



**HAL**  
open science

# Exploration de la diversité naturelle de *Medicago truncatula* pour la croissance hétérotrophe des plantules en fonction de l'apport en nitrate et de la température

Douae Ben Hdech

## ► To cite this version:

Douae Ben Hdech. Exploration de la diversité naturelle de *Medicago truncatula* pour la croissance hétérotrophe des plantules en fonction de l'apport en nitrate et de la température. Sciences agricoles. Université d'Angers, 2020. Français. NNT : 2020ANGE0090 . tel-03219191

**HAL Id: tel-03219191**

**<https://univ-angers.hal.science/tel-03219191>**

Submitted on 2 Mar 2023

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

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

# Thèse de doctorat de

L'UNIVERSITE D'ANGERS  
Comue Université Bretagne Loire

ECOLE DOCTORALE N° 600  
*Ecole doctorale Ecologie, Géosciences, Agronomie et Alimentation*  
Spécialité : « *Biologie et physiologie végétales* »

Thèse présentée et soutenue à « Angers », le « 10/11/2020 »  
Unité de recherche : UMR 1345 IRHS  
Thèse N° :

Par  
« **Douae BEN HDECH** »

« **Exploration de la diversité naturelle de *Medicago truncatula* pour la croissance hétérotrophe des plantules en fonction de l'apport en nitrate et de la température** »

## Composition du Jury :

Président	Didier PELTIER	Professeur, Université d'Angers
Rapporteur	Philippe BARRE	Ingénieur de Recherche, INRAE Lusignan
Rapporteur	Loïc RAJJOU	Professeur, Université Paris-Saclay
Examinatrice	Juliette LEYMARIE	Professeur, Université Paris Est Créteil
Examineur	Jean-Bernard CLIQUET	Maître de Conférences, Université de Caen
Examinatrice	Anne LAPERCHE	Maître de conférences, Agrocampus Ouest Rennes
Directeur de thèse	Anis M. LIMAMI	Professeur, Université d'Angers
Co-directrice de thèse	Béatrice TEULAT	Maître de Conférences, Agrocampus Ouest Angers



# Remerciements

---

Le travail de thèse est accompli aujourd'hui, je tiens donc à exprimer ma gratitude aux nombreuses personnes qui ont participé de près ou de loin à ce travail.

Mes remerciements se dirigent en premier, au laboratoire d'accueil et aux financeurs de mes travaux thèses inscrits au projet MeDi-SENS -Programme régional RFI Objectif Végétal : la région Pays de Loire, Angers Loire Métropole, l'Institut de Recherche en Horticulture et Semences « INRAE, Université d'Angers, Agro-Campus Ouest ». Mes remerciements s'adressent également aux jurys de thèse qui ont accepté de juger ce travail : Philippe BARRE, Jean-Bernard CLIQUET, Anne LAPERCHE, Juliette LEYMARIE, Didier PELTIER et Loïc RAJOU. Je souhaite aussi remercier les membres de mon comité de thèse, qui se sont réunis à trois reprises durant la thèse : Hélène MURANTY, Fabien CHARDON et Jean-Marie PROSPERI.

Je tiens à remercier mes directeurs de thèse, Anis LIMAMI et Béatrice TEULAT ainsi que mon encadrante Catherine Aubry. Je tiens à remercier chaleureusement Béatrice, pour son encadrement, sa disponibilité et son engagement dans toutes les étapes de la thèse, en partant des expérimentations, passant par les analyses jusqu'à son implication dans la rédaction. En plus de ses qualités de généticienne et de physiologiste des plantules, j'ai beaucoup apprécié ses qualités humaines, d'écoute, de gentillesse et d'honnêteté. Ensuite, je tiens à témoigner toute ma reconnaissance à Anis, son encadrement m'a permis de développer la rigueur scientifique nécessaire pour mener à bien une thèse. Merci, d'avoir partagé avec moi ton expérience de physiologiste et tes connaissances en métabolisme azoté. Je ne te remercierai jamais assez de m'avoir permis de réaliser la thèse et pour ton soutien. Enfin, je remercie Catherine pour sa gentillesse, son encadrement, son aide dans les expérimentations et sa réactivité pendant la rédaction. À mes trois encadrants, merci de m'avoir donné l'occasion de participer aux nombreux congrès scientifiques et pour votre confiance en espérant que nos chemins professionnels se recroiseront.

Je tiens à remercier Daniel BEUCHER pour son expertise technique et sa participation active dans la mise en place des protocoles, pour son énorme contribution dans le déroulement des expérimentations au laboratoire et à la serre ainsi que pour sa superbe bonne humeur. Je tiens à remercier Bénédicte ALIBERT, pour son aide pour les analyses et les expériences, pour sa rigueur dans le travail et pour ses sympathiques encouragements. Je témoigne aussi ma gratitude à toute l'équipe SMS, Thibault C., Quentin M., Marie-Christine L-P. et tous les autres pour leur contribution dans le phénotypage de la CC192. À toute cette bonne ambiance « sous lumière verte ».



Tout mon travail n'aurait pas pu être réalisé sans les nombreux partenaires auxquels j'exprime une profonde reconnaissance. Ainsi je remercie en premier, le Centre de Ressources Biologiques de *M. truncatula* et particulièrement Jean-Marie PROSPERI de nous avoir fourni les graines. Ensuite, je remercie Christine LESIGNOR de l'INRAE de Dijon pour les fichiers de génotypage, pour ses précieux conseils pour l'analyse GWAS. Je remercie, Fabien CHARDON et Anne MARMAGNE de l'Institut Jean-Pierre BOURGIN, à INRA-AgroParisTech, pour les dosages d'azote et de carbone. Je remercie David MACHEREL et Abdelilah BENAMAR, pour leurs aides dans les expériences d'oxygraphie. Un grand merci à Pascale SATOUR pour sa grande implication pour les dosages d'anions inorganiques et pour sa bonne humeur. Je remercie Françoise MONTRICHARD pour son expertise apportée autour des GSTs. J'ai une pensée particulière à Claudine LANDÉS, pour son aide et pour avoir investi un temps considérable dans les analyses de clusterisation.

Je remercie Alice G. pour ses travaux préliminaires à ma thèse, Cécile J. et Marine A. pour leur contribution à ma thèse dans le cadre leur stage. J'ai également le plaisir de remercier Anis et Dimitri T. qui m'ont initié à l'enseignement à l'université d'Angers.

Je salue également l'esprit d'échange d'information entre le personnel de l'IRHS. Dans ce cadre, je remercie Latifa H. pour sa gentillesse, son aide et ses conseils. Merci à Hélène M. et Jordan M-M. pour leurs nombreux conseils dans les situations de « Beug »

Je tiens à remercier tous mes amis et collègues doctorants et docteurs que j'ai eu le plaisir de rencontrer pendant ces années de thèse ; Justine C., Mathieu M., Elise R., Ophélie D., Alexis P. et tous les autres membres et co-fondateurs de l'association Greenyd. Many thanks to Souha B., Lili Z., Thi Thu D., Assiya R. and Denis B. Aussi un grand merci à tous les personnages sympathiques que j'ai pu rencontrer au R+2 Caroline, Natallia, Tanegmart, Cyril, Jean-Baptiste, Elise, Jérôme, Joseph, David ...

Je remercie Patrice HERANNEY, Jean-Luc, JUNG Jérémy CLOTAULT, Vanessa, SOUFFLET-FRESLON, Anis et Béatrice pour m'avoir donné l'envie de continuer dans le monde de la recherche.

Dans un registre plus personnel, je remercie en premier lieu mon père Mohamed BEN HDECH à qui je dédie entièrement ma thèse. Je souhaite remercier très chaleureusement ma mère Fatiha, Doha, Hajar, Zakaria et Atidelle pour leurs soutiens psychologiques et pour leurs prières. Un grand merci à mon mari Hatim pour son énorme soutien et ses encouragements. Je remercie enfin tous mes amis qui m'ont toujours supporté avec leurs engagements : Majda, Khawla, Sophia, Fati, Basma et tous les autres.



# Glossaire

---

## **Caractères d'allongement des organes et de mobilisation de la biomasse des graines au cours/à la fin de la croissance hétérotrophe :**

**HL** : longueur de l'hypocotyle

**RL** : longueur de la racicule

**RHL** : ratio de la longueur de la racicule par rapport à la longueur de l'hypocotyle

**CRM** ou **CRDW** : biomasse résiduelle dans les cotylédons

**HAM** ou **HADW**: biomasse allouée à l'hypocotyle

**RAM** ou **RADW**: biomasse allouée à la racicule

**LM** ou **LDW**: biomasse perdue

## **Indices de plasticité de réponse des caractères à l'absence de nitrate par rapport à sa présence:**

**rHL** ou **pHL** : indice pour la longueur de l'hypocotyle

**rRL** ou **pRL** : indice pour la longueur de la racicule

**rRHL** ou **pRHL** : indice pour le ratio de la longueur de la racicule par rapport à la longueur de l'hypocotyle

**rCRM** ou **pCRDW** : indice pour la biomasse résiduelle dans les cotylédons

**rHAM** ou **pHADW**: indice pour l'allocation de la biomasse à l'hypocotyle

**rRAM** ou **pRADW**: indice pour l'allocation de la biomasse à la racicule

**rLM** ou **pLDW**: indice pour la biomasse perdue

## **Indices de plasticité de réponse des caractères au froid par rapport à la température de contrôle:**

**rtHL**: indice pour la longueur de l'hypocotyle

**rtRL**: indice pour la longueur de la racicule

**rtRHL**: indice pour le ratio de la longueur de la racicule par rapport à la longueur de l'hypocotyle

**rtRCM**: indice pour la biomasse résiduelle dans les cotylédons

**rtHAM** : indice pour l'allocation de la biomasse à l'hypocotyle

**rtRAM** : indice pour l'allocation de la biomasse à la racicule

**rtLM** : indice pour la biomasse perdue



### **Autres caractères liés à la croissance hétérotrophe :**

**SM** ou **SDW**: biomasse de la graine

**%N**: pourcentage en azote dans la graine

**%C**: pourcentage en carbone dans la graine

**N<sub>mg</sub>** : quantité d'azote

**C<sub>mg</sub>** : quantité de carbone

**δ<sup>15</sup>N** : delta 15N est une mesure du rapport des deux isotopes stables de l'azote; 15N et 14N.

**N<sub>h/r</sub>** : pourcentage en nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) dans l'hypocotyle ou la racine

**C<sub>h/r</sub>** : pourcentage en chlorure (Cl<sup>-</sup>) dans un mg l'hypocotyle ou la racine

**P<sub>h/r</sub>** : pourcentage en phosphate (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) dans l'hypocotyle ou la racine

**UI**: indice d'utilisation de l'azote par l'axe embryonnaire en présence d'azote exogène (UI<sub>endo+exo</sub>) et en absence d'azote exogène (UI<sub>endo</sub>)

**PartC** et **PartN**: pourcentage d'azote et de carbone dans les organes puits (hypocotyle, racine) par rapport à celui présent dans les organes sources (cotylédons).

### **Autres abréviations:**

**ACP**: Analyses en Composante Principale

**BLAST**: Basic Local Alignment Search Tool

**C**: phénotypes (C1, C2, C3, C4) de réponse de la performance des plantules à l'absence de nitrate en température de contrôle (17 °C)

**CC**: Core Collection

**CRB**: Centre de Ressources Biologiques

**EMMA**: Efficient Mixed-Model Association

**ETE**: Environment for Tree Exploration

**FarmCPU**: Fixed and random model Circulating Probability Unification

**G**: phénotypes (G1; G2, G3) de réponse de la performance des plantules en interaction avec les caractéristiques géo-climatiques des régions natives des accessions de la CC192

**G**: facteur génotype

**GA**: Génétique d'Association

**GEMMA**: Genome-Wide Efficient Mixed-Model Association



**GLM:** General Linear Model

**GST:** Glutathione S-transferase

**GWAS:** Genome-Wide Association Studies

**HAT:** heures après le transfert des plantules dans le milieu de culture

**HATS :** systèmes de transport de nitrate à haute affinité

**HPLC :** chromatographie en phase liquide à haute performance

**LI et LII :** désigne les lots de graines, avec le lot I produite en 2013 et le lot II produite en 2014

**L:** phytotypes (L1, L2, L3) de réponse de la performance des plantules à l'absence de nitrate en température de froid (10 °C)

**LATS:** système de transport de nitrate à faible affinité

**LD:** Déséquilibre de Liaison

**LG :** Groupes de Liaison

**MLMM:** Multi-Locus Mixed Model

**MS:** solution nutritive avec milieu de Murashige et Skoog

**MULTALIN:** Multiple sequence Alignment

**NC:** Condition de Nitrate; présence (N<sup>+</sup> ; N) et absence (N<sup>-</sup>) de nitrate

**NCBI:** National Center for Biotechnology Information

**NPF:** Nitrate Transporter 1/Peptide Transporter Family

**NRT :** Nitrate Transporter

**P:** phytotypes (P1, P2, P3) de performance des plantules en interaction avec les caractéristiques potentiellement explicatives de la croissance hétérotrophe en présence de nitrate et en température de contrôle (17 °C)

**P3D :** Population Parameters Previously Determined

**PC:** Composante Principale de l'ACP

**PTR:** Peptide Transporter

**QTL:** Quantitative Trait Loci

**QTN:** Quantitative Trait Nucleotide

**RIL:** Recombinant Inbred Line

**ROS:** Espèces Réactives de l'Oxygène

**SMART:** Simple Modular Architecture Research Tool

**SNK:** Student–Newman–Keuls

**SNP:** Single Nucleotide Polymorphism

**TC:** Condition de Température ; contrôle (17 °C ; O) et froid (10 °C ; B ; L).



# Table des matières

---

REMERCIEMENTS.....	2
GLOSSAIRE.....	6
INTRODUCTION GENERALE .....	1
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	7
I. Importance des légumineuses.....	9
I-1-Medicago truncatula, une espèce modèle des Fabacées.....	9
I-2-Outils de génétique et de génomique développés chez <i>M. truncatula</i> .....	11
II. La croissance hétérotrophe : de la germination à la levée.....	13
II-1-Utilisation des réserves de la graine.....	13
II-2-Développement de l'axe embryonnaire.....	17
III. Déterminisme environnemental de la croissance hétérotrophe .....	19
III-1. Influence de la nutrition azotée.....	21
III-2-Influence du froid.....	29
IV. Déterminisme génétique de la croissance hétérotrophe des plantules.....	33
IV-1 Les méthodes d'études de la génétique quantitative .....	33
IV-2 Déterminisme génétique de la croissance hétérotrophe chez <i>M. truncatula</i> .....	41
V. Objectifs et démarches.....	43
<b>CHAPITRE I : EXPLORATION DE LA DIVERSITE NATURELLE DE <i>M. TRUNCATULA</i></b> <b>POUR LA REPONSE DE LA PERFORMANCE DES PLANTULES A L'ABSENCE DE</b> <b>NITRATE SOUS TEMPERATURE DE CONTROLE.....</b>	<b>45</b>
I- Exploring natural diversity of <i>Medicago truncatula</i> reveals phenotypes and loci associated with the response of seedling performance to nitrate supply.....	49
I-1-Introduction .....	51
I-2-Materials and Methods .....	55
I-3-Results .....	65
I-4-Discussion.....	79
II- Analyse bio-informatique focalisée sur les gènes codants des GSTs identifiés en cluster autour de loci associés à la réponse de l'allongement des organes de la plantule à l'absence de nitrate grâce au modèle MLMM.....	93
II-1-Etapes de l'analyse bio-informatique.....	93
II-2-L'analyse bio-informatique permet la localisation de familles de gènes identifiées par GWAS .....	95
III- Analyses GWAS complémentaires pour la détection de nouveaux loci .....	99
III-1-Méthodologie de détection de nouveaux loci associés aux traits de performance des plantules et à leurs réponses à l'absence de nitrate .....	99
III-2-Identification de nouveaux loci grâce à l'approche des 200 SNPs les plus significatifs en fort DL .....	101



III-3-Identification de nouveaux loci grâce à l’approche GWAS basée sur le modèle FarmCPU .....	103
IV- Idées principales du chapitre I : .....	105
<b>CHAPITRE II : EXPLORATION DES CARACTERISTIQUES METABOLIQUES EXPLICATIVES DE LA CROISSANCE HETEROTROPHE.....</b>	<b>107</b>
I-Introduction .....	109
II-Matériel et méthodes.....	111
II-1-Matériels biologiques .....	111
II-2-Protocoles expérimentaux et mesures .....	113
III-Résultats.....	121
III-1- Caractérisation du statut azoté et carboné des graines et des plantules pour un panel réduit d’accessions de <i>M. truncatula</i> .....	121
III-2- Caractérisation du statut azoté et carboné des graines et des plantules à l’échelle de la CC192.....	135
IV-Discussion .....	145
IV-1- Relation entre l’évolution de la croissance hétérotrophe au cours du temps et la dynamique des réserves de la graine .....	145
IV-2- La relation entre les biomarqueurs de la croissance hétérotrophe et la performance des plantules varie selon les caractéristiques génotypiques.....	147
V- Idées principales du chapitre II.....	151
<b>CHAPITRE III : EFFET DU FROID SUR LA PERFORMANCE DES PLANTULES EN INTERACTION AVEC LA PLASTICITE DE REPONSE A L’ABSENCE DE NITRATE ....</b>	<b>153</b>
I-Introduction .....	155
II-Matériel et méthodes.....	155
II-1-Matériel biologique .....	155
II-2-Croissance hétérotrophe des plantules au froid en présence et en absence de nitrate.....	157
II-3-Analyses statistiques et identification de phénotypes .....	157
II-4-Analyse de l’effet du froid sur le comportement des accessions en réponse à l’absence de nitrate .....	159
II-5-Identification de loci associés aux caractéristiques de la performance des plantules au froid .....	161
III-Résultats.....	163
III-1-Influence du froid sur la performance des plantules indépendamment des conditions nutritives .....	163
III-2-Réponse combinée du froid et de l’absence de nitrate sur les déterminants de la performance des plantules .....	165
III-3- Influence du froid sur les loci identifiés .....	171



IV-Discussion .....	173
IV-1-Le froid modifie la performance des plantules .....	173
IV-2-Le froid modifie la réponse des caractères à l'absence de nitrate .....	175
IV-3-Identification des loci associés aux caractéristiques de performance des plantules au froid .....	177
V- Idées principales du chapitre III .....	181
<b>CHAPITRE IV : INFLUENCE DES FACTEURS GEO-CLIMATIQUES DES SITES D'ORIGINE DES ACCESSIONS ET DU LOT DE GRAINES SUR LA PERFORMANCE DES PLANTULES ET SUR LEUR REPOSE AUX CONDITIONS ENVIRONNEMENTALES PENALISANTES .....</b>	<b>183</b>
I-Introduction .....	185
II-Matériel et méthodes.....	185
I-1-Matériel.....	185
II-2-Analyses statistiques et estimation des caractères .....	187
III-Résultats.....	191
III-1-Influence du lot de graines.....	191
III-2-Influence des caractéristiques géo-climatiques des sites d'origine des accessions .....	195
IV-Discussion .....	199
IV-1-La variation de la biomasse de la graine est à l'origine de l'effet du lot.....	199
IV-2 La masse de la graine et l'allongement de l'hypocotyle dépendent des conditions géo-climatiques d'origine des accessions.....	201
V- Idées principales du chapitre IV .....	207
<b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>209</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>223</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>261</b>



# **Introduction Générale**

---



Durant les dernières décennies, la population mondiale et son taux de consommation augmente, ce qui entraîne une augmentation de la demande en denrées alimentaires. On estime que la demande de produits agricoles de 2005 à 2050 augmentera de 1,1 % par an, alors que la population mondiale atteindra environ 9,2 milliards en 2050 (McKenzie & Williams 2015). Pour répondre à cette demande, une surproduction agricole est nécessaire, mais doit néanmoins tenir compte d'une agriculture durable, plus respectueuse de l'environnement, tout en s'adaptant aux grands changements climatiques. Ainsi, de nouveaux défis climatiques et environnementaux conduisent à modifier significativement les méthodes de production agricole. En Europe, par exemple, le changement climatique se caractérise par des périodes de températures élevées et par un déficit hydrique dont l'impact est non négligeable sur le développement des graines et leur remplissage en fin de cycle, ce qui mène les agriculteurs à adapter leur calendrier cultural. Les semis sont alors réalisés plus précocement dans l'année et certaines aires de production sont délocalisées plus au Nord, vers des régions plus fraîches (Tuck et al. 2006; Vocanson & Jeuffroy 2008; Olesen et al. 2011; Olesen et al. 2012). Ainsi, les plantules sont de plus en plus confrontées à des périodes de basses températures pouvant limiter leur levée et entraîner des pertes considérables de rendement et de la qualité des semences. D'autres régions du monde pratiquent des semis plus profonds afin de profiter de l'humidité du sol, comme au Sud-Ouest de l'Australie ou encore au Nord-Ouest des Etats-Unis (Schillinger et al. 1998; Mohan et al. 2013). Mais malgré le grand intérêt de cette pratique, le semis profond limite la levée des plantules. Afin d'améliorer ces pratiques culturales, il s'avère donc nécessaire de disposer de plantes plus tolérantes aux basses températures et possédant également une bonne capacité de la levée.

Un autre défi de l'agriculture actuelle repose sur la production de cultures à faibles intrants et entre autres en intrants azotés inorganiques. La fertilisation azotée est très coûteuse en énergie, avec plus de 60 % de cet azote perdu par la combinaison du lessivage, la dénitrification, la volatilisation et la consommation microbienne (Raun & Johnson 1999; Rothstein 2007). Ces pertes d'azote entraînent une pollution des sols et une eutrophisation des eaux profondes des fleuves et des océans et les émissions d'oxyde nitrique dans l'atmosphère provoquent de sérieuses conséquences environnementales. Ainsi, une nouvelle gestion de la fertilisation azotée aura pour but de limiter ces risques liés à l'environnement et de limiter les pertes économiques causées par les apports excessifs d'azote (N). Toutefois, la croissance des plantules est fortement impactée par les variations de températures et de disponibilité en nitrate, ainsi que par la combinaison entre ces deux facteurs. Il est donc plus que nécessaire d'adapter les productions en début de cycle aux basses températures et à un apport azoté réduit en orientant la sélection variétale lors de l'établissement des cultures. Cela passe



par une sélection de variétés ayant une efficacité d'utilisation de l'azote (NUE) élevée et qui émergent du sol de façon rapide et homogène, avec une forte capacité d'élongation et d'exploration du sol en dépit des conditions environnementales pénalisantes qu'elles peuvent rencontrer (*i.e.* froid). Enfin, pour répondre à la demande croissante en denrées alimentaires, une augmentation de la production de graines de légumineuses est nécessaire. Ces graines contiennent un taux élevé en protéine, qui est le deuxième aliment le plus important pour l'homme et la combinaison de légumineuses et de céréales peut contenir tous les acides aminés nécessaires à une alimentation humaine saine (Ejigui et al. 2007; Paul et al. 2008)

Les travaux menés précédemment au sein de l'équipe d'accueil de cette thèse sur l'espèce modèle *Medicago truncatula*, ont mis en avant l'existence d'une variabilité génétique de l'allongement de l'hypocotyle au cours de la croissance hétérotrophe en réponse au froid et au déficit hydrique. La cartographie à l'aide de plusieurs populations de lignées recombinantes a permis l'identification de QTLs (Quantitative Trait Loci) majeurs qui gouvernent la croissance de l'hypocotyle et la racine en hétérotrophie ainsi qu'en autotrophie en réponse à une variation de température, de condition hydrique et de nutrition azotée (Dias et al. 2011; Vandecasteele et al. 2011; Youssef et al. 2016). Dans ce contexte scientifique, les travaux de recherche présentés dans cette thèse consistent à caractériser la croissance hétérotrophe des plantules de *M. truncatula* dans différentes conditions d'apport d'azote et de température en explorant la diversité génétique naturelle de l'espèce. Cette thèse comprend une synthèse bibliographique qui décrit l'influence de conditions thermiques et nutritives sur la croissance des plantules et plus particulièrement sur les déterminants de la croissance hétérotrophe (potentiel d'allongement et mobilisation de la biomasse). Ensuite, les stratégies d'étude du déterminisme génétique de caractères quantitatifs complexes sont abordées. Enfin sont présentés les objectifs et la démarche générale suivis dans ces travaux. Le premier chapitre des travaux se présente sous la forme d'un article publié dans la revue *Physiologia Plantarum* intitulée "Exploring natural diversity of *Medicago truncatula* reveals phenotypes and loci associated with the response of seedling performance to nitrate supply". Il synthétise les comportements physiologiques adaptatifs de la croissance hétérotrophe de plantules identifiés en réponse à la variation d'apport en nitrate à une température contrôlée et leur déterminisme génétique et ce pour une core collection de 192 accessions représentatives d'une large diversité génétique naturelle de *M. truncatula*. L'article est suivi d'une investigation bio-informatique complémentaire réalisée sur les gènes identifiés par GWAS. Le deuxième chapitre concerne l'étude des caractéristiques potentiellement explicatives de la croissance hétérotrophe des plantules et de leur réponse à l'absence de nitrate à cette même température. Le troisième chapitre traite de l'effet du froid sur la performance des plantules en interaction avec la plasticité de réponse à l'absence de nitrate. Le quatrième chapitre aborde l'influence des facteurs géo-climatiques des sites d'origine des accessions utilisées sur la performance des plantules et leur réponse à l'absence de nitrate et au froid. Enfin, l'ensemble des résultats obtenus et des perspectives à ce travail font l'objet d'une discussion générale.



## **Synthèse Bibliographique**

---



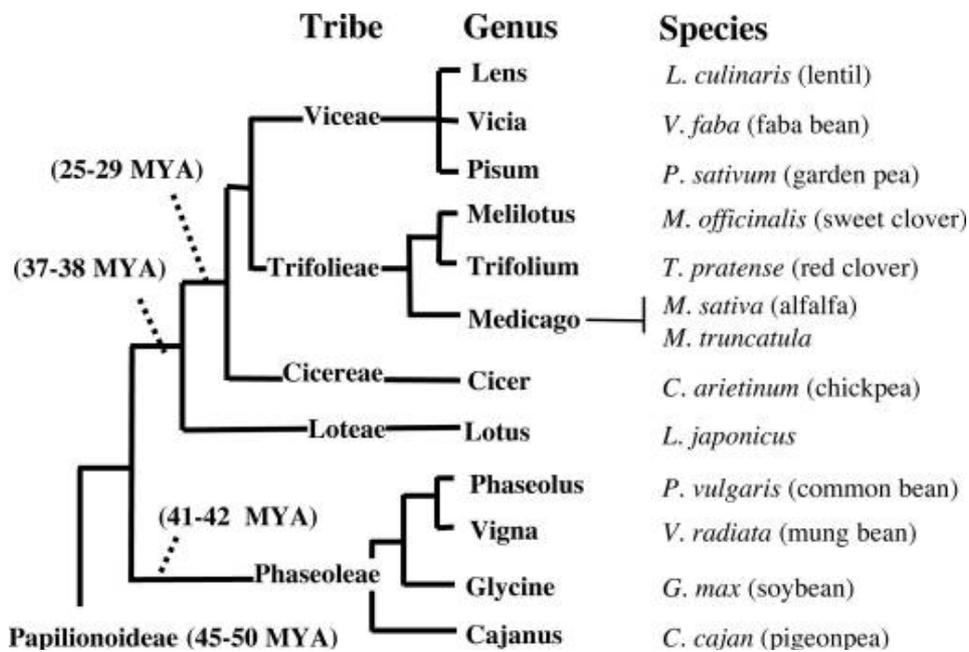
## ***I. Importance des légumineuses***

Les légumineuses font partie de la troisième plus grande famille des plantes à fleurs et la seconde plus vaste famille des plantes cultivées avec environ 20000 espèces (Doyle & Luckow 2003; Gepts et al. 2005). En France, les terres cultivées en légumineuses à grains ont augmenté de façon spectaculaire dès les années 80 (Voisin et al. 2014). La majorité des légumineuses peuvent fixer l'azote atmosphérique par symbiose avec *Rhizobium* (Young et al. 2011). Cela entraîne une réduction des intrants en fertilisants azotés qui peuvent causer une pollution environnementale (Sutton et al. 2011). Dans ce cadre et pour répondre aux exigences du développement durable, ces légumineuses servent de source d'azote alternative et durable (Fustec et al. 2010).

