyano TC, Villarroel E, Gutiérrez RA. 2014.** Systems analysis of transcriptome data provides new hypotheses about Arabidopsis root response to nitrate treatments. *Frontiers in Plant Science* **5**.
- Cárdenas L, Vidali L, Domínguez J, et al., 1998.** Rearrangement of Actin Microfilaments in Plant Root Hairs Responding to Rhizobium etli Nodulation Signals. *Plant Physiology* **116**: 871–877.
- Casadebaig P, Debaeke P, Lecoœur J. 2008.** Thresholds for leaf expansion and transpiration response to soil water deficit in a range of sunflower genotypes. *European Journal of Agronomy* **28**: 646–654.
- Casimiro I, Marchant A, Bhalerao RP, et al., 2001.** Auxin Transport Promotes Arabidopsis Lateral Root Initiation. *The Plant Cell* **13**: 843–852.
- Castillo LD del, Hunt S, Layzell DB. 1992.** O₂ regulation and O₂-limitation of nitrogenase activity in root nodules of pea and lupin. *Physiologia Plantarum* **86**: 269–278.
- Cavailles E. 2009.** La relance des légumineuses dans le cadre d'un plan protéine : quels bénéfices environnementaux ?
- Cernay C, Ben-Ari T, Pelzer E, Meynard J-M, Makowski D. 2015.** Estimating variability in grain legume yields across Europe and the Americas. *Scientific Reports* **5**.
- Cerri MR, Frances L, Kelner A, et al., 2016.** The Symbiosis-Related ERN Transcription Factors Act in Concert to Coordinate Rhizobial Host Root Infection. *Plant Physiology* **171**: 1037–1054.
- Chan KX, Wirtz M, Phua SY, Estavillo GM, Pogson BJ. 2013.** Balancing metabolites in drought: the sulfur assimilation conundrum. *Trends in Plant Science* **18**: 18–29.
- Charlton AJ, Donarski JA, Harrison M, et al., 2008.** Responses of the pea (*Pisum sativum*

- L.) leaf metabolome to drought stress assessed by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Metabolomics* **4**: 312–327.
- Chaves MM, Flexas J, Pinheiro C. 2009.** Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany* **103**: 551–560.
- Chaves MM, Maroco JP, Pereira JS. 2003.** Understanding plant responses to drought — from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology* **30**: 239.
- Chen T, Duan L, Zhou B, et al., 2017.** Interplay of Pathogen-Induced Defense Responses and Symbiotic Establishment in *Medicago truncatula*. *Frontiers in Microbiology* **8**.
- Chen D, Wang S, Cao B, et al., 2016.** Genotypic variation in growth and physiological response to drought stress and re-watering reveals the critical role of recovery in drought adaptation in maize seedlings. *Frontiers in Plant Science* **6**: 1241.
- Chen Y-F, Wang Y, Wu W-H. 2008.** Membrane transporters for nitrogen, phosphate and potassium uptake in plants. *Journal of Integrative Plant Biology* **50**: 835–848.
- Colebrook EH, Thomas SG, Phillips AL, Hedden P. 2014.** The role of gibberellin signalling in plant responses to abiotic stress. *Journal of Experimental Biology* **217**: 67–75.
- Comas LH, Becker SR, Cruz VMV, Byrne PF, Dierig DA. 2013.** Root traits contributing to plant productivity under drought. *Frontiers in Plant Science* **4**.
- Cousin R. 1997.** Peas (*Pisum sativum* L.). *Field Crops Research* **53**: 111–130.
- Couvreur V, Vanderborght J, Draye X, Javaux M. 2014.** Dynamic aspects of soil water availability for isohydric plants: Focus on root hydraulic resistances. *Water Resources Research* **50**: 8891–8906.
- Dai A. 2013.** Increasing drought under global warming in observations and models. *Nature Climate Change* **3**: 52–58.
- Dalmais M, Schmidt J, Le Signor C, et al., 2008.** UTILdb, a *Pisum sativum* in silico forward and reverse genetics tool. *Genome Biology* **9**: R43.
- Dash M, Yordanov YS, Georgieva T, Tschaplinski TJ, Yordanova E, Busov V. 2017.** Poplar *PtabZIP1-like* enhances lateral root formation and biomass growth under drought stress. *The Plant Journal* **89**: 692–705.
- Daszkowska-Golec A, Szarejko I. 2013.** Open or Close the Gate – Stomata Action Under the Control of Phytohormones in Drought Stress Conditions. *Frontiers in Plant Science* **4**.
- Davidson EA, de Carvalho CJR, Figueira AM, et al., 2007.** Recuperation of nitrogen cycling in Amazonian forests following agricultural abandonment. *Nature* **447**: 995–998.
- Davière J-M, Achard P, 2013.** Gibberellin signaling in plants. *Development* **140**: 1147–1151
- Day DA, Poole PS, Tyerman SD, Rosendahl L. 2001.** Ammonia and amino acid transport across symbiotic membranes in nitrogen-fixing legume nodules. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* **58**: 61–71.
- Deak KI, Malamy J. 2005.** Osmotic regulation of root system architecture. *The Plant Journal* **43**: 17–28.
- Dénarié J, Debelle F, Promé JC. 1996.** Rhizobium lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annual Review*

of *Biochemistry* **65**: 503–535.

- Denhartig C. 2015.** Diagnostic des filières de légumineuses à destination de l'alimentation humaine en France - Intérêt environnemental et perspectives de développement.
- Desbrosses GJ, Stougaard J. 2011.** Root Nodulation: A Paradigm for How Plant-Microbe Symbiosis Influences Host Developmental Pathways. *Cell Host & Microbe* **10**: 348–358.
- Ding Y, Kalo P, Yendrek C, et al., 2008.** Abscisic Acid Coordinates Nod Factor and Cytokinin Signaling during the Regulation of Nodulation in *Medicago truncatula*. *The Plant Cell* **20**: 2681–2695.
- Dobert RC, Blevins DG. 1993.** Effect of seed size and plant growth on nodulation and nodule development in lima bean (*Phaseolus lunatus* L.). *Plant and Soil* **148**: 11–19.
- Dolan L, Janmaat K, Willemsen V, et al., 1993.** Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root. : 14.
- Doré T, Meynard JM, Sebillotte M. 1998.** The role of grain number, nitrogen nutrition and stem number in limiting pea crop (*Pisum sativum*) yields under agricultural conditions. *European Journal of Agronomy* **8**: 29–37.
- Du H, Liu H, Xiong L. 2013.** Endogenous auxin and jasmonic acid levels are differentially modulated by abiotic stresses in rice. *Frontiers in Plant Science* **4**.
- Dubrovsky JG, Rost TL, Colón-Carmona A, Doerner P. 2001.** Early primordium morphogenesis during lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **214**: 30–36.
- Durand JL, Sheehy JE, Minchin FR. 1987.** Nitrogenase Activity, Photosynthesis and Nodule Water Potential in Soyabean Plants Experiencing Water Deprivation. *Journal of Experimental Botany* **38**: 311–321.
- Endre G, Kereszt A, Kevei Z, Mihacea S, Kaló P, Kiss GB. 2002.** A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature* **417**: 962–966.
- Erice G, Louahlia S, Irigoyen JJ, Sánchez-Díaz M, Alami IT, Avice J-C. 2011.** Water use efficiency, transpiration and net CO₂ exchange of four alfalfa genotypes submitted to progressive drought and subsequent recovery. *Environmental and Experimental Botany* **72**: 123–130.
- Erice G, Louahlia S, Irigoyen JJ, Sanchez-Diaz M, Avice J-C. 2010.** Biomass partitioning, morphology and water status of four alfalfa genotypes submitted to progressive drought and subsequent recovery. *Journal of Plant Physiology* **167**: 114–120.
- Farber M, Attia Z, Weiss D. 2016.** Cytokinin activity increases stomatal density and transpiration rate in tomato. *Journal of Experimental Botany* **67**: 6351–6362.
- Farooq M, Basra SMA, Wahid A, Ahmad N, Saleem BA. 2009.** Improving the Drought Tolerance in Rice (*Oryza sativa* L.) by Exogenous Application of Salicylic Acid. *Journal of Agronomy and Crop Science* **195**: 237–246.
- Farooq M, Wahid A, Kobayashi N, Fujita D, Basra SMA. 2009.** Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agronomy for Sustainable Development* **29**: 185–212.
- Felle HH, Kondorosi É, Kondorosi Á, Schultze M. 1999.** Elevation of the Cytosolic Free [Ca²⁺] Is Indispensable for the Transduction of the Nod Factor Signal in Alfalfa. *Plant Physiology* **121**: 273–280.

- Fenta BA, Driscoll SP, Kunert KJ, Foyer CH. 2012.** Characterization of drought-tolerance traits in nodulated soya beans: The importance of maintaining photosynthesis and shoot biomass under drought-induced limitations on nitrogen metabolism. *Journal of Agronomy and Crop Science* **198**: 92–103.
- Ferguson BJ, Indrasumunar A, Hayashi S, et al., 2010.** Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *Journal of Integrative Plant Biology* **52**: 61–76.
- Ferguson BJ, Mathesius U. 2014.** Phytohormone Regulation of Legume-Rhizobia Interactions. *Journal of Chemical Ecology* **40**: 770–790.
- Ferguson BJ, Mens C, Hastwell AH, et al., 2019.** Legume nodulation: The host controls the party. *Plant, Cell & Environment* **42**: 41–51.
- Ferguson BJ, Ross JJ, Reid JB. 2005.** Nodulation Phenotypes of Gibberellin and Brassinosteroid Mutants of Pea. *Plant Physiology* **138**: 2396–2405.
- Fernie AR, Carrari F, Sweetlove LJ. 2004.** Respiratory metabolism: glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport. *Current Opinion in Plant Biology* **7**: 254–261.
- Fletcher AL, Sinclair TR, Allen LH. 2007.** Transpiration responses to vapor pressure deficit in well watered ‘slow-wilting’ and commercial soybean. *Environmental and Experimental Botany* **61**: 145–151.
- Fonouni-Farde C, Tan S, Baudin M, Brault M, Wen J, Mysore KS, Niebel A, Frugier F, Diet A. 2016.** DELLA-mediated gibberellin signalling regulates Nod factor signalling and rhizobial infection. *Nature communications* **7**: 1-13
- Forth S, Kapoor TM. 2017.** The mechanics of microtubule networks in cell division Mechanics of microtubule networks in dividing cells. *The Journal of Cell Biology* **216**: 1525–1531.
- Foster K, Lambers H, Real D, Ramankutty P, Cawthray GR, Ryan MH. 2015.** Drought resistance and recovery in mature *Bituminaria bituminosa* var. *albomarginata*: Drought resistance and recovery in teder. *Annals of Applied Biology* **166**: 154–169.
- Frechilla S, González EM, Royuela M, Minchin FR, Aparicio-Tejo PM, Arrese-Igor C. 2000.** Source of nitrogen nutrition (nitrogen fixation or nitrate assimilation) is a major factor involved in pea response to moderate water stress. *Journal of Plant Physiology* **157**: 609–617.
- Frugier F, Kosuta S, Murray JD, Crespi M, Szczyglowski K. 2008.** Cytokinin: secret agent of symbiosis. *Trends in Plant Science* **13**: 115–120.
- Gage DJ. 2004.** Infection and Invasion of Roots by Symbiotic, Nitrogen-Fixing Rhizobia during Nodulation of Temperate Legumes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **68**: 280–300.
- Galant A, Preuss ML, Cameron J, Jez JM. 2011.** Plant Glutathione Biosynthesis: Diversity in Biochemical Regulation and Reaction Products. *Frontiers in Plant Science* **2**.
- Galvez L. 2005.** Evidence for carbon flux shortage and strong carbon/nitrogen interactions in pea nodules at early stages of water stress. *Journal of Experimental Botany* **56**: 2551–2561.
- Garay AF, Wilhelm WW. 1983.** Root System Characteristics of Two Soybean Isolines Undergoing Water Stress Conditions 1. *Agronomy Journal* **75**: 973–977.

- Gaworzewska ET, Carlile MJ. 1982.** Positive Chemotaxis of *Rhizobium leguminosarum* and other Bacteria towards Root Exudates from Legumes and other Plants. *Microbiology*, **128**: 1179–1188.
- Geurts R, Xiao TT, Reinhold-Hurek B. 2016.** What Does It Take to Evolve A Nitrogen-Fixing Endosymbiosis? *Trends in Plant Science* **21**: 199–208.
- Gigolashvili T, Kopriva S. 2014.** Transporters in plant sulfur metabolism. *Frontiers in Plant Science* **5**.
- Gilroy S, Jones DL. 2000.** Through form to function: root hair development and nutrient uptake. *Trends in Plant Science* **5**: 56–60.
- Gonzalez A-A, Agbévénou K, Herrbach V, Gough C, Bensmihen S. 2014.** Abscisic acid promotes pre-emergence stages of lateral root development in *Medicago truncatula*. *Plant Signaling & Behavior* **10**.
- González EM, Aparicio-Tejo PM, Gordon AJ, Minchin FR, Royuela M, Arrese-Igor C. 1998.** Water-deficit effects on carbon and nitrogen metabolism of pea nodules. *Journal of Experimental Botany* **49**: 1705–1714.
- Gonzalez EM, Galvez L, Arrese-Igor C. 2001.** ABA induces a decline in nitrogen fixation that involves leghaemoglobin but is independent of SS activity.pdf. *Journal of Experimental Botany* **52**: 285–293.
- González EM, Gálvez L, Royuela M, Aparicio-Tejo PM, Arrese-Igor C. 2001.** Insights into the regulation of nitrogen fixation in pea nodules: lessons from drought, abscisic acid and increased photoassimilate availability. *Agronomie* **21**: 607–613.
- González EM, Gordon AJ, James CL, Arrese-Igor C. 1995.** The role of sucrose synthase in the response of soybean nodules to drought. *Journal of Experimental Botany* **46**: 1515–1523.
- Gonzalez-Rizzo S, Crespi M, Frugier F. 2006.** The *Medicago truncatula* CRE1 Cytokinin Receptor Regulates Lateral Root Development and Early Symbiotic Interaction with *Sinorhizobium meliloti*. *The Plant Cell* **18**: 2680–2693.
- Gordon null, Minchin null, James null, Komina null. 1999.** Sucrose synthase in legume nodules is essential for nitrogen fixation. *Plant Physiology* **120**: 867–878.
- Govers F, Bisseling T. 1988.** The Role of Nodulins in Root Nodule Development In: O’Gara F, Manian S, Drevon JJ, eds. Advances in Agricultural Biotechnology. *Physiological Limitations and the Genetic Improvement of Symbiotic Nitrogen Fixation: Proceedings of an International Conference on the Physiological Limitations and the Genetic Improvement of Symbiotic Nitrogen Fixation, Cork, Ireland, September 1–3, 1987*. Dordrecht: Springer Netherlands, 193–206.
- Graham PH. 2003.** Legumes: Importance and Constraints to Greater Use. *Plant Physiology* **131**: 872–877.
- Grieneisen VA, Xu J, Marée AFM, Hogeweg P, Scheres B. 2007.** Auxin transport is sufficient to generate a maximum and gradient guiding root growth. *Nature* **449**: 1008–1013.
- Guilioni L, Wéry J, Lecoeur J. 2003.** High temperature and water deficit may reduce seed number in field pea purely by decreasing plant growth rate. *Functional Plant Biology* **30**: 1151–1164.
- Gunes A, Çiçek N, Inal A, et al., 2006.** Genotypic response of chickpea (*Cicer arietinum* L.)

- cultivars to drought stress implemented at pre- and post-anthesis stages and its relations with nutrient uptake and efficiency. *Plant soil environment* **52**: 368–376.
- Guseman JM, Webb K, Srinivasan C, Dardick C. 2017.** DRO1 influences root system architecture in Arabidopsis and Prunus species. *The Plant Journal* **89**: 1093–1105.
- Ha S, Vankova R, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Tran L-SP. 2012.** Cytokinins: metabolism and function in plant adaptation to environmental stresses. *Trends in Plant Science* **17**: 172–179.
- Hacin JI, Bohlool BB, Singleton PW. 1997.** Partitioning of ¹⁴C-labelled photosynthate to developing nodules and roots of soybean (*Glycine max*). *New Phytologist* **137**: 257–265.
- Hamanishi ET, Barchet GL, Dauwe R, Mansfield SD, Campbell MM. 2015.** Poplar trees reconfigure the transcriptome and metabolome in response to drought in a genotype- and time-of-day-dependent manner. *BMC Genomics* **16**: 329.
- Hanin M, Brini F, Ebel C, Toda Y, Takeda S, Masmoudi K. 2011.** Plant dehydrins and stress tolerance. *Plant Signaling & Behavior* **6**: 1503–1509.
- He M, Dijkstra FA. 2014.** Drought effect on plant nitrogen and phosphorus: a meta-analysis. *The New Phytologist* **204**: 924–931.
- Herdina, Silsbury JH. 1990.** Growth, nitrogen accumulation and partitioning, and N₂ fixation in faba bean (*Vicia faba* cv. Fiord) and pea (*Pisum sativum* cv. Early Dun). *Field Crops Research* **24**: 173–188.
- Herrbach V, Remblière C, Gough C, Bensmihen S. 2014.** Lateral root formation and patterning in *Medicago truncatula*. *Journal of Plant Physiology* **171**: 301–310.
- Hirsch AM. 1992.** Developmental biology of legume nodulation. *New Phytologist* **122**: 211–237.
- Hirsch RE, Lewis BD, Spalding EP, Sussman MR. 1998.** A role for the AKT1 potassium channel in plant nutrition. *Science (New York, N.Y.)* **280**: 918–921.
- Hochholdinger F. 2016.** Untapping root system architecture for crop improvement. *Journal of Experimental Botany* **67**: 4431–4433.
- Hodge A, Berta G, Doussan C, Merchan F, Crespi M. 2009.** Plant root growth, architecture and function. *Plant and Soil* **321**: 153–187.
- Hodgson D, McDonald JL, Hosken DJ. 2015.** What do you mean, ‘resilient’? *Trends in Ecology & Evolution* **30**: 503–506.
- Hoogenboom G, Huck MG, Peterson CM. 1987.** Root Growth Rate of Soybean as Affected by Drought Stress 1. *Agronomy Journal* **79**: 607–614.
- Horváth E, Szalai G, Janda T. 2007.** Induction of Abiotic Stress Tolerance by Salicylic Acid Signaling. *Journal of Plant Growth Regulation* **26**: 290–300.
- Huang C-Y, Boyer JS, Vanderhoef LN. 1975.** Limitation of Acetylene Reduction (Nitrogen Fixation) by Photosynthesis in Soybean Having Low Water Potentials. *Plant physiology* **56**: 228–232.
- Huang T, Jander G. 2017.** Abscisic acid-regulated protein degradation causes osmotic stress-induced accumulation of branched-chain amino acids in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **246**: 737–747.

- Huynh-Thu VA, Geurts P. 2018.** dynGENIE3: dynamical GENIE3 for the inference of gene networks from time series expression data. *Scientific Reports* **8**: 3384.
- Ingram J, Bartels D. 1996.** The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**: 377–403.
- Ivanov S, Fedorova EE, Limpens E, et al., 2012.** Rhizobium–legume symbiosis shares an exocytotic pathway required for arbuscule formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**: 8316–8321.
- Jaillais Y, Santambrogio M, Rozier F, Fobis-Loisy I, Miège C, Gaude T. 2007.** The Retromer Protein VPS29 Links Cell Polarity and Organ Initiation in Plants. *Cell* **130**: 1057–1070.
- Janiak A, Kwaśniewski M, Szarejko I. 2016.** Gene expression regulation in roots under drought. *Journal of Experimental Botany* **67**: 1003–1014.
- Javot H, Maurel C. 2002.** The Role of Aquaporins in Root Water Uptake. *Annals of Botany* **90**: 301–313.
- Jensen E. 1986.** The influence of rate and time of nitrate supply on nitrogen fixation and yield in pea (*Pisum sativum* L.). *Fertilizer research* **10**: 193–202.
- Jensen ES, Hauggaard-Nielsen H. 2003.** How can increased use of biological N₂ fixation in agriculture benefit the environment? *Plant and Soil* **252**: 177–186.
- Jensen ES, Peoples MB, Boddey RM, et al., 2012.** Legumes for mitigation of climate change and the provision of feedstock for biofuels and biorefineries. A review. *Agronomy for Sustainable Development* **32**: 329–364.
- Judy C, Ruffel S, Freixes S, et al., 2010.** Adaptation of *Medicago truncatula* to nitrogen limitation is modulated via local and systemic nodule developmental responses. *New Phytologist* **185**: 817–828.
- Jeuffroy M-H, Warembourg FR. 1991.** Carbon Transfer and Partitioning between Vegetative and Reproductive Organs in *Pisum sativum* L. *Plant physiology* **97**: 440–448.
- Jia J, Li S, Cao X, et al., 2016.** Physiological and transcriptional regulation in poplar roots and leaves during acclimation to high temperature and drought. *Physiologia Plantarum* **157**: 38–53.
- Jia X, Sun C, Zuo Y, et al., 2016.** Integrating transcriptomics and metabolomics to characterise the response of *Astragalus membranaceus* Bge. var. *mongolicus* (Bge.) to progressive drought stress. *BMC Genomics* **17**: 188.
- Jin Y, Liu H, Luo D et al., 2016.** DELLA proteins are common components of symbiotic rhizobial and mycorrhizal signalling pathways. *Nature Communications* **7**: 1-14
- Jongrunklang N, Jogloy S, Kesmala T, Vorasoot N, Patanothai A. 2014.** Responses of rooting traits in peanut genotypes under pre-flowering drought stress. *International Journal of Plant Production*: 18.
- Joshi R, Wani SH, Singh B, et al., 2016.** Transcription Factors and Plants Response to Drought Stress: Current Understanding and Future Directions. *Frontiers in Plant Science* **7**.
- Kang GZ, Li GZ, Liu GQ, et al., 2013.** Exogenous salicylic acid enhances wheat drought tolerance by influence on the expression of genes related to ascorbate-glutathione cycle.

Biologia Plantarum **57**: 718–724.

- Kapilan R, Vaziri M, Zwiazek JJ. 2018.** Regulation of aquaporins in plants under stress. *Biological Research* **51**.
- Kawashima K, Suganuma N, Tamaoki M, Kouchi H. 2001.** Two Types of Pea Leghemoglobin Genes Showing Different O₂-Binding Affinities and Distinct Patterns of Spatial Expression in Nodules. *Plant Physiology* **125**: 641–651.
- Kidokoro S, Watanabe K, Ohori T, et al., 2015.** Soybean DREB1/CBF-type transcription factors function in heat and drought as well as cold stress-responsive gene expression. *The Plant Journal* **81**: 505–518.
- Kim T-H, Böhmer M, Hu H, Nishimura N, Schroeder JI. 2010.** Guard Cell Signal Transduction Network: Advances in Understanding Abscisic Acid, CO₂, and Ca²⁺ Signaling. *Annual review of plant biology* **61**: 561–591.
- King CA, Purcell LC. 2001.** Soybean Nodule Size and Relationship to Nitrogen Fixation Response to Water Deficit. *Crop Science* **41**: 1099.
- Klee HJ, Romano CP, Binns DA. 2011.** The Roles of Phytohormones in Development as Studied in Transgenic Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*.
- Kobayashi K, Salam MU. 2000.** Comparing Simulated and Measured Values Using Mean Squared Deviation and its Components. *Agronomy Journal* **92**: 345–352.
- Korver RA, Koevoets IT, Testerink C. 2018.** Out of Shape During Stress: A Key Role for Auxin. *Trends in Plant Science* **23**: 783–793.
- Kosslak RM, Bohlool BB. 1984.** Suppression of Nodule Development of One Side of a Split-Root System of Soybeans Caused by Prior Inoculation of the Other Side. *Plant Physiology* **75**: 125–130.
- Kouchi H, Yoneyama T. 1984.** Dynamics of Carbon Photosynthetically Assimilated in Nodulated Soya Bean Plants under Steady-state Conditions 2. The Incorporation of ¹³C into Carbohydrates, Organic Acids, Amino Acids and some Storage Compounds. *Annals of Botany* **53**: 883–896.
- Kramer PJ. 1969.** Plant and soil water relationships: a modern synthesis. *Plant and soil water relationships: a modern synthesis*.
- Kreplak J, Madoui M-A, Cápál P, et al., 2019.** A reference genome for pea provides insight into legume genome evolution. *Nature Genetics* **51**: 1411–1422.
- Krusell L, Madsen LH, Sato S, et al., 2002.** Shoot control of root development and nodulation is mediated by a receptor-like kinase. *Nature* **420**: 422–426.
- Kunert KJ, Vorster BJ, Fenta BA, Kibido T, Dionisio G, Foyer CH. 2016.** Drought Stress Responses in Soybean Roots and Nodules. *Frontiers in Plant Science* **7**.
- La VH, Lee B-R, Zhang Q, Park S-H, Islam MdT, Kim T-H. 2019.** Salicylic acid improves drought-stress tolerance by regulating the redox status and proline metabolism in Brassica rapa. *Horticulture, Environment, and Biotechnology* **60**: 31–40.
- Ladrera R, Marino D, Larrainzar E, Gonzalez EM, Arrese-Igor C. 2007.** Reduced Carbon Availability to Bacteroids and Elevated Ureides in Nodules, But Not in Shoots, Are Involved in the Nitrogen Fixation Response to Early Drought in Soybean. *Plant physiology* **145**: 539–546.
- Lake PS. 2013.** Resistance, Resilience and Restoration. *Ecological Management &*

Restoration **14**: 20–24.