Il existe un intérêt à étudier l'influence de l'absence de nitrate sur la croissance hétérotrophe des plantules (croissance post-germinative des plantules à l'obscurité) chez les légumineuses car le système symbiotique de fixation de l'azote atmosphérique ne se met en place qu'à partir de 200°C-jours de levée, en d'autres termes en l'absence d'apports de nitrate, la croissance hétérotrophe s'effectue dans un milieu dépourvu de nitrate exogène. Il est aussi à noter qu'en présence de nitrate dans le milieu, celui-ci est absorbé dès la percée des téguments par la racicule (Moreau et al. 2008; Brunel-Muguet et al. 2015).

### ***I-1-Medicago truncatula, une espèce modèle des Fabacées***

*M. truncatula* est une plante légumineuse originaire du bassin méditerranéen et modèle des régions tempérées. C'est une espèce sauvage, pour laquelle il existe une large disponibilité de ressources et une grande diversité génétique naturelle. *M. truncatula* se distingue par un génome diploïde de petite taille (~510 Mb), un temps générationnel rapide (3 mois), ce qui facilite les travaux de génétique, génomique et de transgénése (Trieu & Harrison 1996; Trinh et al. 1998; Trieu et al. 2000; Young & Udvardi 2009). N'ayant pas subi de pressions de sélection par le biais de la domestication ou de croisements sélectifs (Gross & Olsen 2010; Roorkiwal et al. 2014), cette espèce offre une large diversité de comportements adaptatifs intéressants (Gentzbittel et al. 2015). Largement utilisée comme légumineuse modèle pour étudier le développement de nodules et la symbiose *Rhizobium* – Légumineuse (Rose 2008; Young et al. 2011), *M. truncatula* a été également beaucoup utilisée comme légumineuse modèle pour étudier la croissance des plantules, le développement et longévité des graines et l'accumulation des réserves dans les graines (Gallardo et al. 2003; Thompson et al. 2009; Vandecasteele et al. 2011; Verdier et al. 2013; Pierre et al. 2014; Brunel-Muguet et al. 2015; Youssef et al. 2016).

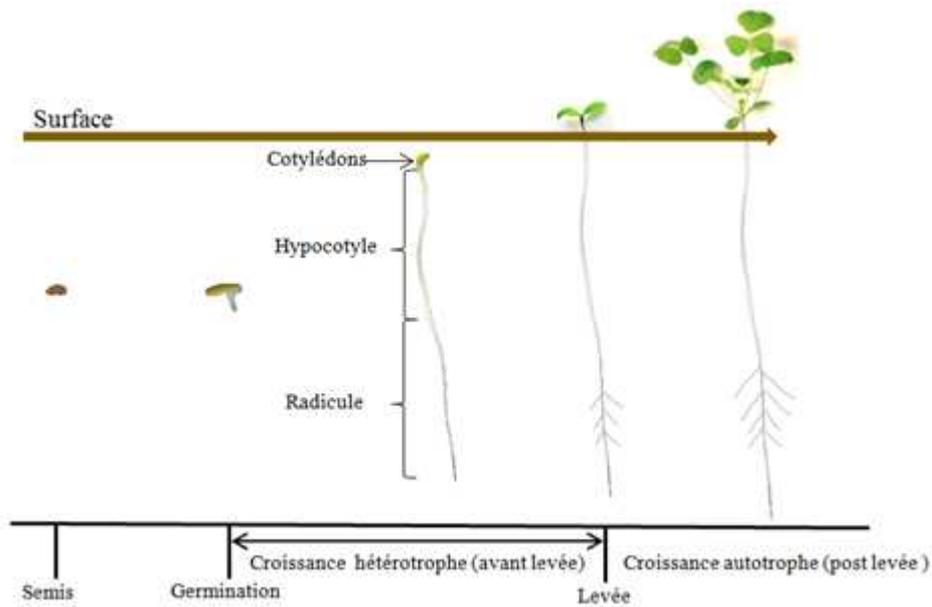


**Figure I** : Relations taxonomiques au sein des deux principaux clades de légumineuses cultivées. Les temps de divergence indiqués sont en millions d'années (MYA). *M. truncatula* se trouve dans le même clade regroupant la plupart des légumineuses cultivées (Choi et al. 2004).

Un certain nombre de ces avancées scientifiques sur cette espèce sauvage peuvent être transférées aux espèces cultivées. En effet, *M. truncatula* présente une synténie (Figure I) et une proximité phylogénétique avec plusieurs espèces de Fabacées cultivées comme la luzerne (Kaló et al. 2004), la lentille (Phan et al. 2007), le pois (Choi et al. 2004), ainsi qu'avec des espèces sauvages.

### ***I-2-Outils de génétique et de génomique développés chez M. truncatula***

Dans la famille des Fabacées, *M. truncatula* et *L. japonicus* sont deux espèces modèles pour lesquelles il existe une très large disponibilité de ressources génomiques (Young & Udvardi 2009). En effet, en raison d'avancées scientifiques sur les espèces végétales modèles et ceux d'intérêt économique, le développement d'outils de génétique, de génomique et de bio-informatique s'est produit pour analyser les bases génétiques structurales et fonctionnelles des caractères d'intérêt. Des ressources génétiques et génomiques ont été développées pour l'espèce *M. truncatula*, grâce à l'organisation de consortiums internationaux par instituts (e.g. Institut National De Recherche Pour L'agriculture, L'alimentation Et L'environnement (INRAE), Centre national de la recherche scientifique (CNRS), National Center for Genome Resources (NCGR), Boyce Thompson Institute (BTI), J. Craig Venter Institute (JCVI), Noble Foundation, British Columbia, ENSAT ...) et plusieurs universités (e.g. Minnesota, Hamline, Southern California, Toulouse, Paris-Saclay, Angers, Paris Diderot, Paris Sorbonne ...). À l'issue de ces consortiums, trois versions du génome du génotype « A17 » de *M. truncatula* ont été publiées et régulièrement mises à jour. La version (Mt3.5), a été basée sur un séquençage par la méthode de Sanger, s'étendant sur 418 Mb (Young et al. 2011). La version (Mt4.0), a été réalisée par la technique d'Illumina, et s'étend sur 412 Mb (Tang et al. 2014). La dernière version (Mt5.0) du génome de *M. truncatula* (Pecrix et al. 2018), a été basée sur la technologie de séquençage PacBio avec un génome référent de 430 Mb. Pour chacune des versions du génome, des génotypages de lignées couvrant une large gamme de la diversité de *Medicago* ont été réalisés. Les bases de données résultantes de ces génotypages sont disponibles sur [ww.medicago.org](http://ww.medicago.org) et [www.medicago.toulouse.inra.fr](http://www.medicago.toulouse.inra.fr). Cela a permis d'établir une description de la structure de la population (Figure IV-1), de l'apparentement et ainsi créer une ressource cartographique, accessible à la communauté pour les études Genome Wide Association Study (GWAS). En conséquence, les deux dernières versions du génotypage de la légumineuse *M. truncatula* ont été utilisées dans la présente étude.



**Figure 2** : Schéma décrivant l'implantation à partir d'une graine à germination épigée : cas de *Medicago truncatula*. La germination épigée est un mode de germination dans lequel les cotylédons sont soulevés au-dessus de la surface du sol. La principale partie observable de la plantule au-dessus du sol est l'hypocotyle.

## ***II. La croissance hétérotrophe : de la germination à la levée***

La croissance hétérotrophe est une phase déterminante du cycle de vie de la plante (Figure 2). Son succès dépend de la capacité d'un lot de graines à installer rapidement des plantules performantes quelles que soient les conditions environnementales. La quantité, la qualité et le potentiel de redistribution des réserves de la graine d'une part (Tekrony et al. 1987; Soltani et al. 2006; Pereira et al. 2015) et le potentiel de levée des parties aériennes et la capacité de colonisation du sol par les parties souterraines, d'autre part, demeurent les composantes clé de cette croissance post-germinative (Finch-Savage et al. 2010).

### ***II-1-Utilisation des réserves de la graine***

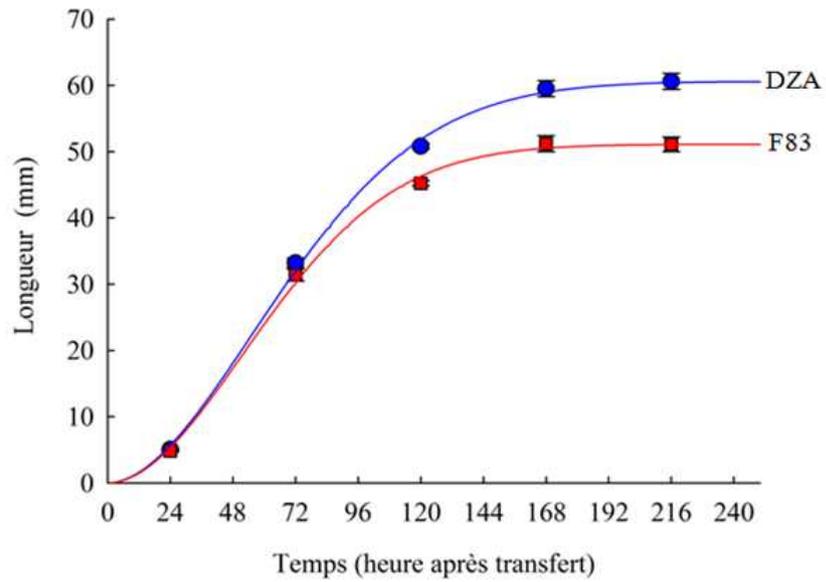
Après le semis, la levée de la dormance des graines conduit à l'activation des processus métaboliques, notamment la respiration qui est nécessaire à la mobilisation de leurs réserves (Lawrence et al. 1990). En conditions hétérotrophe, la croissance est exclusivement dépendante de la mobilisation des réserves de la graine jusqu'à la levée de la plantule et le début de la photosynthèse (Ichie et al. 2001). Les réserves sont converties en métabolites solubles qui seront transportés à l'axe embryonnaire en croissance. La majorité de ces réserves sont transportées suivant plusieurs voies selon le besoin de chaque compartiment de la plantule. Les flux métaboliques endogènes de la graine vont des organes sources primaires (albumen, cotylédons, tégument) vers les organes puits (hypocotyle, épicotyle, coléoptile, radicule), où ils sont assimilés. Toutefois, les réserves mobilisées depuis les graines ne sont pas toutes assimilées dans les organes puits. Une partie des réserves mobilisées est utilisée pour couvrir les besoins énergétiques à travers le processus de respiration cellulaire. La quantité des réserves mobilisées depuis la graine et leur efficacité d'utilisation peuvent directement influencer la croissance hétérotrophe des plantules (Soltani et al. 2006; Mohammadi et al. 2011).

Il existe principalement trois types de réserves dans les graines, les protéines, les lipides et les glucides. Parmi ces réserves, les glucides font partie des réserves majeures impliquées dans la croissance hétérotrophe et constituent la principale source de carbone pour la croissance de l'hypocotyle et de la radicule. Parmi les carbohydrates abondants dans les graines des Fabacées, on



trouve de grandes quantités d'oligosaccharides de la famille du raffinose (RFOs ; raffinose, stachyose et verbascose) (Peterbauer & Richter 2001; Weber et al. 2005). Chez *M. truncatula*, les RFOs sont associés à la vigueur des graines et constituent les sucres précurseurs du glucose et du fructose, qui sont les sucres les plus abondants au cours de la germination et l'allongement de l'hypocotyle (Vandecasteele et al. 2011; Pierre et al. 2014). Ces sucres vont se dégrader tout au long de la croissance hétérotrophe jusqu'à épuisement. Les composés carbonés font partie des constituants majeurs de la paroi cellulaire. Parmi ces constituants, les galactomannanes constituent des polysaccharides de réserves chez les plantes et sont trouvées chez une large gamme de graines de légumineuses (Buckeridge et al. 2000). En plus d'être une source de carbone, les sucres jouent un rôle d'osmolyte impliqués dans le maintien de la turgescence cellulaire et servent de signal de prévention des dommages cellulaires lors de stress abiotiques (Carpita 1996; Pierre et al. 2014). Le ratio saccharose/RFOs a été décrit comme un bon marqueur de la germination et la croissance de la racine en hétérotrophie chez *M. truncatula* (Vandecasteele et al. 2011). Ainsi, la balance entre la dégradation et la synthèse de ces sucres majeurs jouerait un rôle de signal gouvernant la croissance de la racine et la germination (Rolland et al. 2006).

Le deuxième type de réserves majeures correspond aux protéines, lesquelles se dégradent pour procurer l'azote à la plantule. Chez les légumineuses, les réserves protéiques peuvent constituer plus de 35 % de la biomasse de la graine (Monti & Grillo 1983). Djemel et al. (2005) affirment que les graines de *M. truncatula* accumulent une grande quantité de protéines à maturité pouvant atteindre jusqu'à 32-42 % de leur poids sec. Parmi les protéines de réserves les plus importantes, on trouve les globulines qui font partie de la superfamille des globulines. Les plus importantes dans les graines des légumineuses sont les vicilines (7S) et les légumines (11S) (Shewry et al. 1995). On peut également trouver des protéines de réserves de la superfamille des prolamines qui sont les prolamines et les albumines. Ces réserves d'azote permettent la synthèse de nouveaux acides aminés, acides nucléiques et organites lors de l'élongation cellulaire au cours de la croissance hétérotrophe. Chez *M. truncatula*, les apports en azote couvriraient en premier lieu les besoins de la racine puis ceux de l'hypocotyle (Dürr & Mary 1998; Brunel-Muguet et al. 2015). En plus de leur rôle métabolique, les composés azotés (*e.g.* nitrate) jouent un rôle de signal modulant le taux de mobilisation des réserves. Il a été montré que le taux de mobilisation des réserves de la graine était élevé dans les graines contenant une forte quantité d'azote par rapport à celles contenant une faible quantité d'azote (Liebering et al. 1996).



**Figure 3** : Exemple de cinétiques d’allongement de l’hypocotyle pour les accessions DZA315-16 (DZA) et F83005-5 (F83) de *M. truncatula* à l’obscurité à 17 °C. Les plantules des deux accessions atteignent le plateau d’allongement 168h après le transfert (d’après Youssef et al. 2015).

Enfin, les derniers types de réserves majeures mobilisées et utilisées lors de la germination et la croissance post-germinative sont les réserves lipidiques, qui sont très souvent stockées dans les graines sous forme de corps lipidiques composés de triacylglycérols. Ces triacylglycérols sont hydrolysés pour libérer des acides gras et du glycérol. Ce dernier rejoint la glycolyse et les acides gras sont décomposés par  $\beta$ -oxydation pour produire de l'acétyl-CoA (Graham 2008), qui peut ensuite être utilisé *via* le cycle du glyoxylate et la gluconéogenèse dans la production de sucres, ou pour soutenir la respiration (Eastmond & Graham 2001; Eastmond et al. 2015).

## ***II-2-Développement de l'axe embryonnaire***

Lors de la germination, le redémarrage des activités métaboliques et la pression osmotique liée à l'imbibition de la graine en germination provoquent la rupture des téguments et, par conséquent, la sortie de l'axe embryonnaire. L'élongation de cet axe embryonnaire à travers l'élongation cellulaire (Pierre et al. 2014) donne naissance à deux organes distincts. Le premier organe qui sort des téguments est la radicule. Cette dernière est à elle seule à l'origine de tout le système racinaire chez plusieurs espèces végétales. Cette radicule devient la racine principale à partir de laquelle émergent des racines latérales. Ce système racinaire permettra l'ancrage de la plantule, son alimentation en nutriments et en eau. Il permettra également la détection et la réponse aux signaux environnementaux, ainsi que l'adaptation à l'environnement changeant. Chez les espèces à germination épigées, le deuxième organe constituant l'axe embryonnaire est l'hypocotyle (Figure 2). En hétérotrophie, l'hypocotyle est considéré comme l'organe clé de la levée des plantules.

La radicule commence sa croissance à partir de la pointe à la fois par division cellulaire et allongement cellulaire. L'équilibre entre le taux d'élongation cellulaire et la différenciation cellulaire contrôle la longueur finale des cellules et celle de la racine (Petricka et al. 2012). Pour l'hypocotyle, l'élongation commence par les cellules basales puis implique les cellules apicales. Chez le tournesol, l'allongement des organes tel que l'hypocotyle en condition hétérotrophe est le résultat à la fois de la division cellulaire et de l'allongement cellulaire (Heupel & Kutschera 1997). Chez *M. truncatula*, la division cellulaire précède la croissance hétérotrophe car le nombre de cellules est préétabli au cours de la formation de l'embryon et seul le potentiel d'élongation cellulaire gouverne l'allongement de l'hypocotyle (Pierre et al. 2014; Youssef et al. 2016). En fin de croissance hétérotrophe, l'allongement de l'hypocotyle atteint son maximum (Figure 3) et implique les cellules de la partie supérieure de



l'hypocotyle qui sont les plus longues (*A. thaliana*, Cendreau et al. 1997; *M. truncatula*, Pierre et al. 2014). La longueur de ces deux organes de l'axe embryonnaire dépend, à un temps donné, du nombre de cellules présentes dans cet organe et de leur élongation. Cette élongation cellulaire résulte des phénomènes de pressions de turgescence et d'extension irréversible de la paroi cellulaire. Grâce à une accumulation de sucres, d'ions et d'autres solutés osmo-compatibles, les cellules présentent un potentiel osmotique faible qui attire l'eau vers l'intérieur. Cette arrivée massive d'eau dans les cellules induit une augmentation de la pression de turgescence, provoquant ainsi une augmentation de la taille des cellules. L'extension irréversible de la paroi, qui subit un relâchement suite à la modification de ses composants, est suivie d'un dépôt de nouveaux polymères qui empêche sa fragilisation (Cosgrove 2005; Wang et al. 2013). Le relâchement de la paroi cellulaire est en partie régulé par les expansines et les xyloglucanes endotransglucosylases (Gimeno-Gilles et al. 2009). Ces protéines agissent directement sur les xyloglucanes qui constituent le principal polymère d'hémicellulose et du réseau cellulosique (Park & Cosgrove 2012). Au final, le relâchement de la paroi cellulaire entraîne l'absorption d'eau et donc l'expansion volumétrique de la cellule (Cosgrove 2014).

### ***III. Déterminisme environnemental de la croissance hétérotrophe***

Les stress abiotiques affectent la production des cultures mondiales, ce qui provoque des pertes économiques chaque année (Godfray et al. 2010; Cramer et al. 2011). Chez plusieurs espèces, la croissance des plantules est l'étape la plus sensible aux stress abiotiques au cours du cycle de vie et, étant donné leur immobilité, les plantules doivent modifier leur croissance et leur morphologie afin de s'adapter au mieux à ces stress (Sakakibara 2006). La limitation en nutrition azotée et les basses températures font partie des stress environnementaux qui influencent le plus la germination, la croissance des plantules et celle des plantes (Dias et al. 2011; Wang et al. 2014; Brunel-Muguet et al. 2015). De plus, la combinaison de la basse température et la limitation d'apport en azote (Schaberg et al. 2002) compromet l'établissement des plantules en affectant l'élongation des organes (hypocotyle et radicule) et la mobilisation de la biomasse des graines.



### ***III-1. Influence de la nutrition azotée***

#### ***III-1-1. Importance de la fertilisation azotée***

L'azote, en tant qu'élément essentiel requis pour la synthèse des acides aminés, des acides nucléiques et des chlorophylles, est l'un des principaux macronutriments pour la croissance et le développement des plantes (Hirel et al. 2007; Ruffel et al. 2014; O'Brien et al. 2016). Son absorption induit une croissance rapide des plantules en allouant une proportion plus importante de biomasse aux parties aériennes et en augmentant leur capacité d'assimilation du carbone (Miller & Hawkins 2007; Brunel-Muguet et al. 2015). Dans les conditions agronomiques, les plantules sont fréquemment soumises à des variations de disponibilité en éléments nutritifs, en particulier en azote, ce qui influence leurs performances. Bien qu'il fasse partie des éléments les plus abondants sur terre, l'azote est un des principaux facteurs limitant pour la croissance des plantes et son absorption peut commencer relativement tôt dans le cycle de vie des plantes (Wang et al. 2014; Brunel-Muguet et al. 2015). De nombreux changements physiologiques et biochimiques interviennent dans les plantes comme des réponses adaptatives à la limitation de l'azote. On peut citer l'augmentation de l'absorption de N par des transporteurs à forte affinité, la réduction du ratio partie aérienne/ partie souterraine, le partitionnement du carbone dans les plantes, la remobilisation de l'azote à partir des vieilles feuilles vers les jeunes feuilles et les organes reproducteurs, le retard de la croissance et de la photosynthèse et l'accumulation accrue d'anthocyanines (Ono et al. 1996; Améziène et al. 1997; Chalker-Scott 1999; Ding et al. 2005; Diaz et al. 2008).

#### ***III-1-2. Le nitrate : absorption, transport et assimilation***

L'azote est très souvent apporté sous forme de fertilisant minéral, qui provient principalement des engrais dans les terres cultivées, comprenant le nitrate, l'ammonium et l'urée. Dans la plupart des sols agricoles, l'azote est absorbé préférentiellement sous forme de nitrate (Crawford & Glass 1998; Crawford & Forde 2002). Après son absorption, le nitrate est réduit en nitrite par la nitrate réductase puis en ammonium par la nitrite réductase (Crawford & Forde 2002). L'ammonium sera par la suite assimilé sous forme d'acide aminé *via* le cycle de la glutamine synthétase GS / glutamate synthétase GOGAT.



Selon le niveau de concentration du nitrate dans le sol, les plantes modulent l'architecture de leur système racinaire ainsi que les mécanismes d'acquisition de ce composé (Zhang & Forde 2000). Deux systèmes d'affinité ont été décrits, un système de transport à haute affinité (HATS) impliqué dans l'absorption du nitrate extérieur à de faibles concentrations (environ 1  $\mu\text{M}$ ), et un système de transport à faible affinité (LATS) fonctionnant à des concentrations plus élevées ( $>0,5$  mM) (Nacry et al. 2013). Ces niveaux d'affinité différents font intervenir deux familles de protéines de transport de nitrate, d'une part les protéines NPFs (Nitrate transporter 1/ Peptide transporter Family) anciennement appelées Nitrate Transporter 1/ Peptide Transporter (NRT1/PTR) (Léran et al. 2014) et d'autre part, les protéines NRT2 (Nitrate Transporter 2) (Nacry et al. 2013). Les transporteurs de type NRT2 sont généralement impliqués dans les systèmes HATS, alors que les transporteurs de nitrate de type NPF sont généralement impliqués par des systèmes LATS.

### ***III-1-3. Le nitrate comme molécule signal***

#### ***III-1-3-1. Le nitrate peut influencer plusieurs processus physiologiques***

L'importance du nitrate ne se limite pas à son rôle nutritionnel dans le cadre de la fertilisation azotée, il intervient également dans plusieurs processus physiologiques comme molécule signal (Zhang & Forde 2000; Castaings et al. 2011). La fertilisation par le nitrate conduit à une augmentation du taux d'acides aminés, de protéines (Marschner 1995; Crawford 1995; Forde & Clarkson 1999), ainsi qu'à un changement du métabolisme carboné (Scheible et al. 1997). En tant que molécule signal, le nitrate joue un rôle important, par exemple dans la réduction de la dormance des graines (Alboresi et al. 2005), dans le développement des plantes (Nacry et al. 2013). Le nitrate peut également influencer la répartition des réserves de la graine dans les compartiments de la plantule en croissance. Chez les céréales comme l'orge et le blé, l'ajout de nitrate augmente la mobilisation des réserves de la graine en croissance à l'obscurité (Andrews et al. 1991; Lieffering et al. 1996). La mobilisation des réserves est favorisée par une augmentation du flux d'eau dans la plante résultant d'une modification de la pression osmotique provoquée par le de nitrate (Lieffering et al. 1996). Le rôle de molécule signal du nitrate dans la régulation de l'architecture racinaire a également été mis en évidence dans plusieurs études y compris dans les plantules (Morère-Le Paven et al. 2011; De Pessemier et al. 2013; Ruffel et al. 2014).

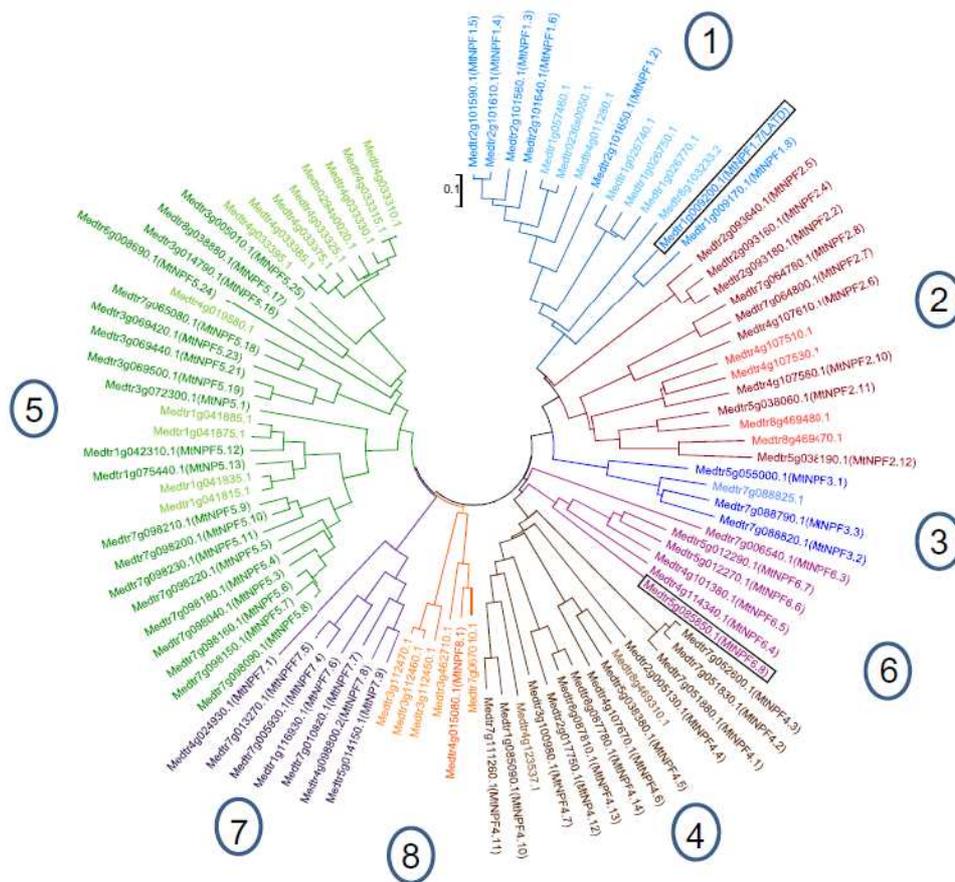


### ***III-1-3-1-1. Le nitrate module l'architecture du système racinaire***

Plusieurs études ont montré que le nitrate, comme molécule signal, façonnait l'architecture du système racinaire (racine primaire, latérale, pointe) chez plusieurs espèces (Forde 2000; Tian et al. 2008; Celis-Arámburo et al. 2011; De Pessemier et al. 2013; Pellizzaro et al. 2017). En premier lieu, l'intérêt s'est porté sur la croissance des racines latérales, lesquelles constituent un élément essentiel qui façonne l'architecture racinaire (Zhang et al. 1999; Ruffel et al. 2011). La racine primaire, constituant l'autre élément important du système racinaire, a ensuite été étudiée en interaction avec la disponibilité du nitrate. Les fortes concentrations en nitrate diminuent le nombre des racines latérales (Zhang & Forde 2000) et inhibent la croissance racinaire par la diminution du ratio racine/parties aériennes. C'est le cas pour le maïs (Tian et al. 2008), *A. thaliana* (Linkohr et al. 2002) et *M. truncatula* (Morère-Le Paven et al. 2011), où les racines primaires des jeunes plantules sont inhibées suite à l'ajout de nitrate exogène. Chez *A. thaliana*, la présence de nitrate à 5 mM induit aussi une réduction de la racine primaire (Vidal et al. 2010).

Au contraire, les faibles concentrations de nitrate induisent une extension de la racine primaire et une diminution du ratio des parties aériennes / souterraines (Luo et al. 1994), la croissance des parties aériennes des plantules étant plus inhibée que la croissance des parties racinaires (Améziane et al. 1997). De même, l'extension de la racine primaire s'explique par le fait qu'une partie de la croissance de la radicule est favorisée dans le but d'augmenter la surface d'absorption et le potentiel de prospection du milieu de culture en cas de nitrate limitant.

Toutefois, un certain nombre d'études ont mis en avant l'existence de molécules comme le nitrate, jouant un rôle signal, dont la disponibilité dans le milieu extérieur est perçue comme signal *via* un senseur modifiant le comportement des cellules (Redinbaugh & Campbell 1991; Crawford 1995). Chez *A. thaliana*, plusieurs transporteurs de nitrate ont été caractérisés comme trancpteurs, servant à la fois de transporteur du flux de nitrate et de senseur de sa concentration (Muños et al. 2004; Little et al. 2005; Wang et al. 2009; Gojon et al. 2011). Parmi ces transporteurs AtNPF6.3 et AtNRT2.1 se sont distingués pour leur implication dans le contrôle du développement des racines latérales *via* le nitrate (Remans et al. 2006; Krouk et al. 2010).



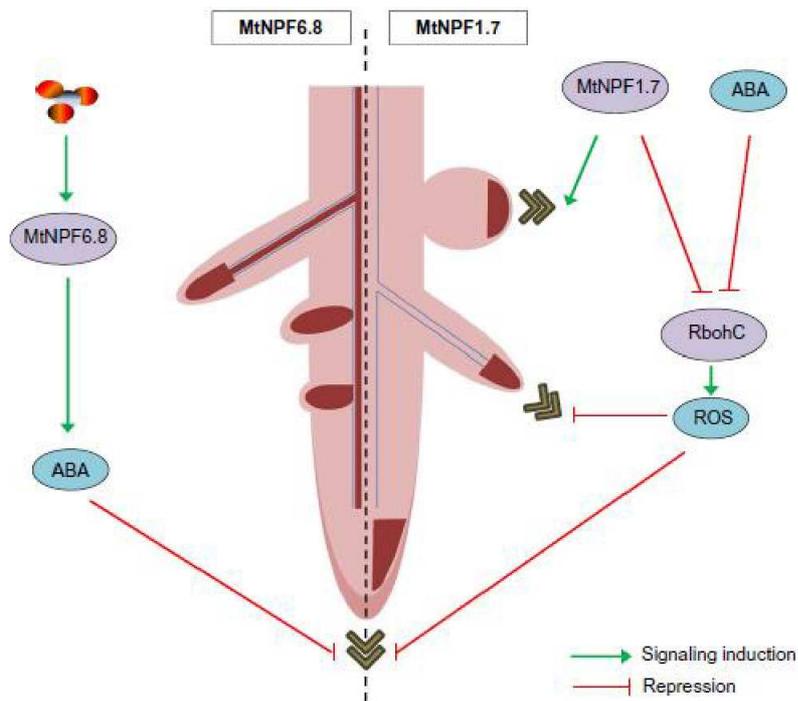
**Figure 4.** Arbre phylogénétique des protéines de la famille des transporteurs de nitrate MtNPF identifiés chez *M. truncatula* (Pellizzaro et al. 2017). La recherche in silico des séquences de protéines a été effectuée en utilisant l'algorithme BLAST de la base de données spécifique à *Medicago* JCVI (<http://www.jcvi.org/medicago/>) en utilisant la version du génome Mt4.0. L'arbre phylogénétique a été obtenu via le logiciel MEGA5. L'analyse met en avant 97 séquences protéiques identifiées comme des MtNPF putatifs. Huit clades de protéines (de la même couleur) proche phylogénétiquement sont notés de 1 (vert) à 8 (orange)). Les cases noires indiquent les deux transporteurs de nitrate largement caractérisés chez *M. truncatula* : MtNPF1.7 (Yendrek et al. 2010) et MtNPF6.8 (Morère-Le Paven et al. 2011). Les plus récentes séquences identifiées, grâce à l'annotation du génome Mt4.0, sont présentées en couleur claire. Les identifiants indiquent le nom du gène et entre parenthèse le nom de la protéine.

### ***III-1-3-1-2. Modulation du système racinaire par le signal nitrate chez M. truncatula***

Pour *M. truncatula*, il est tout aussi important d'étudier l'effet du nitrate sur la racine primaire que chez les autres espèces car, en dépit de la capacité de fixation de l'azote atmosphérique, le système symbiotique ne se met en place qu'à partir de 200 °C-jours de levée (Moreau et al. 2008). En attendant qu'elles soient autosuffisantes en azote et afin de satisfaire leurs besoins précoces, les légumineuses puisent l'azote de leur milieu dès la germination ou le mobilisent à partir des réserves de la graine (Durrant & Mash 1989; Brunel-Muguet et al. 2015).

A cet égard chez *M. truncatula*, des études ont été réalisées sur la réponse des plantules au nitrate en autotrophie par l'équipe d'accueil de cette thèse. Elles ont montré que la croissance des plantules est un caractère multigénique sensible à l'apport de nitrate exogène (Vandecasteele et al. 2011; Morère-Le Paven et al. 2011). L'investigation génétique de ce caractère a permis l'identification de MtNPF6.8, un transporteur de nitrate impliqué dans le contrôle de l'élongation de la racine. Ce transporteur de nitrate fait partie de la famille des transporteurs NPF qui sont les plus étudiés et dont il existe 97 isoformes chez *M. truncatula* (Pellizzaro et al. 2017). Ces protéines sont distribués en huit groupes (Figure 4; (Pellizzaro et al. 2017), et seuls deux transporteurs de nitrate sont largement caractérisés jusque-là, MtNPF1.7 (Yendrek et al. 2010) et MtNPF6.8 (Morère-Le Paven et al. 2011) (Figure 5).

MtNPF1.7 est un transporteur de nitrate à forte affinité (Bagchi et al. 2012) tandis que MtNPF6.8 est un transporteur à double-affinité (Morère-Le Paven et al. 2011; Pellizzaro et al. 2014; 2017). Le gène *MtNPF1.7* est impliqué dans le développement du système racinaire et indispensable pour la fonction du méristème des racines et des nodules, où il est exprimé (Liang et al. 2007; Yendrek et al. 2010; Figure 5). De plus, ce transporteur est également impliqué dans la perception de l'ABA (Yendrek et al. 2010). L'ABA agirait de façon coordonnée avec le gène *MtNPF1.7* pour contrôler la croissance des racines indirectement *via* le contrôle du niveau des ROS (espèces réactives de l'oxygène) (Zhang et al. 2014; Pellizzaro et al. 2017; Figure 5). Le transporteur MtNPF6.8, localisé au niveau de la membrane plasmique, entraîne une réduction de la longueur des racines primaires en réponse au nitrate et joue un rôle à la fois de transporteur et de senseur "transcepteur" (Pellizzaro et al. 2014), comme pour AtNPF6.3 (Wang et al. 2009). Comme pour MtNPF1.7, l'ABA agirait en aval de MtNPF6.8 dans la voie de la signalisation par le nitrate (Pellizzaro et al. 2014, Figure 5).



**Figure 5 :** Schéma résumant le rôle des deux transporteurs de nitrate (Pellizzaro et al. al. 2017)., MtNPF1.7 (droite) et MtNPF6.8 (gauche), caractérisés chez *M. truncatula*, dans le développement du système racinaire. MtNPF6.8 est un senseur de nitrate agissant sur l'allongement cellulaire de la racine primaire. L'ABA agit en aval de MtNPF6.8 dans la voie de signalisation (Pellizzaro et al. 2014). MtNPF1.7 contribue au développement du méristème des nodules, à la formation des racines latérales (secondaires) et à l'organisation de la croissance racinaire primaire de la pointe de la racine (Harris, 2015). Zhang et al. (2014) proposent que l'ABA et MtNPF1.7 fonctionne probablement en parallèle pour moduler l'allongement des racines via l'action des espèces réactives de l'oxygène (ROS) générées par la NADPH oxydase MtRbohC. Les régions de la racine colorées en rouge foncé sont celles où chacun des deux gènes de transporteur de nitrate sont exprimés. La molécule en amont de la voie de signalisation est le nitrate.

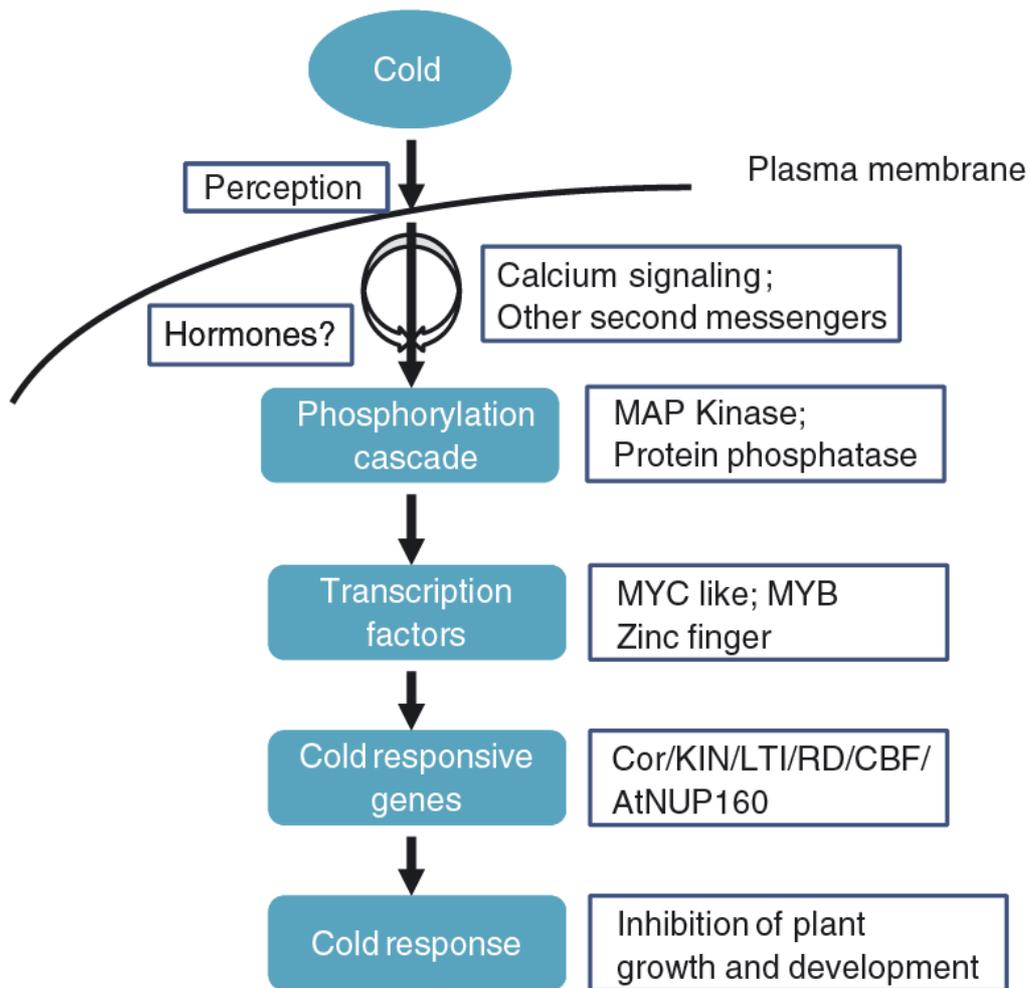
## ***III-2-Influence du froid***

### ***III-2-1-Le froid est un facteur affectant la croissance des plantes***

La basse température est l'un des principaux stress abiotiques limitant la croissance, la productivité et la qualité des plantes (Sharma et al. 2005; Tommasini et al. 2008) et la répartition des espèces dans les écosystèmes. La réduction de la croissance provoquée par les basses températures a été constatée chez de nombreuses espèces, exemple chez le maïs (Louarn et al. 2008).

Il a été démontré chez *Arabidopsis* que le froid engendre une cascade de réponses au niveau cellulaire (Figure 6). En premier, il diminue la fluidité membranaire suite à un changement du niveau d'insaturation des acides gras et de la composition lipido-protéique de la membrane cellulaire (Wang et al. 2006), ce qui modifie la perméabilité membranaire et augmente sa rigidification. C'est ainsi que la signalisation par le froid est initiée par cette rigidification de la membrane qui joue un rôle important dans la perception du signal froid qui met en jeu des canaux de transport du calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ). La réorganisation des filaments d'actine serait impliquée dans l'augmentation de l'influx de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytoplasme. Ce dernier active une cascade de phosphorylations, à travers l'action de l'histidine kinase, des récepteurs kinases, des phospholipases qui relayent le signal froid vers l'aval (Rahman 2012). Il s'en suit l'activation de facteurs de transcription qui régulent à leur tour les gènes induits par le froid, ce qui engendre au final la réduction de la croissance et du développement des plantes.

Par ailleurs, il existe un certain nombre de stress secondaires qui peuvent découler du stress causé par le froid, comme un stress hydrique, provoquant une chute rapide de la conductance hydraulique racinaire, ou un stress oxydatif *via* l'accumulation de ROS par activation de la NADPH oxydase (Hopkins & Hüner 2008). Par conséquent, les plantes ont mis en place des mécanismes biologiques, tels que la synthèse de protéines en réponse au froid ou la modification du statut osmotique cellulaire, qui permettent une tolérance et une acclimatation aux variations de température (Yadav 2010). Chez *Medicago sativa* par exemple, la rigidification de la membrane plasmique provoque l'activation de gènes de réponse au froid (Örvar et al. 2000).



**Figure. 6.** Voie de transduction du signal suite à un stress froid chez *Arabidopsis* (Rahman 2012). Le froid est perçu par la membrane plasmique ce qui entraîne, en présence de calcium et peut-être d'hormones, une cascade de phosphorylations activant des facteurs de transcription qui vont induire l'expression de gènes de réponse au froid et entraîner la réduction de la croissance et du développement de la plante.

### ***III-2-2-le froid est un facteur limitant de la croissance des plantules***

Dans les conditions agronomiques, les températures de l'air et du sol modifient la croissance et le développement des plantes. La température de l'air a une incidence directe sur le métabolisme et notamment sur le taux de photosynthèse et de respiration. En revanche, la température du sol influence plutôt la germination, le développement racinaire et le taux d'absorption des éléments nutritifs et la levée (Hopkins & Hüner 2008; Dias et al. 2011). La température est l'un des facteurs environnementaux les plus importants sur la germination des graines et sur la croissance hétérotrophe des plantules (Finch-Savage et al. 2001; Brunel et al. 2009; Dias et al. 2011). En effet, aux stades précoces de croissance, les températures faibles peuvent induire des modifications physiologiques allant jusqu'à empêcher la levée des plantules. En premier, elles peuvent provoquer la mise en place d'hypocotyles ou de coléoptiles vitreux, tortueux qui auront du mal à émerger des téguments. Ensuite, les basses températures réduisent directement l'allongement de l'hypocotyle, ce qui diminue le taux de levée (Brunel et al. 2009; Vandecasteele et al. 2011; Pierre et al. 2014).

En outre, la baisse de température influence également l'utilisation des réserves de la graine. Bien qu'une étude sur trois accessions de *M. truncatula* ait montré que la biomasse sèche mobilisée n'était pas influencée par la baisse de la température (Brunel et al. 2009), le taux d'utilisation des réserves s'avère plus important chez les accessions capables de germer à basse température (Derieux et al. 1989). Les basses températures peuvent également diminuer le métabolisme énergétique. En effet, les besoins en énergie pour l'absorption des ions diminuent avec la baisse de la température et la demande en ATP diminue à basses températures. Enfin, le froid qui survient aux stades précoces de la croissance peut engendrer des conséquences sur les stades plus avancés. A titre d'exemple, le froid retarde la croissance des plantules de pastèque et peut endommager l'appareil photosynthétique jusqu'à retarder la formation des primordia floraux dans les méristèmes (Korkmaz & Dufault 2001).

### ***III-2-3-Etude de la réponse des plantules de M. truncatula au froid***



La croissance de l'hypocotyle est influencée par la modification de la paroi cellulaire en fonction de la température. Cette dernière contrôle la balance entre la rigidité et le relâchement de la paroi cellulaire, ce qui influence le potentiel d'allongement. Dias et al. (2011), ont mis en avant des co-localisations entre des gènes impliqués dans la rigidification de la paroi cellulaire et des QTLs liés à l'allongement de l'hypocotyle à basse température. Enfin, globalement, une modification de l'expression des gènes impliqués dans la modification des parois et l'allongement cellulaire ainsi que des gènes codant des GSTs, a été observée en réponse au froid dans l'hypocotyle chez *M. truncatula* en condition hétérotrophe (Pierre et al. 2014).

#### ***IV. Déterminisme génétique de la croissance hétérotrophe des plantules***

##### ***IV-1 Les méthodes d'études de la génétique quantitative***

##### ***IV-1 1-La cartographie de liaison est une approche limitée en terme d'exploration de la diversité naturelle***

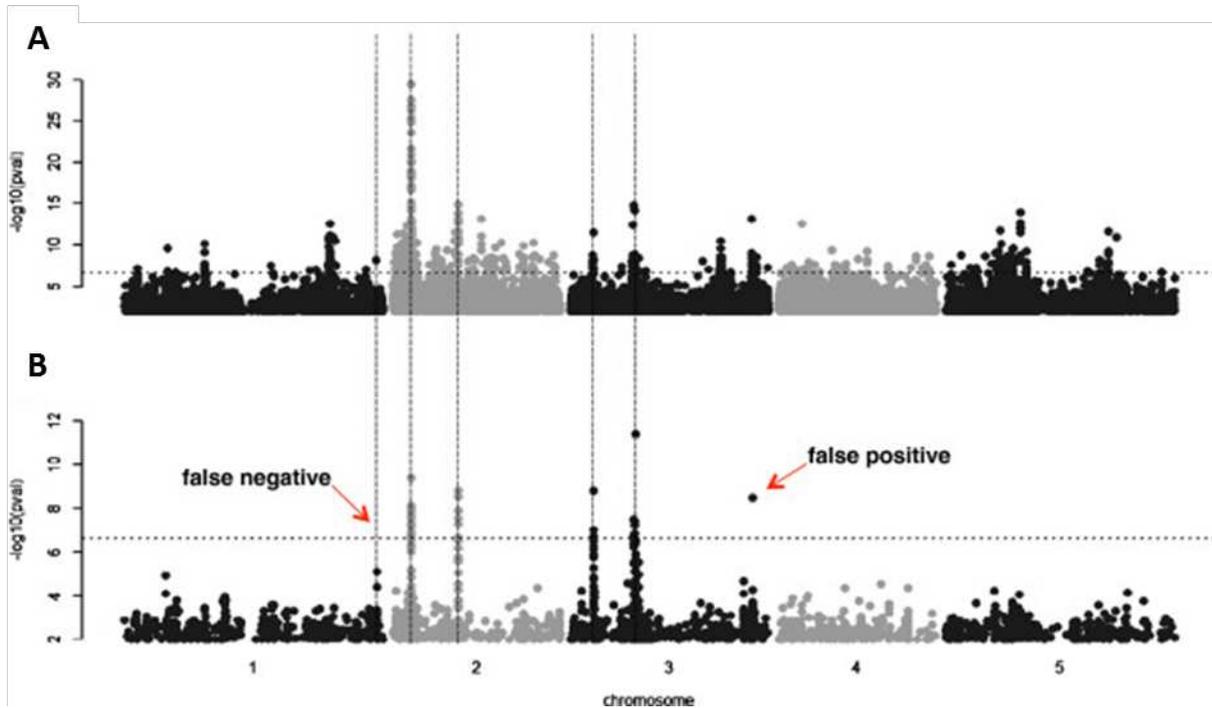
Chez les végétaux, l'étude des déterminants génétiques à l'origine des caractères complexes est abordée par des approches de cartographie de liaison ou de génétique d'association qui permettent d'associer les variations des caractères phénotypiques aux variations des séquences génomiques. La cartographie par analyse de liaison est utilisée pour détecter les régions du génome qui co-ségrègent avec un caractère quantitatif donné et utilisent des populations en ségrégation issues de croisements biparentaux ou encore de pedigrees. Or, malgré sa robustesse et son utilisation dans de nombreux programmes de sélection, la cartographie de liaison souffre de certaines limites. Parmi ces limites, il y a le nombre de recombinaisons restreint et le temps générationnel non négligeable pour obtenir des populations en ségrégation (*i.e.* recombinant inbred lines (RILs)). La production de RILs à partir de croisements entre plusieurs parents, nommée lignées MAGIC (Multiparent Advanced Generation Inter-Cross Lines), ou chez *Arabidopsis* par exemple, *Arabidopsis* multi-parent RIL (AMPRIL) a pu augmenter le polymorphisme allélique et améliorer la résolution de la cartographie (Kover et al. 2009; Huang et al. 2011). Dans ce contexte la génétique d'association (GA) présente l'avantage de s'affranchir de ces points faibles et compléter l'approche de la cartographie de liaison.



## ***IV-1 2-La génétique d'association est une approche puissante pour l'étude des caractères phénotypiques complexes***

La génétique d'association (GA) a été initialement proposée pour identifier les zones du génome impliquées dans le contrôle de pathologies génétiques à déterminisme simple ou complexe chez l'espèce humaine pour laquelle il n'est pas possible de créer des populations recombinées (Dickson et al. 2010; Platt et al. 2010). Elle s'est ensuite étendue aux animaux (Flint & Eskin 2012) puis aux végétaux (Atwell et al. 2010). Le but de cette analyse est premièrement d'identifier les facteurs causatifs d'un caractère donné, du locus jusqu'au gène. Deuxièmement, la GA peut servir d'expérimentation de base pour déterminer l'architecture génétique complexe (*i.e.* le nombre de loci associés et leurs contributions respectives au phénotype), ce qui permet de mieux cibler le choix des parents pour les études de cartographie de liaison (Korte & Farlow 2013). Deux stratégies sont possibles: une stratégie "GWAS" sans *a priori* en analysant le génome en entier ou une stratégie "gène -candidats" avec *a priori* à l'échelle de gènes d'intérêt.

Le principe de la génétique d'association est d'associer un polymorphisme nucléotidique à une variation phénotypique observée d'un caractère au sein de populations naturelles ou de collections diversifiées (Ingvarsson & Street 2011). L'utilisation de ces populations naturelles et des core collections représentatives de la diversité naturelle offre la possibilité d'exploiter une plus large diversité allélique (Diwan et al. 1994). La diversité et le nombre d'allèles disponibles au sein de ces populations sont largement plus importants (Yu & Buckler 2006; Weigel 2012) que ce qui est disponible dans les lignées issues de croisements biparentaux. Cette diversité allélique est issue d'une accumulation d'événements de recombinaisons et de mutations durant l'histoire évolutive des espèces, offrant ainsi une meilleure résolution et distinction des régions génomiques associées au phénotype (Zhu et al. 2008; Rafalski 2010). Un autre point fort de la génétique d'association est qu'elle permet d'exploiter des populations déjà présentes dans la nature et qui ont besoin de quelques générations d'auto-fécondations pour la fixation allélique, contrairement aux populations recombinées utilisées en cartographie de liaison. C'est ainsi que la génétique d'association demeure une approche à forte résolution et à fort pouvoir statistique, exploitable surtout grâce au développement des systèmes de phénotypage et de génotypage à haut débit, notamment *via* le développement des marqueurs SSR et SNP (Thuillet et al. 2005; Stranger et al. 2011).

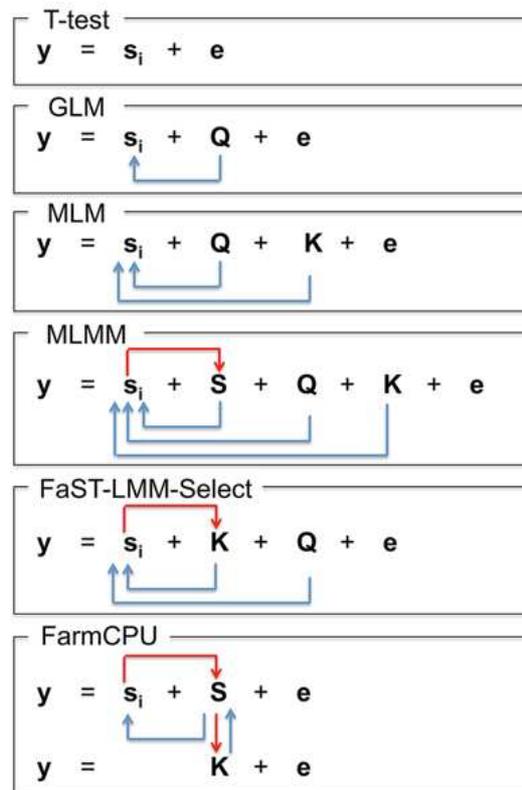


**Figure 7.** Amélioration de la performance de l'analyse GWAS par la prise en compte du fonds génétique (Korte & Farlow 2013). Les analyses GWAS représentées utilisent (A) un modèle linéaire « naïf » et (B) un modèle mixte qui tient compte de la structure de la population et d'autres facteurs génomiques. Le modèle linéaire simple conduit à des  $-\log(P\text{-valeur})$  très élevées et les cinq marqueurs causaux ne sont pas les associations les plus fortes. Le modèle mixte améliore la détection des marqueurs, mais conduit à la détection d'un faux négatif et d'un faux positif. Les graphiques représentent les Manhattan plots pour un caractère simulé dans lequel chaque point représente un SNP sur chacun des cinq chromosomes d'*Arabidopsis*. La ligne horizontale en pointillés indique le seuil de 5 % de Bonferroni. Cinq SNP (indiqués par des lignes verticales en pointillés) ont été choisis au hasard pour être « causatifs » et représenter chacun jusqu'à 10 % de la variance phénotypique.

### *IV-1 3-Les contraintes liées à l'utilisation de la génétique d'association*

Malgré la pertinence de l'analyse par génétique d'association, il existe des limites à cette stratégie liées aux différents biais statistiques dus à la structuration génétique de la population étudiée et à la surestimation des effets des allèles mineurs. La détection de faux positifs (Figure 7) peut ainsi survenir à cause de la structuration génétique des populations naturelles en sous-populations provoquée par les forces évolutives (mutations, migrations, sélection naturelle, dérive génétique) (LoveLess & Hamrick, 1984). Le risque de confondre des allèles ayant un effet génétique réel sur le phénotype étudié avec des allèles permettant d'identifier les groupes génétiques est grand (Myles et al. 2009; Liu et al. 2016). De même, il existe un autre effet de la structuration génétique dû aux groupes génétiques appartenant à la même famille. Le risque consiste à avoir une covariance phénotypique élevée entre les individus les plus proches parents.

Le risque consiste à avoir une covariance phénotypique élevée entre les individus apparentés. Ensuite, la détection de faux positifs en GWAS (figure 7) peut survenir à cause des allèles rares à petit effet phénotypique (Asimit & Zeggini 2010; Gibson 2011). Ces allèles rares souffrent d'être en forte association avec de nombreux autres variants rares non causaux au sein du génome ce qui conduit aux situations hétérogénéités génétiques (Dickson et al. 2010). L'hétérogénéité se définit par le fait que des marqueurs non causaux sont de meilleurs descripteurs du phénotype que ne le seraient les marqueurs causaux (Platt et al. 2010). Cette hétérogénéité génétique causée par les allèles rares peut augmenter avec la réduction de taille de la population étudiée dans laquelle les caractères étudiés ne sont représentés que par quelques loci qui expliquent une grande partie de la variance phénotypique (Korte & Farlow 2013). Par conséquent l'ensemble de ces limites réduit le pouvoir de détection des réelles associations. Depuis lors, des modèles mixtes ont été largement appliqués en GWAS (Yu & Buckler 2006; Kang et al. 2008; Zhang et al. 2010; Segura et al. 2012; Liu et al. 2016) pour réduire le nombre de détections de fausses associations liés notamment à la structuration génétiques (Figure 7).