- Landais E. 1998.** Agriculture durable : les fondements d'un nouveau contrat social ? *Le Courrier de l'environnement de l'INRA* **33**: 5–22.
- Langfelder P, Horvath S. 2008.** WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. *BMC Bioinformatics* **9**: 559.
- Laplaze L, Benkova E, Casimiro I, et al., 2007.** Cytokinins Act Directly on Lateral Root Founder Cells to Inhibit Root Initiation. *The Plant Cell* **19**: 3889–3900.
- Larrainzar E, Molenaar J. A., Wienkoop S, et al., 2014.** Drought stress provokes the down-regulation of methionine and ethylene biosynthesis pathways in *Medicago truncatula* roots and nodules. *Plant, Cell & Environment* **37**: 2051–2063.
- Larrainzar E, Wienkoop S, Scherling C, et al., 2009.** Carbon metabolism and bacteroid functioning are involved in the regulation of nitrogen fixation in *Medicago truncatula* under drought and recovery. *Molecular plant-microbe interactions* **22**: 1565–1576.
- Laskowski M, Grieneisen VA, Hofhuis H, et al., 2008.** Root System Architecture from Coupling Cell Shape to Auxin Transport. *PLOS Biology* **6**: e307.
- Layzell DB, Hunt S. 1990.** Oxygen and the regulation of nitrogen fixation in legume nodules. *Physiologia Plantarum* **80**: 322–327.
- Lecoeur J, Sinclair TR. 1996.** Field Pea Transpiration and Leaf Growth in Response to Soil Water Deficits. *Crop Science* **36**: 331–335.
- Lecomte C, Prost L, Gauffreteau A. 2009.** Présentation d'une méthode pour améliorer la connaissance des aptitudes variétales, intérêt des modèles, besoins de développements nouveaux.
- Lee D-K, Yoon S, Kim YS, Kim J-K. 2016.** Rice OsERF71-mediated root modification affects shoot drought tolerance. *Plant Signaling & Behavior* **12**.
- Lévy J, Bres C, Geurts R, et al., 2004.** A Putative Ca²⁺ and Calmodulin-Dependent Protein Kinase Required for Bacterial and Fungal Symbioses. *Science* **303**: 1361–1364.
- Li X, Feng H, Wen J, Dong J, Wang T. 2018.** MtCAS31 Aids Symbiotic Nitrogen Fixation by Protecting the Leghemoglobin MtLb120-1 Under Drought Stress in *Medicago truncatula*. *Frontiers in Plant Science* **9**: 633.
- Li D, Kinkema M, Gresshoff PM. 2009.** Autoregulation of nodulation (AON) in *Pisum sativum* (pea) involves signalling events associated with both nodule primordia development and nitrogen fixation. *Journal of Plant Physiology* **166**: 955–967.
- Li X, Zeng R, Liao H. 2016.** Improving crop nutrient efficiency through root architecture modifications. *Journal of Integrative Plant Biology* **58**: 193–202.
- Li R, Zeng Y, Xu J, et al., 2015.** Genetic variation for maize root architecture in response to drought stress at the seedling stage. *Breeding Science* **65**: 298–307.
- Li X, Zhao J, Tan Z, Zeng R, Liao H. 2015.** GmEXPB2, a Cell Wall β -Expansin, Affects Soybean Nodulation through Modifying Root Architecture and Promoting Nodule Formation and Development. *Plant Physiology* **169**: 2640–2653.
- Liu A, Contador CA, Fan K, Lam H-M. 2018.** Interaction and Regulation of Carbon, Nitrogen, and Phosphorus Metabolisms in Root Nodules of Legumes. *Frontiers in Plant Science* **9**.

- Limpens E, Franken C, Smit P, Willemse J, Bisseling T, Geurts R. 2003.** LysM Domain Receptor Kinases Regulating Rhizobial Nod Factor-Induced Infection. *Science* **302**: 630–633.
- Loake G, Grant M. 2007.** Salicylic acid in plant defence—the players and protagonists. *Current Opinion in Plant Biology* **10**: 466–472.
- Lodwig EM, Hosie AHF, Bourdès A, et al., 2003.** Amino-acid cycling drives nitrogen fixation in the legume–Rhizobium symbiosis. *Nature* **422**: 722–726.
- López-Bucio J, Cruz-Ramírez A, Herrera-Estrella L. 2003.** The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Current Opinion in Plant Biology* **6**: 280–287.
- Love MI, Huber W, Anders S. 2014.** Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology* **15**: 550.
- Lynch JP. 2015.** Root phenes that reduce the metabolic costs of soil exploration: opportunities for 21st century agriculture. *Plant, Cell & Environment* **38**: 1775–1784.
- Madsen EB, Madsen LH, Radutoiu S, et al., 2003.** A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. *Nature* **425**: 637–640.
- Mafakheri A, Siosemardeh A, Bahramnejad B, Struik PC, Sohrabi Y. 2011.** Effect of drought stress and subsequent recovery on protein, carbohydrate contents, catalase and peroxidase activities in three chickpea (*Cicer arietinum*) cultivars. *Australian Journal of Crop Science* **5**: 1255.
- Mahieu S, Germon F, Aveline A, Hauggaard-Nielsen H, Ambus P, Jensen ES. 2009.** The influence of water stress on biomass and N accumulation, N partitioning between above and below ground parts and on N rhizodeposition during reproductive growth of pea (*Pisum sativum* L.). *Soil Biology and Biochemistry* **41**: 380–387.
- Malamy JE. 2005.** Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture. *Plant, Cell & Environment* **28**: 67–77.
- Malamy JE, Benfey PN. 1997.** Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* **124**: 33–44.
- Malekpoor Mansoorkhani F, Seymour GB, Swarup R, Moeiniyan Bagheri H, Ramsey RJL, Thompson AJ. 2014.** Environmental, developmental, and genetic factors controlling root system architecture. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* **30**: 95–112.
- Mao X, Zhang H, Qian X, Li A, Zhao G, Jing R. 2012.** TaNAC2, a NAC-type wheat transcription factor conferring enhanced multiple abiotic stress tolerances in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* **63**: 2933–2946.
- Marino D, González EM, Arrese-Igor C. 2006.** Drought effects on carbon and nitrogen metabolism of pea nodules can be mimicked by paraquat: evidence for the occurrence of two regulation pathways under oxidative stresses. *Journal of Experimental Botany* **57**: 665–673.
- Maróti G, Downie JA, Kondorosi É. 2015.** Plant cysteine-rich peptides that inhibit pathogen growth and control rhizobial differentiation in legume nodules. *Current Opinion in Plant Biology* **26**: 57–63.
- Martin FM, Uroz S, Barker DG. 2017.** Ancestral alliances: Plant mutualistic symbioses with fungi and bacteria. *Science* **356**: eaad4501.

- Martínez-Abarca F, Herrera-Cervera JA, Bueno P, Sanjuan J, Bisseling T, Olivares J. 1998.** Involvement of Salicylic Acid in the Establishment of the *Rhizobium meliloti* - Alfalfa Symbiosis. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **11**: 153–155.
- Maruyama K, Todaka D, Mizoi J, et al., 2012.** Identification of cis-acting promoter elements in cold- and dehydration-induced transcriptional pathways in Arabidopsis, rice, and soybean. *DNA research: an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes* **19**: 37–49.
- Masson-Boivin C, Giraud E, Perret X, Batut J. 2009.** Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? *Trends in Microbiology* **17**: 458–466.
- Maurel C, Chrispeels MJ. 2001.** Aquaporins. A molecular entry into plant water relations. *Plant Physiology* **125**: 135–138.
- Maury P, Langlade N, Grieu P, et al., 2011.** Ecophysiologie et génétique de la tolérance à la sécheresse chez le tournesol. *Innovations Agronomiques* **14**: 123–138.
- McPhee K. 2005.** Variation for Seedling Root Architecture in the Core Collection of Pea Germplasm. *Crop Science* **45**: 1758–1763.
- Meyer E, Aspinwall MJ, Lowry DB, et al., 2014.** Integrating transcriptional, metabolomic, and physiological responses to drought stress and recovery in switchgrass (*Panicum virgatum* L.). *BMC Genomics* **15**: 527.
- Miao Z, Han Z, Zhang T, Chen S, Ma C. 2017.** A systems approach to a spatio-temporal understanding of the drought stress response in maize. *Scientific Reports* **7**: 6590.
- Middleton PH, Jakab J, Penmetsa RV, et al., 2007.** An ERF Transcription Factor in *Medicago truncatula* That Is Essential for Nod Factor Signal Transduction. *The Plant Cell* **19**: 1221–1234.
- Misra BB, Langefeld C, Olivier M, Cox LA. 2019.** Integrated omics: tools, advances and future approaches. *Journal of Molecular Endocrinology*: R21–R45.
- Mittler R, Zilinskas BA. 1994.** Regulation of pea cytosolic ascorbate peroxidase and other antioxidant enzymes during the progression of drought stress and following recovery from drought. *The Plant Journal* **5**: 397–405.
- Mohd-Radzman NA, Djordjevic MA, Imin N. 2013.** Nitrogen modulation of legume root architecture signaling pathways involves phytohormones and small regulatory molecules. *Frontiers in Plant Science* **4**.
- Moreau D, Burstin J, Aubert G, et al., 2012.** Using a physiological framework for improving the detection of quantitative trait loci related to nitrogen nutrition in *Medicago truncatula*. *Theoretical and Applied Genetics* **124**: 755–768.
- Mortier V, De Wever E, Vuylsteke M, Holsters M, Goormachtig S. 2012.** Nodule numbers are governed by interaction between CLE peptides and cytokinin signaling: CLE peptide signaling in nodulation. *The Plant Journal* **70**: 367–376.
- Mortier V, Herder GD, Whitford R, et al., 2010.** CLE Peptides Control *Medicago truncatula* Nodulation Locally and Systemically. *Plant Physiology* **153**: 222–237.
- Mortier V, Holsters M, Goormachtig S. 2012.** Never too many? How legumes control nodule numbers. *Plant, Cell & Environment* **35**: 245–258.
- Moschen S, Di Rienzo JA, Higgins J, et al., 2017.** Integration of transcriptomic and

- metabolic data reveals hub transcription factors involved in drought stress response in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Molecular Biology* **94**: 549–564.
- Muchhal US, Pardo JM, Raghothama KG. 1996.** Phosphate transporters from the higher plant *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**: 10519–10523.
- Munier-Jolain N, Biarnès V, Chaillet I, Lecoœur J. 2005.** *Agrophysiologie du pois protéagineux*. Editions Quae.
- Munier-Jolain N, Carrouee B. 2003.** Considering pea in sustainable agriculture: agricultural and environmental arguments. *Cahiers d'Etudes et de Recherches Francophones Agricultures (France)*.
- Müssig C, Shin G-H, Altmann T. 2003.** Brassinosteroids Promote Root Growth in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **133**: 1261–1271.
- Mylona P, Pawlowski K, Bisseling T. 1995.** Symbiotic Nitrogen Fixation. *The Plant Cell* **7**: 869–885.
- Nadeem M, Li J, Yahya M, Sher A, Ma C, Wang X. 2019.** Research Progress and Perspective on Drought Stress in Legumes: A Review. *International Journal of Molecular Sciences* **20**: 2541.
- Nagata M, Suzuki A. 2014.** Effects of Phytohormones on Nodulation and Nitrogen Fixation in Leguminous Plants. *Advances in Biology and Ecology of Nitrogen Fixation*.
- Nagatani H, Shimizu M, Valentine RC. 1971.** The mechanism of ammonia assimilation in nitrogen fixing Bacteria. *Archiv Fur Mikrobiologie* **79**: 164–175.
- Nallu S, Silverstein KAT, Samac DA, Bucciarelli B, Vance CP, VandenBosch KA. 2013.** Regulatory Patterns of a Large Family of Defensin-Like Genes Expressed in Nodules of *Medicago truncatula*. *PLOS ONE* **8**: e60355.
- Nasr Esfahani M, Sulieman S, Schulze J, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Tran L-SP. 2014.** Mechanisms of physiological adjustment of N₂ fixation in *Cicer arietinum* L. (chickpea) during early stages of water deficit: single or multi-factor controls. *The Plant Journal* **79**: 964–980.
- Naya L, Ladrera R, Ramos J, et al., 2007.** The Response of Carbon Metabolism and Antioxidant Defenses of Alfalfa Nodules to Drought Stress and to the Subsequent Recovery of Plants. *PLANT PHYSIOLOGY* **144**: 1104–1114.
- Neo HH, Layzell DB. 1997.** Phloem glutamine and the regulation of O₂ diffusion in legume nodules. *Plant Physiology* **113**: 259–267.
- Nishida H, Handa Y, Tanaka S, Suzaki T, Kawaguchi M. 2016.** Expression of the CLE-RS3 gene suppresses root nodulation in *Lotus japonicus*. *Journal of Plant Research* **129**: 909–919.
- Nishida H, Suzaki T. 2018.** Nitrate-mediated control of root nodule symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology* **44**: 129–136.
- Nishiyama R, Watanabe Y, Fujita Y, et al., 2011.** Analysis of Cytokinin Mutants and Regulation of Cytokinin Metabolic Genes Reveals Important Regulatory Roles of Cytokinins in Drought, Salt and Abscisic Acid Responses, and Abscisic Acid Biosynthesis. *The Plant Cell* **23**: 2169–2183.

- Noctor G, Foyer CH. 1998.** ASCORBATE AND GLUTATHIONE: Keeping Active Oxygen Under Control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**: 249–279.
- Novak K, Lisá L, Škrdleta V. 2011.** Pleiotropy of pea RisfixC supernodulation mutation is symbiosis-independent. *Plant and Soil* **342**: 173–182.
- Oh S-J, Song SI, Kim YS, et al., 2005.** Arabidopsis CBF3/DREB1A and ABF3 in transgenic rice increased tolerance to abiotic stress without stunting growth. *Plant Physiology* **138**: 341–351.
- Oka-Kira E, Tateno K, Miura K, et al., 2005.** klavier (klv), A novel hypernodulation mutant of *Lotus japonicus* affected in vascular tissue organization and floral induction. *The Plant Journal* **44**: 505–515.
- Okamoto S, Ohnishi E, Sato S, et al., 2009.** Nod Factor/Nitrate-Induced CLE Genes that Drive HAR1-Mediated Systemic Regulation of Nodulation. *Plant and Cell Physiology* **50**: 67–77.
- Oldroyd GED. 2007.** PLANT SCIENCE: Nodules and Hormones. *Science* **315**: 52–53.
- Oldroyd GED, Downie JA. 2004.** Calcium, kinases and nodulation signalling in legumes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **5**: 566–576.
- Oldroyd GED, Engstrom EM, Long SR. 2001.** Ethylene Inhibits the Nod Factor Signal Transduction Pathway of *Medicago truncatula*. *Plant cell* **13**: 1835–1849.
- Palma F, López-Gómez M, Tejera NA, Lluch C. 2013.** Salicylic acid improves the salinity tolerance of *Medicago sativa* in symbiosis with *Sinorhizobium meliloti* by preventing nitrogen fixation inhibition. *Plant Science* **208**: 75–82.
- Parreira JR, Branco D, Almeida AM, et al., 2016.** Systems Biology Approaches to Improve Drought Stress Tolerance in Plants: State of the Art and Future Challenges In: Hossain MA, Wani SH, Bhattacharjee S, Burritt DJ, Tran L-SP, eds. *Drought Stress Tolerance in Plants, Vol 2: Molecular and Genetic Perspectives*. Cham: Springer International Publishing, 433–471.
- Parthasarathy A, Cross PJ, Dobson RCJ, Adams LE, Savka MA, Hudson AO. 2018.** A Three-Ring Circus: Metabolism of the Three Proteogenic Aromatic Amino Acids and Their Role in the Health of Plants and Animals. *Frontiers in Molecular Biosciences* **5**: 29.
- Pascual MB, El-Azaz J, de la Torre FN, Cañas RA, Avila C, Cánovas FM. 2016.** Biosynthesis and Metabolic Fate of Phenylalanine in Conifers. *Frontiers in Plant Science* **7**.
- Peleg Z, Blumwald E. 2011.** Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants. *Current Opinion in Plant Biology* **14**: 290–295.
- Peleg-Grossman S, Melamed-Book N, Levine A. 2012.** ROS production during symbiotic infection suppresses pathogenesis-related gene expression. *Plant Signaling & Behavior* **7**: 409–415.
- Péret B, De Rybel B, Casimiro I, et al., 2009.** Arabidopsis lateral root development: an emerging story. *Trends in Plant Science* **14**: 399–408.
- Pinu FR, Beale DJ, Paten AM, et al., 2019.** Systems Biology and Multi-Omics Integration: Viewpoints from the Metabolomics Research Community. *Metabolites* **9**: 76.

- Plet J, Wasson A, Ariel F, et al., 2011.** MtCRE1-dependent cytokinin signaling integrates bacterial and plant cues to coordinate symbiotic nodule organogenesis in *Medicago truncatula*: Hormonal interactions in nodulation. *The Plant Journal* **65**: 622–633.
- Ployet R, Veneziano Labate MT, Regiani Cataldi T, et al., 2019.** A systems biology view of wood formation in *Eucalyptus grandis* trees submitted to different potassium and water regimes. *New Phytologist* **223**: 766–782.
- Popp M, Smirnoff N. 1995.** Polyol accumulation and metabolism during water deficit. *Environment and Plant Metabolism : Flexibility and Acclimation*: 199–215.
- Price AH, Tomos AD. 1997.** Genetic dissection of root growth in rice (*Oryza sativa* L.).II: mapping quantitative trait loci using molecular markers. *Theoretical and Applied Genetics* **95**: 143–152.
- Prudent M, Salon C, Smith DL, Emery RJN. 2016.** Nod factor supply under water stress conditions modulates cytokinin biosynthesis and enhances nodule formation and N nutrition in soybean. *Plant Signaling & Behavior* **11**: e1212799.
- Prudent M, Vernoud V, Girodet S, Salon C. 2016.** How nitrogen fixation is modulated in response to different water availability levels and during recovery: A structural and functional study at the whole plant level. *Plant and Soil* **399**: 1–12.
- Qi J, Sun S, Yang L, Li M, Ma F, Zou Y. 2019.** Potassium Uptake and Transport in Apple Roots Under Drought Stress. *Horticultural Plant Journal* **5**: 10–16.
- Radutoiu S, Madsen LH, Madsen EB, et al., 2003.** Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature* **425**: 585–592.
- Rauf S, Sadaqat HA. 2008.** Identification of physiological traits and genotypes combined to high achene yield in sunflower (*Helianthus annuus* L.) under contrasting water regimes. *Australian Journal of Crop Science* **1**: 23–30.
- Redillas MCFR, Jeong JS, Kim YS, et al., 2012.** The overexpression of OsNAC9 alters the root architecture of rice plants enhancing drought resistance and grain yield under field conditions. *Plant Biotechnology Journal* **10**: 792–805.
- Reguera M, Peleg Z, Abdel-Tawab YM, Tumimbang EB, Delatorre CA, Blumwald E. 2013.** Stress-Induced Cytokinin Synthesis Increases Drought Tolerance through the Coordinated Regulation of Carbon and Nitrogen Assimilation in Rice. *Plant physiology* **163**: 1609–1622.
- Reichert RD, MacKenzie SL. 1982.** Composition of peas (*Pisum sativum*) varying widely in protein content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **30**: 312–317.
- Reid DE, Ferguson BJ, Gresshoff PM. 2011.** Inoculation- and Nitrate-Induced CLE Peptides of Soybean Control NARK-Dependent Nodule Formation. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **24**: 606–618.
- Rellán-Álvarez R, Lobet G, Lindner H, et al., 2015.** GLO-Roots: an imaging platform enabling multidimensional characterization of soil-grown root systems (MJ Harrison, Ed.). *eLife* **4**: e07597.
- Rengel D, Arribat S, Maury P, et al., 2012.** A Gene-Phenotype Network Based on Genetic Variability for Drought Responses Reveals Key Physiological Processes in Controlled and Natural Environments (M Bendahmane, Ed.). *PLoS ONE* **7**: e45249.
- Rhijn P van, Vanderleyden J. 1995.** The Rhizobium-plant symbiosis. *Microbiological Reviews* **59**: 124–142.

- Rowe JH, Topping JF, Liu J, Lindsey K. 2016.** Abscisic acid regulates root growth under osmotic stress conditions via an interacting hormonal network with cytokinin, ethylene and auxin. *New Phytologist* **211**: 225–239.
- Ruffel S, Freixes S, Balzergue S, et al., 2008.** Systemic Signaling of the Plant Nitrogen Status Triggers Specific Transcriptome Responses Depending on the Nitrogen Source in *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* **146**: 2020–2035.
- Sakakibara H. 2010.** Cytokinin Biosynthesis and Metabolism In: Davies PJ, ed. *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!*. Dordrecht: Springer Netherlands, 95–114.
- Salon C, Munier-Jolain NG, Duc G, et al., 2001.** Grain legume seed filling in relation to nitrogen acquisition: A review and prospects with particular reference to pea. *Agronomie* **21**: 539–552.
- Sánchez-Blanco MJ, Álvarez S, Ortuño MF, Ruiz-Sánchez MC. 2014.** Root System Response to Drought and Salinity: Root Distribution and Water Transport In: Morte A, Varma A, eds. *Root Engineering*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 325–352.
- Sasaki T, Suzaki T, Soyano T, Kojima M, Sakakibara H, Kawaguchi M. 2014.** Shoot-derived cytokinins systemically regulate root nodulation. *Nature Communications* **5**: 1–9.
- Schenk HJ, Jackson RB. 2002.** The Global Biogeography of Roots. *Ecological Monographs* **72**: 311–328.
- Scheres B, Engelen F van, Knaap E van der, Wiel C van de, Kammen A van, Bisseling T. 1990.** Sequential induction of nodulin gene expression in the developing pea nodule. *The Plant Cell* **2**: 687–700.
- Schiltz S, Munier-Jolain N, Jeudy C, Burstin J, Salon C. 2005.** Dynamics of Exogenous Nitrogen Partitioning and Nitrogen Remobilization from Vegetative Organs in Pea Revealed by ¹⁵N in Vivo Labeling throughout Seed Filling. *Plant Physiology* **137**: 1463–1473.
- Schnabel E, Journet E-P, de Carvalho-Niebel F, Duc G, Frugoli J. 2005.** The *Medicago truncatula* SUNN gene encodes a CLV1-like leucine-rich repeat receptor kinase that regulates nodule number and root length. *Plant Molecular Biology* **58**: 809–822.
- Schulze E-D, Robichaux RH, Grace J, Rundel PW, Ehleringer JR. 1987.** Plant water balance. *BioScience* **37**: 30–37.
- Seo SY, Kim YJ, Park KY. 2019.** Increasing Polyamine Contents Enhances the Stress Tolerance via Reinforcement of Antioxidative Properties. *Frontiers in Plant Science* **10**: 1331.
- Seo PJ, Xiang F, Qiao M, et al., 2009.** The MYB96 Transcription Factor Mediates Abscisic Acid Signaling during Drought Stress Response in Arabidopsis. *Plant Physiology* **151**: 275–289.
- Serraj R, Sinclair T, Purcell LC. 1999.** *Symbiotic N₂ fixation response to drought*. <http://jxb.oxfordjournals.org/content/50/331/143.full.pdf+html>. 16 Nov. 2016.
- Sharma R, Singh G, Bhattacharya S, Singh A. 2018.** Comparative transcriptome meta-analysis of *Arabidopsis thaliana* under drought and cold stress (I-F Chang, Ed.). *PLOS ONE* **13**: e0203266.

- Shi H, Chen L, Ye T, Liu X, Ding K, Chan Z. 2014.** Modulation of auxin content in Arabidopsis confers improved drought stress resistance. *Plant Physiology and Biochemistry* **82**: 209–217.
- da Silva EC, Nogueira RJC, da Silva MA, de Albuquerque MB. 2011.** Drought Stress and Plant Nutrition. *Plant stress*.
- Sinclair TR, Zimet AR, Muchow RC. 1988.** Changes in soybean nodule number and dry weight in response to drought. *Field Crops Research* **18**: 197–202.
- Singh D, Laxmi A. 2015.** Transcriptional regulation of drought response: a tortuous network of transcriptional factors. *Frontiers in Plant Science* **6**.
- Siopongco JDLC, Yamauchi A, Salekdeh H, Bennett J, Wade LJ. 2006.** Growth and Water Use Response of Doubled-Haploid Rice Line to Drought and Rewatering during the Vegetative Stage. *Plant Production Science* **9**: 141–151.
- Smirnoff N. 1998.** Plant resistance to environmental stress. *Current Opinion in Biotechnology* **9**: 214–219.
- Smýkal P, Coyne CJ, Ambrose MJ, et al., 2015.** Legume Crops Phylogeny and Genetic Diversity for Science and Breeding. *Critical Reviews in Plant Sciences* **34**: 43–104.
- Soto MJ, Domínguez-Ferreras A, Pérez-Mendoza D, Sanjuán J, Olivares J. 2009.** Mutualism versus pathogenesis: the give-and-take in plant-bacteria interactions. *Cellular Microbiology* **11**: 381–388.
- Stacey G, McAlvin CB, Kim S-Y, Olivares J, Soto MJ. 2006.** Effects of Endogenous Salicylic Acid on Nodulation in the Model Legumes *Lotus japonicus* and *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* **141**: 1473–1481.
- Stagnari F, Maggio A, Galieni A, Pisante M. 2017.** Multiple benefits of legumes for agriculture sustainability: an overview. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture* **4**: 2.
- Steudle E. 2001.** The cohesion-tension mechanism and the acquisition of water by plant roots. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**: 847–875.
- Stoate C, Boatman ND, Borralho RJ, Carvalho CR, Snoo GR de, Eden P. 2001.** Ecological impacts of arable intensification in Europe. *Journal of Environmental Management* **63**: 337–365.
- Stracke S, Kistner C, Yoshida S, et al., 2002.** A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. *Nature* **417**: 959–962.
- Streeter JG. 2003.** Effects of drought on nitrogen fixation in soybean root nodules. *Plant, Cell & Environment* **26**: 1199–1204.
- Striker GG. 2012.** Time is on our side: the importance of considering a recovery period when assessing flooding tolerance in plants. *Ecological Research* **27**: 983–987.
- Suliman SAR. 2009.** Physiological regulation of symbiotic N₂ fixation in the model legume.
- Sun J, Cardoza V, Mitchell DM, Bright L, Oldroyd G, Harris JM. 2006.** Crosstalk between jasmonic acid, ethylene and Nod factor signaling allows integration of diverse inputs for regulation of nodulation. *The Plant Journal* **46**: 961–970.
- Sun C, Gao X, Chen X, Fu J, Zhang Y. 2016.** Metabolic and growth responses of maize to