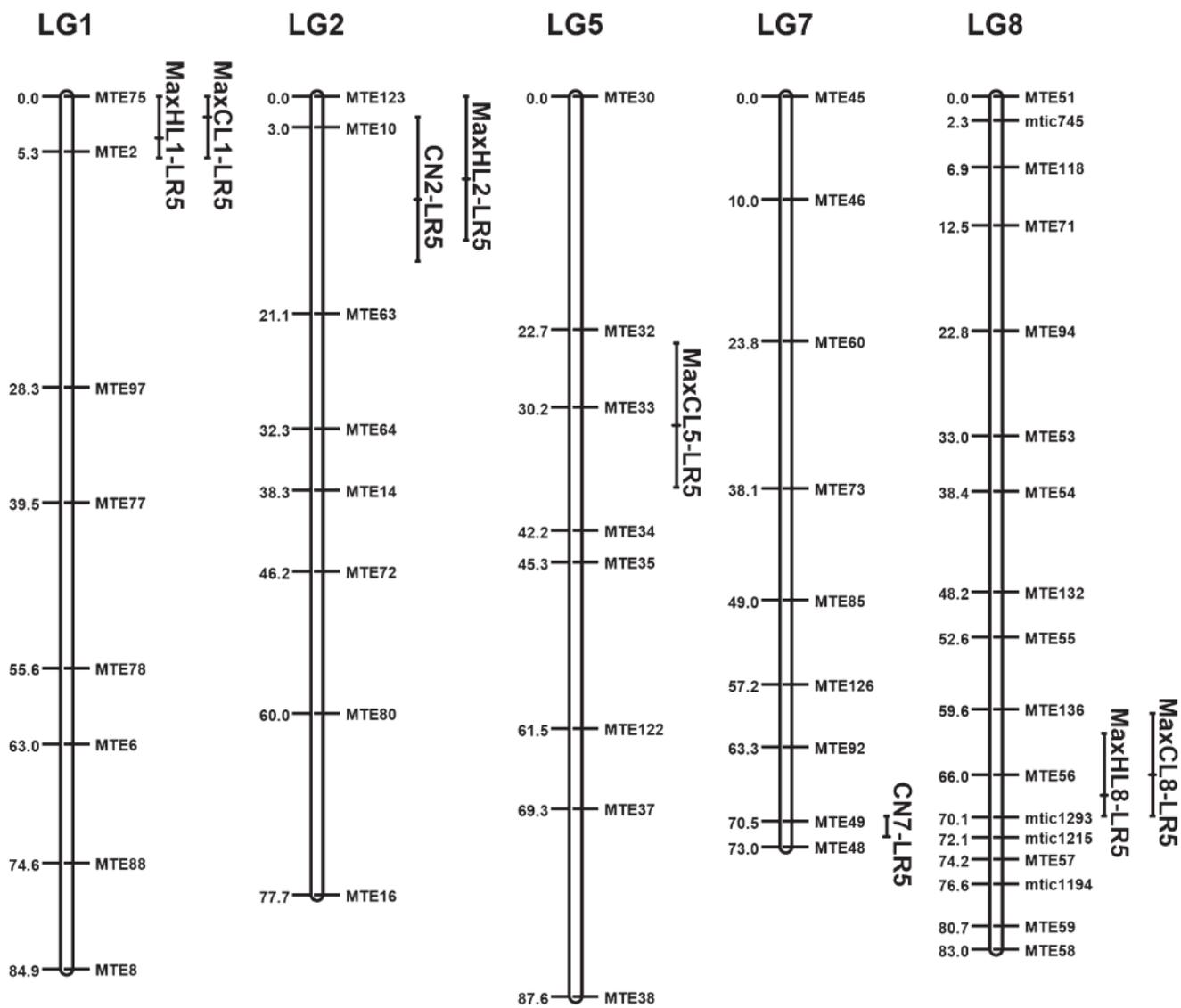


**Figure 8. Développement conceptuel et procédure de FarmCPU.** La méthode proposée, FarmCPU, a été inspirée par le développement de méthode démontré dans la figure. Ces méthodes commencent par un modèle naïf (*e.g.* t-test) qui teste l'effet marqueur, un à la fois, *i.e.*  $i^{\text{th}}$  marqueur ( $s_i$ ), sur le phénotype ( $y$ ) avec un effet résiduel ( $e$ ). Ensuite, GLM contrôle les faux positifs en ajustant la structure de la population ( $Q$ ) comme covariables pour ajuster le test sur les marqueurs génétiques indiqués par les flèches bleues. MLM utilise à la fois à  $Q$  et à l'apparentement ( $K$ ) comme covariables. Cependant,  $Q$  et  $K$  restent constants pour tester tous les marqueurs. Ni  $Q$  ni  $K$  ne reçoivent d'ajustement des tests d'association sur les marqueurs. MLMM ajoute des pseudo QTN comme covariables supplémentaires ( $S$ ). Ces pseudo QTN sont estimés par une procédure de régression par étapes. Par conséquent, ces pseudo QTNs reçoivent un ajustement de tests d'association sur des marqueurs comme indiqué par la flèche rouge. Cependant,  $Q$  et  $K$  restent constants pour tester tous les marqueurs. Bien que similaire au MLM, FaST-LMM-Select contrôle les faux positifs en ajustant  $Q$  et  $K$  comme covariables ; le  $K$  de FaST-LMM-Select est incorporé avec des tests d'association sur les marqueurs comme indiqué par la flèche rouge. Cependant,  $Q$  reste constant. FarmCPU supprime complètement la confusion entre le marqueur de test et  $K$  -  $Q$  en combinant MLMM et FaST-LMM-Select, mais permettant à un modèle à effets fixes et à un modèle à effets aléatoires de fonctionner séparément. Le modèle à effet fixe contient le marqueur de test et des pseudo QTN pour contrôler les faux positifs. Les pseudo QTN sont sélectionnés parmi les marqueurs associés et évalués par le modèle à effet aléatoire, avec  $K$  défini par les pseudos QTN. The pseudo QTNs are selected from associated markers and evaluated by the random effect model, with  $K$  defined by the pseudo QTNs. Le modèle à effets fixes et le modèle à effets aléatoires sont utilisés de manière itérative jusqu'à ce qu'un stade de convergence soit atteint, c'est-à-dire lorsqu'aucun nouveau pseudo QTN n'est ajouté (Liu et al. 2016).

#### *IV-1 4-Développement des modèles mixtes*

Pour pallier les problèmes d'hétérogénéité génétique et de détection d'associations erronées en général, des modèles statistiques mixtes ont été élaborés. Les modèles sont passés du plus simplifié "GLM" (General Linear Model) dit « naïf », liant la simple variation de la séquence génomique à la variation du caractère phénotypique, à des modèles plus complexes (figure 7). Cette évolution des modèles est passée par deux types d'ajustement afin d'éviter les confusions liées aux erreurs de surestimation (faux positifs) ou de sous-estimation (faux négatifs) des effets des allèles (figure 7). Le premier type d'ajustement est présent dans les modèles prenant en considération la structuration génétique (Q) et les relations de parentés (K) de façon combinée (Yu & Buckler 2006), sous le format de modèles mixtes "MLM" (Mixed Linear Model). De nombreux algorithmes ont été développés selon cet ajustement, incluant EMMA (Efficient Mixed-Model Association; Kang et al. 2008), P3D (Population Parameters Previously Determined; Zhang et al. 2010), GEMMA (Genome-Wide Efficient Mixed-Model Association; (Zhou & Stephens 2012; Zhou & Stephens 2014). Ces algorithmes, effectuent les tests de marqueur génétique un par un, selon une analyse dite « single locus ». Dans ce cas, l'effet de chaque SNP est indépendant de l'effet des autres SNP et seules la matrices d'apparentement pré-définies et la structuration génétique sont considérées comme cofacteurs. Cependant, malgré leur succès, les modèles mixtes single locus, peuvent tout de même générer la détection de faux positifs et masquer des faux négatifs (Figure 7B).

Un deuxième type d'ajustement a été développé pour réduire ces confusions. Le principe de cet ajustement consiste soit à affiner la façon dont l'information sur l'apparentement est dérivée de tous les marqueurs, soit en incluant ou en excluant sélectivement les marqueurs pseudo-significatifs en fonction de leur relation avec les autres marqueurs. L'avantage est que l'information dérive de tous les marqueurs simultanément au cours de l'analyse. Plusieurs algorithmes prenant en considération ce deuxième type d'ajustement ont été ainsi développés, notamment le MLM (Multi-Locus Mixed-Model, Segura et al. 2012) et le FarmCPU (Fixed and random model Circulating Probability Unification, Liu et al. 2016) (Figure 8). Le "MLM" incorpore plusieurs marqueurs simultanément en tant que co-variables dans un modèle linéaire mixte grâce à une procédure de régression par étapes. Pour ce modèle multi-locus "MLM", la contribution de l'hétérogénéité génétique est prise en compte en incluant des variants en compétition comme des cofacteurs (Segura et al. 2012). Si le SNP le plus significatif est le seul marqueur causal, l'inclure comme cofacteur devrait expliquer toute la variance phénotypique apportée par cette région génomique.



**Figure 9.** Localisation des QTLs identifiés pour le nombre de cellules (CN) dans l'épiderme de l'hypocotyle de la graine sèche et pour la longueur maximale de ces cellules (MaxCL) à 10 °C dans une population RIL issue du croisement entre Jemalong A17 and F83005-5. Colocalisations avec les QTLs pour la longueur maximale de l'hypocotyle (MaxHL) à 10 °C identifiés dans le même contexte génétique par Dias et al. (2011). Les QTLs sont positionnés le long de 5 groupes de liaison (LG1 ; LG2 ; LG5 ; LG7 ; LG8). Les noms des marqueurs et les QTLs sont indiqués à droite du LG et leurs positions à gauche. Les barres verticales représentent les intervalles de confiance et les traits horizontaux internes indiquent les positions des pics (Youssef et al. 2016).

Le modèle FarmCPU divise le MLMM en deux parties, le modèle à effet fixe (FEM) et le modèle à effet aléatoire (REM), et les utilise de manière itérative (Liu et al. 2016). Le FEM contient des marqueurs de test considérés un par un et plusieurs marqueurs associés comme co-variables pour contrôler les faux positifs. Pour éviter un problème de sur-ajustement dans le ‘FEM’, les marqueurs associés sont ré-estimés par le ‘REM’ à travers une redéfinition de l’information sur l’apparentement à chaque étape, ce qui permet de contrôler les faux positifs (Liu et al. 2016).

En définitive, ces analyses GWAS avec les différents modèles améliorés sont idéalement utilisées en complément de la détection de QTLs par cartographie de liaison, car lorsqu’elles sont menées ensemble, elles atténuent les limites des autres (Brachi et al. 2010).

#### ***IV-2 Déterminisme génétique de la croissance hétérotrophe chez *M. truncatula****

La cause de la variation dans la vigueur des graines n’est pas totalement comprise et tout particulièrement ses bases génétiques (Finch-Savage & Bassel, 2016). Toutefois, des études génétiques sur la vigueur des graines ont été réalisées, notamment chez la tomate (Foolad et al. 2007), la laitue (Hayashi et al. 2008), ou encore le riz (Wang et al. 2010). Chez *M. truncatula*, des travaux menés précédemment au sein de l’équipe d’accueil de cette thèse ont révélé l’existence d’une variabilité génétique de l’allongement de l’hypocotyle au cours de la croissance hétérotrophe en conditions optimales de croissance (20 °C), mais aussi en réponse à des stress abiotiques (10 °C et sous déficit hydrique à -0,50 MPa) entre 8 cultivars et accessions naturelles (Brunel et al. 2009; Youssef et al. 2016). Des QTLs contrôlant l’allongement de cet organe à basse température et sous déficit hydrique ont été identifiés (Dias et al. 2011; Vandecasteele et al. 2011).

Par la suite, Youssef et al. (2016) ont montré que le nombre de cellules de l’épiderme est le principal déterminant de la variation de longueur de l’hypocotyle en conditions optimales de croissance, et deux QTL contrôlant ce caractère ont été identifiés sur les chromosomes 2 et 7 (Figure 9). Cependant, l’élongation cellulaire devient le principal déterminant des différences génotypiques au froid. Trois QTLs contrôlant la longueur maximale des cellules atteinte à basse température (chromosome 1, 5 et 8) dans une population RIL de 101 lignées provenant de croisements entre les accessions Jemalong A17 et F830005-5 ont été identifiés (Youssef et al. 2016; Figure 9). De plus, Pierre (2012) a établi une liste de gènes exprimés lors de l’élongation de l’hypocotyle à basse température en combinant une approche transcriptomique et une analyse cellulaire sur des accessions



contrastées. Jusqu'à présent, la croissance des plantules en réponse aux variations de concentrations exogènes de nitrate a été réalisée en autotrophie (Vandecasteele et al. 2011; Morère-Le Paven et al. 2011). Enfin, plusieurs études de GWAS réalisées chez *M. truncatula* ont pu mettre en avant des associations significatives, allant jusqu'à des gènes candidats d'intérêt pour des caractères de qualité nutritionnelle des semences (Le Signor et al. 2017), de résistance aux maladies (Bonhomme et al. 2014), de tolérance à la sécheresse (Kang et al. 2015) et de dormance de la graine (Renzi et al. 2019). Néanmoins aucune étude de GWAS n'a été réalisée sur la croissance hétérotrophe en réponse à la limitation du nitrate et au froid.

## ***V. Objectifs et démarches***

Ce projet de thèse s'intègre dans la dynamique de recherche de l'équipe SMS (Seedling, Metabolism & Stress) de l'UMR IRHS à Angers. Un des objectifs de l'équipe est d'élucider les déterminants génétiques, physiologiques et moléculaires liés à la croissance post-germinative des plantules de la famille des Fabacées, en réponse aux contraintes environnementales. Afin de répondre à ces objectifs, les thématiques de recherche de l'équipe s'organisent notamment autour de deux axes: 1) Les déterminants de la vigueur des plantules et 2) la perception et la signalisation du nitrate. Le présent travail s'inscrit dans ces deux axes de recherche dans le cadre d'un projet intitulé « MEDISENS » (thèse environnée AAP RFI OV 2016). Ainsi, dans cette thèse nous avons, par une approche combinant physiologie et génétique étudié les caractéristiques de la performance des plantules d'une légumineuse pendant la croissance hétérotrophe en fonction de l'apport en nitrate et de la température.

Ainsi, l'objectif de cette thèse a été, par une approche combinant physiologie et génétique, d'étudier les caractéristiques de la performance des plantules d'une légumineuse pendant la croissance hétérotrophe en fonction de l'apport en nitrate et de la température. Pour réaliser cet objectif des cores collections représentatives de la diversité naturelle de *M. truncatula* ont été utilisées pour explorer un panel de caractères, évaluant l'allongement des organes naissant des plantules et la mobilisation de la biomasse de la graine pour deux conditions d'approvisionnement en nitrate contrastées en combinaison avec le stress froid. Ceci a été fait dans l'objectif d'identifier des groupes de comportements phénotypiques et grâce à l'analyse GWAS et au data mining identifier les QTLs et les gènes associées aux caractères étudiés. On a exploité également la diversité des lieux d'origine des accessions de la core collection pour évaluer l'impact des conditions géo-climatiques sur la réponse des plantules en croissance hétérotrophe à la disponibilité en nitrate et au froid.



**Chapitre I : Exploration De La Diversité Naturelle De *M. Truncatula* Pour La Réponse De La Performance Des Plantules A L'absence De Nitrate Sous Température De Contrôle**

---



Comme il a été introduit précédemment, la présente étude vient en continuité de nombreux travaux réalisés sur la croissance de la partie aérienne des plantules de *M. truncatula* en hétérotrophie en lien avec la température de culture sur un nombre limité d'accessions (Brunel et al. 2009; Pierre et al. 2014; Youssef et al. 2016). Ce chapitre aborde l'exploration d'une large diversité naturelle de cette espèce afin de caractériser la performance de la plantule en hétérotrophie en interaction avec les variations d'apport en nitrate à une température contrôle/de référence (17 °C, Brunel et al. 2009; Youssef 2015). Dans ce cadre, nous avons caractérisé la performance des plantules d'une core collection de 192 accessions en présence et en absence de nitrate dans le milieu à cette température. La performance des plantules a été analysée par l'estimation du potentiel d'élongation des organes de la plantule, d'une part, et de la mobilisation de la biomasse depuis la graine vers les organes en croissance, d'autre part. Dans un second temps, nous avons recherché l'existence de typologies de comportements génotypiques en réponse à la variation des conditions de nutrition azotée au sein de la variabilité naturelle. Nous avons donc calculé des index de plasticité de réponse des plantules à l'absence de nitrate et identifié des groupes d'accessions qui diffèrent en termes d'allongement des organes des plantules et de partitionnement de la biomasse des graines en réponse à l'absence de nitrate à l'aide de ces index. Enfin, nous avons cherché à mieux comprendre le déterminisme génétique de la performance des plantules et de leur réponse aux différentes conditions de nutrition azotée. Dans ce but nous avons utilisé l'approche de la génétique d'association (GWAS) pour identifier les QTLs et les gènes qui gouvernent la performance de la plantule en réponse à la variation de nutrition azotée en hétérotrophie. Cette partie de l'étude est présentée sous forme d'un article publié dans la revue *Physiologia Plantarum*. Ensuite, des données complémentaires à la publication sont présentées. Elles concernent la phylogénie de certains gènes candidats identifiés par GWAS, d'une part, et l'exploration d'autres méthodes pour détecter des loci significativement associés à la performance des plantules aux conditions d'apport en nitrate contrastées (*i.e.* avec et sans nitrate) d'autre part.



## **I- Exploring natural diversity of *Medicago truncatula* reveals physiotypes and loci associated with the response of seedling performance to nitrate supply**

**Douae Ben Hdech<sup>1</sup>, Catherine Aubry<sup>1</sup>, Bénédicte Alibert<sup>1</sup>, Daniel Beucher<sup>1</sup>, Jean-Marie Prosper<sup>2</sup>, Anis M. Limami<sup>1</sup> and Béatrice Teulat<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>IRHS-UMR1345, Université d'Angers, INRAE, Institut Agro, SFR 4207 QuaSaV, 42, rue Georges Morel, 49071, Beaucouzé, France

<sup>2</sup>AGAP, Université de Montpellier, CIRAD, INRAE, Institut Agro, France

### **Correspondence**

\*Corresponding author,

e-mail: [beatrice.teulat@agrocampus-ouest.fr](mailto:beatrice.teulat@agrocampus-ouest.fr)

Seedling pre-emergence is a critical phase of development for successful crop establishment because of its susceptibility to environmental conditions. In a context of reduced use of inorganic fertilizers, the genetic bases of the response of seedlings to nitrate supply received little attention. This issue is important even in legumes where nitrate absorption starts early after germination, before nodule development. Natural variation of traits characterizing seedling growth in the absence or presence of nitrate was investigated in a core collection of 192 accessions of *Medicago truncatula*. Plasticity indexes to the absence of nitrate were calculated. The genetic determinism of the traits was dissected by genome-wide association study (GWAS). The absence of nitrate affected seed biomass mobilization and root/shoot length ratio. However, the large range of genetic variability revealed different seedling performances within natural diversity. A principal component analysis (PCA) carried out with plasticity indexes highlighted four physiotypes of accessions differing in relationships between seedling elongation and seed biomass partitioning traits in response to the absence of nitrate. Finally, GWAS revealed 45 associations with single or combined traits corresponding to coordinates of accessions on PCA, as well as two clusters of genes encoding sugar transporters and glutathione transferases surrounding loci associated with seedling elongation traits.



*Abbreviations* — CC, core collection; CRDW, cotyledon residual dry weight; GST, Glutathione S-transferase; GWAS, Genome-Wide Association Studies; HADW, dry weight allocated to hypocotyl; HL, hypocotyl length; LD, linkage disequilibrium; LDW, lost dry weight; MLMM, Multi-Locus Mixed Model; NC, Nitrate Condition; N<sup>+</sup>, presence of nitrate; N<sup>-</sup>, absence of nitrate; PC, Principal Component; PCA, Principal Component Analysis; QTL, Quantitative Trait Loci; QTN, Quantitative Trait Nucleotide; RL, radicle length; RADW, dry weight allocated to radicle; RHL, ratio between radicle and hypocotyl lengths; RIL, Recombinant Inbred Line; SDW, seed dry weight; SNP, Single Nucleotide Polymorphism.

## ***I-1-Introduction***

Crop yield depends on successful plant establishment in the field that relies on the capacity of a seed lot to rapidly establish homogenous and vigorous seedlings irrespective the environmental conditions (Finch-Savage & Bassel 2016). In a context of global climate change and sustainable agriculture development, it is urgent to develop crop varieties adapted to new agricultural practices and new environmental conditions to ensure seedling establishment. Although Nitrogen (N) is determinant for plant growth and productivity, the limitation of inorganic fertilizers use is necessary (Eickhout et al. 2007; Canfield et al. 2010). For this purpose, legumes are often incorporated into cropping systems due to their property to fix atmospheric N<sub>2</sub> (Lawrie & Wheeler 1974; Giller 2001; Spiertz 2010; Lithourgidis et al. 2011). However, legumes are weak competitors for N uptake in their early life cycle (*i.e.* before nodules are fully developed) compared to non-legumes (Pate 1958; Lawrie & Wheeler 1974; Voisin et al. 2010; Dayoub et al. 2017).

One alternative to deal with this issue is the development of varieties of legumes adapted to low N availability during seedling establishment. Most studies conducted at early stages concerned autotrophic seedlings (Zhang & Forde 2000; Morère-Le Paven et al. 2011; Pellizzaro et al. 2014; O'Brien et al. 2016). Seedling pre-emergence growth, *i.e.* heterotrophic growth, is dramatically susceptible to environmental cues. During this period, seedling growth response to environmental changes is seed-reserve-dependent, and the establishment of seedling autotrophy depends on the efficiency of use of both endogenous and exogenous nutrients (Krigel 1967; Deleens et al. 1984; Finch-Savage et al. 2001; Maillard et al. 2004). Gaining knowledge on genetic variation and



architecture of traits associated with seedling performance such as traits optimizing N acquisition (Kiba & Krapp 2016), seed biomass allocation to the seedling organs, or nitrogen use efficiency during this phase is a first step necessary for the identification and incorporation of new traits and alleles in breeding programs. Only few works, on small number of genotypes, studied allocation of seed biomass between seedling organs during heterotrophic growth (Dürr & Mary 1998; Brunel et al. 2009; Brunel-Muguet et al. 2015). Phenotypic plasticity can also provide relevant adaptive traits in response to climatic variability or management actions (Wu et al. 2011; Yu et al. 2014; Casadebaig et al. 2015; Mašková & Herben 2018; Scheepens et al. 2018). Germplasm screening is a way to identify adaptive traits, as well as new alleles and key genes involved in physiological processes underlying complex traits through genome-wide association studies (GWAS). Natural diversity is of particular interest as a potential source of different selected adaptive traits resulting from adaptive plasticity (Via & Conner 1995) or local adaptation due to genotype by environment interactions ( $G \times E$ ). The diversity of adaptive phenotypes resulting from a variety of originated habitats should be a source of new phenotypes and associated functional traits, as well as causal genes responsible for natural variation resulting from historical recombination that can be identified (Morrison & Linder 2014; Sharma et al. 2018). In this context, model plants such as *Arabidopsis thaliana* and *Medicago truncatula* are interesting to investigate because of their wide range of genetic and trait variation among accessions derived from ecotypes (Chardon et al. 2010; De Pessemier et al. 2013; Yoder et al. 2014; Gentzbittel et al. 2015).

Most QTL (quantitative trait locus) studies on seedling heterotrophic performance were based on traditional linkage mapping using bi-parental populations either in crop species (Bettey et al. 2000; Lee et al. 2001; Limami et al. 2002; Finch-Savage et al. 2010; Rebetzke et al. 2014), or in our previous studies in *M. truncatula* (Dias et al. 2011; Vandecasteele et al. 2011; Youssef et al. 2016). Few were based on GWAS analyses (Li et al. 2016; in wheat). Despite the potential of plant natural diversity, it is an underused resource for physiological and genetic (QTL) studies regarding seedling establishment.

The present work aimed at improving knowledge on the natural variation and the genetic control of the response of seedling heterotrophic growth to contrasting nitrate supply conditions (*i.e.* with and without nitrate). To address this objective, we investigated a core collection of 192 accessions of the legume *M. truncatula*. We identified seedling phenotypes displaying different relationships between elongation and biomass traits in response to the absence of nitrate within the collection as well as loci and potential causal candidate genes associated with the trait variation.



## ***I-2-Materials and Methods***

### ***I-2-1-Plant material***

A core-collection of 192 accessions (CC192) representing *M. truncatula* natural diversity around the Mediterranean basin (Loridon et al. 2013; Bonhomme et al. 2014) was used to explore and characterize the seedling plasticity to nitrate supply conditions during pre-emergence growth. The CC192 is constituted of several nested core-collections based on different sampling stratification methods using marker information, geographical origin and flowering date (Ronfort et al. 2006). The seeds of each accession were collected from plants grown the same year (2014) under controlled conditions in insect-proof greenhouse at the *Medicago truncatula* Biological Resources Centre (Montpellier France, <http://www1.montpellier.inra.fr/BRC-MTR/>). *M. truncatula* is a self-pollinating species and native genotypic characteristics of these accessions were fixed after several successive generations of self-fertilization to obtain homozygous lines and to avoid sampling problems from one generation to another. Isolated plants of each accession were grown in pots filled with a mixture of soil and sand, and naturally nodulated. No nitrogen was applied during plant growth and seed production. For GWAS, the 175 accessions included in the *M. truncatula* HapMap international consortium project with genomes sequenced ([www.medicagohapmap.org](http://www.medicagohapmap.org), Stanton-Geddes et al. (2013) were used.

### ***I-2-2-Phenotypic variation of seedling growth parameters***

#### ***I-2-2-1-Experimental design***

Seedling growth parameters were determined at the end of heterotrophic growth in the presence (N+, 5 mM) and absence (N-) of nitrate at 17°C, previously determined as a control temperature for comparing genotypes during early seedling growth of *M. truncatula* (Brunel et al. 2009; Youssef et al. 2016). The seedling growth protocol and nitrate concentration were chosen based



on previous results (Vandecasteele et al. 2011; Pellizzaro et al. 2014). Briefly, all experiments were carried out in dark conditions or under green lights to mimic dark during manipulations. To avoid any influence of seed dormancy (Smýkal et al. 2015) and seed germination on seedling growth parameters, they were determined from homogenous seedlings starting from a comparable developmental time point as reported by Vandecasteele et al. (2011). For this purpose, 50 seeds per accession per biological replicate were homogeneously scarified with sandpaper. Seeds were then stratified to homogenize germination by imbibition in water for 3 h at 17°C, then 4 days at 4°C, followed by 24 h at 17°C, in the dark. Finally, ten seedlings with  $10 \pm 2$  mm length were selected and transferred into plastic plates (12×12×1.3 cm) with filter paper containing N-free modified MS medium (Murashige & Skoog 1962), either supplemented with 5 mM nitrate provided as KNO<sub>3</sub> (N+), or not (N-). For the N- condition, 5 mM KCl was added to avoid osmotic difference with the N+ condition (Pellizzaro et al. 2014). The plates were wrapped with Parafilm<sup>®</sup>, inclined at 85 degrees to respect normal upward gravitropism of dark-grown seedlings and placed at 17°C. Plates were organized in a randomized complete block design with two blocks containing all accessions and both nitrate conditions (NC). With this design, the two blocks corresponded to two complete independent replicates, each containing 384 plates (one plate with 10 seedlings per accession and per NC).