- successive drought and re-watering cycles. *Agricultural Water Management* **172**: 62–73.
- Suzaki T, Yoro E, Kawaguchi M. 2015.** Chapter Three - Leguminous Plants: Inventors of Root Nodules to Accommodate Symbiotic Bacteria In: Jeon KW, ed. *International Review of Cell and Molecular Biology*. Academic Press, 111–158.
- Suzuki A, Suriyagoda L, Shigeyama T, et al., 2011.** Lotus japonicus nodulation is photomorphogenetically controlled by sensing the red/far red (R/FR) ratio through jasmonic acid (JA) signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**: 16837–16842.
- Takahara M, Magori S, Soyano T, et al., 2013.** TOO MUCH LOVE, a Novel Kelch Repeat-Containing F-box Protein, Functions in the Long-Distance Regulation of the Legume–Rhizobium Symbiosis. *Plant and Cell Physiology* **54**: 433–447.
- Tanimoto E. 2005.** Regulation of Root Growth by Plant Hormones—Roles for Auxin and Gibberellin. *Critical Reviews in Plant Sciences* **24**: 249–265.
- Tanimoto M, Roberts K, Dolan L. 1995.** Ethylene is a positive regulator of root hair development in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **8**: 943–948.
- Tardieu F. 2012.** Any trait or trait-related allele can confer drought tolerance: just design the right drought scenario. *Journal of Experimental Botany* **63**: 25–31.
- Tardieu F, Draye X, Javaux M. 2017.** Root Water Uptake and Ideotypes of the Root System: Whole-Plant Controls Matter. *Vadose Zone Journal* **16**.
- Tardieu F, Granier C, Muller B. 2011.** Water deficit and growth. Co-ordinating processes without an orchestrator? *Current Opinion in Plant Biology* **14**: 283–289.
- Tardieu F, Simonneau T. 1998.** Variability among species of stomatal control under fluctuating soil water status and evaporative demand: modelling isohydric and anisohydric behaviours. *Journal of Experimental Botany* **49**: 419–432.
- Terres Univia. 2018.** Chiffres clés 2017 : Plantes riches en protéines.
- Tilman D, Cassman KG, Matson PA, Naylor R, Polasky S. 2002.** Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* **418**: 671–677.
- Timmers AC, Auriac MC, Truchet G. 1999.** Refined analysis of early symbiotic steps of the Rhizobium-Medicago interaction in relationship with microtubular cytoskeleton rearrangements. *Development* **126**: 3617–3628.
- Tirichine L, Imaizumi-Anraku H, Yoshida S, et al., 2006.** Dereglulation of a Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase leads to spontaneous nodule development. *Nature* **441**: 1153–1156.
- Tjørve KMC, Tjørve E. 2017.** The use of Gompertz models in growth analyses, and new Gompertz-model approach: An addition to the Unified-Richards family (RMH Merks, Ed.). *PLOS ONE* **12**: e0178691.
- Tominaga A, Nagata M, Futsuki K, et al., 2009.** Enhanced Nodulation and Nitrogen Fixation in the Abscisic Acid Low-Sensitive Mutant *enhanced nitrogen fixation1* of *Lotus japonicus*. *Plant Physiology* **151**: 1965–1976.
- Toro A. 1996.** Nodulation competitiveness in the Rhizobium-legume symbiosis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **12**: 157–162.
- Tricot F, Crozat Y, Pellerin S. 1997.** Root system growth and nodule establishment on pea

- (*Pisum sativum* L.). *Journal of Experimental Botany* **48**: 1935–1941.
- Tron S, Bodner G, Laio F, Ridolfi L, Leitner D. 2015.** Can diversity in root architecture explain plant water use efficiency? A modeling study. *Ecological Modelling* **312**: 200–210.
- Ubeda-Tomás S, Beemster GTS, Bennett MJ. 2012.** Hormonal regulation of root growth: integrating local activities into global behaviour. *Trends in Plant Science* **17**: 326–331.
- Ubeda-Tomás S, Federici F, Casimiro I, et al., 2009.** Gibberellin Signaling in the Endodermis Controls Arabidopsis Root Meristem Size. *Current Biology* **19**: 1194–1199.
- Ubeda-Tomás S, Swarup R, Coates J, et al., 2008.** Root growth in Arabidopsis requires gibberellin/DELLA signalling in the endodermis. *Nature Cell Biology* **10**: 625–628.
- Udvardi MK, Day DA. 1997.** Metabolite Transport Across Symbiotic Membranes of Legume Nodules. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**: 493–523.
- Uga Y, Sugimoto K, Ogawa S, et al., 2013.** Control of root system architecture by DEEPER ROOTING 1 increases rice yield under drought conditions. *Nature Genetics* **45**: 1097–1102.
- Uheda E, Syōno K. 1982.** Physiological Role of Leghaemoglobin Heterogeneity in Pea Root Nodule Development. *Plant and Cell Physiology* **23**: 75–84.
- Vadez V, Berger JD, Warkentin T, et al., 2012.** Adaptation of grain legumes to climate change: a review. *Agronomy for Sustainable Development* **32**: 31–44.
- Vadez V, Sinclair TR, Serraj R. 2000.** Asparagine and ureide accumulation in nodules and shoots as feedback inhibitors of N₂ fixation in soybean. *Physiologia Plantarum* **110**: 215–223.
- van Zeijl A, Op den Camp RHM, Deinum EE, et al., 2015.** Rhizobium Lipochitooligosaccharide Signaling Triggers Accumulation of Cytokinins in *Medicago truncatula* Roots. *Molecular Plant* **8**: 1213–1226.
- Vasse J, de Billy F, Camut S, Truchet G. 1990.** Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules. *Journal of Bacteriology* **172**: 4295–4306.
- Verma V, Ravindran P, Kumar PP. 2016.** Plant hormone-mediated regulation of stress responses. *BMC Plant Biology* **16**: 86.
- Voisin A-S, Guéguen J, Huyghe C, et al., 2013.** Les légumineuses dans l'Europe du XXI^e siècle: Quelle place dans les systèmes agricoles et alimentaires actuels et futurs? Quels nouveaux défis pour la recherche? : 31.
- Voisin A-S, Munier-Jolain NG, Salon C. 2010.** The nodulation process is tightly adjusted to plant growth. An analysis using environmentally and genetically induced variation of nodule number and biomass in pea. *Plant and Soil* **337**: 399–412.
- Voisin A-S, Prudent M, Duc G, Salon C. 2015.** Pea nodule gradients explain N nutrition and limited symbiotic fixation in hypernodulating mutants. *Agronomy for Sustainable Development* **35**: 1529–1540.
- Voisin AS, Salon C, Jeudy C, Warembourg FR. 2003a.** Root and nodule growth in *Pisum sativum* L. in relation to photosynthesis: analysis using ¹³C-labelling. *Annals of Botany* **92**: 557–563.

- Voisin AS, Salon C, Jeudy C, Warembourg FR. 2003b.** Seasonal Patterns of ¹³C Partitioning Between Shoots and Nodulated Roots of N₂- or Nitrate-fed *Pisum sativum* L. *Annals of Botany* **91**: 539–546.
- Voisin AS, Salon C, Jeudy C, Warembourg FR. 2003c.** Symbiotic N₂ fixation activity in relation to C economy of *Pisum sativum* L. as a function of plant phenology. *Journal of Experimental Botany* **54**: 2733–2744.
- Voisin A-S, Salon C, Munier-Jolain NG, Ney B. 2002a.** Effect of mineral nitrogen on nitrogen nutrition and biomass partitioning between the shoot and roots of pea (*Pisum sativum* L.). : 12.
- Voisin A-S, Salon C, Munier-Jolain NG, Ney B. 2002b.** Quantitative effects of soil nitrate, growth potential and phenology on symbiotic nitrogen fixation of pea (*Pisum sativum* L.). *Plant and Soil* **243**: 31–42.
- Wang Y-Y, Hsu P-K, Tsay Y-F. 2012.** Uptake, allocation and signaling of nitrate. *Trends in Plant Science* **17**: 458–467.
- Warembourg FR. 1983.** Estimating the true cost of dinitrogen fixation by nodulated plants in undisturbed conditions. *Canadian Journal of Microbiology* **29**: 930–937.
- Wasaya A, Zhang X, Fang Q, Yan Z. 2018.** Root Phenotyping for Drought Tolerance: A Review. *Agronomy* **8**: 241.
- van der Weele CM, Spollen WG, Sharp RE, Baskin TI. 2000.** Growth of *Arabidopsis thaliana* seedlings under water deficit studied by control of water potential in nutrient-agar media. *Journal of Experimental Botany* **51**: 1555–1562.
- Werner T, Nehnevajova E, Köllmer I, et al., 2010.** Root-Specific Reduction of Cytokinin Causes Enhanced Root Growth, Drought Tolerance, and Leaf Mineral Enrichment in *Arabidopsis* and Tobacco. *The Plant Cell* **22**: 3905–3920.
- Wezel A, Bellon S, Doré T, Francis C, Vallod D, David C. 2009.** Agroecology as a science, a movement and a practice. A review. *Agronomy for Sustainable Development* **29**: 503–515.
- Xiao TT, Schilderink S, Moling S, et al., 2014.** Fate map of *Medicago truncatula* root nodules. *Development* **141**: 3517–3528.
- Xu Z, Zhou G, Shimizu H. 2010.** Plant responses to drought and rewatering. *Plant Signaling & Behavior* **5**: 649–654.
- Yahyaoui FE, Küster H, Amor BB, et al., 2004.** Expression Profiling in *Medicago truncatula* Identifies More Than 750 Genes Differentially Expressed during Nodulation, Including Many Potential Regulators of the Symbiotic Program. *Plant Physiology* **136**: 3159–3176.
- Yaqoob M, Hollington PA, Mahar AB, Gurmani ZA. 2013.** Yield performance and responses studies of chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes under drought stress. *Emirates Journal of Food and Agriculture* **25**: 117–123.
- Yoshida T, Fujita Y, Maruyama K, et al., 2015.** Four *Arabidopsis* AREB/ABF transcription factors function predominantly in gene expression downstream of SnRK2 kinases in abscisic acid signalling in response to osmotic stress. *Plant, Cell & Environment* **38**: 35–49.
- Yoshimoto N, Inoue E, Saito K, Yamaya T, Takahashi H. 2003.** Phloem-Localizing Sulfate Transporter, Sultr1;3, Mediates Re-Distribution of Sulfur from Source to Sink

- Organs in Arabidopsis. *Plant Physiology* **131**: 1511–1517.
- Yoshimoto N, Takahashi H, Smith FW, Yamaya T, Saito K. 2002.** Two distinct high-affinity sulfate transporters with different inducibilities mediate uptake of sulfate in Arabidopsis roots. *The Plant Journal* **29**: 465–473.
- Yousfi N, Saïdi I, Slama I, Abdelly C. 2015.** Phenology, leaf gas exchange, growth and seed yield in *Medicago polymorpha* L. populations affected by water deficit and subsequent recovery. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* **214**: 50–60.
- Zahran HH. 1999.** Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiology and molecular biology reviews* **63**: 968–989.
- Zeihner C, Egli DB, Leggett JE, Reicoskf DA. 1982.** Cultivar Differences in N Redistribution in Soybeans'. *Agronomy Journal* **74**: 375–379.
- Zenis A, Kantartzi S, Meksem K, Kassem A. 2016.** Influence of Drought Stress on Several Root Traits and their Correlation with Seed Protein and Oil Contents in Soybean. *Atlas Journal of Biology*: 267–273.
- Zhan A, Schneider H, Lynch JP. 2015.** Reduced Lateral Root Branching Density Improves Drought Tolerance in Maize. *Plant Physiology* **168**: 1603–1615.
- Zhang J-Y, Cruz De Carvalho MH, Torres-Jerez I, et al., 2014.** Global reprogramming of transcription and metabolism in *Medicago truncatula* during progressive drought and after rewatering. *Plant, Cell & Environment* **37**: 2553–2576.
- Zhang H, Han W, Smet ID, et al., 2010.** ABA promotes quiescence of the quiescent centre and suppresses stem cell differentiation in the Arabidopsis primary root meristem. *The Plant Journal* **64**: 764–774.
- Zhang S-W, Li C-H, Cao J, et al., 2009.** Altered Architecture and Enhanced Drought Tolerance in Rice via the Down-Regulation of Indole-3-Acetic Acid by *TLDI* / *OsGH3.13* Activation. *Plant Physiology* **151**: 1889–1901.
- Zhang Lina, Zhang Lichao, Xia C, et al., 2015.** A novel wheat bZIP transcription factor, TabZIP60, confers multiple abiotic stress tolerances in transgenic Arabidopsis. *Physiologia Plantarum* **153**: 538–554.
- Zhukov V, Radutoiu S, Madsen LH, et al., 2008.** The Pea Sym37 Receptor Kinase Gene Controls Infection-Thread Initiation and Nodule Development. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **21**: 1600–1608.
- Zuber H, Poignavent G, Signor CL, et al., 2013.** Legume adaptation to sulfur deficiency revealed by comparing nutrient allocation and seed traits in *Medicago truncatula*. *The Plant Journal* **76**: 982–996.

Valorisation des travaux issus de la thèse

Articles

Mégane Couchoud, Sylvie Girodet, Vanessa Vernoud, Christophe Salon, Marion Prudent - How does pea (*Pisum sativum*) recover from water deficit? (2019). ILS3 highlighted nice results and challenging opportunities for innovative research on grain legume. **Legume Perspective, 18, sous presse. Revue sans comité de lecture**

Mégane Couchoud, Christophe Salon, Sylvie Girodet, Christian Jeudy, Vanessa Vernoud, Marion Prudent - Fine-tuning of nodulation is required for an efficient post-drought recovery in pea. (2019). **Frontiers in Plant Science.**

Communications orales

Mégane Couchoud, Marion Prudent, Vanessa Vernoud, Christophe Salon – Analyse écophysiological de la récupération après un stress hydrique chez la légumineuse à graine *Pisum sativum* – Forum Jeunes Chercheurs, Besançon, France – 14/06/2018

Mégane Couchoud, Marion Prudent, Vanessa Vernoud, Christophe Salon – How does pea (*Pisum sativum*) recover from drought ? – Journée des doctorants du département BAP de l'INRA, Paris, France – 20-21/09/2018

Mégane Couchoud, Marion Prudent, Vanessa Vernoud, Christophe Salon – Analyse écophysiological de la récupération après un stress hydrique chez la légumineuse à graine *Pisum sativum* – RFL #2 (2ème Rencontres Francophone des Légumineuses), Toulouse, France – 17-18/10/2018

Mégane Couchoud, Sylvie Girodet, Vanessa Vernoud, Christophe Salon, Marion Prudent - How does pea (*Pisum sativum*) recover from water deficit ? – Journée des doctorants de l'UMR Agroécologie, Dijon, France – 30/04/2019

Mégane Couchoud, Sylvie Girodet, Vanessa Vernoud, Christophe Salon, Marion Prudent - How does pea (*Pisum sativum*) recover from water deficit? – Third international legume society (ILS #3), Poznan, Poland – 30/04/2019

Prudent, M., **Couchoud, M.**, Jacques, C., Jeudy, C., Girodet, S., Rossin, N., Aubert, G., Bourion, V., Vernoud, V., Salon, C. (2019). Le système racinaire nodulé du pois : un rôle pivot pour sa stabilité sous contraintes hydriques fluctuantes. Presented at Root Days, système racinaire, Interactions Rhizosphériques, Immunité végétale, Rouen, FRA (2019-09-19 - 2019-09-20).

Posters

Mégane Couchoud, Marion Prudent, Vanessa Vernoud, Christophe Salon - Comment la plante récupère-t-elle après un stress hydrique? Une étude écophysiological et moléculaire chez la légumineuse à graines *Pisum sativum* – Journée des doctorants de l'UMR Agroécologie, Dijon, France – 10/04/2017

Mégane Couchoud, Marion Prudent, Morgane Térézol, Jonathan Kreplak, Sophie Valière, Gilles Clément, Christophe Salon, Vanessa Vernoud - Transcriptomic and metabolomic responses of the nodulated pea root system during water deficit recovery – Third International conference on legume genetics and genomics (ICLGG), Dijon, France – 13-17/05/2019

Annexes

Annexe 1 : Article de stage de Master 2

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Drought stress stimulates endocytosis and modifies membrane lipid order of rhizodermal cells of *Medicago truncatula* in a genotype-dependent manner

Mégane Couchoud^{1†}, Christophe Der^{2†}, Sylvie Girodet¹, Vanessa Vernoud¹, Marion Prudent¹ and Nathalie Leborgne-Castel^{2*} 

Abstract

Background: Drought stress negatively affects plant growth and productivity. Plants sense soil drought at the root level but the underlying mechanisms remain unclear. At the cell level, we aim to reveal the short-term root perception of drought stress through membrane dynamics.

Results: In our study, 15 *Medicago truncatula* accessions were exposed to a polyethylene glycol (PEG)-induced drought stress, leading to contrasted ecophysiological responses, in particular related to root architecture plasticity. In the reference accession Jemalong A17, identified as drought susceptible, we analyzed lateral roots by imaging of membrane-localized fluorescent probes using confocal microscopy. We found that PEG stimulated endocytosis especially in cells belonging to the growth differentiation zone (GDZ). The mapping of membrane lipid order in cells along the root apex showed that membranes of root cap cells were more ordered than those of more differentiated cells. Moreover, PEG triggered a significant increase in membrane lipid order of rhizodermal cells from the GDZ. We initiated the membrane analysis in the drought resistant accession HM298, which did not reveal such membrane modifications in response to PEG.

Conclusions: Our data demonstrated that the plasma membranes of root cells from a susceptible genotype perceived drought stress by modulating their physical state both via a stimulation of endocytosis and a modification of the degree of lipid order, which could be proposed as mechanisms required for signal transduction.

Keywords: *Medicago truncatula*, Root architecture, PEG, Endocytosis, Order degree of the membrane, Fluorescent dyes

Background

Climate change is expected to cause more frequent and more intense episodes of drought [1]. Unfortunately, drought-induced injury is a major constraint in agriculture that limits geographic distribution and productivity of crop plants [2]. To cope with drought, plants have developed several strategies under natural selection, including numerous changes at the morphological, physiological, and biochemical levels in all plant organs (for review [3]).

Plant roots are essential organs that provide the plant with water and nutrients. They also represent the primary site for sensing drought and initiating signaling cascades to the whole plant for adequate responses. However, due to limitations on root accessibility, the influence of drought on this organ has been much less studied than aerial plant parts. Roots are organized in a fixed radial pattern of different cell types that persist throughout the root axis. The outermost cell layer is the rhizodermis that functions as a selective barrier between the root and its environment. Below is the cortex that consists of a single cell layer as in *Arabidopsis* or of several [4–6] cell layers as in *Medicago truncatula* [4]. The deepest cells are the vascular bundle cells of the stele

* Correspondence: icastel@u-bourgogne.fr; nathalie.leborgne-castel@inra.fr

[†]Mégane Couchoud and Christophe Der contributed equally to this work.

¹Agroécologie, AgroSup Dijon, INRA, University of Bourgogne, University of Bourgogne Franche-Comté, F-21000 Dijon, France

²Agroécologie, AgroSup Dijon, CNRS, INRA, University of Bourgogne, University of Bourgogne Franche-Comté, F-21000 Dijon, France



that are surrounded by single layers of pericycle and endodermis cells. Roots also display a developmental gradient along their longitudinal proximo-distal axes, with young cells being close to the root tip and the older mature cells at the root base [5]. Therefore, depending on their age, location and/or identity, root cells have diverse forms and shapes associated with specific functions for their development and stress responses [6]. During drought, one of the plant adaptations for survival is the adjustment of the root system architecture to maximize water absorption [7], but little is known about how the root perceives soil drought at an early stage to promptly respond to water stress.

The plasma membrane (PM) is the primary site of perception for responding to external abiotic stimuli [8]. Adverse environments could negatively impact the PM and this feature has been widely used to evaluate the extent of cell damage [9]. In particular, intense drought stress causes disturbance of the cell membrane leading to a loss of membrane integrity [10]. However, osmotic stress triggered by moderate water stress may modify the physical properties of membrane lipids that can be perceived by cells via sensory proteins anchored on the PM, such as receptor kinases or mechanosensitive ion channels [11]. Even though direct drought sensors have not been yet identified, environmental signals are transferred to networks of transduction pathways, with the resulting regulation of gene expression.

The barrier function of the PM and PM plasticity are thus influenced by the physical state of lipid bilayers that may make the membrane (or the cell) resistant or susceptible to environmental changes [12–14]. Indeed, PM plasticity, which corresponds to dynamics either by lateral compartmentalization or intracellular trafficking of membrane molecules, modulates the perception and transduction of environmental cues [15]. The PM contains microdomains of specific lipid composition that influence the PM protein dynamics [16, 17]. PM protein homeostasis also depends on recycling and/or degradation, two processes that are initiated by endocytosis [18].

The mechanisms underlying early cellular responses to drought impact are little studied. Their elucidation would help us to better exploit legumes, which represent a sustainable and valuable food source for humans and animals [19]. Recent studies on the impact of drought stress on the alfalfa (*Medicago sativa* L.) proteome showed a stress-induced adaptation of the plant notably by increasing the quantity of membrane proteins such as those involved in membrane trafficking or membrane modification [20–22].

One standard way to induce drought is the incorporation of polyethylene glycol (PEG) of higher molecular weight (4000 to 8000) in root medium. This non-absorbable and

non-metabolized osmotic agent induces moderate water stress by modifying the osmotic potential in a controlled manner [23]. By making less water available to the plant roots, as in a dry soil, PEG solutions are well-suited to simulate water deficit and plants are able to increase their water absorption area by stimulating lateral root (LR) development [24, 25].

In the present study, we have analyzed the impact of PEG treatment on the model legume *Medicago truncatula*. Fifteen *Medicago truncatula* accessions were phenotyped for their response to PEG treatment in a growth pouch experiment, allowing the study of overall plant growth and root architecture. On the reference accession Jemalong A17, we detected a very early (short-term) perception of PEG-induced drought stress at LR membranes of seedlings. For that purpose, we used the FM4-64 and di-4-ANEPPDHQ fluorescent probes, to monitor endocytosis and lipid order, respectively. We showed that PEG stimulated a rapid endocytosis in rhizodermal cells within 10 min and over a more prolonged period in cortical cells. We also observed a longitudinal gradient of stimulated endocytosis from root caps to elongated cells where the more the cell is mature, the more it responds. Similarly, membranes of rhizodermal cells, which presented a lower lipid order than cortical cells, were less rigid in differentiated/mature zones. In contrast, in this differentiated zone (/mature zone) the rhizodermal cells responded to PEG by increasing lipid order of their membranes. Finally, we extended our analysis to a second accession, which we showed to be PEG-resistant.

Results

PEG applied to a core-collection of *Medicago truncatula* revealed accession-dependent responses

A panel of 15 *Medicago* accessions (Table 1 and Additional file 1: Table S1) was evaluated for its response to PEG-induced drought stress. This panel included 12 inbred lines out of the 16 that constitutes a nested core collection representative of *Medicago truncatula* genetic diversity (CC16, [26]), the Jemalong A17 reference accession used for the genome sequencing effort (hereafter named A17), and two accessions (HM026 and HM298) that were previously tested in an in vitro leaf dehydration assay using PEG and that displayed a contrasted response [27]. Seedlings were grown in plastic pouches and treated for 5 days with 15% PEG 8000 (Fig. 1). With this system, root growth could be easily monitored through the transparent plastic pouch, allowing us to analyze specific root architecture traits such as total projected root length, specific root length, LR number and LR insertion angle.

Each of the 15 accessions displayed specific responses to drought (Table 1). Among the 15 accessions, only six

Table 1 Growth of *Medicago truncatula* accessions after 12 days in pouches: impact of PEG treatment on biomasses and root architectural traits. For each accession, the impact of 8-days PEG treatment on each trait was expressed as a percentage relative to the untreated condition. Values are given in Additional file 1: Table S1. Negative and positive values indicate that PEG decreased or increased the value of the trait, respectively. *ns* means that impact of PEG treatment was not significant at the 0.05 probability level. The two selected and studied genotypes in the following experiments are highlighted in bold.

Accession abbreviation	Biomass (g)			Total projected root length (cm)	Specific root length (cm/mg)	LR number	LR insertion angle (°)
	Plant	Shoot	Root				
A17	-37	-34	-43	<i>ns</i>	43	<i>ns</i>	<i>ns</i>
HM013	-37	-17	-55	-24	68	25	<i>ns</i>
HM004	-33	-34	-29	<i>ns</i>	37	-58	<i>ns</i>
HM012	-25	-28	<i>ns</i>	-35	<i>ns</i>	-27	<i>ns</i>
HM003	-18	<i>ns</i>	-24	-25	<i>ns</i>	27	<i>ns</i>
HM010	-18	-15	-23	<i>ns</i>	23	<i>ns</i>	21
HM001	<i>ns</i>	<i>ns</i>	-20	-22	<i>ns</i>	-19	23
HM026	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	-26	-23	67	<i>ns</i>
HM014	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	-18	<i>ns</i>	<i>ns</i>	22
HM002	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	43	-37	<i>ns</i>
HM005	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	-24	-7
HM015	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	24	-21
HM016	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	37	<i>ns</i>
HM298	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	51	8
HM011	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	16

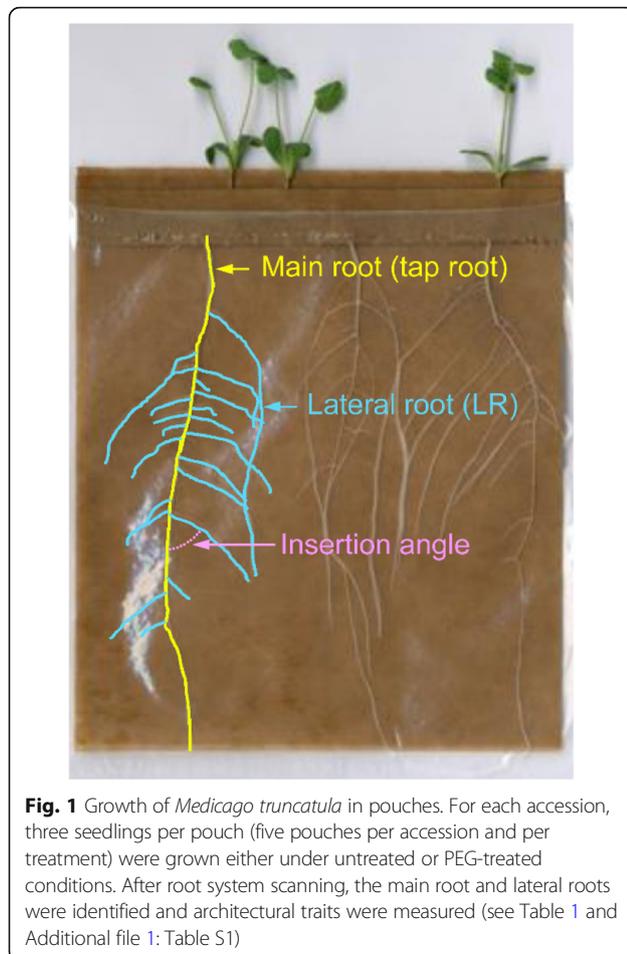
significantly lost plant biomass (ranging from -18% in HM003 and HM010 to -37% in A17 and HM013) following PEG treatment, and were thus considered as PEG-susceptible. This biomass loss was the result of either combined decreased shoot and root biomasses (A17, HM004, HM010, HM013), or biomass decrease localized to the shoot (HM012) or to the root system (HM003 and HM001). Concomitantly with these biomass losses, architectural traits were impacted by PEG application although no common trend was shared between the PEG-susceptible accessions. While the lateral root number decreased in response to PEG treatment for accessions HM004, HM012 and HM001, it increased for accessions HM013 and HM003 and this trait was not affected in A17 and HM010. Total root length was negatively affected by PEG application in four (HM013, HM012, HM003, HM001) out of the seven PEG-susceptible accessions while the average insertion angle of lateral roots was increased in two of them (HM010, HM001). In four PEG-susceptible accessions (A17, HM013, HM004, HM010), specific root length (SRL) significantly increased in response to PEG while it was not affected in the other three accessions.