### ***I-2-2-2-Estimation of seedling growth parameters and of the response to nitrate supply***

The seed dry weight (SDW), representing initial seed biomass available for seedling, was determined before starting growth experiments for three batches of five seeds per accession by oven-drying samples at 70°C for 3 days. Growth in dark conditions ends when the length of the seedling organs reached a plateau value depending on genetic background and environmental conditions. These maximal values allow comparing the potential of elongation of embryonic shoot and root parts of each accession in each environment. Based on previous experiments (Brunel et al. 2009; Youssef et al. 2016), maximal length of hypocotyl (HL) and radicle (RL) as well as the ratio of lengths between root and shoot parts (RHL) were measured 220 h after seedling transfer for both NC. Cotyledons, hypocotyls and radicles from each plate (*i.e.* 10 seedlings) were then gathered to determine dry weights of the different parts of the seedlings. They allowed estimating how SDW was used during heterotrophic growth. The proportions of the SDW remaining in cotyledons (*i.e.* not mobilized) corresponding to the cotyledon residual dry weight (Eqn 1: CRDW), allocated to hypocotyl and



radicle (Eqn 2: HADW, RADW, respectively), and lost by respiration (Eqn 3: LDW) were thus calculated. To better characterize the individual behaviour of accessions to nitrate supply, an index of response to the absence of nitrate called ‘plasticity index’ was additionally calculated for organ length and for biomass use traits (Eqn 4: pTrait), as following:

$$\text{Eqn 1: } CRDW = \frac{CDW}{SDW} \times 100$$

$$\text{Eqn 2: } HADW \text{ (or } RADW) = \frac{HDW \text{ (or } RDW)}{SDW} \times 100$$

$$\text{Eqn 3: } LDW = 100 - [CRDW + HADW + RADW + ScDW]$$

$$\text{Eqn 4: } pTrait = \frac{(Trait N-) - (Trait N+)}{Trait N+} \times 100$$

with SDW, seed initial dry weight, HDW, RDW, CDW and ScDW, hypocotyl, radicle, cotyledons and seed-coat dry weight at the end of heterotrophic growth, respectively. Traits N- and N+ correspond to the trait values determined in the absence and presence of nitrate, respectively.

### ***I-2-3-Statistical analyses***

All statistical analyses were carried out using SAS (V9.4) or R-Studio (R-Studio Team, 2015) softwares. Several analyses of variance (ANOVAs) were performed from GLM using R-Studio packages (car, stats) and a statistical significance threshold of 1 % to evaluate Genotype (G), biological Replicate (R), Nitrate Condition (NC) and  $G \times NC$  interaction effects.

A first model was used for each NC and for pTraits to determine if there were differences between replicates (Eqn 5):

$$\text{Eqn 5: } Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + E_{ijk}$$

where  $Y_{ijk}$  corresponds to the  $k^{\text{th}}$  trait value of the  $i^{\text{th}}$  genotype of the  $j^{\text{th}}$  replicate,  $\mu$  is the overall population mean,  $\alpha_i$  is the fixed effect of the  $i^{\text{th}}$  genotype (G effect),  $\beta_j$  is the fixed effect of the  $j^{\text{th}}$  replicate (R effect) and  $E_{ijk}$  is the random experimental error. As a significant replicate effect was observed for some traits, we generated adjusted means for each NC, and for each pTrait (Table I-1), by a regression on the replicate effect using the least square method (lsmeans command of SAS GLM



procedure). These values were used for correlation analysis, principal component analysis (PCA) and genome-wide association study (GWAS).

A second ANOVA was conducted to determine G, NC and G × NC effects considered as fixed with the following model (Eqn 6):

$$\text{Eqn 6: } Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + E_{ijk}$$

where  $Y_{ijk}$  corresponds to the  $k^{\text{th}}$  trait value of the  $i^{\text{th}}$  genotype in the  $j^{\text{th}}$  NC,  $\mu$  is the overall population mean,  $\alpha_i$  is the effect of the  $i^{\text{th}}$  genotype (G effect),  $\beta_j$  is the effect of the  $j^{\text{th}}$  NC (NC effect),  $\alpha\beta_{ij}$  is the effect of interaction between the  $i^{\text{th}}$  genotype and the  $j^{\text{th}}$  NC (G x NC effect) and  $E_{ijk}$  is the random experimental error.

To estimate the part of the total phenotypic variation due to genotypic variation, broad-sense heritabilities ( $H^2$ ) were calculated for all traits as following (Eqn 7):

$$\text{Eqn 7: } H^2 = \frac{\sigma_g^2}{\sigma_g^2 + \frac{\sigma_e^2}{k}}$$

where  $\sigma_g^2$  represents the genotypic variance,  $\sigma_e^2$  represents the residual variance and  $k$  the number of replicates. Variance components were estimated using the VARCOMP procedure of SAS, from the previous model, Eq5.

Finally, phenotypic correlations between traits were investigated with Pearson correlation coefficients ( $r$ ) declared significant when  $P < 0.01$ . However, given the large number of observations ( $df > 150$ ), only moderate to strong significant correlations were considered ( $r \leq -0.40$  and  $r \geq 0.40$ ).

#### ***I-2-4-Identification of groups of accessions showing different physiological behaviours in response to the absence of nitrate***

To combine the results obtained from the different seedling plasticity indexes (pTraits) and to reveal groups of accessions with different physiological patterns in response to the absence of nitrate, a PCA was conducted with pTraits. PCA analysis and classification of accessions into groups



of behaviours were carried out using `dudi.pca` (R package: `ade4`) and a K-Means clustering method (`kmeans` R), respectively, using 175 accessions. We used the inertia evolution within groups (Calinski Harabasz index from `kmeans` function) to confirm the number of groups. The corresponding groups were then highlighted on the PCA plots.

### ***I-2-5-Genome wide association analyses and identification of candidate genes***

GWAS was carried out to identify loci associated with seedling performance in response to nitrate supply, considering both single traits estimated in N+ and N- conditions, single plasticity indexes (pTraits) as well as pseudo-pTrait combinations corresponding to PCA coordinates of the accessions. We used single nucleotide polymorphism (SNP) data from the Mt4.0v1 of Illumina sequencing from *M. truncatula* HapMap international consortium project ([www.medicagohapmap.org/downloads/mt40](http://www.medicagohapmap.org/downloads/mt40), Stanton-Geddes et al. 2013) comprising 36 526 611 SNPs referring to A17 line genome (HM101, Young et al. 2011). A filtered SNP dataset of 6 013 644 SNPs was obtained for the 175 accessions used for GWAS using a minimum count of 100 non-missing data and a minimum allele frequency of 3 %, as mentioned by Le Signor et al. (2017). GWAS analyses were performed using the Multi-Locus Mixed Model (MLMM) of Segura et al. (2012) considering the population structure (Q) and relatedness (K) information as covariates. The Q structure matrix was provided by J. Ronfort from UMR AGAP (Montpellier, France) and corresponded to the two major genetic groups in the core collection, the ‘Far West group’ mostly localized in the extreme west of the Mediterranean basin, and the ‘Circum group’ containing accessions distributed throughout the

Mediterranean basin (Loridon et al. 2013; Bonhomme et al. 2014, Annexe I-1- Table S1). The GEMMA software v.0.94 using the package “emma” (Zhou & Stephens 2014) was used to estimate the standardised K matrix between accessions. MLMM relies on a stepwise mixed-model regression, with forward inclusion, backward elimination and re-estimation of the variance components of the model at each step. The optimal model was selected according to the extended Bayesian information criterion selection (EBIC, Chen & Chen 2008). To account multi-testing, we used the Bonferroni correction method, firstly with a threshold of 5 %, to reveal significant associations. In that case, QTNs (Quantitative Trait Nucleotides) were defined when the threshold  $-\log_{10}(P\text{-value}) > 8.01$  and the part of variance they explained was obtained. However, as the



Bonferroni correction method is conservative (Rice et al. 2008), we also considered significant associations at  $-\log_{10}(P\text{-value}) > 6.50$  to highlight additional associations with smaller effects. All MLM analyses were done with R-Studio using the packages “mlmm\_cof.r.” and “emma.r.” (scripts at [www.cynin.gmi.oeaw.ac.at/home/resources/mlmm](http://www.cynin.gmi.oeaw.ac.at/home/resources/mlmm)). Finally, a graphical presentation of the associations found was done by projecting the significant associations on the physical map using MapChart software V2.1 ([www.medicagogenome.org](http://www.medicagogenome.org), Voorrips 2002).

We additionally searched for putative causal candidate genes for the traits. For this purpose, an average genome-wide linkage disequilibrium (LD) block size was determined for each chromosome.  $r^2$  values for all pairwise SNPs comparisons were defined using a sliding window size of 50 SNPs around each SNP. The LD decay with physical distance (kb) between SNPs was then evaluated by nonlinear regression and with a  $r^2$  value of 0.1 (Remington et al. 2001; Nordborg et al. 2002; Palaisa et al. 2004). This decay distance value was then used for mining candidate genes for all the traits. Because LD blocks in the *M. truncatula* genome can reach 50 kb (Bonhomme et al. 2014), we extended the chromosomal windows for mining causal genes to 100 kb for the traits associated with the response of organ elongation to the absence of nitrate, 50 kb on each side of significant SNPs. SNPs within the genes found were searched and LD ( $r^2$  and  $D'$  values) estimated between these SNPs and the significant associations. All LD analyses were realized with TASSEL 4.0 (Bradbury et al. 2007) and mining of candidate genes was carried out using the Mt4.0v2 annotation database ([www.medicagogenome.org](http://www.medicagogenome.org)), excluding transposable elements.

### ***I-3-Results***

#### ***I-3-1-Natural variation in seedling elongation and seed biomass use in response to nitrate supply***

Seedling elongation and seed biomass use related traits were investigated in the presence (N+) and absence (N-) of nitrate in a core collection of 192 accessions representing *M. truncatula* natural diversity. Regardless of nitrate conditions (NC), all traits displayed a large range of genetic variability with a genotype effect highly significant, indicating diverse seedling performance within the core collection (Table I-1A). All traits globally followed a continuous distribution (Table I-1A

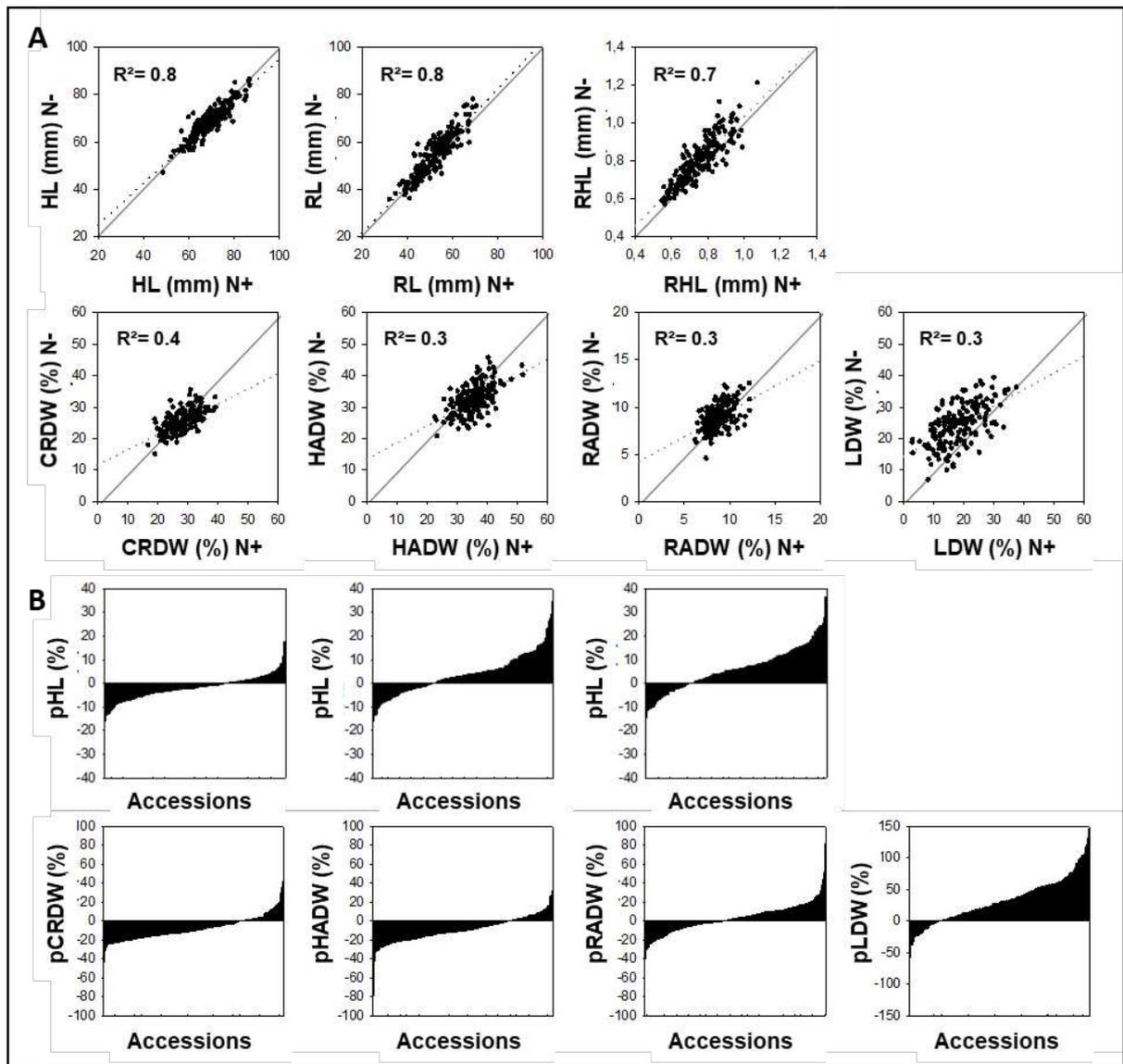
**Table I-1.** Phenotypic analysis for seedling elongation and seed biomass use related traits of the core collection of 192 natural accessions during heterotrophic growth,(A) under contrasted nitrate supply conditions (NC): absence (N<sup>-</sup>) and presence (N<sup>+</sup>, 5 mM), (B) for trait plasticity indexes to the absence of nitrate supply (pTraits). Mean trait values were obtained from 20 seedlings per accession. <sup>a</sup>Adjusted means obtained by regression on the replicate effect. <sup>b</sup>Range of variation within the collection: minimum (Min)/maximum (Max) means. <sup>c</sup>Skewness and Kurtosis coefficients. <sup>d</sup>Broad-sense heritabilities. <sup>e</sup>F-values for effects of genotype (G) and replicate (R), as well as for effects of genotype (G), nitrate condition (NC) and interaction between genotype and nitrate condition (G x NC), followed by the level of significance: \*\*\*,  $p < 0.001$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; ns, not significant. <sup>f</sup>pTraits were estimated as:  $[(\text{Trait N}^-) - (\text{Trait N}^+) / \text{Trait N}^+] \times 100$  where Trait N<sup>+</sup> and Trait N<sup>-</sup> correspond to the mean value for the N<sup>+</sup> or N<sup>-</sup> condition.

Trait	Abbreviations (unit)	NC	Mean <sup>a</sup>	Min / Max <sup>b</sup>	Sk/Kur <sup>c</sup>	H <sup>2d</sup>	F-Value <sup>e</sup>		F-Value <sup>e</sup>		
							G	R	G	NC	G x NC
<b>A</b>											
Seed dry weight	SDW (mg)		4.9	2.5/7.9	0.21/0.15	0.89	24.64***	0.65			
Hypocotyl length	HL (mm)	N+	69.5	49/87	0.17/-0.09	0.79	33.79***	177.83***	62***	110***	3***
		N-	68.2	47/86	0.06/0.03	0.76	28.6***	9.23***			
Radicle length	RL (mm)	N+	52.5	32/71	-0.02/-0.35	0.76	27.16***	12.55***	56***	149***	3***
		N-	54.4	36/78	0.06/-0.24	0.78	30.75***	17.75***			
Radicle:hypocotyl length's ratio	RHL	N+	0.76	0.6/1.1	0.29/-0.36	0.71	20.39***	139.5***	35***	268***	3***
		N-	0.8	0.6/1.2	0.42/0.03	0.70	17.2***	22.92***			
Cotyledon residual dry weight	CRDW (%)	N+	28.5	17/39	0.003/-0.59	0.64	6.24***	18.92***	10***	371***	3***
		N-	25.4	15/35	0.15/0.04	0.70	7.86***	95.29***			
Dry weight allocated to hypocotyl	HADW (%)	N+	35.7	23/52	0.07/0.69	0.77	10.59***	4.01	12***	296***	3***
		N-	32.2	21/46	-0.22/4.72	0.64	6.03***	3.01			
Dry weight allocated to radicle	RADW (%)	N+	8.9	6/12	0.45/0.01	0.75	10.09***	3.5	15***	ns	5***
		N-	9	5/12	0.52/1.89	0.76	10.31***	157.09***			
Lost dry weight	LDW (%)	N+	18.4	3/38	0.41/-0.08	0.64	5.85***	33.32***	9***	393***	2***
		N-	24.1	7/39	-0.07/-0.17	0.65	6.18***	14.53***			
<b>B</b>											
Trait plasticity indexes to the absence of nitrate supply <sup>f</sup>	pHL (%)		-1.9	-16/18	0.28/1.77	0.32	3.12***	22.11***			
	pRL (%)		3.7	-16/34	0.57/0.96	0.39	3.65***	0.01			
	pRHL (%)		6.2	-14/37	0.32/0.23	0.32	2.85***	8.11**			
	pCRDW (%)		-8.3	-43/41	0.93/1.83	0.39	2.88***	2.48			
	pHADW (%)		-9.4	-80/32	-0.4/3.56	0.61	5.53***	2.02			
	pRADW (%)		2.8	-40/81	0.73/3.63	0.64	6.14***	136.01***			
	pLDW (%)		32.1	-57/146	0.44/0.31	0.50	3.41***	6.75**			

and Annexe I-1-Fig. S1). Broad sense heritability values ( $H^2$ ) varied depending on the traits. The highest values were obtained for measured traits, SDW (0.89) followed by length traits (0.76 to 0.79), and slightly lower values were obtained for estimated SDW used traits (0.64 to 0.77). Except for RADW, all the traits presented significant differences between N+ and N- conditions, with the effect of genotype remaining highly significant (Table I-1A). Fig. I-1A allows a detailed visualization of the relationships between each trait values under N+ and N- conditions, *i.e.* the plasticity response of each accession between NC. A significant interaction between genotype and NC was highlighted indicating changes in the relative performance of accessions across NC (Table I-1A and Fig. I-1A). The plasticity indexes, estimating the response of the seedling traits to the absence of nitrate for each accession, also presented a large range of natural variation with the genotype effect highly significant, continuous distributions and  $H^2$  values varying from 0.32 (pHL, pRHL) to 0.64 (pRADW; Table I-1B and Annexe I-1-Fig. S1). These results indicated that plasticity of seedling traits is under genetic control. Some accessions increased and others decreased their trait values, whereas the absence of nitrate has no effect for some others, showing the general behaviour highlighted at the whole collection level hides all-possible accession behaviours (Table I-1A and Fig. I-1B).

Regarding seedling elongation traits, the average value of HL across the accessions was slightly lower in absence (68.2 mm) than in presence (69.5 mm) of nitrate but the range of variability was similar for both NC, varying between accessions from 49 to 87 mm under N+, and from 47 to 86 mm under N- (around 45 % of the maximum value). Radicle length was globally higher in absence (54.4 mm) than in presence (52.5 mm) of nitrate, varying from 32 to 71 mm under N+ and from 36 to 78 mm under N-. Consistently the ratio between radicle and hypocotyl lengths (RHL) showed that the root part of the seedlings was shorter compared to the shoot part (values < 1 in average). Because RL was further stimulated under N-, the RHL ratio also increased under N- (0.80) compared to N+ (0.76). The plasticity indexes also showed that HL decreased, and that RL and RHL increased for a large number of accessions (-1.9 %, +3.7 % and +6.2 % for pHL, pRL and pRHL in average across the collection, respectively), with a higher range of variation for pRL and pRHL compared to pHL (Fig. I-1B). These results underlined that HL was less plastic than RL to the absence of nitrate.

Regarding dry weight traits (Table I-1A), SDW was 4.9 mg in average and displayed a large genetic variability ranging from 2.5 to 7.9 mg (68 % expressed as a percentage of the maximum value), the seed coat biomass representing 10 % of the total SDW in average (not



**Fig. I-1.** Natural variation in seedling elongation and seed biomass use related traits in response to nitrate supply in *M. truncatula*. Traits are defined in Table I-1. (A) Relationships between mean trait values determined in the presence (N+) and absence (N-) of nitrate over 186 accessions. Solid and dashed lines represent the bisector and the regression lines, respectively. The coefficient of determination ( $R^2$ ) is indicated. (B) Range of variability observed for the plasticity indexes expressing the response of accessions to the absence of nitrate. For elongation traits,  $n = 15$  to 20 organs, for dry weight traits  $n = 2 \times 7$  to 10 organs grouped.

shown). The proportion of SDW not used during seedling growth, expressed by CRDW was relatively high, 27 % in average. About 43 % of the SDW was allocated to growing organs, the highest proportion going to hypocotyl (HADW around 34 %), and the lowest to radicle (RADW around 9 %). Finally, a high proportion of the SDW was lost by respiration during growth (LDW around 21 %). Comparing the two NC revealed lower CRDW in absence (25.4 %) than in presence (28.5 %) of nitrate, *i.e.* more SDW was mobilized in the absence of nitrate. However, the latter did not benefit to the growing organs (RADW maintained, HADW lower without nitrate, 32 %, than with nitrate, 36 %) and was concomitant with a higher LDW (about 24 % without vs. 18 % with nitrate), probably due to increased respiration. R<sup>2</sup> values between the N<sup>+</sup> and N<sup>-</sup> conditions for SDW use traits were lower (R<sup>2</sup> = 0.3-0.4) compared to that obtained for organ elongation traits (R<sup>2</sup> = 0.7-0.8) indicating higher interaction between genotype and NC for these traits (Fig. I-1A). Finally, the plasticity indexes (Table I-1 and Fig. I-1B) revealed a higher proportion of accessions decreasing CRDW (pCRDW, -8.3 % in average) and HADW (pHADW, -9.4 %), and increasing LDW (pLDW, +32 %) and RADW (pRADW, +2.8 %). Plasticity indexes also showed that SDW use traits presented higher plastic response to nitrate conditions compared to organ elongation traits, with LDW the most plastic trait, followed by HADW and RADW, and then CRDW.

### ***I-3-2-Phenotypic correlations between seedling traits under N<sup>+</sup> and N<sup>-</sup> conditions***

A correlation analysis was performed to identify putative physiological links between organ elongation and SDW use traits within the collection of natural accessions as a function of NC (Table I-2 and Annexe I-1-Fig. S1). A moderate positive correlation was found between hypocotyl and radicle lengths ( $r = 0.41^{***}$  under N<sup>+</sup> and  $r = 0.46^{***}$  under N<sup>-</sup>), and a strongest correlation was revealed between the ratio RHL and radicle length ( $r = 0.73^{***}$  under N<sup>+</sup> and  $r = 0.77^{***}$  under N<sup>-</sup>). Seed dry weight was also positively correlated with both organ lengths, the correlation being higher with RL ( $r = 0.65^{***}$  for both NC) compared to HL ( $r = 0.49^{***}$  under N<sup>+</sup>, and  $r = 0.48^{***}$  under N<sup>-</sup>). This result suggested that, irrespective the NC, seeds with higher dry weight gave globally rise to organs with higher elongation potential within the collection. Whatever the NC, negative correlations were also highlighted between CRDW and

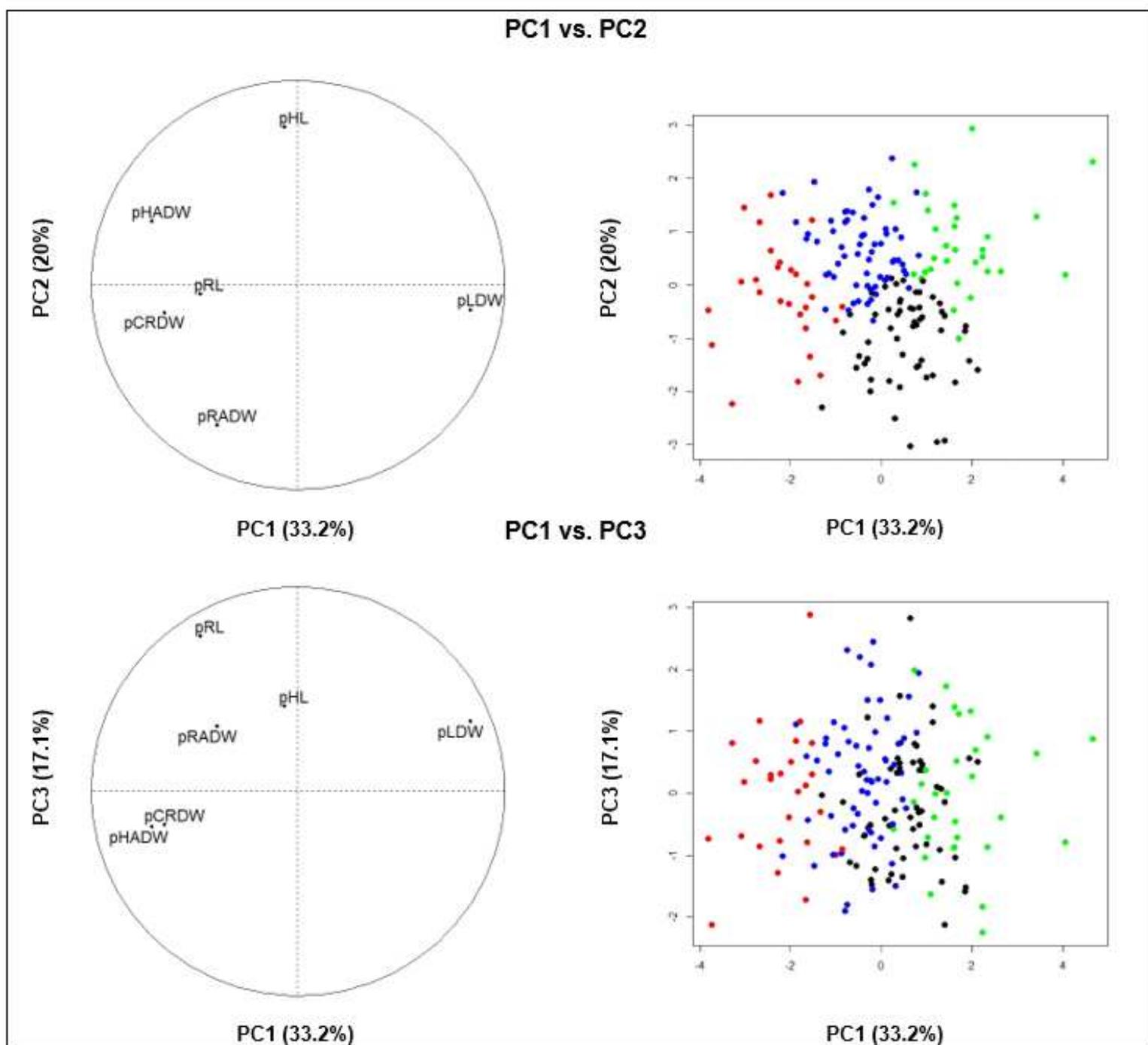
**Table I-2.** Phenotypic correlations between seedling elongation and seed biomass use related traits in the presence (N+, upper side matrix) and absence (N-, lower side matrix) of nitrate. Only moderate to strong significant correlations with  $p < 0.001$  (\*\*\*) and  $r \leq -0.4$  and  $r \geq 0.40$  are indicated.  $n = 185$  accessions. HL, hypocotyl length; RL, radicle length; RHL, ratio between radicle and hypocotyl lengths; HADW, dry weight allocated to hypocotyl; RADW, dry weight allocated to radicle; CRDW, cotyledon residual dry weight; LDW, lost dry weight; SDW, seed dry weight.