On the other hand, in eight accessions, PEG application induced changes in morphological traits of the root

system without impacting biomass accumulation. These accessions were thus considered as PEG-resistant, and included the HM298 and HM026 accessions previously ranked among the most resistant accessions in a PEG-induced leaf dehydration assay [27]. Lateral root number was increased by PEG in four accessions (HM026, HM298, HM015 and HM016), concomitantly (HM026) or not (HM298, HM015 and HM016) with a decrease in the total root length, and concomitantly (HM014, HM005, HM015, HM298, HM011) or not (HM002 and HM016) with changes of the LR insertion angle.

PEG-stimulated endocytosis depends on root cell types

We aimed first at analyzing endocytosis by using the FM4-64 fluorescent dye, which embeds into the membrane. Collected lateral root apices (~1.5 to 2 mm in length) in contact with FM4-64 dye immediately displayed a PM labeling of cells from the root cap, the rhizoderm (Fig. 2) and the first two cortical layers (Fig. 2b), while labeling of deeper cortical cells was rarely observed (*Medicago* has 4–6 root cortical layers). This indicates weak dye penetration and/or low access of confocal laser to deeper cell layers. The meristematic zone was not labelled (Additional file 2: Figure S1)



possibly be due to its deeper localization or distinct cell wall properties that prevented dye penetration under our conditions [28]. FM4-64 labelling allowed us to visualize four functional zones along the longitudinal axis. Zone 1 corresponds to the root cap and the meristematic active cell division zone (RAM), zone 2 to the root transition zone (RTZ), zone 3 to the elongation zone (EZ), and zone 4 to the growth differentiation zone (GDZ) that harbors root hairs (arrow Fig. 2a). In these zones, PM labelling allowed us to distinguish cells of different sizes and shapes according to their identity and position. Root cap cells, which protect root tip, are elongated and some are released from the cap periphery (arrowheads Fig. 2a). We should note that these root cap cells extend beyond the EZ (zone 3) (Fig. 2a). Both rhizodermal and cortical meristem cells (RAM, zone 1) present isodiametrical shape and division in both directions (Fig. 2b). In zones RTZ to GDZ (zone 2 to 4), cortical cells are larger compared with the rhizodermal ones (Fig. 2b). As expected, the closer the cells are to the root base, the more they are elongated.

In the first minutes, the labeling of the majority of cells presented a well-defined fluorescent contour with

exception of root cap cells that contain numerous intracellular fluorescent dots triggering fluorescent signal saturation (Additional file 2: Figure S1 arrow). Because of this complex intracellular labeling we could not take into account the root cap cells for the following study, and endocytosis was thus only monitored in the rhizodermal cells and the first two layers of cortical cells from the RTZ, EZ and GDZ (zones 2, 3 and 4).

In order to reveal how drought is sensed at the cellular level, we first investigated the effect of PEG on root cell endocytosis. Application of 15% PEG 8000 was carried out on well-developed LRs from 7-day germinated A17 seedlings. The presence of FM4-64 labeled fluorescent dots within cells, which reflects endocytosis, was monitored by confocal imaging and quantified using imageJ as previously described in [29]. A rapid and significant increase of FM4-64 internalization was observed in the rhizodermal cells of the upper GDZ zone 4 after only 10–15 min of PEG treatment when compared to untreated roots (Fig. 3a and c) and this internalization was confirmed after 1 hour of treatment (Fig. 3b and d). This stimulation was visible after 1 h in EZ (zone 3), although not significant, but not observed in RTZ (Fig. 3b-c). In cortical cells, endocytosis was not detected after 10 min neither in control nor in PEG-treated cells, but after 1 h, endocytosis was slightly higher in PEG-treated cells even though it occurred to a lesser extent than in rhizodermal cells and not significant (Additional file 3: Figure S2).

Taken together, these data show that a greater bulk-flow of endocytosis is induced by PEG in GDZ (zone 4) compared to EZ (zone 3) and RTZ (zone 2), first confirming that endocytic activity depends on cell identity and second suggesting the existence of a longitudinal gradient of stimulated endocytosis from the apex to the elongation zone of rhizodermal cells.

Mapping of membrane lipid order and packing in rhizodermal cells

To assess the effect of PEG-induced drought on membrane order, we used the di-4-ANEPPDHQ, a membrane fluorescent probe sensitive to local lipid packing, which has been previously used to monitor membrane lipid order in plant cells [30–33]. The spectral properties of the di-4-ANEPPDHQ dye are modified when the membrane environment is changed [34] and a General Polarization (GP) parameter, which defines proportionally the lipid order of the membrane, is calculated from dual-channel images recorded from green and red fluorescence emissions [35].

In *M. truncatula* LRs, the di-4-ANEPPDHQ dye stained well rhizodermal cell membranes and to a lesser extent cortical cells membranes, as seen for FM4-64 labelling. Di-4-ANEPPDHQ fluorescence emissions of

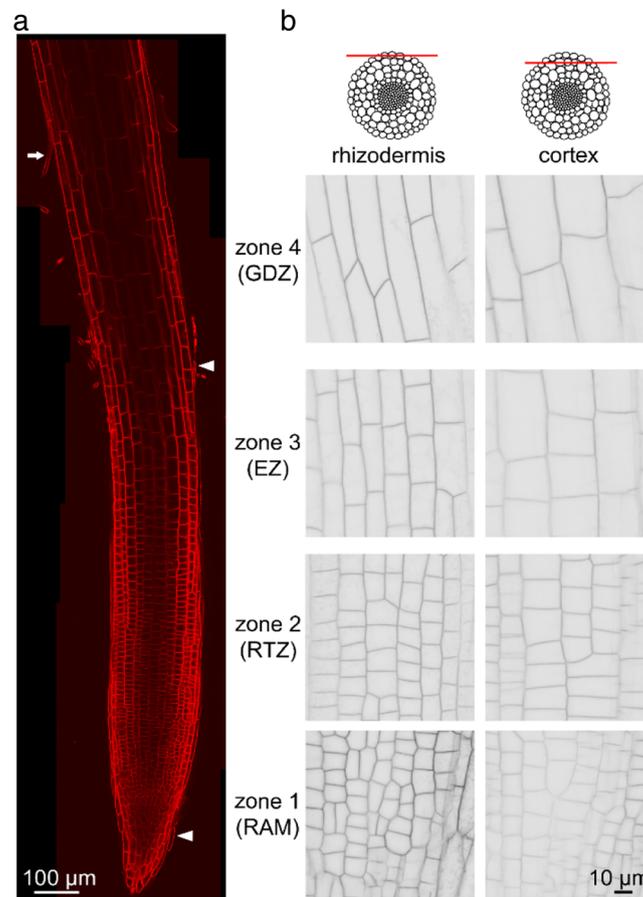


Fig. 2 FM4-64 membrane labeling allowed the distinction of cells from LR apex of accession A17. **a** Confocal image of FM4-64 labelled LR. The four LR functional zones are distinguished as zone 1: root cap and meristematic zones (RAM), zone 2: root transition zone (RTZ), zone 3: elongation zone (EZ), and zone 4: growth differentiation zone (GDZ). Arrowheads: detached root cap cells; arrow: root hair in GDZ. **b** Detail of rhizodermal and cortical cells in the four functional zones labeled with FM4-64. Grayscale tone of confocal images of the root layers

both longitudinal and transverse sides of the PM from cap, rhizodermal and cortical cells were thus recorded (Fig. 4). This global analysis -without distinction of longitudinal zones- showed a significant difference in mean GP values between cell types; rhizodermal cells displayed more lipid-ordered domains than root cap cells but less than cortical cells. This suggests that lipid packing varies along the radial axis. The detailed analysis of GP values in the radial root cells after distinction of the longitudinal zones showed the same result (Additional file 4: Figure S3).

Due to the weaker labeling of cortical cells, we focused only on rhizodermal cells thereafter. In order to determine whether lipid packing in the rhizodermal cell membrane depended on the LR zone concerned, GP values were measured for the four distinct longitudinal root zones (Fig. 5a). RAM-RTZ (zone 1-2) cell membranes displayed significant higher GP values than more mature cells from EZ (zone 3) and GDZ (zone 4) that both had similar GP

values. In addition, the labeled vesicles within cells possessed similar negative GP values whatever the root zone (Fig. 5a-b). Taken together, these results suggest that in the control condition, intracellular vesicles are composed with more disordered membranes than the PM from which they originate.

PEG increases lipid order in mature rhizodermal root cells

The impact of PEG treatment on the GP parameter was evaluated in rhizodermal cells along the root axis. The distribution of GP intensities are shown with colored-maps of optical sections from representative rhizodermal cells (Fig. 6a). The comparison of the GP mean values between untreated (CTL) and PEG-treated cells (PEG) showed that while RAM-RTZ (zone 1-2) cells are not impacted by PEG, cells from the EZ (zone 3) and GDZ (zone 4) show a PEG-induced increase of lipid ordered domains although this is only significant in GDZ (Fig. 6a-b). As observed for the untreated roots (Fig. 5), intracellular

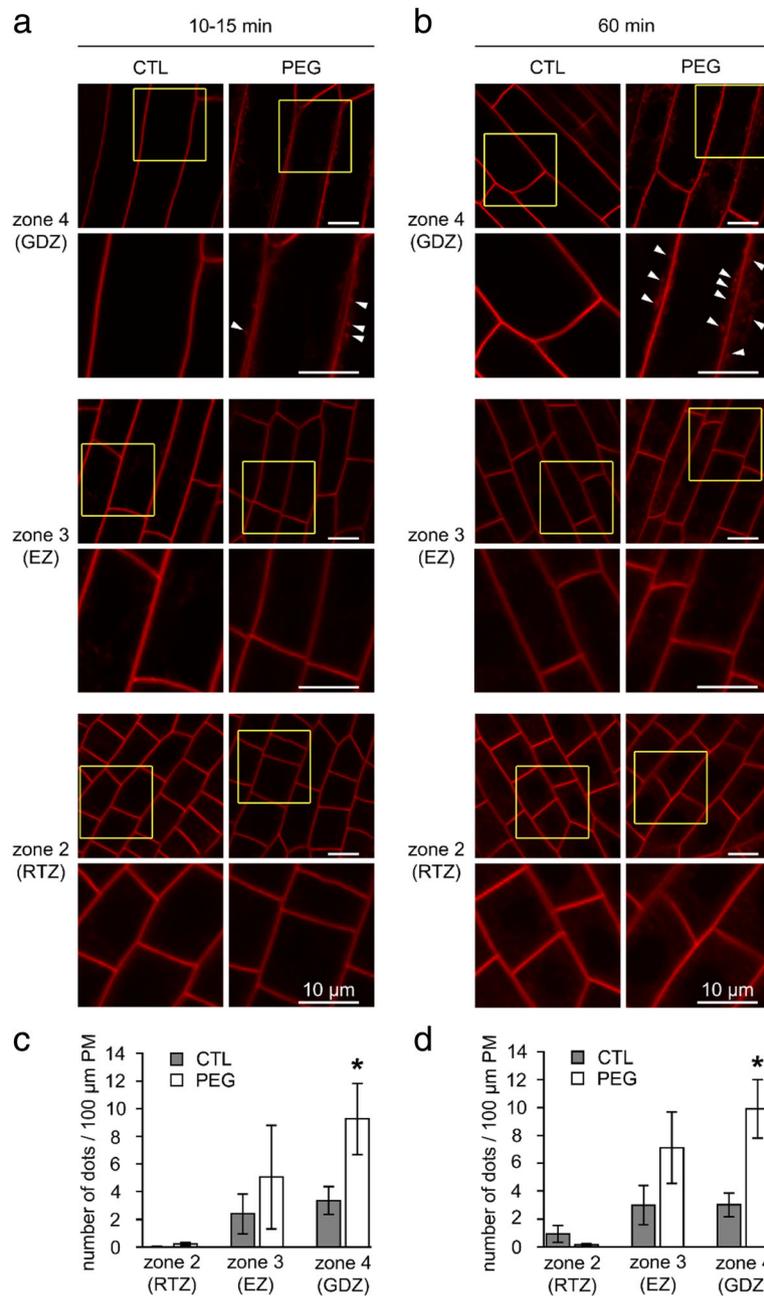
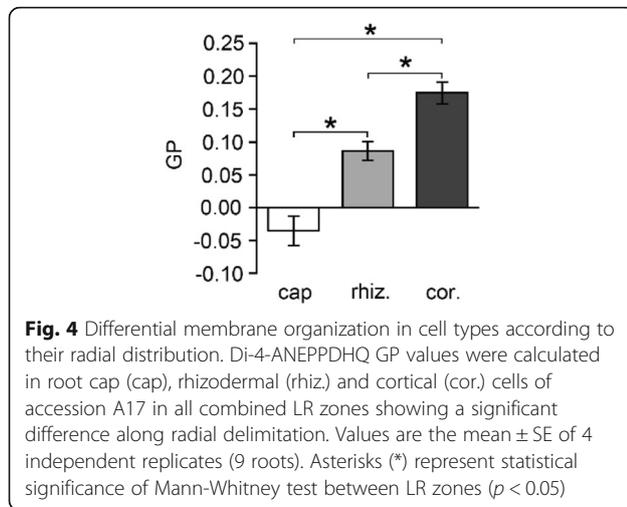


Fig. 3 Spatial and temporal stimulation of endocytosis in rhizodermal cells of accession A17 LRs in response to PEG treatment. Representative confocal images of rhizodermal cells of untreated (CTL) or treated roots with 15% PEG (PEG) after **(a)** 10–15 min or **(b)** 60 min in the three root zones (see Fig. 2). For each zone a magnification of inset is shown. Arrowheads indicate endocytic fluorescent dots. **c, d** Quantification of the endocytosis expressed in number of fluorescent dots per 100 μm of PM after 10–15 min **(c)** or 60 min **(d)** in control (grey bars) or PEG-treated cells (white bars) according to cell type zone. Values are the means ± SE of 4–6 independent replicates (6–9 roots). Asterisks (*) represent statistical significance of Mann-Whitney test ($p < 0.05$)

vesicles of PEG-treated cells displayed lower GP values compared with the PM GP (Additional file 5: Figure S4). However, no difference in vesicle GP values was observed between the different root zones (Fig. 5) indicating their differential composition in comparison with the PM.

Extension of the membrane analyses to a PEG-resistant accession

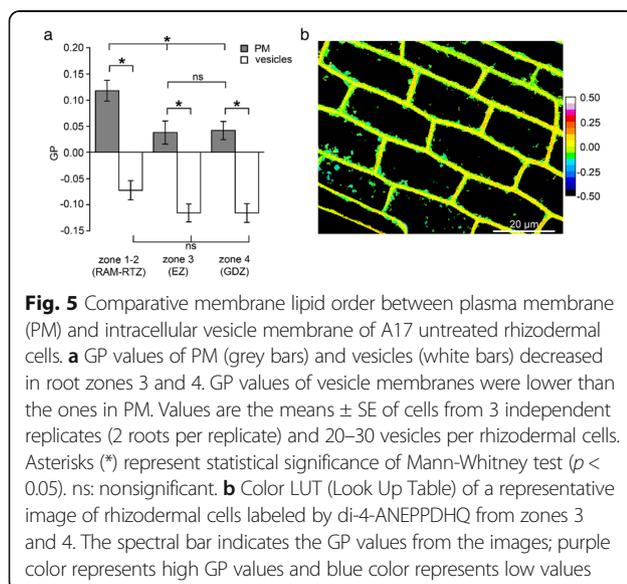
We then asked whether the PEG-induced changes in membrane properties are specific to the PEG-sensitive accession. Following the evaluation of the 15 accessions in response to PEG application (Table 1), a resistant



accession (HM298), which was also selected as a PEG-resistant accession by [27], was chosen for subsequent analysis of endocytosis and lipid order of plasma membrane and vesicles. Even after 1 h, endocytosis was not affected by PEG treatment in accession HM298 (Fig. 7). Interestingly, this accession did not display a significant PEG-induced modulation of lipid order whatever the root zone (Fig. 8), and in particular in the GDZ, unlike the PEG-susceptible accession A17 used in this study.

Discussion

The dynamic structure of cellular membranes in eukaryotes is required for their roles in numerous cellular processes. In the present study, we analyzed PM features in LR cells of *M. truncatula* within minutes of exposure to drought stress, as proof of its perception that may reflect the final outcome of plant performance under long-term



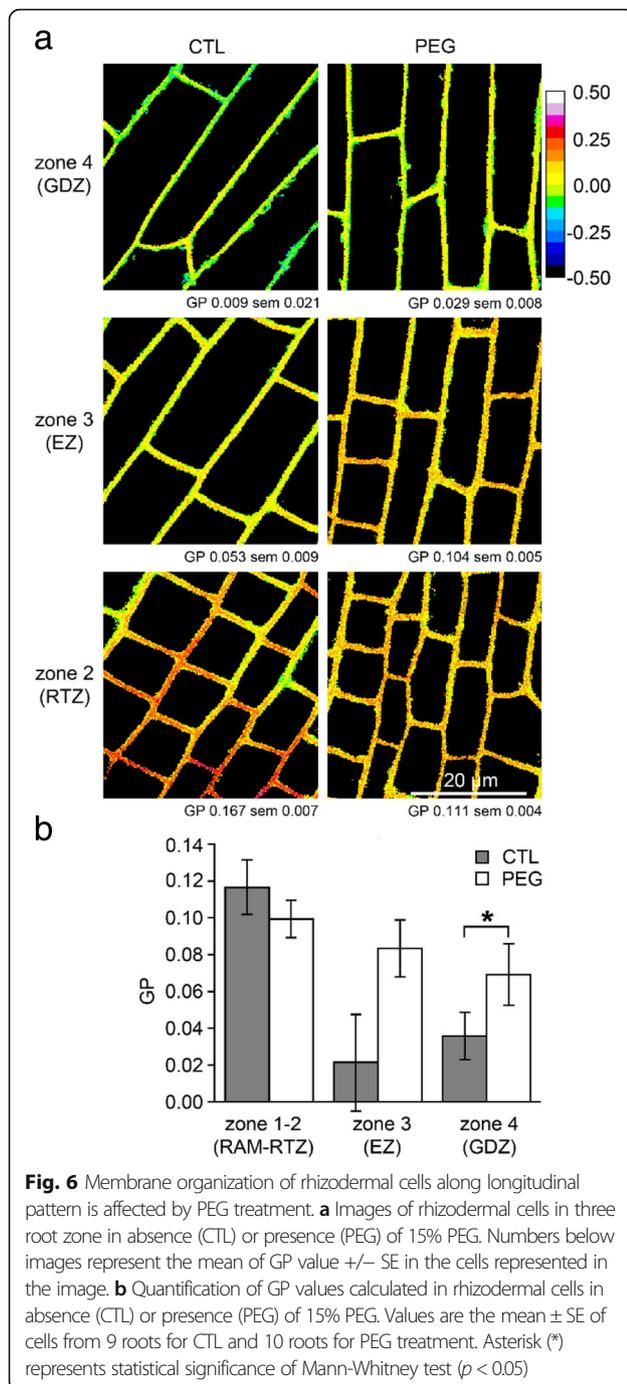
stress. Indeed, LRs, which are formed post-embryonically, are very responsive to environmental cues [36].

Endocytosis stimulation under drought stress

Endocytosis, which is an element of intracellular trafficking, is a ubiquitous process in eukaryotic cells that regulates the internalization of PM proteins. This process has not only a pivotal role for plant development and cell function, but also for the control of cell homeostasis in response to environmental cues [37, 38]. This links endocytosis to cell signaling [39, 40].

In the present study, endocytosis was monitored with the FM4–64 dye, which fluoresces only when embedded in a lipid environment such as the PM and endocytic vesicles, as it is integrated on vesicle membranes following endomembrane system-dependent internalization [41–43]. The PM labeling helped us first to distinguish *M. truncatula* A17 cells in terms of identity or functionality, and then allowed us to show that PEG treatment stimulated endocytosis in this accession. Previous studies showed that water (/osmotic) stress induces a reduction in cell surface area, due to the mitigation of turgor pressure, causing internal vesiculation of the PM, together with internalization of extracellular material [44, 45]. In particular, PEG-induced endocytosis of biotinylated extracellular markers has been demonstrated in rice cells [46].

Changes in the osmotic environment of Arabidopsis roots incurred by mannitol, sorbitol or NaCl have been shown to enhance not only the internalization of the FM4–64 dye but also some PM proteins in rhizodermal cells [47, 48]. These hyperosmotic effects have been partially counteracted by genetic and pharmacological interference of clathrin-mediated endocytosis (CME) [48, 49]. This pointed to the involvement of CME as a major mechanism by which PM proteins are internalized in a highly regulated manner [50]. In addition, by disrupting the PM equilibrium, osmotic stress influences the balance between endocytosis and exocytosis acting through the CME [48]. Interestingly, a proteomic study from *Brassica napus* exposed to PEG showed that proteins involved in intracellular trafficking were up-regulated within hours, such as a clathrin heavy chain, the subunit $\alpha 2$ of the clathrin adapter, the syntaxin vam3p, an annexin, a synaptotagmin and some small G rab proteins [51]. These proteins may re-establish the cellular osmotic balance by the compartmentalization of endomembranes or membrane proteins under water stress. A class of membrane proteins involved in water stress are PM aquaporins (PIPs), which enable the flux of water through membranes. Notably, a genome-wide association analysis of PEG-related and biomass phenotypic variation in *M. truncatula* has identified the aquaporin PIP2 as the second most significantly associated gene with shoot biomass [27]. Interestingly, after



hyperosmotic salt stress, an internalization of PIPs has been demonstrated in Arabidopsis rhizodermal and cortical root cells [47]. This internalization may contribute to protect cells against dehydration by reducing aquaporin abundance at the PM. The PIPs are not only internalized by CME [52], but a clathrin-independent endocytosis (CIE) of PIPs may also occur [53]. Indeed, the less-studied CIE pathway seems to be dependent on sterol- and sphingolipid-enriched membrane microdomains

leading to more ordered domains. By using probes reflecting CME and CIE pathways, a stratified distribution of these processes in Arabidopsis roots under salt stress was observed [54]. Indeed, CME that internalizes transmembrane proteins was found in all cell layers, while CIE that mobilized lipids and lipid-anchored proteins, but not transmembrane protein, was restricted to the rhizodermal layer. By contrast, in saline stress, a third pathway, that is a non-discriminatory CIE in its choice of cargo (lipids or proteins), operated in all layers of the root. This can be considered as a reshuffle of the nature of the endocytic pathways due to the influence of an environmental stimulus on the physical state of the membrane.

Physical state of membranes of “resting” root cells

The mapping of lipid order of membranes in rhizodermal cells of *M. truncatula* A17 highlighted different membrane properties in different root zones. These lipid order-rich domains are thought to intervene in temporal and spatial organization of cell-specific processes. This differential lipid order was also observed in cell types of Arabidopsis root labeled with di-4-ANEPPDHQ dye [33]. We showed that in Medicago, as in Arabidopsis [33], cortical cells displayed higher lipid order than rhizodermal cells, and that cells from the distal root zones (RAM and RTZ; zones 1 and 2) had higher ordered membranes than the elongated and differentiated cells from the GDZ (zone 4). The physical state of the membrane relies on its composition, thus modulation of membrane lipid order may be explained in part by differential lipidome distribution between meristematic and mature cells as observed in soybean [55] and barley roots [56]. Some of these lipids are involved with compartmentalization of intrinsic proteins within lipid microdomains, and are critical in creating platforms for a necessary signal transduction during division and growth (proposed in [17, 33]).

Moreover, in the present study, GP values of PM of rhizodermal cells were statistically higher than those of membranes from intracellular vesicles. This differential order degree between membrane surface and the derived vesicles was also seen in Arabidopsis roots [32] indicating a modification of membrane composition as expected.