Trait	HL	RL	RHL	HADW	RADW	CRDW	LDW	SDW
<b>HL</b>	1	0.41***			-0.4***			0.49***
<b>RL</b>	0.46***	1	0.73***					0.65***
<b>RHL</b>		0.77***	1					
<b>HADW</b>				1			-0.77***	
<b>RADW</b>					1			
<b>CRDW</b>						1	-0.72***	
<b>LDW</b>				-0.83***		-0.51***	1	
<b>SDW</b>	0.48***	0.65***						1

LDW, and HADW and LDW (Table I-2 and Annexe I-1-Fig. S1). These results indicated that more the seed biomass was mobilized during heterotrophic growth, more it was consumed by respiration, and that the loss of biomass mainly affected the biomass allocated to hypocotyl. The two latter negative relationships were also found with pTraits (Annexe I-1-Fig. S1). Finally, the negative correlation between HL and RADW seemed specific to the N<sup>+</sup> condition ( $r = -0.40^{***}$ ).

### ***I-3-3-Seedling indexes of plasticity to the absence of nitrate discriminate four physiotypes of accessions***

A principal component analysis (PCA) was carried out with the plasticity indexes (pTraits) to obtain a global view of the correlations between these traits and analyse how they structured the natural diversity. The first three principal components (PCs) explained around 70 % of the total phenotypic variation (Fig. I-2). PC1 accounted for 33 % of the variation with positive contribution of pLDW, and to a lesser extent negative contribution of pHADW and pCRDW (Figs I-2 and Annexe I-1-Fig. S2A). It, thus, allowed a distinction to be made between accessions based on SDW use traits, *i.e.* accessions displaying higher SDW mobilization concomitantly with higher loss of biomass and lower RADW in response to the absence of nitrate, from accessions with the opposite behaviour. PC2 and PC3 explained 20 % and 17 % of the global variation, respectively. PC2 showed high positive contribution of pHL (50 %), and negative contribution of pRADW (39 %). Finally, PC3 showed positive contribution of pRL, and to a lesser extent of pHL (56 and 17 %, respectively), and thus separated accessions on seedling elongation traits (Figs I-2 and Annexe I-1-Fig. S2A). According to the Calinski-Harabasz criterion values (k-mean classification), we classified accessions into four groups characterized by different physiological behaviours in response to the absence of nitrate, *i.e.* physiotypes (Annexe I-1-Fig. S2B). They can be visualized on Fig. I-2 (Physiotype1: red, Physiotype2: green, Physiotype3: blue, Physiotype4: black). Their average traits values are summarized in Table I-3. Physiotype1 (red) was characterized by a significant increase of RL, CRDW and RADW (10.4 % in average) and a significant decrease in LDW (-8.9 %). Physiotype2 (green) exhibited the lowest SDW, HL and RL values. It was highly affected in SDW used traits, *i.e.* high increase in LDW (+75.1 %), and decrease in CRDW (-13 %), HADW (-19.3 %) and RADW (-14.7 %), but not affected in organ elongation. Physiotype3 (blue) displayed higher LDW (+21.6 %) and RL (+6.5 %), and lower CRDW (-10.8 %) and HADW



**Fig. I-2.** Scattergram of principal components 1 (PC1) and 2 (PC2), and 1 (PC1) and 3 (PC3) with projections of the seedling plasticity indexes to the absence of nitrate (left) and the 175 accessions representing *M. truncatula* natural diversity (right) The projected traits pHL, pRL, pCRDW, pHADW, pRADW and pLDW correspond to the response of hypocotyl length, radicle length, cotyledon residual dry weight, dry weight allocated to hypocotyl, dry weight allocated to radicle, and lost dry weight to the absence of nitrate, respectively. The three first PCs explain around 70 % of the total inertia. Coloured points correspond to the accessions clustered in four distinct groups for the variables investigated (Group1: red, Group2: green, Group3: blue, Group4: black).

(-3.2 %) in the absence of nitrate. Finally, Physiotype4 (black) also presented lower CRDW (-11.4 %) and higher LDW (+42 %). However, RL was not affected and RADW increased (+11 %), while hypocotyl was affected in both elongation (HL, -5.6 %) and dry weight allocation (HADW, -16.6 %).

### ***I-3-4-GWAS allows the identification of loci associated with seedling performance in response to nitrate supply***

GWAS was conducted to identify loci associated with seedling performance in response to the nitrate supply. Manhattan plots for all the traits are presented in Annexe I-1-Fig. S3. Table I-4 reports the 45 significant associations revealed and their characteristics. Six associations were highlighted for SDW, 28 concerned single traits determined under N+ or N- conditions (13 for elongation related traits and 15 for SDW use related traits), 9 concerned single pTraits and two concerned the combined-pTrait PC3, with significant regions per trait ranging from one to six. The positions of all significant associations identified on the physical map of *M. truncatula*. are summarized in Fig. I-3.

Among the six associations with SDW (on chromosomes 1, 2, 5 and 6), the two QTNs positioned on chromosomes 2 and 5 were detected at  $-\log_{10}(P\text{-value}) > 8.01$  and explained a high part of variation (53 %, Annexe I-1-Fig. S3D). Alternative alleles increased SDW compared to the referent alleles (from 8 to 44 % depending on the locus). For two associations on chromosome 2, alternative alleles were rare (frequency: 0.03-0.04). On the contrary, alternative alleles of the other loci were frequent in the population (0.23 to 0.64).

Regarding organ elongation traits, six associations were identified for HL, five for the N- condition on chromosomes 1, 3, 6, 7 and 8, and one for the N+ condition in the same region on chromosome 6 found for the N- condition (Table I-4, Figs I-3 and Annexe I-1-Fig. S3A). The SNPs associated with RL were positioned on distinct regions from that found for HL, on chromosomes 3, 5 and 7. The association on chromosome 3 (position: chr3\_40147951) was common to both NC, while those on chromosomes 5 and 7 were only found for the N+ condition. Three loci associated with RHL were identified. Two that were found for the N+ condition on chromosome 3 were in the same genomic areas but at separated positions from that found for HL or RL. The third association was found for the N- condition on chromosome

**Table I-3.** Seedling elongation and seed biomass use related trait means of the four physiotypes of accessions highlighted with the k-mean classification based on plasticity indexes to the absence of nitrate. The colours mentioned in brackets, refer to the group colours on Figure 2. <sup>a,b</sup>Student–Newman–Keuls method (between the N+ and N– nitrate conditions for each trait,  $p < 0.001$ ). Traits correspond to seed dry weight (SDW), hypocotyl length (HL), radicle length (RL), dry weight allocated to hypocotyl (HADW), dry weight allocated to radicle (RADW), cotyledon residual dry weight (CRDW), lost dry weight (LDW) determined in the presence (N+) and absence (N–) of nitrate, and to corresponding pTraits (plasticity indexes to the absence of nitrate supply, pHL, pRL, pHADW, pRADW, pCRDW and pLDW).

Traits	Physiotype1 (red)	Physiotype2 (green)	Physiotype3 (blue)	Physiotype4 (black)
<b>SDW (mg)</b>	4.9	4.6	5.0	4.9
<b>HL N+ (mm)</b>	70.5	65.8	69.7	71.5 <sup>a</sup>
<b>HL N- (mm)</b>	69.3	65.4	69.8	67.9 <sup>b</sup>
<b>pHL (%)</b>	-1.9	0.1	0.2	-5.6
<b>RL N+ (mm)</b>	52.5 <sup>b</sup>	50.7	53.6 <sup>b</sup>	53.2
<b>RL N- (mm)</b>	57.1 <sup>a</sup>	49.9	56.6 <sup>a</sup>	53.7
<b>pRL (%)</b>	9.9	-1.6	6.5	0.4
<b>CRDW N+ (%)</b>	24.5 <sup>b</sup>	29.5 <sup>a</sup>	29.1 <sup>a</sup>	28.8 <sup>a</sup>
<b>CRDW N- (%)</b>	26.3 <sup>a</sup>	25.0 <sup>b</sup>	25.4 <sup>b</sup>	25.1 <sup>b</sup>
<b>pCRDW (%)</b>	10.6	-13.0	-10.8	-11.4
<b>HADW N+ (%)</b>	32.7	37.1 <sup>a</sup>	34.9 <sup>a</sup>	37.1 <sup>a</sup>
<b>HADW N- (%)</b>	32.7	30.4 <sup>b</sup>	33.8 <sup>b</sup>	30.9 <sup>b</sup>
<b>pHADW (%)</b>	0.9	-19.3	-3.2	-16.6
<b>RADW N+ (%)</b>	8.8 <sup>b</sup>	9.6 <sup>a</sup>	8.9	8.4 <sup>b</sup>
<b>RADW N- (%)</b>	9.6 <sup>a</sup>	8.1 <sup>b</sup>	8.8	9.3 <sup>a</sup>
<b>pRADW (%)</b>	10.6	-14.7	-0.1	11.0
<b>LDW N+ (%)</b>	25.0 <sup>a</sup>	15.4 <sup>b</sup>	18.8 <sup>b</sup>	17.8 <sup>b</sup>
<b>LDW N- (%)</b>	22.7 <sup>b</sup>	25.3 <sup>a</sup>	23.2 <sup>a</sup>	25.7 <sup>a</sup>
<b>pLDW (%)</b>	-8.9	75.1	21.6	41.8

6. For plasticity indexes, one association was identified for pRL on chromosome 3 at  $-\log_{10}(P\text{-value}) > 8.01$ . It explained 28 % of the pRL variation and was at a different position (chr\_3356974) than those found for RL (Table I-4, Figs I-3 and Annexe I-1-Fig. S3A,B). Finally, two loci separated by around 3.4 Mbp were detected on chromosome 7 for the combined-rTrait PC3. Those loci mainly control the response of seedling elongation (*i.e.* both pRL and pHL) to the absence of nitrate (Figs I-2 and Annexe I-1-Fig. S2). Except for one locus for PC3, frequencies of the alternative alleles were lower compared to the referent alleles, ranging from 0.03 to 0.48. In addition, the alternative alleles increased the values of the traits related to organ elongation, except at the two loci for PC3 (Table I-4). Indeed, the positive mean obtained for the referent allele for the combined-pTrait PC3 indicated that accessions presenting this allele were mainly located on the positive sector on the PC3, *i.e.* the referent allele increased pRL and pHL values (Table I-4 and Fig.I-2). At the opposite, the negative mean obtained for the alternative allele indicated that accessions presenting this allele were mainly located on the negative sector on the PC3, *i.e.* the alternative decreased pRL and pHL values.

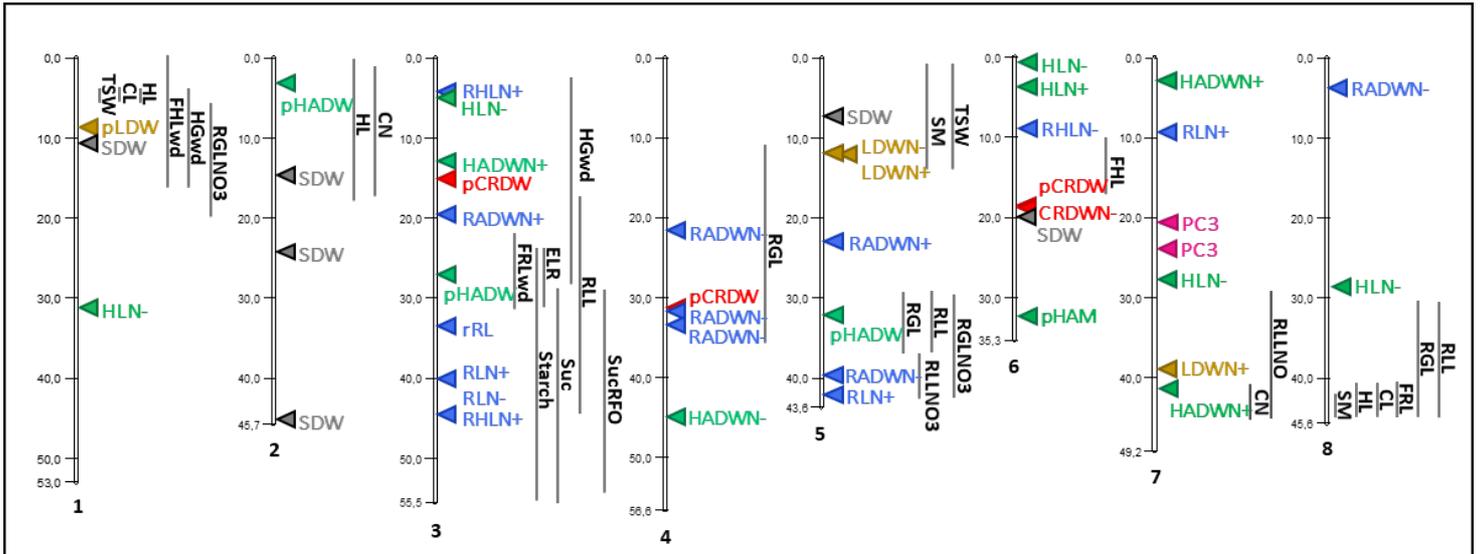
Regarding SDW use related traits, 15 loci distributed on chromosomes 3 to 8 were revealed for traits determined under N+ or N- conditions. For CRDW and HADW, loci were identified for only one NC, whereas for RADW and LDW loci were highlighted for both NC. Among the latter, one region on chromosome 5 shared separate but relatively close loci for LDW for the two NC. It is worth to note that two loci associated with HADW and LDW under the N+ condition are located in the same region on chromosome 7 (Table I-4 and Fig. I-3). Finally, 8 associations were detected for pTraits. Among them, three were identified for pCRDW on chromosomes 3, 4 and 6, including one QTN detected at  $-\log_{10}(P\text{-value}) > 8.01$  that explained 20 % of variation on chromosome 3 (Annexe I-1-Fig. S3D). Finally, four associations with pHADW and one with pLDW were highlighted on chromosomes 2, 3, 5 and 6 and on chromosome 7, respectively. For all the loci associated with SDW used related traits, frequencies of the alternative alleles were lower ( $< 0.43$ , 0.1 for most ones) than that of the referent alleles. The alternative alleles increased the trait values, except for some SNPs associated with HADW N+ and pHADW.

***I-3-5-GWAS allows identifying two gene clusters surrounding loci associated with seedling elongation response to the absence of nitrate***

**Table I-4.** SNPs identified for seedling elongation and seed biomass use related traits in response to nitrate supply. The SNPs were revealed by Multi-Locus Mixed Model (MLMM) analysis at  $-\log_{10}(p\text{-value}) > 6.5$ . They were searched for single traits determined in the presence (N+) and absence (N-) of nitrate, for pTraits (i.e. plasticity indexes expressing the response of each trait to the absence of nitrate), and for the combined-pTrait-PC3 corresponding to coordinates of accessions on the third PC (Figure 2). <sup>a</sup>SNP information: chromosome number (Chr.), chromosomal position in base pairs (Position); SNP ID for the Mt4.0v1 version (ID) and number of other significant closed SNPs within a 1 Mb (Nb.). <sup>b</sup> $-\log_{10}(p\text{-value}) > 6.5$  arbitrary P-value thresholds in the analysis. <sup>c</sup>Information on the referent (Ref)/the alternative (Alt) alleles for each association found: frequency and trait mean values for homozygous. <sup>d</sup>Quantitative trait nucleotides (QTNs) identified as cofactors at the optimal model step (threshold of  $-\log_{10}(p\text{-value}) > 8.01$  with a Bonferroni correction threshold of 5 %. Single traits correspond to seed dry weight (SDW), hypocotyl length (HL), radicle length (RL), ratio between RL and HL (RHL), cotyledon residual dry weight (CRDW), dry weight allocated to hypocotyl (HADW), dry weight allocated to radicle (RADW) and lost dry weight (LDW) determined in the presence (N+) and absence (N-) of nitrate. pTraits correspond to plasticity indexes to the absence of nitrate supply on pHL, pRL, pCRDW, pHADW, pRADW and pLDW. ‘Combined-pTraits’ correspond to coordinates of accessions on three retained PCs of the PCA.

Traits	SNP <sup>a</sup>				$-\log_{10}(p\text{-value})^b$	Ref/Alt <sup>c</sup>	
	Chr.	Position	ID	Nb.		Frequency	Trait mean
<b>Single traits</b>							
SDW	1	10504462	chr1 10504462	5	7.61	0.70/0.30	4.6/5.5
	2	14661354	chr2 14661354	4	7.07	0.97/0.03	4.8/6.1
	2	24156155	chr2 24156155 <sup>d</sup>		9.85	0.96/0.04	4.8/6.9
	2	45074224	chr2 45074224		7.15	0.65/0.35	4.6/5.2
	5	7439421	chr5 7439421 <sup>d</sup>		9.41	0.36/0.64	4.2/5.3
	6	19861282	chr6 19861282		6.60	0.77/0.23	4.8/5.2
HL N+	6	3680493	chr6 3680493	1	6.98	0.95/0.05	68.8/81.8
HL N-	1	31059930	chr1 31059930		6.81	0.60/0.40	66.5/70.9
	3	5213763	chr3 5213763		6.91	0.91/0.09	67.3/77.2
	6	778761	chr6 778761	2	7.05	0.96/0.04	67.5/80.6
	7	27874159	chr7 27874159		7.25	0.96/0.04	67.5/81.9
	8	28383924	chr8 28383924		6.59	0.73/0.27	66.6/72.4
RL N+	3	40147951	chr3 40147951	6	7.13	0.52/0.48	49.4/56.2
	5	42057552	chr5 42057552	2	7.42	0.93/0.07	51.9/64.2
	7	9408292	chr7 9408292		6.59	0.72/0.28	51.1/56.9
RL N-	3	40147951	chr3 40147951	9	7.61	0.52/0.48	50.8/58.8
RHL N+	3	4207635	chr3 4207635	3	7.32	0.89/0.11	0.7/0.9
	3	44571513	chr3 44571513		6.61	0.97/0.03	0.8/1
RHL N-	6	8869416	chr6 8869416		6.64	0.97/0.03	0.8/1.1
CRDW N-	6	18714149	chr6 18714149	1	6.89	0.95/0.05	25.1/32
HADW N+	3	12972406	chr3 12972406		6.64	0.59/0.41	33.9/38.8
	4	44804359	chr4 44804359		6.66	0.96/0.04	36/26.4
	7	2924502	chr7 2924502		6.79	0.92/0.08	36.5/29.3
	7	41494823	chr7 41494823	3	7.16	0.9/0.1	35/42.9
RADW N+	3	19634490	chr3 19634490		6.75	0.96/0.04	8.8/11.8
	5	22957953	chr5 22957953		6.95	0.93/0.07	8.8/10.7
RADW N-	4	21737506	chr4 21737506		7.07	0.96/0.04	8.9/12.2
	4	31619754	chr4 31619754		6.72	0.94/0.06	8.8/11
	4	33187990	chr4 33187990		6.71	0.94/0.06	8.9/10.9
	5	39840103	chr5 39840103		6.73	0.96/0.04	8.8/12
	8	3679902	chr8 3679902	1	7.27	0.96/0.04	8.9/11.7
LDW N+	5	12110949	chr5 12110949		6.53	0.90/0.10	17.7/25.9
	7	38832028	chr7 38832028	1	7.05	0.94/0.06	17.5/30.6
LDW N-	5	11955271	chr5 11955271		6.53	0.82/0.18	23/26.7
<b>pTraits</b>							
pRL	3	33568974	chr3 33568974 <sup>d</sup>	1	8.31	0.97/0.03	2.7/25.8
pCRDW	3	1520728	chr3 15207285 <sup>d</sup>	1	8.74	0.93/0.07	-10.2/13.2
	4	30980383	chr4 30980383		6.77	0.81/0.19	-10.2/-0.4
	6	18403820	chr6 18403820	1	7.32	0.96/0.04	-10.2/23.1
pHADW	2	3231800	chr2 3231800	1	7.93	0.91/0.09	-4.9/-24
	3	27292393	chr3 27292393	4	7.25	0.96/0.04	-8.4/-37.7
	5	32077987	chr5 32077987		6.69	0.88/0.13	-11.6/4.4
	6	32285565	chr6 32285565	4	7.34	0.95/0.05	-8.2/-33.5
pLDW	1	8632060	chr1 8632060	1	7.51	0.95/0.05	25.3/70.1
<b>Combined-pTraits</b>							
PC3	7	20375462	chr7 20375462		6.53	0.74/0.26	0.2/-0.6
	7	23831505	chr7 23831505		7.25	0.50/0.50	0.4/-0.5

Putative causal variants for trait variation were searched by checking the genes encoding proteins positioned within chromosomal regions around the loci revealed, with a special focus on the three significant loci associated with plasticity indexes to the absence of nitrate for elongation traits (*i.e.* pRL and combined-pTrait PC3, *i.e.* the response of seedling elongation to the absence of nitrate, Table I-4). With the genotypic dataset used, LD decay varied from 5.3 kb to 9.3 kb depending on the chromosome (Fig. I-4 and Annexe I-1-Fig. S4). These values were close to those found by Branca et al. (2011) and Bonhomme et al. (2014) and confirmed that LD in *M. truncatula* significantly decays beyond 10 kb on average. We thus searched for genes positioned within 10 kb on either side of all the significant associations. With the exception of pCRDW for which no gene was found, one to 7 genes were revealed depending on the association (Annexe I-1- Table S2). Several genes encode proteins with already known function, however most of them are likely to be involved in the variation of the studied traits (Annexe I-1- Table S2). Because LD blocks in the *M. truncatula* genome can reach 50 kb (Bonhomme et al. 2014), we enlarged the window to 100 kb, 50 kb each side of the three loci we focused on for gene mining (Fig. I-5). The first region contained the QTN associated with pRL (position chr3\_33568974) and 16 genes encoding three hypothetical proteins: (1) one transmembrane protein, (2) a S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase, (3) TPR repeat thioredoxin TTL1-like and plant/F14D7-9 proteins, but especially a cluster of 9 genes encoding putative sugar transporters (Fig.I-5A). The second region contained 16 genes around the locus associated with PC3 at position chr7\_20375462 (Fig. I-5B). Seven of them encode hypothetical proteins. The others encode four F-box protein interaction domain proteins, one transmembrane protein, one GNL3L/Grn1 GTPase, one glycoside hydrolase family 1 protein, one Ramosa 1 enhancer locus 2 protein and one Nodule Cysteine-Rich (NCR) secreted peptide. The third chromosomal region gathers 25 genes including a cluster of 16 glutathione transferase (GSTs) genes identified near the loci associated with the combined-pTrait PC3, at position chr7\_23831505. The other genes encode four hypothetical proteins, two transmembrane proteins, one RHO guanyl-nucleotide exchange factor, one nodule cysteine-rich secreted protein and one early nodulin. As expected for gene mining based on GWAS (Wallace et al. 2014), several of the genes identified did not contain SNPs, *i.e.* 7 of the 9 sugar transporter genes (Fig. I-5). When several markers positioned within a gene were found, LD intensity of the gene sequence with the significant association was assessed by the mean  $r^2$  and  $D'$  values. This LD intensity differed depending on the genes with



**Fig. I-3.** Location on the physical map of *M. truncatula* of the significant SNPs associated with elongation and seed biomass use related traits during seedling heterotrophic growth. The verticals bars represent the different chromosomes. Loci positions are indicated by an arrow on their right (for detailed characteristics of the SNPs, see Table I-4). Single traits under N+ (presence of nitrate, 5 mM) and N- (absence of nitrate): HL, hypocotyl length; RL, radicle length; RHL, ratio between radicle and hypocotyl lengths; HADW, dry weight allocated to hypocotyl; RADW, dry weight allocated to radicle; CRDW, cotyledon residual dry weight. Plasticity indexes to the absence of nitrate (pTraits): pHL, pRL, pCRDW, pHADW, pRADW. PC3: combined-pTrait PC3. Seed dry weight, seedling elongation, hypocotyl, radicle, biomass mobilization and lost dry weight related traits are indicated in grey, pink, green, blue, red and brown, respectively. The co-locations of the SNPs with previously identified QTLs for seed and seedling characteristics related to heterotrophic growth using recombinant inbred line populations are indicated by the projection of the support intervals of these QTLs on the right of the chromosomes (dark vertical bars). SM, seed biomass, ELR, early embryonic axis elongation rate (mm / hr, 20°C, dark), HL, hypocotyl length (10°C, dark) from Dias et al. (2011); CN, cell number in the epidermis of hypocotyl, CL, maximal length of epidermal cells of hypocotyl (10°C, dark) from Youssef et al. (2016); HFwd, HGwd, hypocotyl growth rate under water deficit (-0.5 MPa, dark); RLL, radicle length (16 h light); RLLNO3, radicle length in 5 mM KNO3 (16 hr light), RGLNO3, radicle growth rate in 5 mM KNO3 (16 hr light), TGW, thousand seed weight, Stach, stachyose, Suc, sucrose, SucRFO, ratio Suc over oligosaccharides seed contents from Vandecasteele et al. (2011). The physical map version Mt4.0.v2 from *Medicago truncatula* Genome Database was used.

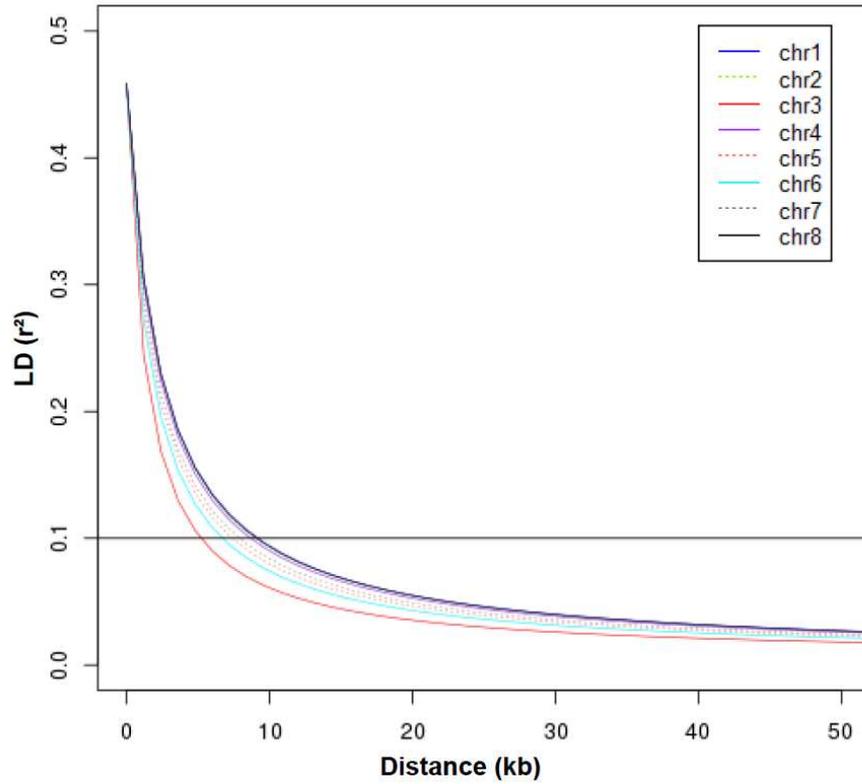
weak  $r^2$  values from 0.1 to 0.2, and  $D'$  values from 0.4 to 1 (Fig. I-5). High  $D'$  values were found for some genes, for example for GST genes, suggesting that a probable causal polymorphism might be due to one or more of these gene cluster members.

In summary, if we base our approach for unravelling the molecular basis of the phenotype on one-SNP-many-genes paradigm (Brodie et al. 2016), among the catalogue of genes found close to significant associations, the finding of the genes encoding sugar transporters and GSTs was of particular interest in this study because of their cluster organization, their large number and their biological functions related to the studied phenotype (*i.e.* possible role in the regulation of root and/or hypocotyl elongation).

#### ***I-4-Discussion***

##### ***I-4-1-Natural diversity for the response of seedling performance to nitrate supply***

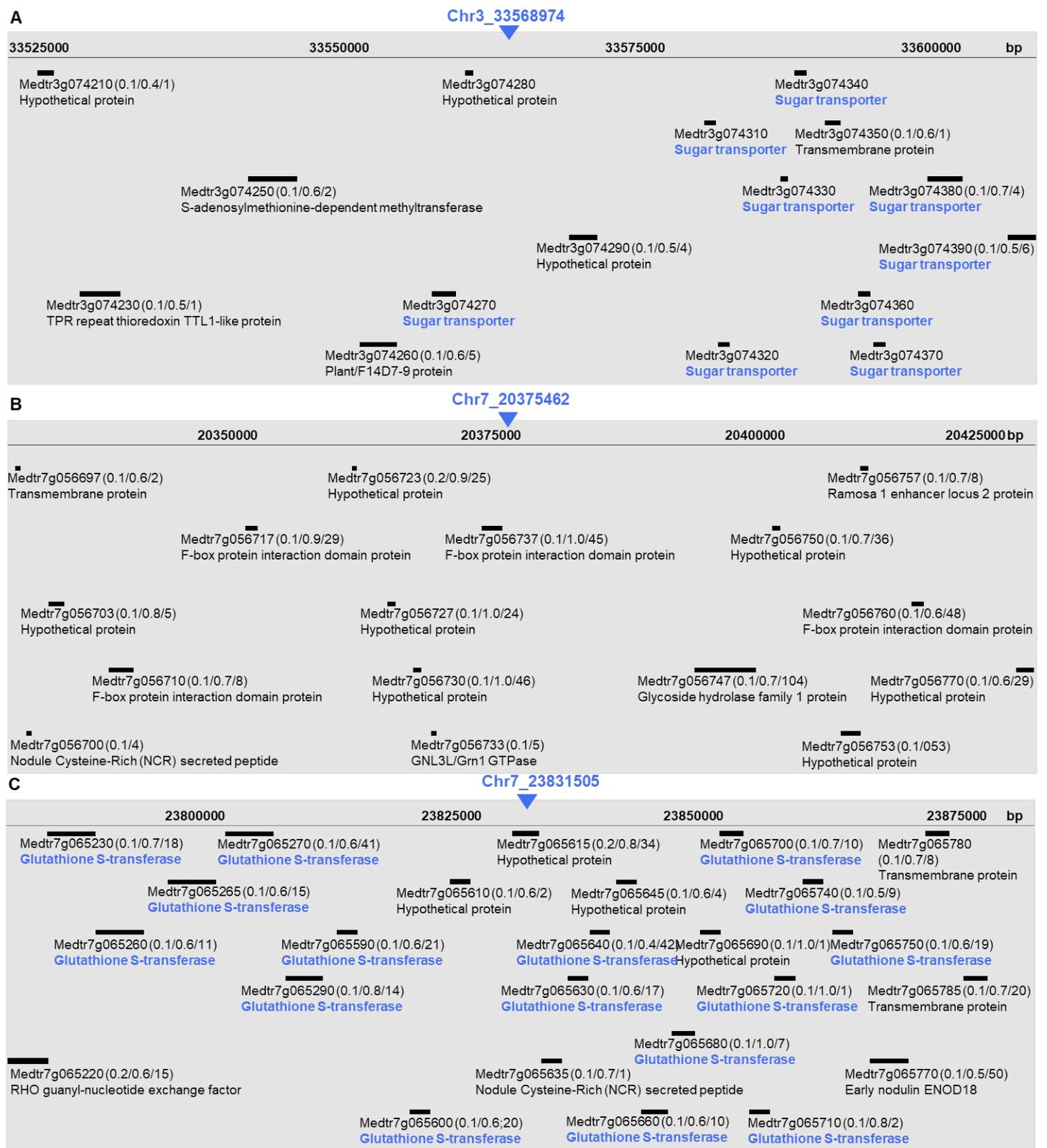
Natural diversity was investigated for the first time to elucidate the genetic architecture of the response of seedling elongation and biomass use related traits to nitrate supply during heterotrophic growth. For this purpose, we characterized the core collection of 192 *M. truncatula* accessions (Ronfort et al. 2006, Annexe I-1- Table S1). Our study revealed the existence of a wide range of seedling trait variation within natural diversity and these seedling traits were responsive to nitrate supply (Table I-1 and Fig. I-1). Maximal hypocotyl length (HL) values (49 to 87 mm), estimating hypocotyl potential of elongation in darkness, were higher than those previously obtained on a smaller core collection of accessions (CC16) grown in water at the same temperature (42 to 57 mm, Youssef et al. 2016). Values of seed dry weight use-related traits were compared to those obtained by Brunel et al. (2009) for two genotypes. They showed that the biomass of cotyledons decreased sharply to about 30–40 % of the initial SDW. Here, we also showed a high proportion of SDW remained in cotyledons, 27 % in average, but the strong variation (15–39 % of SDW) highlighted a large genetic variability for seed reserve mobilization capacity. We also confirmed that the reserves were preferentially allocated to hypocotyl rather than to radicle (around 34 and 9 %, respectively). Finally, the biomass consumed by respiration (Bewley & Black 1982) was very high in our experiments with accessions losing up to 39 % of SDW.



**Fig. I-4.** Linkage Disequilibrium decay (in kb) over each *M. truncatula* chromosome. The filtered genotypic data set of 6 013 644 SNPs was used to produce the LD decay plot. The LD threshold of 0.1 is indicated with a dark horizontal line.

Comparing values obtained for the two nitrate conditions (NC) gave a first indication of the seedling trait response to nitrate supply. However, the calculated plasticity indexes allowed precisely quantifying the sensitivity of the traits to the absence of nitrate and better discriminate the individual response of accessions. The significant differences between accessions and the extensive genetic variability found for the plasticity indexes clearly underlined different seedling phenotypes (Table I-1 and Fig. I-1B), and that phenotypic plasticity to nitrate supply at the studied early stage of plant development was under genetic control. Adaptive seedling phenotypic plasticity could be relevant for breeding programs, selecting for high or low physiological trait plasticity depending on targeted environments in combination with high or low values of the trait per se (Nicotra & Davidson 2010; Dalal et al. 2017).

General trends regarding seedling elongation traits showed that the ratio between the root and shoot parts of the seedling decreased in the absence of nitrate. This decrease was mainly due to the difference in terms of radicle elongation between NC while hypocotyl elongation was little affected. This result was consistent with the inhibitory effect of nitrate on *M. truncatula* radicle elongation as a signalling molecule (Morère-Le Paven et al. 2011; Pellizzaro et al. 2014; Zang et al. 2020) and seemed not related to SDW, seeds with higher dry weight giving globally rise to organs with higher elongation potential (Table I-2). We also found that seed biomass use traits were not clearly correlated with either initial SDW or elongation traits (Table I-2 and Annexe I-1-Fig. S1). However, as both endogenous and exogenous resources contribute to seedling heterotrophic growth, a change in nitrate supply might affect biomass partitioning, as it was found in other studies for developing seedlings in response to ambient nutrient supply (Mašková & Herben 2018) or to drought and salinity (Soltani et al. 2006). In general, seed biomass mobilization increased in the absence of nitrate concomitantly with biomass lost by respiration and decrease in biomass allocation to hypocotyl (Tables I-1 and I-2), suggesting the increased SDW mobilization preferentially supports energetic requirements, thus limiting seedling organ construction, and particularly hypocotyl. The correlation analysis clearly showed the link between SDW mobilization, respiration and biomass allocated to hypocotyl, and indicated that some accessions were able to efficiently allocate SDW to hypocotyl while other accessions exhibited the opposite behaviour (Table I-2 and Annexe I-1-Fig. S1). Lost biomass thus appeared as an important trait regulating how seed biomass was used by different accessions during heterotrophic growth



**Fig. I-5.** Schematic windows of the genomic regions surrounding three loci associated with the response of seedling elongation to the absence of nitrate. Each window represents the gene distribution within a region of 100 kb surrounding the significant single nucleotide polymorphism markers (blue arrows) at positions Chr3\_33568974 (A) associated with the plasticity index for radicle length (pRL), and at positions Chr7\_20375462 (B) and Chr7\_23831505 (C) associated with the combined-pTrait PC3, i.e. with seedling elongation in response to the absence of nitrate. Sugar transporter and glutathione transferase genes are indicated in blue. Linkage disequilibrium (LD) was computed between the significant SNPs and the markers found within the genes included in the windows. When LD was highlighted, the mean  $r^2$  and  $D'$  values as well as the number of SNPs involved were indicated after the gene's ID. The black bars in bold represent the physical positions of the genes according to *Medicago truncatula* Genome Database version Mt4.0v2.

#### ***I-4-2-Physiotypes for relationship between elongation and biomass traits in response to the absence of nitrate***

The PCA carried out, integrating natural variation of plasticity indexes (pTraits), has proven to be a good strategy for identifying physiotypes of seedlings determining their response to the absence of nitrate among genetic diversity. Plasticity indexes structured the accessions into four seedling physiological patterns differing in relationships between elongation and biomass traits, and between biomass traits (Figs 2 and Annexe I-1-Fig. S2, Table I-3). Physiotype1 was the only one composed of accessions lowering SDW mobilization (*i.e.* increasing CRSW) concomitantly with lowering dry weight consumed by respiration (Table I-3). However, it was able to maintain high hypocotyl growth, and promote radicle growth by increasing both elongation and biomass allocation to radicle. One explanation could be that physiotype1 exhibited the highest capacity for SDW remobilization under N+, and even if this capacity decreased under N-, it remained higher than that observed for the other physiotypes under both NC (Table I-3). Seedling growth of physiotype1 seemed therefore less affected by variations in nitrate availability than the other physiotypes. Accessions of Physiotype2 were not affected in organ elongation probably because they displayed the lowest SDW, and the lowest HL and RL values in N+ conditions (Table I-3). However, they were highly affected in SDW use traits. These accessions displayed high HADW and RADW under N+, but both traits were highly reduced under N- in relation with the large proportion of respired biomass and despite an increase of SDW mobilization. SDW of these accessions seemed thus preferentially used for energy requirements. Accessions of Physiotype3 increased SDW mobilization, and even if a part of this biomass was lost, they managed promoting radicle elongation and maintaining hypocotyl elongation. Finally, physiotype4 was the only one significantly affected in hypocotyl growth by N- condition, both in elongation and in allocation of biomass. Physiotype4 was however able to maintain radicle growth probably because of an increase in biomass partitioning towards radicle.

The data presented in this study highlighted the existence of several physiotypes of seedlings responsive to nitrate supply variations during heterotrophic growth among *M. truncatula* natural diversity. A better knowledge of their physiological and molecular bases



could be helpful for designing adaptive functional traits to nitrate limitation relevant for seedling establishment. These results could also help to identify a minimum set of physiological traits for the successful emergence and establishment of seedlings, and to prioritize target traits for the design of ideotypes, as defined by Martre et al. (2015), optimizing seedling performance under limited nitrogen conditions.

### ***I-4-3-Identification of loci associated with the response of seedlings to nitrate supply***

We showed that the genetic architecture of nitrate supply response during seedling heterotrophic growth comprised multiple genomic regions consisting of potentially low frequency and rare alleles that in majority increased the trait values (Table I-4 and Fig. I-3). In general, GWAS performed on plasticity indexes as to the absence / presence of nitrate (pTraits) and on PC3, *i.e.* a PCA-based integrative pTrait, revealed specific loci, different from those identified under each single treatment, presence (N+) or absence (N-) of nitrate. Combined-trait PC variables is an approach firstly used for QTL linkage mapping by Weller et al. (1996) and then for GWAS in animals (Zhang et al. 2018) and plants (Bonhomme et al. 2014; Bouchet et al. 2017). It allowed capturing the genetic variation for several traits simultaneously, that may be controlled by a single locus. Based on multi-trait analysis, it enhances the power to identify common loci shared by several traits (Guo et al. 2017), particularly when using a high marker density dataset (Bonhomme et al. 2014; Bolormaa et al. 2014; Zhang et al. 2018). Here, no locus was identified at the threshold used for the combined-pTraits PC1 and PC2. This suggested that numerous genomic regions with small effects probably contribute to these PCA-based trait expressions making them difficult to detect. However, we identified two associations on chromosome 7 for the combined-pTrait PC3 that captures a part of the genetic variation associated with both pRL and pHL (Table I-4, Figs I-2, I-3 and Annexe I-1-Fig. S2). With this combined-pTrait PC3 two novel loci common for both seedling elongation-related traits were thus discovered and distinct from those found for HL, RL and pRL when analysed separately. Finally, the loci found with plasticity indexes and with the combined-pTrait PC3 provided new opportunities to better understand the physiological bases of seedling plasticity in response to nitrate supply during seedling heterotrophic growth and to identify genes involved in this regulation.



When comparing the locations of the associations identified, some loci associated with the same trait determined in both NC shared common regions on chromosomes 3, 5 and 6, for RL, HL and LDW respectively (Table I-4 and Fig. I-3). Some regions also presented several associations for correlated traits, for example for LDW and HADW under N+ on chromosome 7, or for combined-pTrait PC3 and HL under N-, also on chromosome 7. Such results could mean linked genes for the different traits with specific expression to one NC. Besides, except at the bottom of chromosome 5, associations with elongation traits and with biomass use traits did not share common genomic regions suggesting independent genetic control, consistently with the phenotypic correlation analysis.

Most of the loci identified in the present study were new but some shared common regions with QTLs controlling SDW or seedling elongation under low temperature or water deficit previously identified using RIL populations (Dias et al. 2011; Vandecasteele et al. 2011; Youssef et al. 2016). It was the case for loci associated with pHADW or HADW positioned within confidence intervals of QTLs controlling hypocotyl elongation related traits on chromosomes 2, 3 and 7, and for loci associated with radicle elongation related traits, on chromosomes 3, 4 and 5 (Fig. I-3). Finally, some loci for SDW identified in the present study were positioned within confidence intervals of QTLs controlling the same trait on chromosomes 1 and 3.

#### ***I-4-4-Implication of sugars and glutathione transferases in the regulation of seedling elongation in response to the absence of nitrate***

Candidate gene mining based on GWAS allowed discovering two gene clusters encoding sugar transporters and glutathione transferases (GSTs) near the associations revealed for traits related to seedling elongation in response to the absence of nitrate, pRL and the combined-pTrait PC3, *i.e.* the response of both RL and HL (Fig. I-5). This cluster organization, the large number of gene cluster members and their biological link with the phenotype was a promising finding. The cluster of 9 sugar transporter genes was close to the QTN controlling pRL on chromosome 3 (Fig. I-5A). As the only source of carbon during seedling heterotrophic growth comes from seed sugar reserve mobilization, the role of sugars and sugar transport is crucial (Vandecasteele et al. 2011; Sánchez-Linares et al. 2012). Among the genomic regions presenting co-locations of QTLs controlling seedling growth and seed sugar composition



related traits previously highlighted (Vandecasteele et al. 2011), one coincided with that enriched in sugar transporter genes around the locus associated with pRL identified here (Figs I-3 and I-5A). This is consistent with the increased SDW mobilization in the absence of nitrate (Table I-1) that should boost C mobilization from seed sugar reserves to provide C building blocks for RL. The second region is enriched in 16 GST genes close to one of the loci associated with the combined-pTrait PC3 on chromosome 7 (Fig. I-5C). Cluster spots of GST genes due to gene duplication events are generally found in plants genomes

(Dixon et al. 2002; Sappl et al. 2009; Islam et al. 2017; Abdul Kayum et al. 2018; Han et al. 2018; Han et al. 2018). GST genes have been classified into different classes based on their genomic localization and their function (Dixon et al. 2010). Based on their localization, the genes revealed in the present study encode GSTs of class tau (Han et al. 2018), whose expression is often correlated with tolerance to a wide range of abiotic stresses (Dixon et al. 2009). This is notably in relation to the action of GSTs as antioxidant enzymes able to remove reactive oxygen species (ROS), and thereby limit cell oxidative damages (Sappl et al. 2009; Foyer & Noctor 2011; Río 2015). The role of ROS is not always deleterious. Indeed, ROS were reported to act as plant growth regulators, particularly controlling cell division and elongation during root development (Liszkay et al. 2004; Dunand et al. 2007; Tsukagoshi et al. 2010). As cell elongation is the common biological mechanism underlying both hypocotyl and radicle elongation during heterotrophic growth in *M. truncatula* (Gimeno-Gilles et al. 2009; Pierre et al. 2014), the locus identified for the combined-pTrait PC3 could then have a pleiotropic effect on both traits through control of cell elongation by GSTs in response to the absence of nitrate.

In summary, the present results improve our knowledge on the genetic variation and determinism of seedling pre-emergence growth and on the physiological mechanisms that may be involved. Based on our findings, deciphering the role of sugars according to nitrate supply, as well as the link between GSTs, ROS and nitrate involvement in the control of cell elongation during heterotrophic growth would provide valuable knowledge on seedling performance and fitness of genotypes in response to various nitrate availability conditions.



### **Author contributions**

D.B.H. carried out all the experiments with the assistance of D.B. and B.A. She performed all the statistical and QTL analyses with the assistance of B.A. and contributed to write the manuscript. B.T., A.M.L. and C.A. conceived the study, participated in its design and coordination, and co-wrote the manuscript together with D.B.H. J-M.P. gave advices for statistical analyses. All authors read and approved the final manuscript.

**Acknowledgements** — The authors acknowledge C. Le Signor (INRAE of Dijon, France) for her advice in GWAS with providing the SNP-kinship datasets, and H. Muranty and C. Landès of UMR IRHS for suggestions in statistical analyses. The authors gratefully acknowledge the *Medicago truncatula* Biological Resource Centre in Montpellier (UMR 1334 AGAP, France) for providing seeds of accessions and population structure matrix. The authors also thank all the team Seedling Metabolism and Stress of IRHS for technical assistance for seedling phenotyping, particularly A. Gasc for the preliminary experiments and F. Montrichard for critical reading of part of the manuscript. This research was conducted in the framework of the regional programme “Objectif Végétal, Research, Education and Innovation in Pays de la Loire”, supported by the French Region Pays de la Loire, Angers Loire Métropole and the European Regional Development Fund.

### **Data availability statement**

The data sets supporting the results of this article are included within the article and its supporting information. They derived from the following resources available in the public domain: *Medicago truncatula* Biological Resources Centre (<http://www1.montpellier.inra.fr/BRC-MTR/>), *Medicago* hapmap ([www.medicagohapmap.org](http://www.medicagohapmap.org)) and *Medicago* genome database ([www.medicagogenome.org](http://www.medicagogenome.org)). The other data was generated for this publication.

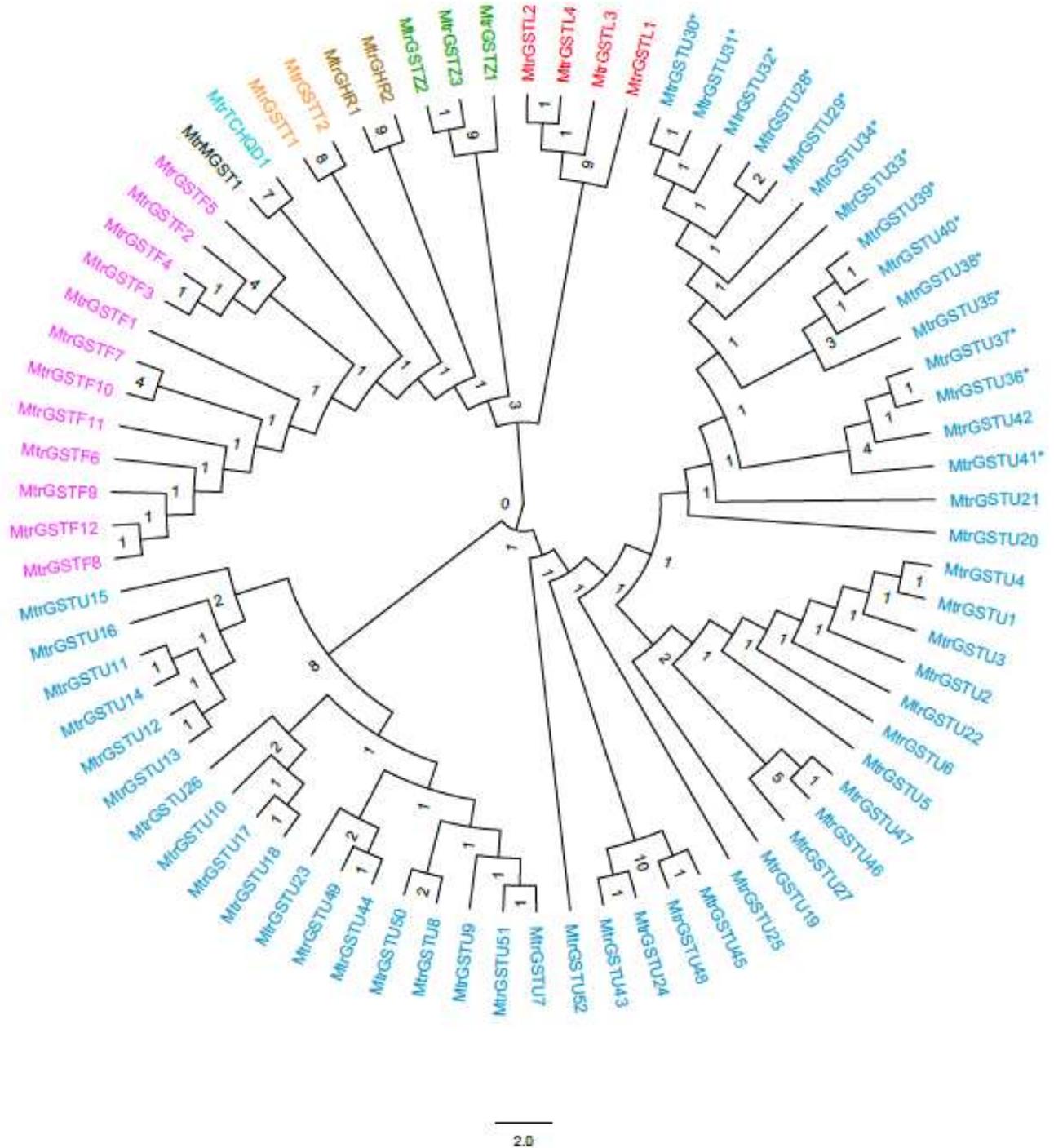


## ***II- Analyse bio-informatique focalisée sur les gènes codants des GSTs identifiés en cluster autour de loci associés à la réponse de l'allongement des organes de la plantule à l'absence de nitrate***

### ***II-1-Etapes de l'analyse bio-informatique***

Les travaux réalisés sur la core collection 192 ont permis de mettre en avant plusieurs gènes candidats. Parmi eux, deux groupes de gènes proches de deux loci identifiés ont été retenus sur la base 1) de leur distribution, le long des régions associées, sous forme de cluster de gènes impliqués dans la même fonction et 2) de leur rôle possible dans la régulation de l'allongement des organes de la plantule en fonction de l'environnement. Le premier cluster regroupe des gènes codant pour des transporteurs de sucres alors que le second regroupe des gènes codant pour des glutathion S-transférases (GSTs). Dans ce cadre, une étude bio-informatique supplémentaire a été réalisée sur ces deux clusters.

Dans un premier temps, leurs séquences codantes ont été comparées aux séquences disponibles dans la banque NCBI (National Center for Biotechnology Information : [www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)) avec l'outil BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) afin de rechercher des séquences orthologues chez *A. thaliana*. Dans un second temps, nous avons focalisé les analyses bio-informatiques sur les gènes de GST étant donné leur particularité de distribution connue sous forme de clusters. Tout d'abord, nous avons effectué un recensement de l'ensemble des séquences peptidiques de GSTs chez *M. truncatula*, en faisant une recherche par annotation sur la base de données [www.medicmine.jcvi.org](http://www.medicmine.jcvi.org). L'analyse GWAS a été réalisée sur la version 4 du génome (Mt4.0), mais une nouvelle version (Mt5.0) a été publiée entre temps et est disponible sur [www.medicago.toulouse.inra.fr/MtrunA17r5.0-ANR/](http://www.medicago.toulouse.inra.fr/MtrunA17r5.0-ANR/). Nous avons donc utilisé cette dernière version pour faire les analyses bio-informatiques. Après téléchargement de l'ensemble des séquences de GSTs et leur vérification sur la base de donnée NCBI, des alignements de séquences ont été réalisés *via* l'outil MULTALIN (Multiple sequence alignment) : [www.npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\\_multalinan.html](http://www.npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_multalinan.html)) et l'outil SMART (Simple Modular Architecture Research Tool: [www.smart.embl-heidelberg.de/](http://www.smart.embl-heidelberg.de/)). Ces alignements permettent de confirmer les annotations et font ressortir des motifs conservés pour les séquences sans homologues sur NCBI.



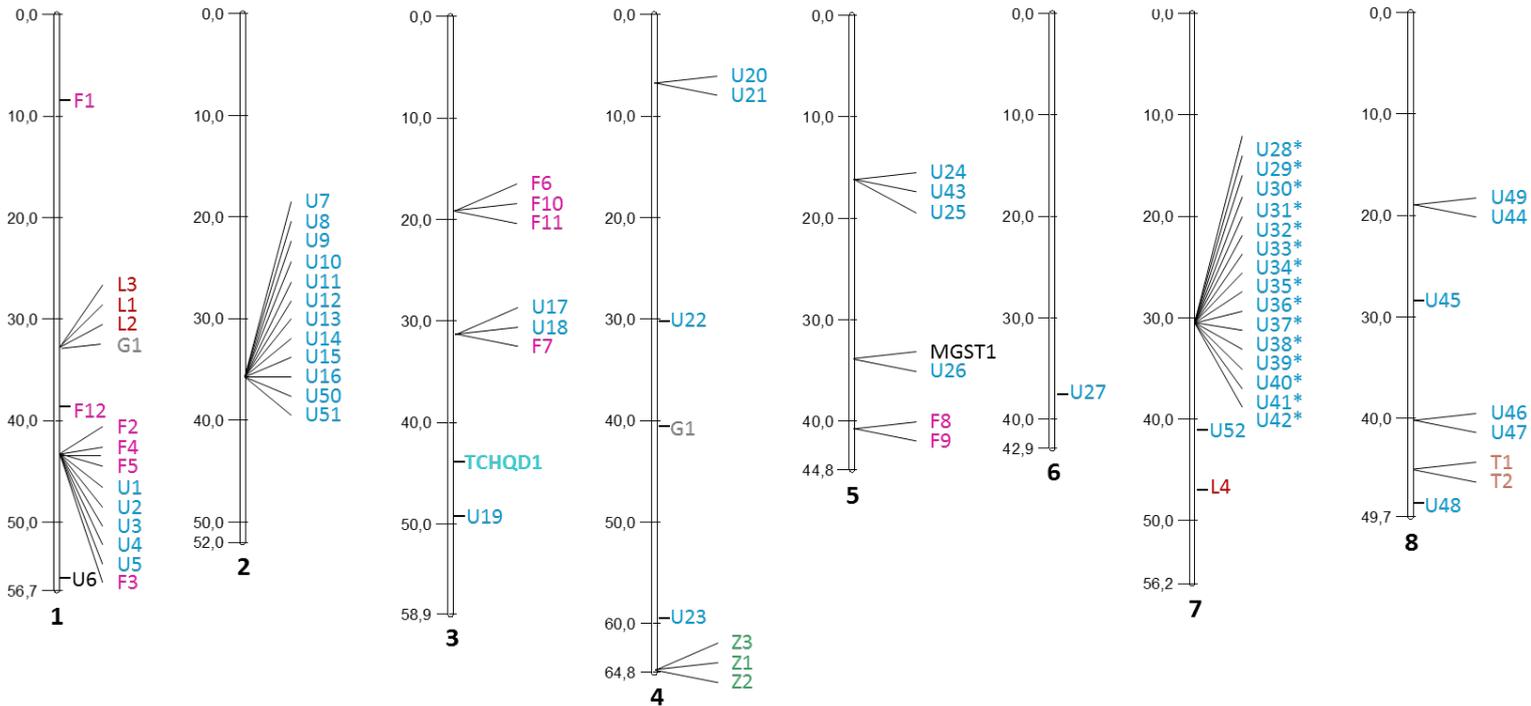
**Figure I-6 :** Arbre phylogénétique des protéines GSTs de l'espèce *M. truncatula* classés selon leur ordre d'apparition (nœuds notés de 0 à 9, respectivement du plus ancien au plus récent). 77 protéines de GSTs sont réparties en huit familles distinctes. Chaque famille de GST est désignée par une couleur (bleu : Tau ; gris : GHR ; rose : Phi ; bleu-ciel : TCHQD ; noir : MGST ; orange : Thêta ; vert : Zeta ; rouge : Lambda). L'arbre est construit, grâce à l'outil ETE (Environment for Tree Exploration : [www.genome.jp/tools-bin/ete](http://www.genome.jp/tools-bin/ete)) et au logiciel FigTreev1.4.3 pour la visualisation.