Drought stress modifies physical state of root cell membranes

Medicago A17 rhizodermal cells showed an increased PM lipid order in response to PEG, reflecting changes in the PM physical state. It is well-known that during hyperosmotic conditions, bacterial osmosensors at the cell surface are activated by changes in physical state / protein-protein interactions [57, 58]. Similarly, in the plant *Pyrus betuloefolia*, the lipid microviscosity of the PM increased in response to PEG while the PM fluidity decreased, indicating an influence of water stress on the physical state of the membrane [59]. In a plant

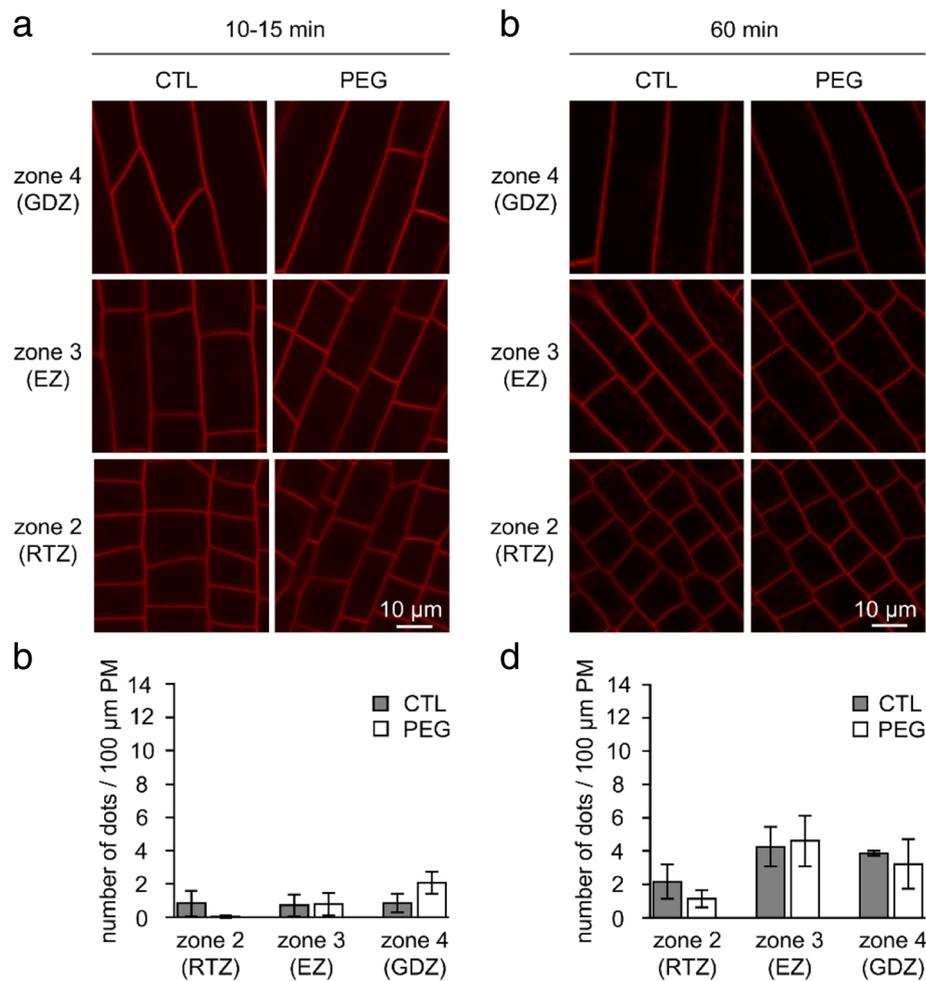


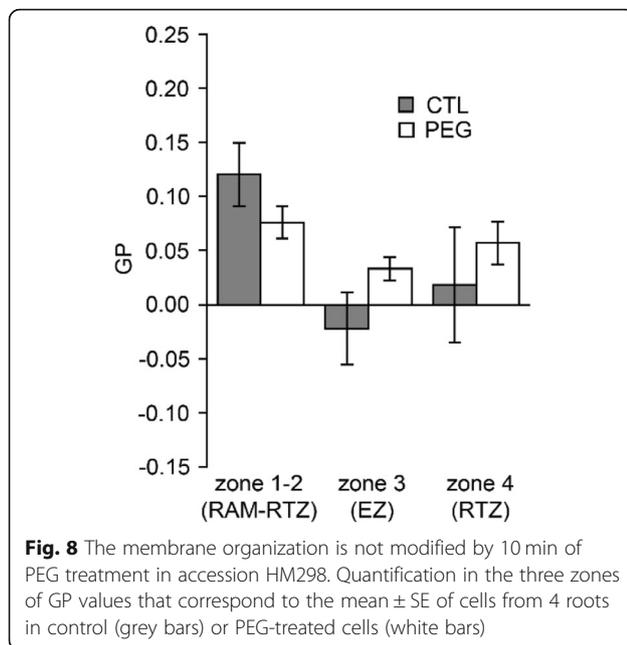
Fig. 7 PEG treatment does not induced endocytosis in accession HM298. **a, b** Confocal images of rhizodermal cells in the three zones labeled with FM4-64 in absence (CTL) or presence (PEG) of 15% PEG for 10–15 or 60 min. **c, d** Quantification of the endocytosis expressed in number of dots per 100 μm of PM after 10–15 min (**c**) or 60 min (**d**) in control (grey bars) or PEG-treated cells (white bars) according to cell type zone. Values are the mean \pm SE of cells from 2 to 3 roots

growth-promoting bacterium (*Azospirillum brasilense*), PEG decreased the fluidity a few minutes after treatment, influencing the perception of the water stress by the bacteria and after 1 h, this effect was offset by an adjustment in lipid composition, contributing to the homeostasis of membrane fluidity under water deficit [60]. Similarly, a recent study showed that a NaCl-mediated hyperosmotic stress modified the spatial distribution and abundance of lipid species in roots of barley seedlings [56]. Interestingly, these stress-induced changes in lipid abundance were more important in the maturation zone than other root zones, suggesting the existence of a stress gradient from the root cap to the maturation zone [56].

In accordance with the above literature, we observed an increase in lipid-ordered state in membranes of *Medicago* rhizodermal cells from GDZ (zone 4) while PEG did not significantly influence the other zones. Thus, the

GDZ of rhizodermal cells, which is the start of the maturation zone, may represent a PEG-responsive zone associated to perception because in the present study the extent of water stress stimulated both endocytosis rate and lipid order. This zone contains differentiated cells with root hairs that are extensions of rhizodermal cells and greatly increase the absorptive surface for collecting water. In the present study, we did not analyze the lipid order of root hairs as they were sometimes damaged by recovery from the pouch paper wick, but such a study has been performed in *Arabidopsis* [33] showing polar hair growth was associated with a polar distribution of highly ordered PM.

We already suggested that PM compartmentalization may modify biochemical functions, in particular those responsible for intracellular signaling. This could allow delivery and retrieval of membrane molecules, that is, exocytosis and endocytosis, at specific membrane



locations to be influenced by or influence back the formation of membrane domains. Surprisingly, the lipid order of the intracellular vesicle membranes was not modified in response to PEG, indicating the stability of endocytic compartment composition. In addition, the study of lipid order in *Arabidopsis* root cells (without stress) identified the vesicles as mostly clathrin-coated [32]. Accordingly, to go further in our study, an analysis of the distinctiveness of endocytosis could be performed in untreated and PEG-induced *Medicago* by the use of markers of the endocytotic pathways such as the subunit $\sigma 2$ of the clathrin adaptor [61] or application of dedicated endocytic inhibitors such as tyrphostin A23 [42] or ikarugamycin [62] that blocks clathrin-coated pits on the PM and vesicle formation.

Does a link exist between ecophysiological traits of drought tolerance and membrane dynamics?

The use of 15 accessions identified as highly genetically diversified [26] enabled us to observe contrasted responses to PEG treatment in terms of plant biomass allocation strategy towards shoots and roots, and in terms of root architecture plasticity. In this study no direct link could be established between root architecture plasticity of several traits and drought resistance (evaluated as a loss of total biomass), although some root traits such as specific root length, number of LRs or insertion angles of LRs are known to play a role in water uptake under water stress [7]. This reflects the necessity of combining architectural and morphological root traits with cellular processes in order to decipher key mechanisms enhancing drought resistance.

In the present study, accession A17 was qualified as drought susceptible due to the significant PEG-induced reduction of both root and shoot biomasses, while HM298 was considered as drought-tolerant with the maintenance of plant growth under PEG conditions. In A17, rhizodermal cells presented a short-time stimulation of endocytosis after PEG treatment while even after 1 h this was not the case for HM298. Such a differential uptake between genotypes was observed in rice cells using biotinylated markers in response to NaCl stress, while tolerance to sorbitol was correlated with an increased uptake [46]. It is tempting to speculate that PM water channels are more regulated by their internalization in A17 than in HM298, limiting the intensive cell dehydration, as was observed in *Arabidopsis* [63]. This is also in accordance with the modulation of root architecture observed in HM298 (and not in A17), that could enhance water acquisition to compensate water loss by PM aquaporin. Indeed, the number of LRs was increased under PEG conditions in this accession and could thus explain its drought tolerance as reviewed in [64].

We also showed that A17 cells displayed a higher increase of the lipid order of membrane of rhizodermal cells, confirming a link between the two processes - endocytosis and lipid order - for stress perception in a “susceptible” genotype. Further investigations are needed to understand the relationship between PEG-induced membrane dynamics and the degree of drought tolerance, by extending the analysis to the other *M. truncatula* accessions representing the whole range of tolerance.

Indeed, we may hypothesize that these early membrane responses, namely endocytosis or lipid packing, may facilitate stress perception or, in reverse, the perception (by another way) may trigger membrane dynamics by mechanosensing. These two membrane processes - linked or not - may be seen as the first steps in the plant’s response to drought stress and can be extended to other abiotic stresses similarly to what was proposed for biotic stress [31, 42]. Finally, our results pave the way to go further with the *M. truncatula* accessions that offer a high level of genetic diversity and high-density molecular marker maps to better understand the behavior of plant under water stress.

Conclusions

This study indicates that cell membranes are not simply passive barriers liable to be damaged during environmental cues, but are involved in cellular responses via the modulation of intracellular signaling. How membrane dynamics of root cells perceive drought and transmit signals to upstream ecophysiological responses via transduction mechanisms is still an open question.

By using confocal imaging of fluorescent dyes, we provide evidence for differential behavior (/properties) of root cell membranes according to their age and location

within the organ in a “susceptible” genotype. By analyzing the behavior of cell PM under PEG-induced drought stress we have highlighted a major modification of the cells in the GDZ mature zone.

Methods

Plant material and growth

Seeds from the *Medicago truncatula* CC16 core collection [26], Jemalong A17, HM026 and HM298 were kindly provided by the *M. truncatula* Genetic Resources Centre (Montpellier, France, <https://www1.montpellier.inra.fr/BRC-MTR/>). Seeds were scarified for 10 min in 99% sulfuric acid (H₂SO₄), rinsed four times with sterile water, sterilized in 0.6% sodium hypochloride for 20 min and rinsed four times with sterile water. Seeds were then germinated on plate containing a cellulose sheet soaked with sterile water for 3 days in the dark. Over the 16 genotypes from the CC16 *Medicago* core collection, only 12 successfully germinated and were subsequently studied (Additional file 1: Table S1). Germinated seedlings were then transferred to autoclaved pouches (<https://mega-international.com/tech-info/>) previously soaked with 8 mL of nutritive solution [1.87 mM KNO₃, 0.57 mM K₂HPO₄, 2.82 mM Ca(NO₃)₂, 1 mM MgSO₄, 2.5 mM NaNO₃, 0.05 mM EDTA-FeNa and oligoelements] as described in [65]. Three seedlings per pouch (Fig. 1) and 10 replicate pouches per accession were used. The lower part of each pouch was wrapped in an aluminum cover in order to keep roots in darkness, and pouches were then placed in upright position in a growth chamber under a 16 h photoperiod (Photosynthetically Active Radiation maintained at 197 μE/m²/s with fluorescent light) and a temperature of 22/20 °C (day/night).

PEG treatment

For root system architecture evaluation of the 15 accessions, plants were grown in pouches during 12 days. After 4 days in pouches (corresponding to 7 days after germination), half of the pouches received 3 mL of nutrient solution while the other half received 3 mL of nutrient solution supplemented with 15% PEG-8000. The expected water potential of the nutrient solution supplemented (−0.3 MPa) or not (−0.007 MPa) with PEG according to [66] was checked in C52 sample chambers coupled to a Wescor HR-33 T Dew Point Microvoltmeter (Wescor Inc., Logan, UT, USA) at 20 °C. Pouches were checked daily and 2 mL of either nutrient solution or nutrient solution supplemented with PEG were added to the pouches in order to compensate the evapotranspiration of the seedlings in untreated (CTL) or PEG-treated pouches, respectively.

For microscopical analysis, after 4 days in pouches, LR s were collected and transferred in Eppendorf tubes containing the nutrient solution. For PEG treatment,

LR s were placed in nutrient solution containing 15% PEG-8000 (PEG-8000/nutritive solution, w/v) for either 10–15 min or 1 h. LR s that were not subjected to PEG were used as control (CTL).

Ecophysiological parameters analysis

For each *Medicago truncatula* accession, 10 to 15 individual seedlings were analysed after 12 days growth in pouches. Root system was scanned (400 dpi) and image analysis was performed using both Smartroot toolbox under ImageJ software [67] and WinRhizo software version 2012b (Regent Instruments Inc., Canada) by separating the main root from LR s (Fig. 1a). Total projected root length, number of LR s and average insertion angles of LR s were thus evaluated. Then seedlings were harvested and roots were separated from shoots. Biomasses of shoot and root were measured after oven drying sample at 80 °C for 48 h. Specific root length was then calculated as the ratio between total root length and root biomass.

Staining with FM4–64 and endocytosis analysis

Plasma membrane staining and internalization were evaluated with the styryl dye FM4–64 (Invitrogen life Technologies #T-13320) that embeds into membrane. The stock solution of FM4–64 was prepared at 2.125 mM in water and stored at −20 °C. LR s were treated with 4.25 μM FM4–64 added in nutritive solution in presence or not of 15% PEG, and incubated at 25 °C for 10–15 min or 1 h. Images of root cells from different functional zones were captured with a SP2 Leica confocal laser scanning microscope using a 40x oil immersion objective (NA = 1.25). FM4–64 was excited using a 488 nm laser and the fluorescence collected in the range of 600–700 nm. Quantification of FM4–64 internalisation was carried out as described in [29]. Briefly, intracellular fluorescent dots were scored and scaled to 100 μm of PM using Image J software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). At least 50 cells were analyzed per LR ($n = 2$ to 9).

Di-4-ANEPPDHQ staining and GP processing

The ratiometric dye di-4-ANEPPDHQ (Invitrogen life Technologies #D36802) allows the evaluation of membrane organization as it differentiates coexisting liquid-ordered phases from liquid-disordered phases. The stock solution of di-4-ANEPPDHQ was prepared at 1.5 mM in dimethylsulfoxide (DMSO) and stored at −20 °C. For staining, LR s were excised from 7-day old seedlings and placed in medium [nutritive solution +/- 15% PEG] containing 3 μM di-4-ANEPPDHQ dye for 5 min. LR s were washed for 1 min in medium without the dye and transferred onto glass slide with 80 μL of medium. A 40x oil immersion objective (NA = 1.25) of a Leica SP2 confocal laser scanning microscope was used for the imaging of 4-di-ANEPPDHQ-labeled cells. The LR s were excited using a 488-nm laser and

the emission range of two channels was set to 540–560 nm (green fluorescence) and 650–670 nm (red fluorescence) reflecting higher and lower membrane lipid order, respectively. Identical microscope settings were maintained for quantitative imaging of membranes. For each cell, longitudinal and transverse sides of the PM and/or membrane vesicles were analyzed. Recorded images were treated with Image J using the Owen macro [35] to generate the GP (General Polarization) parameter proportional to membrane order as followed: $GP = (I_{540-560} - I_{650-670}) / (I_{540-560} + I_{650-670})$, where, $I_{540-560}$ and $I_{650-670}$ corresponds to fluorescence intensities collected by the two microscopic channels.

Statistical analyses

For ecophysiological traits, measured on 10–15 seedlings, analysis of variance were performed (type III sum of squares) and means were compared using a Tukey's HSD (honest significant differences) test at the 0.05 probability level, using R software (<https://www.r-project.org/>). For endocytosis or lipid order analysis, significance between samples were evaluated using the Mann-Whitney U-test in PAST software (<https://folk.uio.no/ohammer/past/>).

Additional files

Additional file 1: Table S1. Values of the traits of *Medicago truncatula* accessions after 12 days in pouches without PEG (none) or with PEG treatment on biomasses and root architectural traits. Mean \pm standard deviation of 15 seedlings. (XLSX 20 kb)

Additional file 2: Figure S1. Confocal image in the deeper zones of a LR of accession A17. Meristematic zone (m), endodermis, and vessel (v) are not reached by the FM4–64 dye. Intense and saturated FM4–64 intracellular labeling is found in root cap cells (arrow). (TIF 1067 kb)

Additional file 3: Figure S2. Spatial and temporal stimulation of endocytosis in cortical cells of accession A17 LRs in response to PEG treatment. (a, b) Confocal images of rhizodermal cells of untreated (CTL) or treated roots with 15% PEG (PEG) after (a) 10–15 min or (b) 60 min the three root zones (see Fig. 2). (c, d) Values are the mean \pm SE of cells from 7 roots after (c) 10–15 min or (d) 60 min in control (grey bars) or PEG-treated cells (white bars) according to cell type zone. (TIF 1860 kb)

Additional file 4: Figure S3. Differential membrane organization in cell types according to their radial and longitudinal distribution. Di-4-ANEPPDHQ GP values were calculated in root cap (cap), rhizodermal (rhiz.) and cortical (cor.) cells of accession A17 in the four LR zones. Values are the mean \pm SE of 4 independent replicates (9 roots). Asterisks (*) represent statistical significance of Mann-Whitney test ($p < 0.05$) between each cell type in a same zone. ns: non significant. (TIF 126 kb)

Additional file 5: Figure S4. Comparative membrane organization between plasma membrane (PM) and vesicle membrane in rhizodermal cells of accession A17 treated by 15% PEG. GP values of vesicle membranes (white bars) were lower than the ones in PM (grey bars). Values are the means \pm SE of 3 independent replicates (2 roots per replicate) and 20–30 vesicles per rhizodermal cells. Asterisks (*) represent statistical significance of Mann-Whitney test ($p < 0.05$). ns: non significant. (TIF 112 kb)

Abbreviations

CIE: Clathrin-Independent Endocytosis; CME: Clathrin-Mediated Endocytosis; GP: General Polarization; LR: Lateral Root; PEG: Polyethylene Glycol; PM: Plasma Membrane

Acknowledgements

We wish to thank the DImaCell Imaging facility (INRA, Université de Bourgogne Franche-Comté, Dijon) for technical assistance in confocal microscopy. We thank Nadia Rossin for technical support with pouches, Manon Connault for root architecture analysis, Jean-Marie Prospéri (Centre de ressources biologique Medicago, SupAgro, Montpellier) for providing seeds and we grateful acknowledge Richard Thompson for English editing.

Funding

This work was supported by an UMR Agroécologie grant.

Availability of data and materials

Not applicable.

Authors' contributions

MP, NLC and W conceived the project. MC, CD and SG performed the experiments and analyzed the data. CD and MP drawn the figures. NLC wrote the publication. All authors contributed to the writing and approved the final manuscript.

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

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

Received: 18 January 2019 Accepted: 30 April 2019

Published online: 28 May 2019

References

- Seneviratne SJ, Luthi D, Litschi M, Schar C. Land-atmosphere coupling and climate change in Europe. *Nature*. 2006;443(7108):205–9.
- Araujo SS, Beebe S, Crespi M, Delbreil B, Gonzalez EM, Gruber V, et al. Abiotic stress responses in legumes: strategies used toCope with environmental challenges. *Crit Rev Plant Sci*. 2015;34(1–3):237–80.
- Neumann PM. Coping mechanisms for crop plants in drought-prone environments. *Ann Bot*. 2008;101(7):901–7.
- Xiao TT, Schilderink S, Moling S, Deinum EE, Kondorosi E, Franssen H, et al. Fate map of *Medicago truncatula* root nodules. *Development*. 2014;141(18):3517–28.
- Bensmihen S. Hormonal control of lateral root and nodule development in legumes. *Plants*. 2015;4(3):523–47.
- Iyer-Pascuzzi AS, Jackson T, Cui HC, Petricka JJ, Busch W, Tsukagoshi H, et al. Cell identity regulators link development and stress responses in the Arabidopsis root. *Dev Cell*. 2011;21(4):770–82.
- Comas LH, Becker SR, Cruz VV, Byrne PF, Dierig DA. Root traits contributing to plant productivity under drought. *Front Plant Sci*. 2013;4:442.
- Barkla BJ, Pantoja O. Plasma membrane and abiotic stress. *Plant Cell Monogr*. 2011;19:457–70.
- Uemura M, Steponkus PL. Cold acclimation in plants: relationship between the lipid composition and the cryostability of the plasma membrane. *J Plant Res*. 1999;112(1106):245–54.
- Osborne DJ, Boubriak I, Leprince O. Rehydration of dried systems: membranes and the nuclear genome. In: Black M, Pritchard HW, editors. *Desiccation and survival in plants: drying without dying*. Wallingford: CABI Publishing; 2002. p. 343–64.
- Osakabe Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Tran LSP. Sensing the environment: key roles of membrane-localized kinases in plant perception and response to abiotic stress. *J Exp Bot*. 2013;64(2):445–58.
- Cronan JE, Roughan PG. Fatty acid specificity and selectivity of the chloroplast sn-glycerol 3-phosphate acyltransferase of the chilling sensitive plant, *Amaranthus lividus*. *Plant Physiol*. 1987;83(3):676–80.
- Leborgne N, Dupou-Cezanne L, Teulieres C, Canut H, Tocanne JF, Boudet AM. Lateral and rotational Mobilities of lipids in specific cellular membranes

- of *Eucalyptus gunnii* cultivars exhibiting different freezing tolerance. *Plant Physiol.* 1992;100(1):246–54.
14. Mikami K, Murata N. Membrane fluidity and the perception of environmental signals in cyanobacteria and plants. *Prog Lipid Res.* 2003; 42(6):527–43.
 15. Urbanus SL, Ott T. Plasticity of plasma membrane compartmentalization during plant immune responses. *Front Plant Sci.* 2012;3:181.
 16. Cacas J-L, Furt F, Le Guedard M, Schmitter J-M, Bure C, Gerbeau-Pissot P, et al. Lipids of plant membrane rafts. *Prog Lipid Res.* 2012;51(3):272–99.
 17. Grosjean K, Der C, Robert F, Thomas D, Mongrand S, Simon-Plas F, et al. Interactions between lipids and proteins are critical for organization of plasma membrane-ordered domains in tobacco BY-2 cells. *J Exp Bot.* 2018; 69(15):3545–57.
 18. Liu C, Shen W, Yang C, Zeng L, Gao C. Knowns and unknowns of plasma membrane protein degradation in plants. *Plant Sci.* 2018;272:55–61.
 19. Foyer CH, Lam H-M, Nguyen HT, Siddique KHM, Varshney RK, Colmer TD, et al. Neglecting legumes has compromised human health and sustainable food production. *Nat Plants.* 2016;2:16112.
 20. Ma Q, Kang J, Long R, Zhang T, Xiong J, Zhang K, et al. Comparative proteomic analysis of alfalfa revealed new salt and drought stress-related factors involved in seed germination. *Mol Biol Rep.* 2017;44(3):261–72.
 21. Yacoubi R, Job C, Belghazi M, Chaibi W, Job D. Proteomic analysis of the enhancement of seed vigour in osmoprimed alfalfa seeds germinated under salinity stress. *Seed Sci Res.* 2013;23(2):99–110.
 22. Zhang C, Shi S. Physiological and proteomic responses of contrasting alfalfa (*Medicago sativa* L.) varieties to PEG-induced osmotic stress. *Front Plant Sci.* 2018;9:242.
 23. Steuter AA. Water potential of aqueous polyethylene glycol. *Plant Physiol.* 1981;67(1):64–7.
 24. Bao Y, Aggarwal P, Robbins NE 2nd, Sturrock CJ, Thompson MC, Tan HQ, et al. Plant roots use a patterning mechanism to position lateral root branches toward available water. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(25): 9319–24.
 25. Ji HT, Liu L, Li KX, Xie QG, Wang ZJ, Zhao XH, et al. PEG-mediated osmotic stress induces premature differentiation of the root apical meristem and outgrowth of lateral roots in wheat. *J Exp Bot.* 2014;65(17):4863–72.
 26. Ronfort J, Bataillon T, Santoni S, Delalande M, David JL, Prosperi JM. Microsatellite diversity and broad scale geographic structure in a model legume: building a set of nested core collection for studying naturally occurring variation in *Medicago truncatula*. *BMC Plant Biol.* 2006;6:28.
 27. Kang Y, Sakiroglu M, Krom N, Stanton-Geddes J, Wang MY, Lee YC, et al. Genome-wide association of drought-related and biomass traits with HapMap SNPs in *Medicago truncatula*. *Plant Cell Environ.* 2015;38(10):1997–2011.
 28. Somssich M, Khan GA, Persson S. Cell Wall heterogeneity in root development of *Arabidopsis*. *Front Plant Sci.* 2016;7:1242.
 29. Adam T, Bouhidel K, Der C, Robert F, Najid A, Simon-Plas F, et al. Constitutive expression of clathrin hub hinders elicitor-induced clathrin-mediated endocytosis and defense gene expression in plant cells. *FEBS Lett.* 2012;586(19):3293–8.
 30. Frescatada-Rosa M, Stanislas T, Backues SK, Reichardt I, Men S, Boutte Y, et al. High lipid order of *Arabidopsis* cell-plate membranes mediated by sterol and DYNAMIN-RELATED PROTEIN1A function. *Plant J.* 2014;80(5): 745–57.
 31. Gerbeau-Pissot P, Der C, Thomas D, Anca I-A, Grosjean K, Roche Y, et al. Modification of plasma membrane organization in tobacco cells elicited by cryptogin. *Plant Physiol.* 2014;164(1):273–86.
 32. Zhao XY, Li RL, Lu CF, Baluska F, Wan YL. Di-4-ANEPPDHQ, a fluorescent probe for the visualisation of membrane microdomains in living *Arabidopsis thaliana* cells. *Plant Physiol Bioch.* 2015b;87:53–60.
 33. Zhao XY, Zhang XR, Qu YL, Li RL, Baluska F, Wen YL. Mapping of membrane lipid order in root apex zones of *Arabidopsis thaliana*. *Front Plant Sci.* 2015a; 6:1151.
 34. Jin L, Millard AC, Wuskell JP, Dong X, Wu D, Clark HA, et al. Characterization and application of a new optical probe for membrane lipid domains. *Biophys J.* 2006;90(7):2563–75.
 35. Owen DM, Rentero C, Magenau A, Abu-Siniyeh A, Gaus K. Quantitative imaging of membrane lipid order in cells and organisms. *Nat Protoc.* 2012; 7(1):24–35.
 36. Tian H, De Smet I, Ding Z. Shaping a root system: regulating lateral versus primary root growth. *Trends Plant Sci.* 2014;19(7):426–31.
 37. Baral A, Shruthi KS, Mathew MK. Vesicular trafficking and salinity responses in plants. *IUBMB Life.* 2015a;67(9):677–86.
 38. Leborgne-Castel N, Luu DT. Regulation of endocytosis by external stimuli in plant cells. *Plant Biosyst.* 2009;143(3):630–5.
 39. Cavalli V, Corti M, Gruenberg J. Endocytosis and signaling cascades: a close encounter. *FEBS Lett.* 2001;498(2–3):190–6.
 40. Claus LAN, Savatin DV, Russinova E. The crossroads of receptor-mediated signaling and endocytosis in plants. *J Integr Plant Biol.* 2018;60(9):827–40.
 41. Bolte S, Talbot C, Boutte Y, Catrice O, Read ND, Satiat-Jeunemaitre B. FM-dyes as experimental probes for dissecting vesicle trafficking in living plant cells. *J Microsc-Oxford.* 2004;214:159–73.
 42. Leborgne-Castel N, Lherminier J, Der C, Fromentin J, Houot V, Simon-Plas F. The plant defense elicitor cryptogin stimulates clathrin-mediated endocytosis correlated with reactive oxygen species production in bright yellow-2 tobacco cells. *Plant Physiol.* 2008;146(3):1255–66.
 43. Rigal A, Doyle SM, Robert S. Live cell imaging of FM4-64, a tool for tracing the endocytic pathways in *Arabidopsis* root cells. *Methods Mol Biol.* 2015; 1242:93–103.
 44. Kubitscheck U, Homann U, Thiel G. Osmotically evoked shrinking of guard-cell protoplasts causes vesicular retrieval of plasma membrane into the cytoplasm. *Planta.* 2000;210(3):423–31.
 45. Steponkus PL, Lynch DV. Freeze/thaw-induced destabilization of the plasma membrane and the effects of cold acclimation. *J Bioenerg Biomembr.* 1989; 21(1):21–41.
 46. Bahaji A, Aniento F, Cornejo M-J. Uptake of an endocytic marker by rice cells: variations related to osmotic and saline stress. *Plant Cell Physiol.* 2003; 44(10):1100–11.
 47. Boursiac Y, Boudet J, Postaire O, Luu DT, Tournaire-Roux C, Maurel C. Stimulus-induced downregulation of root water transport involves reactive oxygen species-activated cell signalling and plasma membrane intrinsic protein internalization. *Plant J.* 2008;56(2):207–18.
 48. Zwiewka M, Nodzynski T, Robert S, Vanneste S, Friml J. Osmotic stress modulates the balance between exocytosis and Clathrin-mediated endocytosis in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant.* 2015;8(8):1175–87.
 49. Galvan-Ampudia CS, Julkowska MM, Darwish E, Gandullo J, Korver RA, Brunoud G, et al. Halotropism is a response of plant roots to avoid a saline environment. *Curr Biol.* 2013;23(20):2044–50.
 50. Chen X, Irani NG, Friml J. Clathrin-mediated endocytosis: the gateway into plant cells. *Curr Opin Plant Biol.* 2011;14(6):674–82.
 51. Luo JL, Tang SH, Peng XJ, Yan XH, Zeng XH, Li J, et al. Elucidation of cross-talk and specificity of early response mechanisms to salt and PEG-simulated drought stresses in *Brassica napus* using comparative proteomic analysis. *PLoS One.* 2015;10(10):e0138974.
 52. Ueda M, Tsutsumi N, Fujimoto M. Salt stress induces internalization of plasma membrane aquaporin into the vacuole in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem Bioph Res Co.* 2016;474(4):742–6.
 53. Li XJ, Wang XH, Yang Y, Li RL, He QH, Fang XH, et al. Single-molecule analysis of PIP2:1 dynamics and partitioning reveals multiple modes of *Arabidopsis* plasma membrane aquaporin regulation. *Plant Cell.* 2011;23(10): 3780–97.
 54. Baral A, Irani NG, Fujimoto M, Nakano A, Mayor S, Mathew MK. Salt-induced remodeling of spatially restricted clathrin-independent endocytic pathways in *Arabidopsis* root. *Plant Cell.* 2015b;27(4):1297–315.
 55. Whitman CE, Travis RL. Phospholipid composition of a plasma membrane-enriched fraction from developing soybean roots. *Plant Physiol.* 1985;79(2): 494–8.
 56. Sarabia LD, Boughton BA, Rupasinghe T, van de Meene AML, Callahan DL, Hill CB, et al. High-mass-resolution MALDI mass spectrometry imaging reveals detailed spatial distribution of metabolites and lipids in roots of barley seedlings in response to salinity stress. *Metabolomics.* 2018;14(5):63.
 57. van der Heide T, Poolman B. Osmoregulated ABC-transport system of *Lactococcus lactis* senses water stress via changes in the physical state of the membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(13):7102–6.
 58. Wood JM. Osmosensing by bacteria: signals and membrane-based sensors. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1999;63(1):230–62.
 59. Zhao HC, Wang BC, Liu YY, Duan CR, Cai SX, Sakanishi A. Influence of water stress on the lipid physical state of plasma membranes from *P. betuloefolia* Bqe leaves. *Colloid Surface B.* 2000;19(2):181–5.
 60. Cesari AB, Paulucci NS, Biasutti MA, Reguera YB, Gallarato LA, Kilmurray C, et al. Reorganization of *Azospirillum brasilense* cell membrane is mediated

- by lipid composition adjustment to maintain optimal fluidity during water deficit. *J Appl Microbiol.* 2016;120(1):185–94.
61. Fan L, Hao H, Xue Y, Zhang L, Song K, Ding Z, et al. Dynamic analysis of Arabidopsis AP2 sigma subunit reveals a key role in clathrin-mediated endocytosis and plant development. *Development.* 2013;140(18):3826–37.
 62. Moscatelli A, Ciampolini F, Rodighiero S, Onelli E, Cresti M, Santo N, et al. Distinct endocytic pathways identified in tobacco pollen tubes using charged nanogold. *J Cell Sci.* 2007;120(Pt 21):3804–19.
 63. Luu DT, Maurel C. Aquaporin trafficking in plant cells: an emerging membrane-protein model. *Traffic.* 2013;14(6):629–35.
 64. Ye H, Roorkiwal M, Valliyodan B, Zhou L, Chen P, Varshney RK, et al. Genetic diversity of root system architecture in response to drought stress in grain legumes. *J Exp Bot.* 2018;69(13):3267–77.
 65. Barker D, Pfaff T, Moreau D, Groves E, Ruffel S, Lepetit M, et al. Growing *M. truncatula*: choice of substrates and growth conditions. In: Etienne-Pascal Journet UM, editor. *Medicago truncatula* handbook Ardmore, USA: The samuel Roberts Noble Fondation, <https://www.noble.org/medicago-handbook/>; 2006. p. 1–26.
 66. Michel BE. Evaluation of the water potentials of solutions of polyethylene Glycol-8000 both in the absence and presence of other solutes. *Plant Physiol.* 1983;72(1):66–70.
 67. Lobet G, Pages L, Draye X. A novel image-analysis toolbox enabling quantitative analysis of root system architecture. *Plant Physiol.* 2011;157(1): 29–39.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



Annexe 2 : Architecture aérienne et racinaire de Kayanne et Puget

Kayanne



Puget

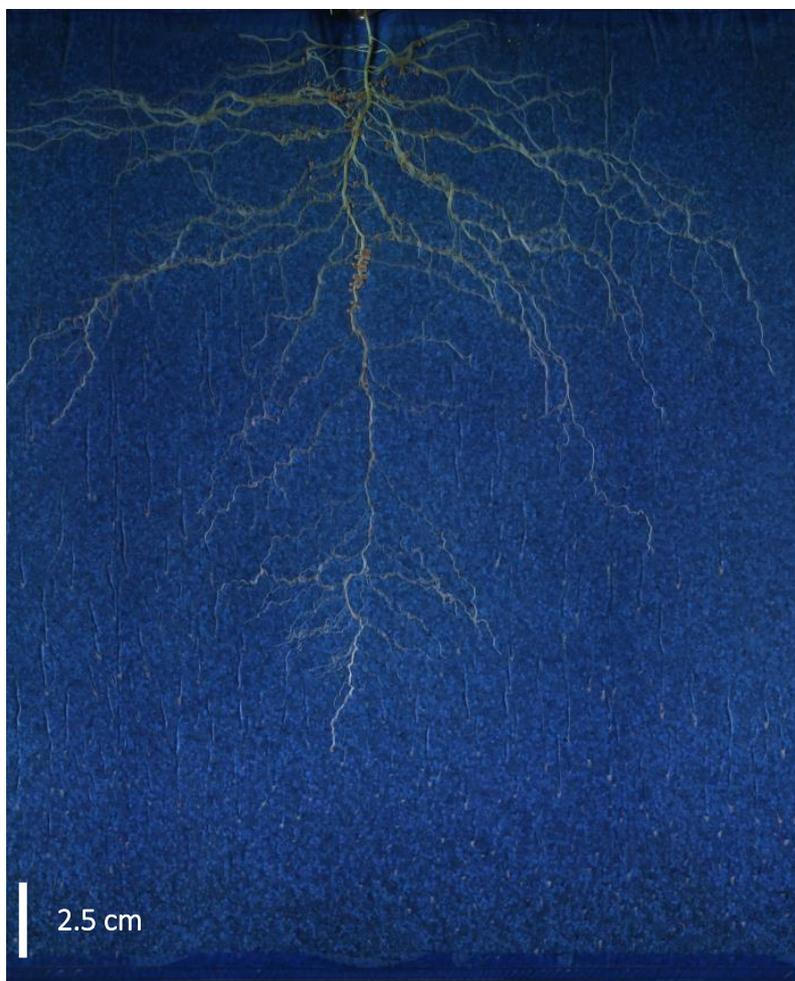


Architecture aérienne des géotypes Kayannes et Puget

Kayanne



Puget



Architecture racinaire des géotypes Kayannes et Puget

Supplementary Table S1: Plant trait values for each genotype and each water treatment measured or calculated throughout the kinetics experiment and associated results from the analysis of variance.

RESULTS OF STATISTICAL ANALYSES

Each tab corresponds to the analysis of one variable

Table 1. Table of one factor ANOVA followed by SNK post-hoc test, $p < 0.05$

For each sampling, for each genotype and water condition
 mean mean of samples
 sd standard deviation of samples
 SNK result of the SNK post-hoc test

Table 2. Table of multi factor ANOVA (genotype effect and water condition effect)

For each sampling, genotype effect, water condition effect and interaction of genotype and water condition effect were tested
 Df degrees of freedom
 Sum Sq sum of square
 Mean Sq mean of square
 F-value F-value
 Pr(>F) P-value

Conditions

7 samplings :
 0 days of water deficit
 7 days of water deficit
 13 days of water deficit
 3 days of re-watering
 7 days of re-watering
 10 days of re-watering
 15 days of re-watering

2 genotypes :
 Kayanne
 Puget

2 water conditions :
 WW well watered plants
 WD plants having experienced a water deficit

Plant total biomass

Table 1

Genotype	Water	0 days of water deficit			7 days of water deficit			13 days of water deficit			3 days of re-watering			7 days of re-watering			10 days of re-watering			15 days of re-watering					
		mean	sd	SNK	mean	sd	SNK	mean	sd	SNK	mean	sd	SNK	mean	sd	SNK	mean	sd	SNK	mean	sd	SNK			
kayanne	WD	NA	NA	NA	0.355	0.040	a	0.609	0.067	b	0.798	0.098	b	1.338	0.137	d	1.549	0.137	c	2.746	0.137	d	2.746	0.791	b
kayanne	WW	0.157	0.004	b	0.355	0.035	a	0.742	0.103	a	1.178	0.200	a	1.742	0.275	b	2.201	0.155	b	3.765	0.378	a	3.765	0.378	a
Puget	WD	NA	NA	NA	0.345	0.034	a	0.492	0.081	b	0.776	0.168	b	1.501	0.258	bc	1.775	0.197	c	3.478	0.553	a	3.478	0.553	a
Puget	WW	0.184	0.011	a	0.360	0.030	a	0.598	0.115	b	1.030	0.022	a	2.046	0.260	a	2.521	0.178	a	4.285	0.283	a	4.285	0.283	a

Table 2

genotype	Sampling	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Residuals	lay of water def	1	1.81E-03	1.81E-03	2.70E+01	8.26E-04
genotype	lay of water def	8	5.36E-04	6.70E-05	NA	NA
water condition	ays of water def	1	6.93E-05	6.93E-05	5.61E-02	8.16E-01
Residuals	ays of water def	1	2.44E-04	2.44E-04	1.97E-01	6.62E-01
genotype	: wdays of water def	1	3.12E-04	3.12E-04	2.53E-01	6.22E-01
Residuals	ays of water def	17	2.10E-02	1.24E-03	NA	NA
genotype	lays of water del	1	9.25E-02	9.25E-02	1.04E+01	4.63E-03
water condition	lays of water del	1	7.72E-02	7.72E-02	8.71E+00	8.54E-03
Residuals	: wdays of water del	1	1.04E-03	1.04E-03	1.18E-01	7.35E-01
genotype	lays of water del	18	1.59E-01	8.86E-03	NA	NA
water condition	day of re-waterri	1	6.66E-02	6.66E-02	3.06E+00	9.71E-02
Residuals	day of re-waterri	1	5.67E-01	5.67E-01	2.61E+01	7.40E-05
genotype	: wday of re-waterri	1	2.09E-02	2.09E-02	9.61E-01	3.40E-01
Residuals	day of re-waterri	18	3.92E-01	2.18E-02	NA	NA
genotype	day of re-waterri	1	2.99E-01	2.99E-01	5.42E+00	3.18E-02
water condition	day of re-waterri	1	1.21E+00	1.21E+00	2.19E+01	1.87E-04
Residuals	: wday of re-waterri	1	2.73E-02	2.73E-02	4.96E-01	4.90E-01
genotype	day of re-waterri	18	9.92E-01	5.51E-02	NA	NA
water condition	day of re-waterri	1	6.25E-01	6.25E-01	2.17E+01	1.94E-04
Residuals	day of re-waterri	1	2.68E+00	2.68E+00	9.31E+01	1.54E-08
genotype	: wday of re-waterri	1	1.15E-02	1.15E-02	4.01E-01	5.34E-01
Residuals	day of re-waterri	18	5.17E-01	2.87E-02	NA	NA
genotype	day of re-waterri	1	2.13E+00	2.13E+00	7.14E+00	1.56E-02
water condition	day of re-waterri	1	4.69E+00	4.69E+00	1.57E+01	9.20E-04
Residuals	: wday of re-waterri	1	6.13E-02	6.13E-02	2.05E-01	6.56E-01
genotype	day of re-waterri	18	5.38E+00	2.99E-01	NA	NA

Shoot biomass

Table 1

Genotype	Water condition	0 days of water deficit			7 days of water deficit			13 days of water deficit			3 days of re-watering			7 days of re-watering			10 days of re-watering			15 days of re-watering		
		mean	sd	SNK	mean	sd	SNK	mean	sd	SNK	mean	sd	SNK	mean	sd	SNK	mean	sd	SNK	mean	sd	SNK
Kayanne	WD	NA	NA	NA	0.224	0.028	a	0.423	0.040	b	0.610	0.084	b	1.046	0.090	b	1.263	0.110	b	2.327	0.667	b
Kayanne	WW	0.083	0.004	b	0.234	0.028	a	0.551	0.080	a	0.948	0.165	a	1.406	0.211	a	1.841	0.135	a	3.241	0.341	a
Puget	WD	NA	NA	NA	0.182	0.023	b	0.289	0.055	c	0.524	0.118	b	1.041	0.217	b	1.277	0.159	b	2.636	0.395	ab
Puget	WW	0.099	0.007	a	0.198	0.017	ab	0.371	0.078	bc	0.704	0.033	b	1.442	0.180	a	1.877	0.143	a	3.246	0.237	a

Table 2

Sampling	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
geno 0 day of water deficit	1	6.72E-04	6.72E-04	2.30E-01	1.36E-03
Residuals 0 day of water deficit	8	2.34E-04	2.92E-05	NA	NA
geno 7 days of water deficit	1	9.05E-03	9.05E-03	1.47E-01	1.33E-03
ttt 7 days of water deficit	1	8.82E-04	8.82E-04	1.43E+00	2.48E-01
geno:ttt 7 days of water deficit	1	4.22E-05	4.22E-05	6.85E-02	7.97E-01
Residuals 7 days of water deficit	17	1.05E-02	6.16E-04	NA	NA
geno 13 days of water deficit	1	1.34E-01	1.34E-01	3.12E-01	2.64E-05
ttt 13 days of water deficit	1	5.87E-02	5.87E-02	1.37E-01	1.65E-03
geno:ttt 13 days of water deficit	1	2.95E-03	2.95E-03	6.87E-01	4.18E-01
Residuals 13 days of water deficit	18	7.73E-02	4.30E-03	NA	NA
geno 3 day of re-watering	1	1.83E-01	1.83E-01	1.34E-01	1.77E-03
ttt 3 day of re-watering	1	3.88E-01	3.88E-01	2.85E-01	4.49E-05
geno:ttt 3 day of re-watering	1	3.32E-02	3.32E-02	2.44E+00	1.35E-01
Residuals 3 day of re-watering	18	2.45E-01	1.36E-02	NA	NA
geno 7 day of re-watering	1	1.25E-03	1.25E-03	3.86E-02	8.46E-01
ttt 7 day of re-watering	1	7.90E-01	7.90E-01	2.45E-01	1.04E-04
geno:ttt 7 day of re-watering	1	2.34E-03	2.34E-03	7.26E-02	7.91E-01
Residuals 7 day of re-watering	18	5.81E-01	3.23E-02	NA	NA
geno 10 day of re-watering	1	3.76E-02	3.76E-02	1.97E-00	1.77E-01
ttt 10 day of re-watering	1	1.88E+00	1.88E+00	9.86E-01	9.96E-09
geno:ttt 10 day of re-watering	1	6.79E-04	6.79E-04	3.56E-02	8.52E-01
Residuals 10 day of re-watering	18	3.43E-01	1.91E-02	NA	NA
geno 15 day of re-watering	1	1.34E-01	1.34E-01	6.62E-01	4.27E-01
ttt 15 day of re-watering	1	3.31E+00	3.31E+00	1.63E+01	7.79E-04
geno:ttt 15 day of re-watering	1	1.26E-01	1.26E-01	6.21E-01	4.41E-01
Residuals 15 day of re-watering	18	3.66E+00	2.03E-01	NA	NA

Nodulated root biomass

Table 1

Genotype	Water condition	0 days of water deficit			7 days of water deficit			13 days of water deficit			3 days of re-watering			7 days of re-watering			10 days of re-watering			15 days of re-watering		
		mean	sd	SNK	mean	sd	SNK	mean	sd	SNK	mean	sd	SNK	mean	sd	SNK	mean	sd	SNK	mean	sd	SNK
Kayanne	WD	NA	NA	NA	0.131	0.020	b	0.186	0.033	a	0.188	0.019	c	0.291	0.036	c	0.285	0.033	d	0.419	0.127	c
Kayanne	WW	0.074	0.004	b	0.120	0.008	b	0.191	0.025	a	0.230	0.039	bc	0.335	0.066	c	0.360	0.030	c	0.525	0.044	c
Puget	WD	NA	NA	NA	0.163	0.014	a	0.204	0.028	a	0.252	0.050	b	0.460	0.049	b	0.498	0.043	b	0.841	0.180	b
Puget	WW	0.085	0.005	a	0.162	0.015	a	0.227	0.040	a	0.326	0.040	a	0.604	0.089	a	0.643	0.056	a	1.039	0.135	a

Table 2

Sampling	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
geno	1	2.75E-04	2.75E-04	1.61E+01	3.89E-03
Residuals	8	1.37E-04	1.71E-05	NA	NA
geno	1	7.53E-03	7.53E-03	3.60E+01	1.44E-05
ttt	1	1.98E-04	1.98E-04	9.47E-01	3.44E-01
geno:ttt	1	1.25E-04	1.25E-04	5.96E-01	4.51E-01
Residuals	17	3.56E-03	2.09E-04	NA	NA
geno	1	3.87E-03	3.87E-03	3.71E+00	6.99E-02
ttt	1	1.26E-03	1.26E-03	1.21E+00	2.87E-01
geno:ttt	1	4.85E-04	4.85E-04	4.65E-01	5.04E-01
Residuals	18	1.88E-02	1.04E-03	NA	NA
geno	1	2.87E-02	2.87E-02	1.92E+01	3.56E-04
ttt	1	1.70E-02	1.70E-02	1.14E+01	3.40E-03
geno:ttt	1	1.42E-03	1.42E-03	9.53E-01	3.42E-01
Residuals	18	2.69E-02	1.49E-03	NA	NA
geno	1	2.61E-01	2.61E-01	6.72E+01	1.72E-07
ttt	1	4.38E-02	4.38E-02	1.13E+01	3.49E-03
geno:ttt	1	1.37E-02	1.37E-02	3.52E+00	7.70E-02
Residuals	18	6.99E-02	3.88E-03	NA	NA
geno	1	3.56E-01	3.56E-01	1.94E+02	4.50E-11
ttt	1	7.01E-02	7.01E-02	3.82E+01	7.85E-06
geno:ttt	1	6.61E-03	6.61E-03	3.60E+00	7.40E-02
Residuals	18	3.31E-02	1.84E-03	NA	NA
geno	1	1.70E+00	1.70E+00	7.35E+01	9.04E-08
ttt	1	1.20E-01	1.20E-01	7.36E+00	1.42E-02
geno:ttt	1	1.16E-02	1.16E-02	7.11E-01	4.10E-01
Residuals	18	2.93E-01	1.63E-02	NA	NA

Root biomass

Table 1

Genotype	Water condition	0 days of water deficit			7 days of water deficit			13 days of water deficit			3 days of re-watering			7 days of re-watering			10 days of re-watering			15 days of re-watering		
		mean	sd	SNK	mean	sd	SNK	mean	sd	SNK	mean	sd	SNK	mean	sd	SNK	mean	sd	SNK	mean	sd	SNK
Kayanne	WD	NA	NA	NA	0.118	0.018	b	0.168	0.031	a	0.168	0.017	c	0.246	0.029	c	0.239	0.029	d	0.346	0.103	c
Kayanne	WW	0.072	0.004	b	0.104	0.006	b	0.163	0.021	a	0.195	0.032	bc	0.278	0.054	c	0.304	0.028	c	0.431	0.046	c
Puget	WD	NA	NA	NA	0.143	0.012	a	0.181	0.025	a	0.224	0.043	b	0.385	0.040	b	0.412	0.041	b	0.684	0.154	b
Puget	WW	0.082	0.005	a	0.139	0.014	a	0.194	0.032	a	0.280	0.036	a	0.510	0.076	a	0.550	0.044	a	0.880	0.122	a

Table 2

Sampling	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
geno	1	2.59E-04	2.59E-04	1.39E+01	5.76E-03
Residuals	8	1.49E-04	1.86E-05	NA	NA
geno	1	4.95E-03	4.95E-03	3.04E+01	3.77E-05
ttt	1	4.29E-04	4.29E-04	2.64E+00	1.23E-01
geno:ttt	1	1.23E-04	1.23E-04	7.59E-01	3.96E-01
Residuals	17	2.76E-03	1.63E-04	NA	NA
geno	1	2.64E-03	2.64E-03	3.42E+00	8.11E-02
ttt	1	1.08E-04	1.08E-04	1.40E-01	7.13E-01
geno:ttt	1	4.35E-04	4.35E-04	5.63E-01	4.63E-01
Residuals	18	1.39E-02	7.73E-04	NA	NA
geno	1	2.29E-02	2.29E-02	2.06E+01	2.52E-04
ttt	1	8.55E-03	8.55E-03	7.69E+00	1.25E-02
geno:ttt	1	1.12E-03	1.12E-03	1.01E+00	3.28E-01
Residuals	18	2.00E-02	1.11E-03	NA	NA
geno	1	1.88E-01	1.88E-01	6.93E+01	1.38E-07
ttt	1	3.02E-02	3.02E-02	1.11E+01	3.68E-03
geno:ttt	1	1.18E-02	1.18E-02	4.36E+00	5.12E-02
Residuals	18	4.88E-02	2.71E-03	NA	NA
geno	1	2.55E-01	2.55E-01	1.85E+02	6.65E-11
ttt	1	6.09E-02	6.09E-02	4.41E+01	3.12E-06
geno:ttt	1	7.20E-03	7.20E-03	5.22E+00	3.47E-02
Residuals	18	2.48E-02	1.38E-03	NA	NA
geno	1	8.46E-01	8.46E-01	7.01E+01	1.28E-07
ttt	1	1.01E-01	1.01E-01	8.35E+00	9.76E-03
geno:ttt	1	1.68E-02	1.68E-02	1.40E+00	2.53E-01
Residuals	18	2.17E-01	1.21E-02	NA	NA

Nodule biomass

Table 1

Genotype	Water condition	0 days of water deficit			7 days of water deficit			13 days of water deficit			3 days of re-watering			7 days of re-watering			10 days of re-watering			15 days of re-watering		
		mean	sd	SNK	mean	sd	SNK	mean	sd	SNK	mean	sd	SNK	mean	sd	SNK	mean	sd	SNK	mean	sd	SNK
Kayanne	WD	NA	NA	NA	0.013	0.003	b	0.018	0.002	c	0.020	0.003	c	0.045	0.008	c	0.047	0.007	b	0.073	0.026	b
Kayanne	WW	0.002	0.001	a	0.016	0.003	b	0.028	0.004	ab	0.035	0.008	b	0.057	0.012	c	0.056	0.004	b	0.094	0.010	b
Puget	WD	NA	NA	NA	0.020	0.002	a	0.022	0.003	bc	0.028	0.008	bc	0.075	0.011	b	0.086	0.008	a	0.157	0.028	a
Puget	WW	0.003	0.001	a	0.023	0.001	a	0.034	0.011	a	0.046	0.004	a	0.094	0.016	a	0.093	0.013	a	0.159	0.016	a

Table 2

Sampling	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
geno 0 day of water deficit	1	2.56E-07	2.56E-07	2.06E-01	6.62E-01
Residuals	8	9.96E-06	1.24E-06	NA	NA
geno 7 days of water deficit	1	2.70E-04	2.70E-04	4.24E+01	5.31E-06
ttt	1	4.40E-05	4.40E-05	6.91E+00	1.76E-02
geno:ttt	1	4.10E-09	4.10E-09	6.44E-04	9.80E-01
Residuals	17	1.08E-04	6.36E-06	NA	NA
geno 13 days of water deficit	1	1.17E-04	1.17E-04	2.94E+00	1.04E-01
ttt	1	6.28E-04	6.28E-04	1.58E+01	8.97E-04
geno:ttt	1	1.35E-06	1.35E-06	3.39E-02	8.56E-01
Residuals	18	7.17E-04	3.98E-05	NA	NA
geno 3 day of re-watering	1	3.27E-04	3.27E-04	7.87E+00	1.17E-02
ttt	1	1.43E-03	1.43E-03	3.45E+01	1.47E-05
geno:ttt	1	1.75E-05	1.75E-05	4.22E-01	5.24E-01
Residuals	18	7.48E-04	4.15E-05	NA	NA
geno 7 day of re-watering	1	6.01E-03	6.01E-03	4.20E+01	4.26E-06
ttt	1	1.27E-03	1.27E-03	8.91E+00	7.94E-03
geno:ttt	1	6.62E-05	6.62E-05	4.63E-01	5.05E-01
Residuals	18	2.58E-03	1.43E-04	NA	NA
geno 10 day of re-watering	1	8.41E-03	8.41E-03	1.05E+02	5.91E-09
ttt	1	3.29E-04	3.29E-04	4.13E+00	5.71E-02
geno:ttt	1	1.25E-05	1.25E-05	1.57E-01	6.97E-01
Residuals	18	1.43E-03	7.97E-05	NA	NA
geno 15 day of re-watering	1	3.03E-02	3.03E-02	6.71E+01	1.75E-07
ttt	1	8.28E-04	8.28E-04	1.83E+00	1.89E-01
geno:ttt	1	4.92E-04	4.92E-04	1.09E+00	3.11E-01
Residuals	18	8.14E-03	4.52E-04	NA	NA

Nodule number

Table 1

Genotype	Water condition	0 days of water deficit			7 days of water deficit			13 days of water deficit			3 days of re-watering			7 days of re-watering			10 days of re-watering			15 days of re-watering		
		mean	sd	SNK	mean	sd	SNK	mean	sd	SNK	mean	sd	SNK	mean	sd	SNK	mean	sd	SNK	mean	sd	SNK
Kayanne	WD	NA	NA	NA	101,4	20,4	a	94,3	20,7	b	105,2	22,6	a	191,8	51,7	ab	281,2	18,3	a	380,8	133,8	b
Kayanne	WW	23,4	6,1	a	97,2	24,1	a	136,8	14,9	a	117,4	28,7	a	248,8	36,5	a	286,3	9,7	a	336,3	26,7	b
Puget	WD	NA	NA	NA	119,2	21,4	a	138,2	31,1	a	118,0	23,1	a	145,4	59,6	b	306,4	39,6	a	527,8	110,1	a
Puget	WW	28,8	10,5	a	137,3	43,8	a	121,8	29,5	ab	139,2	19,0	a	230,7	21,6	a	294,2	29,8	a	364,3	32,7	b

Table 2

Sampling	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
geno	1	72,9	72,9	0,992	0,348
Residuals	8	588,0	73,5	NA	NA
geno	1	4879,7	4879,7	5,637	0,028
ttt	1	322,2	322,2	0,372	0,549
geno:ttt	1	716,8	716,8	0,828	0,374
Residuals	19	16448,2	865,7	NA	NA
geno	1	1133,7	1133,7	1,924	0,182
ttt	1	1360,4	1360,4	2,309	0,146
geno:ttt	1	4730,7	4730,7	8,029	0,011
Residuals	18	10605,8	589,2	NA	NA
geno	1	1572,5	1572,5	2,842	0,109
ttt	1	1524,3	1524,3	2,755	0,114
geno:ttt	1	109,6	109,6	0,198	0,662
Residuals	18	9958,8	553,3	NA	NA
geno	1	3666,2	3666,2	1,872	0,188
ttt	1	27586,8	27586,8	14,087	0,001
geno:ttt	1	1092,1	1092,1	0,558	0,465
Residuals	18	35250,2	1958,3	NA	NA
geno	1	1312,4	1312,4	1,700	0,211
ttt	1	99,0	99,0	0,128	0,725
geno:ttt	1	365,8	365,8	0,474	0,501
Residuals	16	12355,6	772,2	NA	NA
geno	1	27586,8	27586,8	3,685	0,071
ttt	1	51177,9	51177,9	6,836	0,018
geno:ttt	1	18854,9	18854,9	2,518	0,130
Residuals	18	134758,3	7486,6	NA	NA

Evapotranspiration

Table 1

Genotype	Water condition	0 days of water deficit			7 days of water deficit			13 days of water deficit			3 days of re-watering			7 days of re-watering			10 days of re-watering			15 days of re-watering		
		mean	sd	SNK	mean	sd	SNK	mean	sd	SNK	mean	sd	SNK	mean	sd	SNK	mean	sd	SNK	mean	sd	SNK
kayanne	WD	NA	NA	NA	25.91	0.85	b	18.23	2.99	b	53.58	2.78	a	61.92	3.44	a	78.94	7.36	b	86.10	15.04	b
kayanne	WW	34.86	2.25	a	48.17	7.84	a	52.80	3.01	a	57.08	6.58	a	61.33	6.16	a	77.83	5.85	b	91.87	5.70	b
Puget	WD	NA	NA	NA	25.57	1.87	b	17.89	2.57	b	57.42	6.08	a	67.45	6.09	a	90.22	12.09	a	106.44	13.37	a
Puget	WW	32.03	2.81	a	46.75	2.96	a	51.44	4.62	a	55.25	3.52	a	67.70	4.33	a	95.78	6.66	a	111.56	7.44	a

Table 2

Sampling	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
0 day of water deficit	1	2.00E+01	2.00E+00	3.08E+00	1.17E-01
Residuals	8	5.19E+01	6.49E+00	NA	NA
7 days of water deficit	1	8.42E+01	8.42E+01	4.10E+00	5.89E-02
water condition	1	2.43E+03	2.43E+03	1.18E+02	4.52E-09
7 days of water deficit	1	1.47E+00	1.47E+00	7.17E-02	7.92E-01
Residuals	17	3.49E+02	2.05E+01	NA	NA
13 days of water deficit	1	3.94E+00	3.94E+00	3.35E-01	5.70E-01
water condition	1	6.36E+03	6.36E+03	5.41E+02	6.99E-15
13 days of water deficit	1	1.39E+00	1.39E+00	1.19E-01	7.35E-01
Residuals	18	2.12E+02	1.18E+01	NA	NA
3 day of re-watering	1	8.07E+00	8.07E+00	3.04E-01	5.88E-01
water condition	1	5.20E+00	5.20E+00	1.96E-01	6.63E-01
3 day of re-watering	1	4.28E+01	4.28E+01	1.61E+00	2.20E-01
Residuals	18	4.77E+02	2.65E+01	NA	NA
7 day of re-watering	1	1.98E+02	1.98E+02	7.36E+00	1.42E-02
water condition	1	2.30E-01	2.30E-01	8.78E-03	9.26E-01
7 day of re-watering	1	9.47E-01	9.47E-01	3.61E-02	8.51E-01
Residuals	18	4.72E+02	2.62E+01	NA	NA
10 day of re-watering	1	1.15E+03	1.15E+03	1.56E+01	9.50E-04
water condition	1	3.63E+01	3.63E+01	4.93E-01	4.92E-01
10 day of re-watering	1	5.93E+01	5.93E+01	8.04E-01	3.82E-01
Residuals	18	1.33E+03	7.37E+01	NA	NA
15 day of re-watering	1	2.19E+03	2.19E+03	1.76E+01	5.39E-04
water condition	1	1.65E+02	1.65E+02	1.33E+00	2.64E-01
15 day of re-watering	1	5.70E-01	5.70E-01	4.60E-03	9.47E-01
Residuals	18	2.23E+03	1.24E+02	NA	NA

Nitrogen Nutrition Index

Table 1

Genotype	Water condition	0 days of water deficit			7 days of water deficit			13 days of water deficit			3 days of re-watering			7 days of re-watering			10 days of re-watering			15 days of re-watering		
		mean	sd	SNK	mean	sd	SNK	mean	sd	SNK	mean	sd	SNK	mean	sd	SNK	mean	sd	SNK	mean	sd	SNK
Kayanne	WD	NA	NA	NA	0.83	0.02	a	0.81	0.01	d	0.75	0.02	d	0.74	0.02	d	0.78	0.01	d	0.79	0.02	b
Kayanne	WW	0.80	0.03	a	0.83	0.03	a	0.85	0.02	c	0.86	0.08	c	0.83	0.02	c	0.82	0.02	c	0.80	0.04	b
Puget	WD	NA	NA	NA	0.83	0.03	a	1.02	0.02	b	0.93	0.07	b	0.93	0.06	b	0.95	0.04	b	1.02	0.05	a
Puget	WW	0.63	0.04	b	0.86	0.12	a	1.10	0.04	a	1.02	0.04	a	1.12	0.04	a	1.10	0.03	a	1.06	0.03	a

Table 2

Sampling	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
genotype	1	7.40E-02	7.40E-02	5.13E+01	9.61E-05
Residuals	8	1.15E-02	1.44E-03	NA	NA
genotype	1	1.21E-03	1.21E-03	3.98E-01	5.36E-01
water condition	1	1.37E-03	1.37E-03	4.53E-01	5.10E-01
genotype : water condition	1	9.29E-04	9.29E-04	3.07E-01	5.87E-01
Residuals	17	5.14E-02	3.02E-03	NA	NA
genotype	1	2.89E-01	2.89E-01	4.93E+02	1.57E-14
water condition	1	1.89E-02	1.89E-02	3.22E+01	2.21E-05
genotype : water condition	1	9.66E-04	9.66E-04	1.65E+00	2.15E-01
Residuals	18	1.06E-02	5.86E-04	NA	NA
genotype	1	1.45E-01	1.45E-01	4.37E+01	3.32E-06
water condition	1	4.87E-02	4.87E-02	1.47E+01	1.23E-03
genotype : water condition	1	5.29E-04	5.29E-04	1.59E-01	6.95E-01
Residuals	18	5.98E-02	3.32E-03	NA	NA
genotype	1	3.06E-01	3.06E-01	2.50E+02	5.36E-12
water condition	1	9.99E-02	9.99E-02	8.15E+01	4.20E-08
genotype : water condition	1	1.45E-02	1.45E-02	1.18E+01	2.96E-03
Residuals	18	2.21E-02	1.23E-03	NA	NA
genotype	1	2.87E-01	2.87E-01	4.41E+02	4.15E-14
water condition	1	5.90E-02	5.90E-02	9.05E+01	1.91E-08
genotype : water condition	1	1.60E-02	1.60E-02	2.45E+01	1.03E-04
Residuals	18	1.17E-02	6.52E-04	NA	NA
genotype	1	3.24E-01	3.24E-01	2.46E+02	6.07E-12
water condition	1	2.50E-03	2.50E-03	1.90E+00	1.85E-01
genotype : water condition	1	9.05E-04	9.05E-04	6.87E-01	4.18E-01
Residuals	18	2.37E-02	1.32E-03	NA	NA

Nodule-Nodulated Root ratio

Table 1

Genotype	Water condition	0 days of water deficit			7 days of water deficit			13 days of water deficit			3 days of re-watering			7 days of re-watering			10 days of re-watering			15 days of re-watering		
		mean	sd	SNK	mean	sd	SNK	mean	sd	SNK	mean	sd	SNK	mean	sd	SNK	mean	sd	SNK	mean	sd	SNK
Kayanne	WD	NA	NA	NA	0.10	0.01	b	0.10	0.01	b	0.11	0.01	b	0.15	0.02	a	0.16	0.02	ab	0.17	0.02	a
Kayanne	WW	0.03	0.02	a	0.13	0.02	a	0.15	0.01	a	0.15	0.01	a	0.17	0.00	a	0.16	0.01	ab	0.18	0.03	a
Puget	WD	NA	NA	NA	0.13	0.01	a	0.11	0.01	b	0.11	0.02	b	0.16	0.01	a	0.17	0.02	a	0.19	0.01	a
Puget	WW	0.03	0.01	a	0.14	0.01	a	0.15	0.03	a	0.14	0.01	a	0.16	0.02	a	0.14	0.01	b	0.15	0.01	a

Table 2

	Sampling	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
genotype	0 day of water deficit	1	1.25E-08	1.25E-08	6.27E-05	9.94E-01
Residuals	0 day of water deficit	8	1.60E-03	2.00E-04	NA	NA
genotype	7 days of water deficit	1	1.51E-03	1.51E-03	9.09E+00	7.80E-03
water condition	7 days of water deficit	1	3.53E-03	3.53E-03	2.12E+01	2.54E-04
genotype : water condition	7 days of water deficit	1	2.03E-04	2.03E-04	1.22E+00	2.85E-01
Residuals	7 days of water deficit	17	2.83E-03	1.67E-04	NA	NA
genotype	13 days of water deficit	1	9.98E-05	9.98E-05	3.38E-01	5.68E-01
water condition	13 days of water deficit	1	9.76E-03	9.76E-03	3.31E+01	1.87E-05
genotype : water condition	13 days of water deficit	1	2.67E-04	2.67E-04	9.06E-01	3.54E-01
Residuals	13 days of water deficit	18	5.31E-03	2.95E-04	NA	NA
genotype	3 day of re-watering	1	1.79E-04	1.79E-04	9.80E-01	3.35E-01
water condition	3 day of re-watering	1	8.05E-03	8.05E-03	4.40E+01	3.17E-06
genotype : water condition	3 day of re-watering	1	1.88E-04	1.88E-04	1.03E+00	3.24E-01
Residuals	3 day of re-watering	18	3.30E-03	1.83E-04	NA	NA
genotype	7 day of re-watering	1	6.32E-05	6.32E-05	3.82E-01	5.44E-01
water condition	7 day of re-watering	1	1.74E-04	1.74E-04	1.05E+00	3.19E-01
genotype : water condition	7 day of re-watering	1	6.97E-04	6.97E-04	4.22E+00	5.48E-02
Residuals	7 day of re-watering	18	2.97E-03	1.65E-04	NA	NA
genotype	10 day of re-watering	1	1.68E-05	1.68E-05	6.88E-02	7.96E-01
water condition	10 day of re-watering	1	2.20E-03	2.20E-03	9.03E+00	7.61E-03
genotype : water condition	10 day of re-watering	1	6.97E-04	6.97E-04	2.86E+00	1.08E-01
Residuals	10 day of re-watering	18	4.38E-03	2.43E-04	NA	NA
genotype	15 day of re-watering	1	1.55E-04	1.55E-04	3.70E-01	5.51E-01
water condition	15 day of re-watering	1	7.37E-04	7.37E-04	1.76E+00	2.02E-01
genotype : water condition	15 day of re-watering	1	2.44E-03	2.44E-03	5.81E+00	2.69E-02
Residuals	15 day of re-watering	18	7.55E-03	4.19E-04	NA	NA

Stomatal conductance

Table 1

Genotype	Water condition	0 days of water deficit			7 days of water deficit			13 days of water deficit			3 days of re-watering			7 days of re-watering			10 days of re-watering			15 days of re-watering					
		mean	sd	SNK	mean	sd	SNK	mean	sd	SNK	mean	sd	SNK	mean	sd	SNK	mean	sd	SNK	mean	sd	SNK			
Kayanne	WD	NA	NA	NA	0.16	0.04	a	0.74	0.13	a	0.26	0.06	b	0.60	0.08	a	0.35	0.14	a	0.43	0.15	a	0.58	0.34	a
Kayanne	WW	NA	NA	NA	0.16	0.04	a	0.74	0.13	a	0.45	0.12	a	0.62	0.14	a	0.44	0.18	a	0.44	0.15	a	0.67	0.40	a
Puget	WD	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.22	0.06	c	0.24	0.09	b	0.41	0.16	b	0.32	0.16	a	0.38	0.14	a	0.61	0.62	a
Puget	WW	0.05	0.01	b	0.05	0.01	b	0.39	0.10	b	0.27	0.07	b	0.33	0.04	b	0.36	0.20	a	0.43	0.10	a	0.47	0.28	a

Table 2

	Sampling	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
genotype	0 day of water deficit	1	2.72E-02	2.72E-02	3.96E+01	7.50E-04
Residuals	0 day of water deficit	6	4.12E-03	6.87E-04	NA	NA
genotype	7 days of water deficit	1	5.58E-01	5.58E-01	5.51E+01	4.98E-07
water condition	7 days of water deficit	1	2.87E-01	2.87E-01	2.83E+01	3.91E-05
genotype : water condition	7 days of water deficit	1	1.67E-02	1.67E-02	1.65E+00	2.15E-01
Residuals	7 days of water deficit	19	1.92E-01	1.01E-02	NA	NA
genotype	13 days of water deficit	1	5.76E-02	5.76E-02	7.13E+00	1.51E-02
water condition	13 days of water deficit	1	7.40E-02	7.40E-02	9.17E+00	6.92E-03
genotype : water condition	13 days of water deficit	1	4.53E-02	4.53E-02	5.61E+00	2.86E-02
Residuals	13 days of water deficit	19	1.53E-01	8.07E-03	NA	NA
genotype	3 day of re-watering	1	3.33E-01	3.33E-01	2.52E+01	7.65E-05
water condition	3 day of re-watering	1	5.37E-03	5.37E-03	4.06E-01	5.32E-01
genotype : water condition	3 day of re-watering	1	1.38E-02	1.38E-02	1.05E+00	3.19E-01
Residuals	3 day of re-watering	19	2.51E-01	1.32E-02	NA	NA
genotype	7 day of re-watering	1	1.86E-02	1.86E-02	6.15E-01	4.43E-01
water condition	7 day of re-watering	1	2.21E-02	2.21E-02	7.30E-01	4.04E-01
genotype : water condition	7 day of re-watering	1	3.50E-03	3.50E-03	1.16E-01	7.38E-01
Residuals	7 day of re-watering	18	5.45E-01	3.03E-02	NA	NA
genotype	10 day of re-watering	1	2.08E-03	2.08E-03	1.11E-01	7.43E-01
water condition	10 day of re-watering	1	3.70E-03	3.70E-03	1.98E-01	6.62E-01
genotype : water condition	10 day of re-watering	1	1.46E-03	1.46E-03	7.81E-02	7.83E-01
Residuals	10 day of re-watering	16	2.99E-01	1.87E-02	NA	NA
genotype	15 day of re-watering	1	4.77E-02	4.77E-02	2.55E-01	6.20E-01
water condition	15 day of re-watering	1	5.04E-03	5.04E-03	2.69E-02	8.71E-01
genotype : water condition	15 day of re-watering	1	6.84E-02	6.84E-02	3.65E-01	5.53E-01
Residuals	15 day of re-watering	19	3.56E+00	1.87E-01	NA	NA

Total nitrogen amount

Table 1

Genotype	Water condition	0 days of water deficit		7 days of water deficit		13 days of water deficit		3 days of re-watering		7 days of re-watering		10 days of re-watering		15 days of re-watering					
		mean	sd	mean	sd	mean	sd	mean	sd	mean	sd	mean	sd	mean	sd				
Kayanne	WD	NA	NA	NA	NA	0,0150	0,0017	a	0,0296	0,0028	b	0,0476	0,0038	c	0,5843	0,3369	a		
Kayanne	VWV	0,0072	0,0005	a	0,0150	0,0016	a	0,0313	0,0043	a	0,0478	0,0072	a	0,0676	0,0106	b	0,6693	0,4000	a
Puget	WD	NA	NA	NA	NA	0,0146	0,0015	a	0,0337	0,0061	b	0,0623	0,0086	b	0,6064	0,6189	a		
Puget	VWV	0,0065	0,0004	a	0,0155	0,0021	a	0,0302	0,0061	ab	0,0483	0,0006	a	0,0983	0,0110	a	0,4726	0,2782	a

Table 2

	Sampling	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
genotype	0 day of water deficit	1	9,55E-07	9,55E-07	4,59E+00	6,44E-02
Residuals	0 day of water deficit	8	1,66E-06	2,08E-07	NA	NA
genotype	7 days of water deficit	1	1,87E-08	1,87E-08	6,38E-03	9,37E-01
water condition	7 days of water deficit	1	9,57E-07	9,57E-07	3,27E-01	5,75E-01
genotype : water condition	7 days of water deficit	1	9,29E-07	9,29E-07	3,17E-01	5,81E-01
Residuals	7 days of water deficit	17	4,98E-05	2,93E-06	NA	NA
genotype	13 days of water deficit	1	8,14E-06	8,14E-06	3,86E-01	5,42E-01
water condition	13 days of water deficit	1	2,44E-04	2,44E-04	1,16E+01	3,19E-03
genotype : water condition	13 days of water deficit	1	1,43E-07	1,43E-07	6,77E-03	9,35E-01
Residuals	13 days of water deficit	18	3,79E-04	2,11E-05	NA	NA
genotype	3 day of re-watering	1	3,67E-06	3,67E-06	1,36E-01	7,17E-01
water condition	3 day of re-watering	1	1,49E-03	1,49E-03	5,50E+01	7,07E-07
genotype : water condition	3 day of re-watering	1	1,66E-05	1,66E-05	6,14E-01	4,43E-01
Residuals	3 day of re-watering	18	4,87E-04	2,71E-05	NA	NA
genotype	7 day of re-watering	1	2,83E-03	2,83E-03	3,58E+01	1,17E-05
water condition	7 day of re-watering	1	4,08E-03	4,08E-03	5,17E+01	1,08E-06
genotype : water condition	7 day of re-watering	1	3,50E-04	3,50E-04	4,44E+00	4,95E-02
Residuals	7 day of re-watering	18	1,42E-03	7,90E-05	NA	NA
genotype	10 day of re-watering	1	4,97E-03	4,97E-03	1,14E+02	3,19E-09
water condition	10 day of re-watering	1	6,74E-03	6,74E-03	1,55E+02	2,80E-10
genotype : water condition	10 day of re-watering	1	4,18E-04	4,18E-04	9,60E+00	6,20E-03
Residuals	10 day of re-watering	18	7,84E-04	4,35E-05	NA	NA
genotype	15 day of re-watering	1	1,75E-02	1,75E-02	4,13E+01	4,76E-06
water condition	15 day of re-watering	1	7,04E-03	7,04E-03	1,67E+01	6,99E-04
genotype : water condition	15 day of re-watering	1	4,30E-06	4,30E-06	1,02E-02	9,21E-01
Residuals	15 day of re-watering	18	7,60E-03	4,22E-04	NA	NA

Shoot-Nodulated root ratio

Table 1

Genotype	Water condition	0 days of water deficit			7 days of water deficit			13 days of water deficit			3 days of re-watering			7 days of re-watering			10 days of re-watering			15 days of re-watering		
		mean	sd	SNK	mean	sd	SNK	mean	sd	SNK	mean	sd	SNK	mean	sd	SNK	mean	sd	SNK	mean	sd	SNK
Keyanne	WD	NA	NA	NA	1.75	0.27	a	2.30	0.29	b	3.24	0.33	b	3.61	0.19	b	4.45	0.37	b	5.57	0.45	b
Keyanne	WW	1.11	0.09	a	1.95	0.15	a	2.88	0.16	a	4.13	0.32	a	4.24	0.38	a	5.12	0.35	a	6.18	0.39	a
Puget	WD	NA	NA	NA	1.11	0.09	b	1.42	0.14	c	2.07	0.06	c	2.25	0.31	c	2.56	0.16	c	3.18	0.38	c
Puget	WW	1.17	0.04	a	1.22	0.08	b	1.63	0.14	c	2.19	0.32	c	2.40	0.21	c	2.93	0.26	c	3.16	0.43	c

Table 2

Sampling	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
genotype	1	7.06E-03	7.06E-03	1.54E+00	2.50E-01
Residuals	8	3.68E-02	4.60E-03	NA	NA
genotype	1	2.53E+00	2.53E+00	9.10E+01	3.09E-08
water condition	1	1.40E-01	1.40E-01	5.03E+00	3.85E-02
genotype : water condition	1	1.39E-02	1.39E-02	4.99E-01	4.89E-01
Residuals	17	4.73E-01	2.78E-02	NA	NA
genotype	1	6.25E+00	6.25E+00	1.76E+02	1.00E-10
water condition	1	7.94E-01	7.94E-01	2.23E+01	1.68E-04
genotype : water condition	1	1.81E-01	1.81E-01	5.09E+00	3.68E-02
Residuals	18	6.40E-01	3.55E-02	NA	NA
genotype	1	1.35E+01	1.35E+01	1.73E+02	1.15E-10
water condition	1	1.61E+00	1.61E+00	2.07E+01	2.51E-04
genotype : water condition	1	7.91E-01	7.91E-01	1.01E+01	5.15E-03
Residuals	18	1.40E+00	7.80E-02	NA	NA
genotype	1	1.40E+01	1.40E+01	1.74E+02	1.11E-10
water condition	1	9.48E-01	9.48E-01	1.18E+01	2.97E-03
genotype : water condition	1	3.20E-01	3.20E-01	3.97E+00	6.16E-02
Residuals	18	1.45E+00	8.05E-02	NA	NA
genotype	1	2.13E+01	2.13E+01	2.51E+02	5.09E-12
water condition	1	1.37E+00	1.37E+00	1.62E+01	8.01E-04
genotype : water condition	1	1.23E-01	1.23E-01	1.45E+00	2.44E-01
Residuals	18	1.52E+00	8.46E-02	NA	NA
genotype	1	3.99E+01	3.99E+01	2.33E+02	9.74E-12
water condition	1	5.59E-01	5.59E-01	3.26E+00	8.78E-02
genotype : water condition	1	5.24E-01	5.24E-01	3.06E+00	9.73E-02
Residuals	18	3.09E+00	1.71E-01	NA	NA

Leaf area

Table 1

Genotype	Water condition	0 days of water deficit			7 days of water deficit			13 days of water deficit			3 days of re-watering			7 days of re-watering			10 days of re-watering			15 days of re-watering		
		mean	sd	SNK	mean	sd	SNK	mean	sd	SNK	mean	sd	SNK	mean	sd	SNK	mean	sd	SNK	mean	sd	SNK
Kayanne	WD	NA	NA	NA	47,67	4,83	a	80,16	7,38	b	105,68	9,87	d	169,47	11,62	d	202,78	11,66	d	284,17	56,38	d
Kayanne	WW	16,56	1,10	b	50,63	7,00	a	108,51	11,54	a	169,26	24,50	b	218,41	19,41	c	269,73	14,42	c	367,46	28,42	c
Puget	WD	NA	NA	NA	48,05	4,91	a	83,76	14,66	b	138,67	27,98	c	255,44	31,52	b	309,77	19,34	b	496,41	51,79	b
Puget	WW	25,84	1,50	a	53,07	5,80	a	113,59	25,10	a	206,10	12,21	a	353,96	34,87	a	451,06	27,52	a	628,08	36,72	a

Table 2

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
genotype	1	2,15E+02	2,15E+02	1,24E+02	3,77E-06
Residuals	8	1,39E+01	1,73E+00	NA	NA
genotype	1	3,12E+00	3,12E+00	9,48E-02	7,62E-01
water condition	1	7,89E+01	7,89E+01	2,39E+00	1,40E-01
genotype : water condition	1	5,40E+00	5,40E+00	1,64E-01	6,91E-01
Residuals	17	5,60E+02	3,29E+01	NA	NA
genotype	1	1,03E+02	1,03E+02	3,72E-01	5,50E-01
water condition	1	4,68E+03	4,68E+03	1,69E+01	6,53E-04
genotype : water condition	1	2,97E+00	2,97E+00	1,07E-02	9,19E-01
Residuals	18	4,98E+03	2,76E+02	NA	NA
genotype	1	4,33E+03	4,33E+03	9,92E+00	5,53E-03
water condition	1	2,30E+04	2,30E+04	5,28E+01	9,40E-07
genotype : water condition	1	1,97E+01	1,97E+01	4,52E-02	8,34E-01
Residuals	18	7,85E+03	4,36E+02	NA	NA
genotype	1	6,69E+04	6,69E+04	1,06E+02	5,82E-09
water condition	1	2,81E+04	2,81E+04	4,44E+01	2,99E-06
genotype : water condition	1	3,35E+03	3,35E+03	5,29E+00	3,36E-02
Residuals	18	1,14E+04	6,33E+02	NA	NA
genotype	1	1,24E+05	1,24E+05	3,21E+02	6,38E-13
water condition	1	6,33E+04	6,33E+04	1,64E+02	1,79E-10
genotype : water condition	1	7,37E+03	7,37E+03	1,91E+01	3,74E-04
Residuals	18	6,96E+03	3,87E+02	NA	NA
genotype	1	3,05E+05	3,05E+05	1,52E+02	3,22E-10
water condition	1	6,10E+04	6,10E+04	3,04E+01	3,08E-05
genotype : water condition	1	3,19E+03	3,19E+03	1,59E+00	2,23E-01
Residuals	18	3,61E+04	2,00E+03	NA	NA

Plant nitrogen concentration

Table 1

Genotype	Water condition	0 days of water deficit			7 days of water deficit			13 days of water deficit			3 days of re-watering			7 days of re-watering			10 days of re-watering			15 days of re-watering		
		mean	sd	SNK	mean	sd	SNK	mean	sd	SNK	mean	sd	SNK	mean	sd	SNK	mean	sd	SNK	mean	sd	SNK
Kayanne	WD	NA	NA	NA	0,042	0,001	a	0,041	0,000	d	0,037	0,001	d	0,036	0,001	d	0,037	0,000	c	0,036	0,001	b
Kayanne	WW	0,043	0,002	a	0,042	0,001	a	0,042	0,001	c	0,041	0,003	c	0,039	0,001	c	0,038	0,001	c	0,035	0,002	b
Puget	WD	NA	NA	NA	0,042	0,001	a	0,047	0,001	b	0,044	0,003	b	0,042	0,003	b	0,043	0,002	b	0,044	0,001	a
Puget	WW	0,034	0,002	b	0,043	0,004	a	0,050	0,001	a	0,047	0,001	a	0,048	0,001	a	0,047	0,001	a	0,045	0,001	a

Table 2

Sampling	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
geno	1	1,97E-04	1,97E-04	4,33E+01	1,73E-04
Residuals	8	3,64E-05	4,55E-06	NA	NA
geno	1	3,03E-07	3,03E-07	7,63E-02	7,86E-01
ttt	1	5,95E-07	5,95E-07	1,50E-01	7,04E-01
geno:ttt	1	3,89E-07	3,89E-07	9,78E-02	7,58E-01
Residuals	17	6,76E-05	3,98E-06	NA	NA
geno	1	3,08E-04	3,08E-04	4,18E+02	6,57E-14
ttt	1	2,86E-05	2,86E-05	3,88E+01	7,05E-06
geno:ttt	1	3,33E-06	3,33E-06	4,53E+00	4,75E-02
Residuals	18	1,33E-05	7,37E-07	NA	NA
geno	1	2,12E-04	2,12E-04	4,34E+01	3,45E-06
ttt	1	6,80E-05	6,80E-05	1,39E+01	1,52E-03
geno:ttt	1	1,39E-09	1,39E-09	2,84E-04	9,87E-01
Residuals	18	8,78E-05	4,88E-06	NA	NA
geno	1	3,23E-04	3,23E-04	1,49E+02	3,78E-10
ttt	1	1,19E-04	1,19E-04	5,51E+01	6,98E-07
geno:ttt	1	1,30E-05	1,30E-05	6,02E+00	2,46E-02
Residuals	18	3,90E-05	2,16E-06	NA	NA
geno	1	3,40E-04	3,40E-04	2,54E+02	4,63E-12
ttt	1	4,16E-05	4,16E-05	3,11E+01	2,72E-05
geno:ttt	1	1,92E-05	1,92E-05	1,44E+01	1,33E-03
Residuals	18	2,41E-05	1,34E-06	NA	NA
geno	1	4,19E-04	4,19E-04	2,59E+02	3,89E-12
ttt	1	1,44E-07	1,44E-07	8,95E-02	7,68E-01
geno:ttt	1	7,56E-07	7,56E-07	4,68E-01	5,02E-01
Residuals	18	2,90E-05	1,61E-06	NA	NA

NUE

Table 1

Genotype	Water condition	Between 0 and 7 days of water deficit				Between 7 and 13 days of water deficit				Between 13 days of water deficit and 3 days of re-watering				Between 3 and 10 days of re-watering				Between 10 and 15 days of re-watering					
		mean	sd	SNK	F value	mean	sd	SNK	F value	mean	sd	SNK	F value	mean	sd	SNK	F value	mean	sd	SNK	F value		
Kayanne	WD	25,90	0,85	a	25,92	0,86	a	1,28E-10	39,00	3,93	a	27,44	0,29	b	30,27	0,85	b	27,44	0,29	b	30,27	0,85	b
Kayanne	WW	25,41	1,19	a	24,14	0,30	b	2,33E-01	27,16	3,05	b	29,41	1,99	a	32,80	1,82	a	29,41	1,99	a	32,80	1,82	a
Puget	WD	20,04	0,65	b	16,17	0,64	c	8,09E-01	28,55	1,64	c	23,76	0,85	c	21,83	0,89	d	23,76	0,85	c	21,83	0,89	d
Puget	WW	19,31	1,83	b	16,34	1,17	c	7,76E-03	23,80	1,10	c	23,80	0,51	d	25,82	0,99	c	23,80	0,51	d	25,82	0,99	c

Table 2

genotype	water condition	Sampling	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	P(>F)
genotype	water condition	Between 0 and 7 days of water deficit	1	2,15E+02	2,15E+02	1,45E+02	1,28E-10
genotype	water condition	Between 0 and 7 days of water deficit	1	2,24E+00	2,24E+00	1,51E+00	2,33E-01
Residuals		Between 0 and 7 days of water deficit	20	8,93E-02	8,93E-02	6,03E-02	8,09E-01
genotype	water condition	Between 7 and 13 days of water deficit	1	4,62E+02	4,62E+02	7,12E+02	4,12E-17
genotype	water condition	Between 7 and 13 days of water deficit	1	3,91E+00	3,91E+00	6,02E+00	2,34E-02
Residuals		Between 7 and 13 days of water deficit	20	5,68E+00	5,68E+00	8,76E+00	7,76E-03
genotype	water condition	Between 13 days of water deficit and 3 days of re-watering	1	1,30E+01	6,49E+01	NA	NA
genotype	water condition	Between 13 days of water deficit and 3 days of re-watering	1	2,86E+02	2,86E+02	4,00E+01	3,57E-06
Residuals		Between 13 days of water deficit and 3 days of re-watering	20	4,13E+02	4,13E+02	5,77E+01	2,56E-07
genotype	water condition	Between 13 days of water deficit and 3 days of re-watering	1	7,54E+01	7,54E+01	1,05E+01	4,04E-03
Residuals		Between 13 days of water deficit and 3 days of re-watering	20	1,43E+02	7,15E+00	NA	NA
genotype	water condition	Between 3 and 10 days of re-watering	1	2,17E+02	2,17E+02	1,74E+02	2,57E-11
genotype	water condition	Between 3 and 10 days of re-watering	1	8,25E-01	8,25E-01	6,59E-01	4,26E-01
Residuals		Between 3 and 10 days of re-watering	20	3,28E+01	3,28E+01	2,62E+01	5,21E-05
genotype	water condition	Between 10 and 15 days of re-watering	1	3,56E+02	3,56E+02	2,46E+02	1,07E-12
genotype	water condition	Between 10 and 15 days of re-watering	1	6,38E+01	6,38E+01	4,40E+01	1,86E-06
Residuals		Between 10 and 15 days of re-watering	20	3,15E+00	3,15E+00	2,17E+00	1,56E-01
Residuals		Between 10 and 15 days of re-watering	20	2,90E+01	1,45E+00	NA	NA

Table 1

Genotype	Water condition	Between 0 and 7 days of water deficit			Between 7 and 13 days of water deficit			Between 13 days of water deficit and 3 days of re-watering			Between 3 and 10 days of re-watering			Between 10 and 15 days of re-watering		
		mean	sd	SNK	mean	sd	SNK	mean	sd	SNK	mean	sd	SNK	mean	sd	SNK
Kayanne	WD	0,0011	0,0001	a	0,0023	0,0002	a	0,0011	0,0003	b	0,0016	0,0001	d	0,0026	0,0006	b
Kayanne	WW	0,0006	0,0001	c	0,0012	0,0001	b	0,0019	0,0001	a	0,0023	0,0002	b	0,0036	0,0003	a
Puget	WD	0,0009	0,0001	b	0,0013	0,0003	b	0,0015	0,0005	a	0,0019	0,0001	c	0,0033	0,0003	a
Puget	WW	0,0005	0,0001	c	0,0008	0,0001	c	0,0018	0,0002	a	0,0027	0,0001	a	0,0032	0,0001	a

Table 2

genotype	water condition	Sampling	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
genotype		Between 0 and 7 days of water deficit	1	7,18E-08	7,18E-08	1,37E+01	1,41E-03
water condition		Between 0 and 7 days of water deficit	1	1,03E-06	1,03E-06	1,97E+02	8,28E-12
genotype : water condition		Between 0 and 7 days of water deficit	1	1,05E-08	1,05E-08	2,00E+00	1,73E-01
Residuals		Between 0 and 7 days of water deficit	20	1,05E-07	5,24E-09	NA	NA
genotype		Between 7 and 13 days of water deficit	1	3,41E-06	3,41E-06	1,04E+02	2,32E-09
water condition		Between 7 and 13 days of water deficit	1	3,73E-06	3,73E-06	1,14E+02	1,07E-09
genotype : water condition		Between 7 and 13 days of water deficit	1	6,43E-07	6,43E-07	1,96E+01	2,61E-04
Residuals		Between 7 and 13 days of water deficit	20	6,57E-07	3,29E-08	NA	NA
genotype		Between 13 days of water deficit and 3 days of re-watering	1	1,88E-07	1,88E-07	2,09E+00	1,64E-01
water condition		Between 13 days of water deficit and 3 days of re-watering	1	1,82E-06	1,82E-06	2,02E+01	2,20E-04
genotype : water condition		Between 13 days of water deficit and 3 days of re-watering	1	3,12E-07	3,12E-07	3,47E+00	7,73E-02
Residuals		Between 13 days of water deficit and 3 days of re-watering	20	1,80E-06	8,99E-08	NA	NA
genotype		Between 3 and 10 days of re-watering	1	9,33E-07	9,33E-07	4,24E+01	2,38E-06
water condition		Between 3 and 10 days of re-watering	1	3,18E-06	3,18E-06	1,45E+02	1,31E-10
genotype : water condition		Between 3 and 10 days of re-watering	1	3,27E-09	3,27E-09	1,49E-01	7,04E-01
Residuals		Between 3 and 10 days of re-watering	20	4,40E-07	2,20E-08	NA	NA
genotype		Between 10 and 15 days of re-watering	1	1,29E-07	1,29E-07	1,07E+00	3,14E-01
water condition		Between 10 and 15 days of re-watering	1	1,30E-06	1,30E-06	1,08E+01	3,64E-03
genotype : water condition		Between 10 and 15 days of re-watering	1	1,84E-06	1,84E-06	1,53E+01	8,67E-04
Residuals		Between 10 and 15 days of re-watering	20	2,41E-06	1,20E-07	NA	NA

Water uptake activity (sRWU)

Table 1

Genotype	Water condition	Between 0 and 7 days of water deficit			Between 7 and 13 days of water deficit			Between 13 days of water deficit and 3 days of re-watering			Between 3 and 10 days of re-watering			Between 10 and 15 days of re-watering		
		mean	sd	SNK	mean	sd	SNK	mean	sd	SNK	mean	sd	SNK	mean	sd	SNK
Kayanne	WD	273,91	4,32	c	131,74	6,54	c	242,57	13,65	b	169,28	3,87	a	297,09	7,34	a
Kayanne	WW	544,49	23,48	a	393,86	15,14	a	300,98	12,29	a	144,32	6,41	b	252,00	5,22	b
Puget	WD	232,19	10,92	d	111,77	6,51	d	237,08	10,76	b	126,99	2,97	c	196,95	5,81	c
Puget	WW	434,38	14,43	b	312,80	8,44	b	237,62	10,33	b	98,18	5,91	d	157,02	2,94	d

Table 2

Genotype	water condition	Residuals	Sampling	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
genotype			Between 0 and 7 days of water deficit	1	3,46E+04	3,46E+04	1,54E+02	7,42E-11
genotype			Between 7 and 13 days of water deficit	1	3,35E+05	3,35E+05	1,49E+03	2,85E-20
genotype			Between 13 days of water deficit and 3 days of re-watering	1	7,02E+03	7,02E+03	3,13E+01	1,79E-05
Residuals			Between 0 and 7 days of water deficit	20	4,95E+03	2,24E+02	NA	NA
genotype			Between 7 and 13 days of water deficit	1	1,47E+04	1,47E+04	1,53E+02	8,13E-11
genotype			Between 13 days of water deficit and 3 days of re-watering	1	3,19E+05	3,19E+05	3,31E+03	1,08E-23
Residuals			Between 7 and 13 days of water deficit	1	5,24E+03	5,24E+03	5,43E+01	4,03E-07
Residuals			Between 13 days of water deficit and 3 days of re-watering	20	1,93E+03	9,64E+01	NA	NA
genotype			Between 3 and 10 days of re-watering	1	7,11E+03	7,11E+03	5,08E+01	6,58E-07
genotype			Between 10 and 15 days of re-watering	1	5,21E+03	5,21E+03	3,73E+01	5,78E-06
Residuals			Between 3 and 10 days of re-watering	1	5,02E+03	5,02E+03	3,59E+01	7,37E-06
Residuals			Between 10 and 15 days of re-watering	20	2,80E+03	1,40E+02	NA	NA
genotype			Between 3 and 10 days of re-watering	1	1,17E+04	1,17E+04	4,69E+02	2,33E-15
genotype			Between 10 and 15 days of re-watering	1	4,34E+03	4,34E+03	1,74E+02	2,56E-11
Residuals			Between 3 and 10 days of re-watering	1	2,23E+01	2,23E+01	8,93E-01	3,56E-01
Residuals			Between 10 and 15 days of re-watering	20	5,00E+02	2,50E+01	NA	NA
genotype			Between 3 and 10 days of re-watering	1	5,71E+04	5,71E+04	1,85E+03	3,46E-21
genotype			Between 10 and 15 days of re-watering	1	1,08E+04	1,08E+04	3,51E+02	3,71E-14
Residuals			Between 3 and 10 days of re-watering	1	3,99E+01	3,99E+01	1,29E+00	2,69E-01
Residuals			Between 10 and 15 days of re-watering	20	6,17E+02	3,09E+01	NA	NA

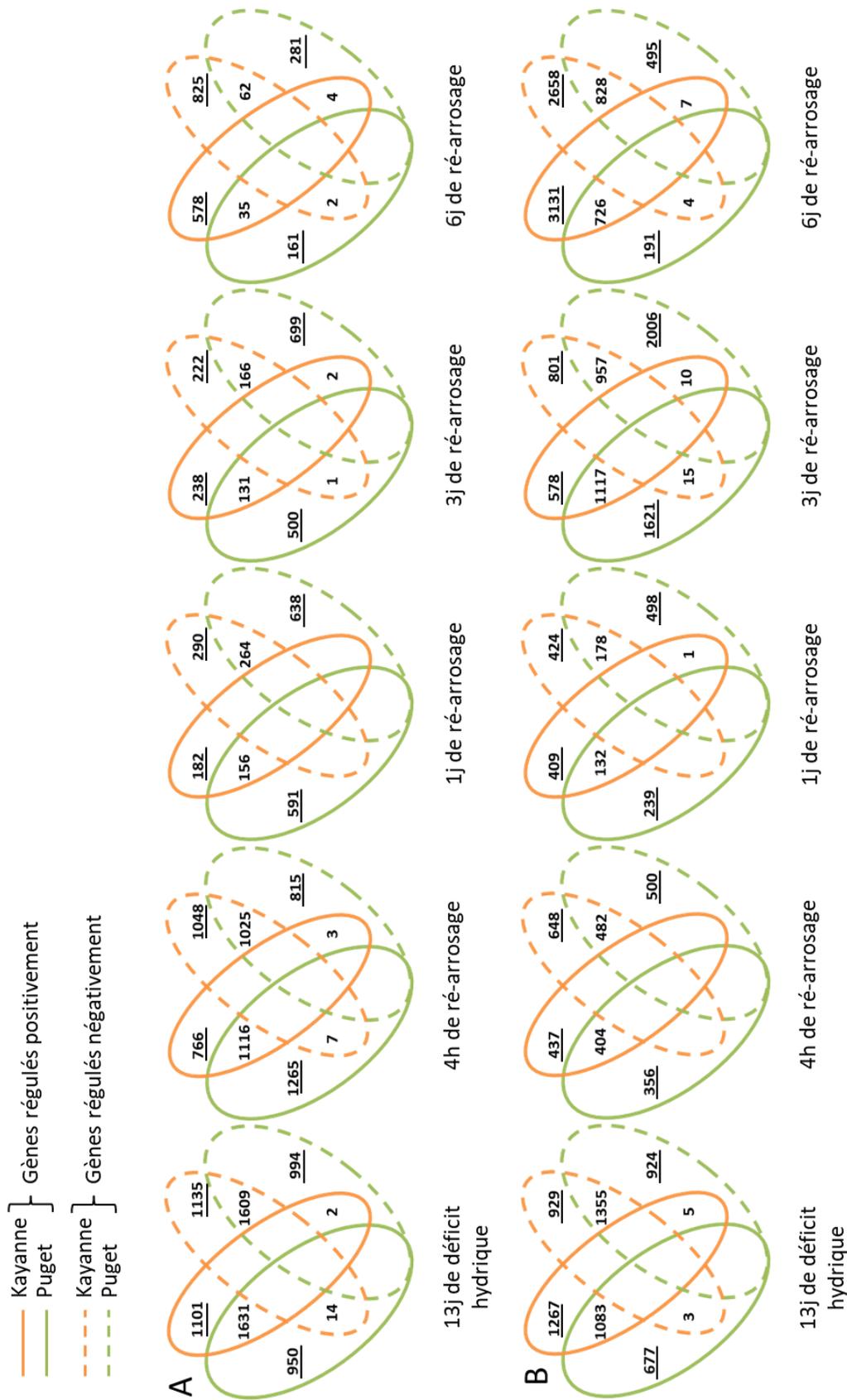


Figure supplémentaire 4 : Diagramme de Venn représentant le nombre de gènes différentiellement exprimés (DE) en réponse au déficit hydrique et au ré-arrosage dans les racines (A) et les nodosités (B) de Kayanne et Puget. Les gènes régulés positivement sont en traits pleins et les gènes régulés négativement sont en pointillés. Le génotype Kayanne est en orange et le génotype Puget en vert. Les gènes régulés de manière spécifique chez Kayanne ou Puget pour un prélèvement donné (nombres soulignés) ont été utilisés pour réaliser des enrichissements fonctionnels présentés dans les Figures 44 et 45. Les gènes utilisés lors de l'analyse d'enrichissement en termes GO (gene ontology) sont soulignés

Tableaux supplémentaires du chapitre 3

Les tableaux du chapitre 3 étant trop volumineux pour être ajoutés au manuscrit, vous les trouverez en fichier Excel attachés au manuscrit.

Tableau supplémentaire 2 :

Ce tableau présente la liste des métabolites différentiellement accumulés en réponse au déficit hydrique et/ou ré-arrosage ainsi que leur accumulation dans les différents échantillons.

Tableau supplémentaire 3 :

Ce tableau présente la liste des gènes différentiellement exprimés en réponse au déficit hydrique et/ou ré-arrosage ainsi que leur comptage dans les différents échantillons.

Abstract

Pea (*Pisum sativum* L.) has the unique ability to fix atmospheric dinitrogen (N₂) via a symbiosis with soil bacteria in root nodules. Although this specificity makes this crop particularly interesting in the context of agroecological transition, symbiotic nitrogen fixation is particularly sensitive to abiotic stresses such as water deficit, which contributes to the yield instability of this protein crop and reduces its interest for farmers. Yield stability depends both on plant's ability to tolerate stress and on its ability to recover after stress. However, the mechanisms involved during the recovery period have been for now poorly explored. It is, therefore, essential to identify traits of plants maximizing pea resilience to water deficit, in order to propose new ideotypes that are better adapted to environmental conditions of fluctuating water or nutrient availabilities.

The main objectives of this study were: i) to identify the ecophysiological processes involved during the recovery period following a water deficit, considering in particular plant growth and plant nitrogen acquisition, and ii) to determine the underlying molecular processes within roots and nodules.

During a first experiment in controlled conditions (4PMI Platform, Dijon, France), the dynamics of recovery of two pea genotypes were analyzed in detail after imposing plants before their flowering to a water deficit of two weeks. While one of the genotypes, (Kayanne), was able to maintain its yield under these conditions, yield of the other one (Puget) was decreased by water deficit. We have used both a) a whole-plant approach (using an ecophysiological framework focused on carbon, nitrogen and water fluxes in the plant) and b) so-called "omics" approaches (metabolomics, transcriptomics, and phytohormone assays) concerning root and nodule compartments. This analysis was completed by a second one where ¹³C and ¹⁵N₂ isotopic labeling experiment allowed us to precisely measure carbon and nitrogen fluxes in the soil-plant-atmosphere continuum.

Our analyses revealed that the two genotypes studied had contrasting resilience abilities, partly explained by different recovery strategies during the re-watering period, and particularly implying processes which were related to nitrogen nutrition. We have demonstrated that during the recovery period Kayanne was able to quickly and strictly re-adjust the formation of nodules to its growth needs, allowing this genotype to fully recover from the 2-week water deficit period. On the other hand, in Puget, the initiation of new nodules after water deficit was delayed compared to control plants, but numerous additional nodules developed. We hypothesized that the associated larger energy cost, which occurred to the detriment of growth, would finally negatively impact Puget's yield.

This difference in the dynamics of the root system response to re-watering was comforted by the molecular analysis performed in root and nodule compartments. The "omics" analysis also highlighted differences in antioxidant and osmoprotective responses between the two genotypes that could help to explain the delay observed for the recovery of the two genotypes.

Altogether these results give new insights for the understanding of the regulatory mechanisms underlying the recovery of pea plant after a water deficit. Next step will consist in a statistical integration of the multi-scaled data (ecophysiological, hormonal, metabolomic and transcriptomic data), which should make it possible to identify the main regulators involved in recovery, for breeding strategies leading to the selection of pea ideotypes better suited to fluctuating water conditions.

Le pois (*Pisum Sativum* L.) possède la capacité de fixer le diazote atmosphérique (N₂) *via* une symbiose avec des bactéries du sol au sein d'organes racinaires que sont les nodosités. Bien que cette particularité rende cette espèce particulièrement intéressante dans un contexte de transition agro-écologique, la fixation symbiotique du N₂ est cependant sensible aux stress abiotiques tels que le déficit hydrique du sol, ce qui contribue à l'instabilité du rendement du pois et réduit son attrait chez les agriculteurs. La stabilité du rendement dépend à la fois de la capacité de la plante à tolérer un stress, mais aussi de sa capacité à récupérer après ce stress. Or, les mécanismes impliqués pendant la phase de récupération demeurent peu explorés. Il est ainsi essentiel d'identifier des traits de plantes maximisant la résilience du pois au déficit hydrique, afin de proposer des idéotypes mieux adaptés à des conditions environnementales de disponibilité en eau ou nutriments fluctuantes.

Les principaux objectifs de cette étude étaient dans un premier temps d'identifier les processus écophysologiques impliqués pendant la phase de récupération, après un épisode de déficit hydrique, et en considérant en particulier la croissance de la plante et son acquisition d'azote. Dans un deuxième temps, il s'agissait de déterminer les composantes moléculaires sous-jacentes à ces mécanismes de récupération au sein des racines et des nodosités. Au cours d'une première expérimentation réalisée sur la plateforme de phénotypage 4PMI (Dijon, France) nous avons analysé en détail la dynamique de récupération de deux génotypes de pois après leur avoir imposé un déficit hydrique de deux semaines. Alors que pour l'un des génotypes (Kayanne) le rendement à maturité physiologique était maintenu sous ces conditions de déficit hydrique temporaire, le rendement du second génotype étudié (Puget) a été négativement affecté par le déficit hydrique. Nous avons utilisé conjointement une approche au niveau plante entière (en utilisant un cadre d'analyse écophysologique axé sur les flux de carbone, azote et eau dans la plante) à des approches de type « omiques » (métabolomique, transcriptomique et dosages de phytohormones) dans les compartiments racinaires et nodulaires. Cette analyse a été complétée par une seconde expérimentation impliquant des marquages isotopiques au ¹³C et ¹⁵N₂ qui nous a permis de mesurer précisément les flux de carbone et d'azote dans le continuum sol-plante-atmosphère.

Nos analyses ont révélé que les deux génotypes étudiés avaient des capacités de résilience contrastées, en partie expliquées par la mise en place de différentes stratégies de récupération pendant la période de ré-arrosage, et impliquant des processus liés à la nutrition azotée de la plante. Nous avons démontré que pendant la phase de récupération, Kayanne pouvait rapidement ajuster la formation de ses nodosités en fonction de ses besoins en azote pour sa croissance, lui permettant ainsi de récupérer totalement après deux semaines de déficit hydrique. Au contraire, la restauration du statut azoté chez le génotype Puget a été initiée plus tardivement mais plus intensément aboutissant à une surcompensation en termes de nombre de nodosités formées. Nous avons donc émis l'hypothèse que le fort coût en énergie résultant de la surcompensation nodulaire s'est effectué aux dépens de la croissance de la plante, impactant *in fine* le rendement de Puget.

Les différences dans les dynamiques de réponse du système racinaire nodulé au déficit hydrique observées entre les deux génotypes ont été confirmées par les analyses moléculaires réalisées dans les racines et les nodosités. Les analyses « omiques » ont en effet souligné des réponses contrastées entre les deux génotypes, impliquant des molécules antioxydantes et osmoprotectrices et les processus associés. Ceux-ci pourraient participer au décalage de récupération observé chez les deux génotypes.

Ces résultats apportent de nouvelles perspectives pour la compréhension des mécanismes de régulation qui sous-tendent la récupération des plantes de pois après un déficit hydrique. La prochaine étape consistera en une intégration statistique des données multi-échelles obtenues (données écophysologiques, hormonales, métabolomiques et transcriptomiques). Cette intégration devrait permettre d'identifier les principaux régulateurs impliqués dans la récupération, et ainsi de proposer des gènes candidats pour des stratégies de sélection d'idéotypes de pois mieux adaptés à des conditions hydriques fluctuantes.