Un arbre phylogénétique a ensuite été construit, grâce à l'outil ETE (Environment for Tree Exploration : [www.genome.jp/tools-bin/ete](http://www.genome.jp/tools-bin/ete)) et au logiciel FigTreev1.4.3 pour la visualisation. La nomenclature utilisée pour ces GSTs est celle proposée par Dixon et al. (2002) avec au début du nom, les trois lettres désignant l'organisme source (Mtr) suivies de la classe à laquelle elles appartiennent (ex : GSTU, GSTF, GSTT...) et se terminant par un nombre progressif pour chaque gène suivant l'ordre de découverte (ex : MtrGSTU1...). Enfin, une projection schématique de l'ensemble des gènes codant les GSTs le long du génome de *M. truncatula* a été réalisée grâce au logiciel MapChart V2.1 (Voorrips, 2002).

## ***II-2-L'analyse bio-informatique permet la localisation de familles de gènes identifiées par GWAS***

Une recherche des gènes orthologues chez l'espèce modèle *A. thaliana* a d'abord été investie pour les gènes appartenant aux deux clusters identifiés chez *M. truncatula*. Les gènes constituant le cluster de gènes de GST ont tous des gènes orthologues chez *A. thaliana*. Pour le cluster de gènes de transporteur de sucres, le gène *Medtr3g074350* n'a pas d'orthologues chez *A. thaliana* (Annexe I-2). Les 9 gènes codant des transporteurs de sucres identifiés par l'approche GWAS, présentait 40 à 65 % d'homologie de séquence avec les séquences d'*A. thaliana*. La fonction de ces orthologues était identifiée comme un transporteur de sucre (dont le glucose) ou comme un simple transporteur.

Nous avons recensé 77 gènes codant pour des GSTs à partir de la dernière version du génome de *M. truncatula* (Mt5.0). L'espèce *M. truncatula* se place donc, avec *S. lycopersicum* dont le génome peut contenir 90 gènes de GST (Islam et al. 2017), parmi celles où les gènes de GST recensés sont les plus abondantes. Chez *C. sinensis* ou *A. thaliana* seulement 23 et 55 gènes codant des GSTs respectivement ont été identifiés jusqu'à présent (Sappl et al. 2009; Licciardello et al. 2014). Basées sur la localisation dans le génome, l'organisation de leurs gènes ainsi que sur leurs similarités de séquence et de fonctions, les 77 gènes de GST sont réparties en huit classes distinctes (Figure I-6), de la façon suivante : 52 gènes de GST de la classe tau (U), 12 gènes de GST de la classe phi (F), 2 gènes de GST de la classe theta (T), 3 gènes de GST de la classe zeta (Z), 4 gènes de GST de la classe lambda (L), 1 gène de GST de la classe tetrachlorohydroquinone dehalogénase (TCHQD), 2 gènes de GST de la classe glutathionylhydroquinone réductase (GHR). En plus de ces gènes de GST cytosoliques, nous avons également identifié un gène de GST de la classe Microsomale (MGST). Confrontés aux travaux réalisés par Han et al. (2018) sur la version Mt4.0, nous avons identifié certains

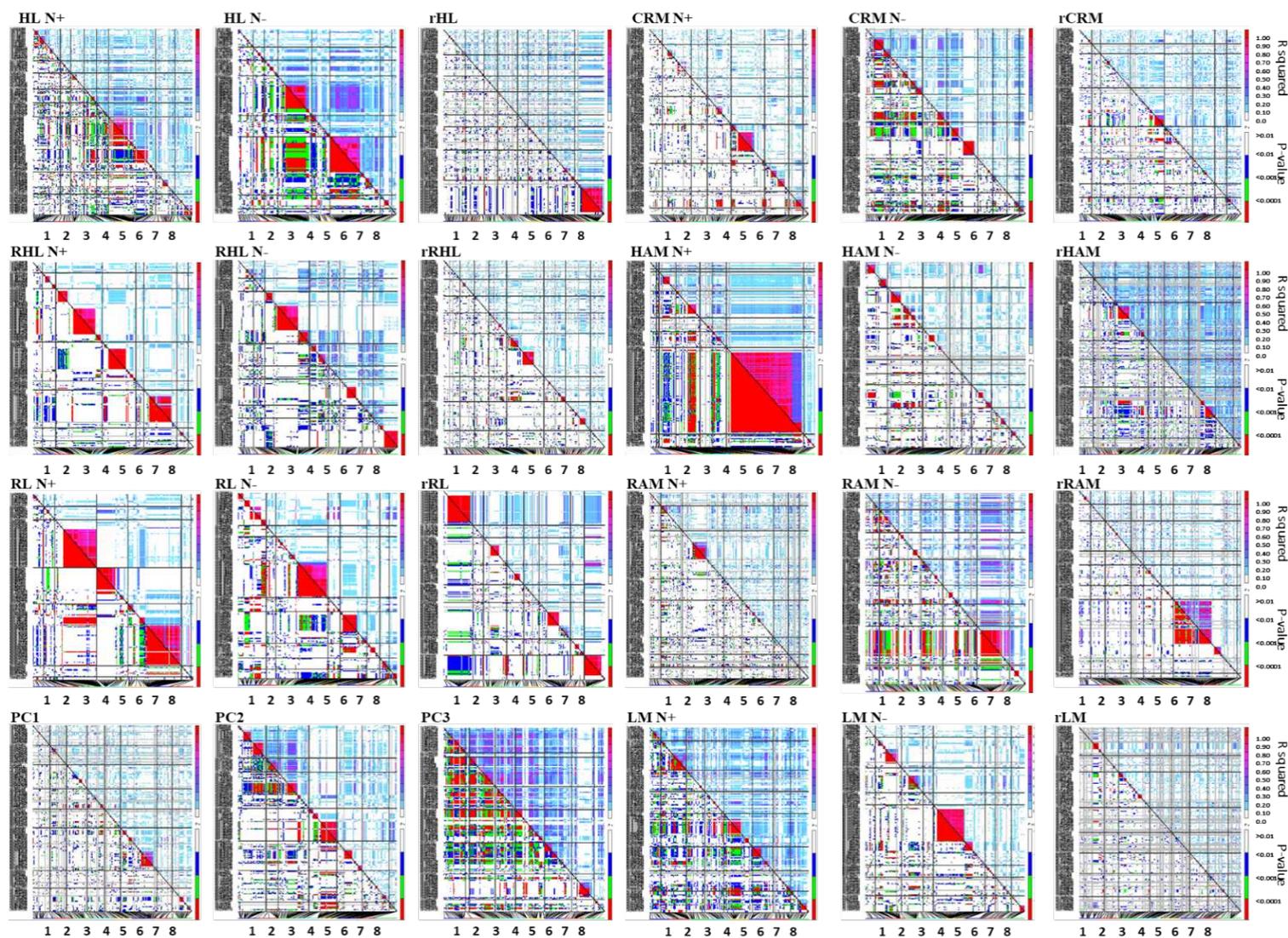


**Figure I-7 :** Localisation des gènes codant les GSTs sur les 8 chromosomes de *M. truncatula*. Chaque famille de GST est désignée par une couleur (bleu : Tau ; gris : GHR ; rose : Phi ; bleu-ciel : TCHQD ; noir : MGST ; orange : Thêta ; vert : Zeta ; rouge : Lambda). Le symbole \* sur le LG7 correspond au cluster de gènes situé autour du QTL associé au caractère PC3 identifié par GWAS.

différences au niveau des classes et du nombre gènes codant pour des GSTs. En effet, dans la version Mt5.0, nous avons trouvé 3 gènes de GSTU, 3 gènes de GSTF, 1 gène de GSTZ, 2 gènes de GHR et 1 gène de MGST de plus que ce qui a été trouvé dans l'étude de Han et al. (2018). De la même façon, l'étude de Han et al. (2018) avait identifié 3 gènes de GSTG et 1 gène de GSTT (Islam et al. 2017) de plus que ce qui a été identifié dans la version Mt5.0.

Pour la plupart des espèces végétales, les gènes codant les GSTs se distinguent par une organisation en cluster le long du génome (*e.g. Arabidopsis thaliana* ; Dixon & Edwards, 2010). Dans cette étude, nous avons également projeté les gènes de GST identifiés sur le génome. Comme dans les travaux de Han et al. (2018), un grand nombre de gènes de GST sont regroupés sous formes de cluster d'au minimum 3 gènes de GST de la même fonction dans des régions génomiques très restreintes (Figure I-7). Dans notre étude, sept clusters sont déterminés dont deux localisés sur le chromosome 1 et un localisé sur chacun des chromosomes 2, 3, 4, 5 et 7. Avec la version Mt5.0 du génome, deux clusters de gènes de GST supplémentaires localisés sur les chromosomes 1 et 3 sont identifiés par rapport aux travaux précédents menés avec la version Mt4.0 par Han et al. (2018). Les différences de localisation physique de certains gènes proviennent de l'amélioration du séquençage et d'une nouvelle annotation entre les deux versions (Mt4.0 vs Mt5.0).

Avec la nouvelle version du génome Mt5.0, 15 des 16 gènes codant pour des GSTs identifiés en cluster précédemment par l'approche GWAS ont bien été retrouvés à la même position. Le 16<sup>ème</sup> gène a changé de nom mais n'a pas changé sa fonction putative (MtrunA17Chr7g0240691). L'approche GWAS a révélé un locus associé à la réponse de l'allongement de l'hypocotyle et de la radicule à l'absence de nitrate à proximité de ce cluster de gènes codant des GSTs sur le chromosome 7 (figures I-5 et I-8). Ces gènes de GST pourraient être de bons candidats pour jouer un rôle dans la régulation de l'allongement des organes en fonction de l'apport en nitrate. En effet, les GSTs jouent un rôle dans le développement et la tolérance des plantes à divers stress biotiques et abiotiques (Dixon & Edwards 2010). Les études précédentes de l'équipe sur *M. truncatula* ont montré que l'expression de gènes de GST variait en cours de la croissance hétérotrophe de l'hypocotyle et en réponse au froid (Pierre, 2012). De plus, l'allongement de l'hypocotyle est très fortement corrélé avec l'activité des GSTs, dont une majorité de la classe tau (Genitoni, 2013). Les GSTs peuvent contrôler l'allongement des plantules en réponse à un stress abiotique, indirectement à travers leurs rôles d'antioxydant des ROS. Ces derniers sont également largement associés à la régulation de croissance des racines primaires et latérales, ainsi que des poils racinaires (Liszkay et al. 2004; Dunand et al. 2007; Tsukagoshi et al. 2010; O'Brien et al. 2016). Dans



**Figure I-8** : Cartes des déséquilibres de liaison (DL) des 200 SNPs les plus significativement associés aux caractères de performance des plantules en hétérotrophie dans les deux conditions d'apport en nitrate (N+, N-) et en réponse à l'absence de nitrate (rTraits et rTraits-combinés). Sur chaque carte figure en abscisses le numéro des chromosomes (1 à 8) et en ordonnées les noms des SNPs. La partie supérieure désigne le coefficient de corrélation  $R^2$  entre les allèles à deux loci et la partie inférieure désigne la valeur de  $P$  pour le test du DL entre les paires d'allèles. Les barres verticales désignent le code couleur du niveau de signification et du niveau de corrélation. Dans chacune des cartes les « hot spots » en forts DL sont indiqués par une couleur rouge intense.

la présente étude, l'ensemble des membres du cluster identifié appartient à la classe tau, de MtrGSTU28 à MtrGSTU42 (Figure I-7). Dans la majorité des espèces végétales où les GSTs ont été recensées, la classe tau est considérée comme la plus importante en terme d'effectif (Dixon & Edwards, 2010). Chez *Arabidopsis*, la surexpression des gènes codant pour des GSTs de classe tau favoriserait la tolérance aux stress salin et oxydatif (Sharma et al. 2014). L'étude de Han et al. (2018) a également montré des variations d'expression de gènes codant en particulier pour des GSTs de la classe tau suite à l'application d'un herbicide chez *M. truncatula*, avec une spécificité d'expression dans les tissus racinaires (MtrGSTU3, MtrGSTU23). De même, les GSTs de classe tau ont été identifiées comme sensibles à l'auxine. Cette induction par l'auxine signifie que les GSTs de classe tau peuvent être particulièrement abondantes dans les tissus en croissance active.

### ***III- Analyses GWAS complémentaires pour la détection de nouveaux loci***

#### ***III-1-Méthodologie de détection de nouveaux loci associés aux traits de performance des plantules et à leurs réponses à l'absence de nitrate***

Les loci associés aux caractères étudiés présentés précédemment ont été identifiés grâce au « model mixte multi-locus, MLMM » de Segura et al. (2012) qui est une approche de référence pour la détection de loci par GWAS. En complément, nous avons exploré deux autres approches. Une première approche a consisté à rechercher les régions génomiques en fort DL à partir de SNPs ayant les plus faibles valeurs de  $P$  dans l'analyse MLMM. Pour cela, les 200 SNPs ayant les plus faibles valeurs  $P$  ont été retenus pour chaque caractère. Le DL a ensuite été calculé entre chaque paire de ces 200 SNPs à l'aide du logiciel Tassel v5.0. Une deuxième approche a consisté à comparer les résultats obtenus grâce au modèle MLMM, avec ceux obtenus grâce à un modèle mixte plus complexe dans sa détection de QTN, à savoir le modèle FarmCPU (Liu et al. 2016). Le modèle FarmCPU a été utilisé avec succès dans des études récentes (Martinez et al. 2018; Jernigan et al. 2018), grâce à ses nombreux avantages (*e.g.* évolution des cofacteurs SNPs et de la relation de parentés au cours de l'analyse). Pour ce modèle FarmCPU, nous avons appliqué le même seuil arbitraire de  $-\log_{10}(p\text{-value}) > 6,50$  que pour l'approche par MLMM. Les package `bigmemory.sri`, `biganalytics` ainsi qu'un script [www.zzlab.net/FarmCPU/FarmCPU\\_functions.txt](http://www.zzlab.net/FarmCPU/FarmCPU_functions.txt) ont été utilisés.

**Tableau I-5** : Liste des SNPs associés aux caractères de la performance des plantules, en présence et en absence de nitrate, identifiés par la méthode FarmCPU ou MLM. 175 accessions ont été testées en tenant compte de la structuration et de l'évolution de l'apparentement comme co-variables. ID : identifiant du SNP, version *Mt4.0* du génome ; Chr. : numéro du chromosome ; Pos. : position sur le chromosome en paires de bases ;  $-\log_{10}(P)$  :  $-\log_{10}$  valeur du logarithme décimal de valeur *P*; Nb. : nombre de SNP significatifs dans une région restreinte. FarmCPU (Fixed and random model Circulating Probability Unification), MLM (Multi-Locus Mixed-Model).

	ID	FarmCPU				MLM	
		Chr.	Pos.	$-\log_{10}(P)$	Nb.	$-\log_{10}(P)$	Nb.
<b>Caractères simples</b>							
SM	chr3_5705677	3	5705677	6,56			
	chr3_9614896	3	9614896	7,57			
	chr4_24907834	4	24907834	8,87			
	chr5_7439421	5	7439421	22,23		9,41	
	chr7_42744003	7	42744003	6,9			
RL N+	chr2_36359731	2	36359731	10,27			
	chr3_20319868	3	20319868	6,71			
	chr3_40151017	3	40151017	18,73		7,13	6
	chr4_9543184	4	9543184	8,00			
	chr5_27388749	5	27388749	7,20			
	chr5_42057552	5	42057552	8,74		7,42	2
	chr6_24615452	6	24615452	9,12			
	chr6_29571434	6	29571434	6,96			
	chr7_2781411	7	2781411	6,57			
	chr8_31139809	8	31139809	6,58			
RHL N+	chr3_4207635	3	4207635	6,89	2	7,32	3
RHL N-	chr3_40150876	3	40150876	6,56			
CRM N-	chr6_18714149	6	18714149	6,81		6,89	2
HAM N+	chr7_41494823	7	41494823	7,47	5	7,16	3
RAM N+	chr2_3405049	2	3405049	6,73			
RAM N-	chr1_34394691	1	34394691	8,86			
	chr1_15816095	1	15816095	8,52			
	chr3_7564269	3	7564269	8,35			
	chr3_53555676	3	53555676	13,2	2		
	chr4_21737506	4	21737506	24,14		7,07	
	chr6_18825632	6	18825632	15,32			
	chr7_2051437	7	2051437	10,26			
	chr7_29539244	7	29539244	7,36			
	chr7_40536557	7	40536557	14,18			
chr8_18987640	8	18987640	7,97				
LM N+	chr2_18118733	2	18118733	6,03			
	chr5_12110949	5	12110949	6,58		6,53	
LM N-	chr5_11955271	5	11955271	6,53		6,53	

### ***III-2-Identification de nouveaux loci grâce à l'approche des 200 SNPs les plus significatifs en fort DL***

Les 200 SNPs avec les valeurs de  $P$  les plus faibles, considérés ici comme significativement associés aux caractères analysés, se regroupent sous forme de « hot spots » avec un fort déséquilibre de liaison (figure I-8). Ces « hot spots » de SNPs en fort DL sont localisés au niveau des pics de SNPs déjà détectés avec l'approche MLMM (Annexe I-1-Fig. S3). A titre d'exemple, parmi les caractères liés à la longueur des organes, RL aux deux conditions nitrate a permis la détection d'un « hot spot » autour du SNP « chr3\_40147951 ». De même, pour les caractères liés à la biomasse, HAM en présence de nitrate a permis la détection d'un large « hot spot » autour du SNP « chr7\_41494823 ». De plus, certains de ces « hot spots » peuvent également être en fort DL les uns avec les autres. C'est le cas du caractère combiné PC3, qui présentent deux hot-spots en DL au niveau du chromosome 7, l'un autour du SNP « chr7\_20375462 » et l'autre autour du SNP « chr7\_23831505 ». En revanche, pour certains caractères comme les indices de réponse à l'absence de nitrate (*e.g.* rRL, rCRM, rHAM, rLM), très peu de « hot spots » ont détecté autour des SNPs mis en avant précédemment.

Cette analyse permet aussi, de mettre en avant de nouveaux SNPs formant des hot-spots en DL. A titre d'exemple, pour le caractère rRAM aucun SNPs n'avait été détecté précédemment, alors qu'avec cette approche, un « hot spot » de SNPs se distingue au niveau 25 Mb du chromosome 7 (Figure I-8). De même, à la différence de ce qui été identifié précédemment, de nouveaux SNPs formant des « hot spots » peuvent être détectés dans l'autre condition nitrate. A titre d'exemple, HL et RHL associées respectivement à des régions en fort DL autour des SNPs chr6\_778761 et chr3\_4207635, en présence de nitrate. Or, cette analyse complémentaire a révélé que ces deux régions étaient également associées à ces deux caractères en absence de nitrate. Par conséquent, l'ensemble de ces résultats indique que l'association du DL et la baisse du seuil, permet la détection de nouveaux SNP pouvant être précédemment considérés comme des faux-négatifs.

**Tableau I-6** : Liste des SNPs associés aux indices (simples et combinés) de réponse à l'absence de nitrate, identifiés par la méthode FarmCPU ou MLMM. Les 175 accessions ont été testées en tenant compte de la structuration et de l'évolution de l'appartenance comme co-variables. ID : identifiant du SNP, version *Mt4.0* du génome ; Chr. : numéro du chromosome ; Pos. : position sur le chromosome en paires de bases ;  $-\log_{10}(P)$  :  $-\log_{10}$  valeur du logarithme décimal de valeur  $P$ ; Nb. : nombre de SNP significatifs dans une région restreinte. FarmCPU (Fixed and random model Circulating Probability Unification), MLMM (Multi-Locus Mixed-Model).

		FarmCPU				MLMM	
	ID	Chr.	Pos.	$-\log_{10}(P)$	Nb.	$-\log_{10}(P)$	Nb.
<b>Indices rTraits</b>							
rRL	chr5_4015893	5	4015893	6,53			
rCRM	chr1_37105716	1	37105716	6,66	2		
	chr2_20528781	2	20528781	6,96			
	chr3_10773022	3	10773022	7,87			
	chr3_15608203	3	15608203	7,93		8,74	2
	chr3_37898112	3	37898112	7,25			
	chr4_8286629	4	8286629	7,12			
	chr5_21990833	5	21990833	7,08			
	chr5_35291334	5	35291334	7,04			
	chr8_41533444	8	41533444	7,21	3		
	rHAM	chr1_32440299	1	32440299	7,07		
chr2_17867449		2	17867449	7,07			
chr2_18396218		2	18396218	6,97			
chr2_27681521		2	27681521	7,08			
chr3_1158258		3	1158258	6,56	2		
chr3_11769647		3	11769647	7,93			
chr4_4863714		4	4863714	6,50			
chr4_29880865		4	29880865	6,53			
chr4_35996215		4	35996215	6,51			
chr5_13438310		5	13438310	6,92			
chr5_26855012		5	26855012	7,31			
chr5_35564353		5	35564353	7,75			
chr6_11857451		6	11857451	7,56			
chr6_13334941		6	13334941	6,83			
chr6_32285565		6	32285565	7,57	5	7,34	4
chr7_3530500		7	3530500	8,04			
chr7_12113705		7	12113705	7,36			
chr7_18732745	7	18732745	7,07				
rLM	chr1_8632060	1	8632060	7,96		7,51	1
	chr1_21297489	1	21297489	6,52			
	chr3_36641219	3	36641219	6,57			
	chr4_31944714	4	31944714	6,79			
	chr5_6553237	5	6553237	6,96			
	chr8_21579206	8	21579206	7,29			
	chr8_22522090	8	22522090	6,53			
<b>Indices rTraits-combinées</b>							
PC2	chr2_31672550	2	31672550	6,8			
PC3	chr7_20375462	7	20375462	6,73		6,53	

### ***III-3-Identification de nouveaux loci grâce à l'approche GWAS basée sur le modèle FarmCPU***

Les caractéristiques des SNPs associés à la performance des plantules en hétérotrophie et à leur réponse à l'absence de nitrate identifiés avec le modèle FarmCPU sont synthétisées dans les tableaux I-5 et I-6. Pour ce modèle, 16 et 13 SNPs ont été identifiés comme associés aux caractères de performance des plantules, respectivement en présence de nitrate et absence nitrate (Tableau I-5). Parmi ces SNPs, 8 sont communs aux deux modèles MLMM et FarmCPU. Certains de ces SNPs communs présentaient une significativité plus importante par rapport à ce qui a été trouvé pour le modèle MLMM (*i.e.* chr3\_40151017;  $-\log_{10}(P\text{-value}) = 18,7$  et  $7,13$ , respectivement par FarmCPU et par MLMM). Concernant les caractères de réponse à l'absence de nitrate (rTraits et rTraits-combinés), 45 SNPs ont été détectés, dont 4 communs avec le modèle MLMM (Tableau I-5). Par conséquent, la confrontation de ces deux modèles GWAS permet tout d'abord de confirmer des loci identifiés avec différentes résolutions et pouvoir de détection. Ensuite, cette investigation permet la détection de SNPs différents entre les deux modèles. Ces SNPs détectés grâce au modèle FarmCPU sont susceptibles d'être des faux négatifs dans le modèle MLMM et qui n'ont pas été détectés. Ce qui en conséquence, nous indique que la liste de SNPs (Tableau I-4) proposés comme associés aux caractères de performance des plantules et à leur réponse à l'absence de nitrate n'est pas exhaustive.



#### ***IV- Idées principales du chapitre I :***

La caractérisation des plantules de la core collection de *M. truncatula* à la température contrôlée a permis de mettre en avant les conclusions suivantes :

- Large diversité naturelle de la performance des plantules (*i.e.* allongement de la plantule et mobilisation de la biomasse de la graine) en condition de présence et d'absence de nitrate.
- Détection de loci associés à la performance des plantules en présence/ absence de nitrate par GWAS.
- Pertinence de l'utilisation d'indices de plasticité phénotypique simples (*i.e.* pour chaque caractère) et combinés (*i.e.* combinaison de caractères dérivés des axes de l'ACP) pour i) quantifier la réponse de la performance des plantules à l'absence de nitrate de chaque accession, ii) identifier des phénotypes pour les caractères adaptatifs pertinents pour l'installation des plantules en réponse à limitation d'azote au sein de la diversité génétique; iii) identifier les loci spécifique à cette réponse et des gènes candidats associés.
- Investigation de l'étendue du DL pour limiter la zone de recherche des gènes candidats à hauteur de 10 Kb.
- Mise en évidence de clusters de gènes codant pour des transporteurs de sucres (*e.g.* glucose) et des GSTs de la class tau associés à la réponse de l'allongement des plantules à l'absence de nitrate.
- Considération de l'analyse GWAS sous différents angles, pour confirmer la pertinence de détection de certain loci et de révéler de nouveaux loci.



## **Chapitre II : Exploration Des Caractéristiques Métaboliques Explicatives De La Croissance Hétérotrophe**

---



## ***I-Introduction***

La croissance hétérotrophe est un caractère complexe, impliquant de nombreux processus métaboliques. Une des possibilités pour disséquer ce caractère a été de réaliser un suivi des caractéristiques métaboliques liées à la performance des plantules (*i.e.* potentiel d'allongement des plantules et de mobilisation de la biomasse de la graine) lors de la croissance hétérotrophe.

Pour cela, une caractérisation détaillée est d'abord réalisée sur un sous-ensemble d'accessions de la core collection de *M. truncatula*. L'objectif a été d'explorer le statut azoté et carboné des graines et des plantules ainsi que le profil des plantules en anions inorganiques, lors de la croissance des plantules aux différentes conditions nutritives en interaction avec les comportements génotypiques. Cela est réalisé grâce à la détermination i) du statut azoté et carboné des graines et de leur composition isotopique en azote ii) de la croissance et du statut azoté et carboné des plantules au cours de la croissance hétérotrophe et iii) du profil des anions inorganiques dans les plantules à la fin de la croissance hétérotrophe. Ensuite, le statut azoté et carboné des graines ainsi que le profil anionique de la plantule sont explorés sur l'ensemble de la CC192. L'objectif a été d'explorer les comportements génotypiques de la CC192 pour ces caractéristiques métaboliques en lien avec la performance des plantules en réponse à la variation des conditions azotées. Pour répondre à cet objectif, des analyses multivariées (*e.g.* analyses de corrélation, ACPs...) sont réalisées en intégrant ces caractéristiques métaboliques. Enfin, les loci associés au statut azoté et carboné des graines ainsi qu'au profil anionique de la plantule sont recherchés. L'objectif étant d'identifier les loci qui co-contrôlent à la fois la performance des plantules et les caractéristiques métaboliques étudiées. Pour répondre à cet objectif, une analyse GWAS a porté i) sur le statut azoté et carboné des graines et de leur composition isotopique en azote et ii) sur le profil des anions inorganiques dans les organes en croissance à la fin de la croissance hétérotrophe.



## ***II-Matériel et méthodes***

### ***II-1-Matériels biologiques***

La variabilité naturelle de l'espèce de *M. truncatula* a été explorée via deux sets d'accessions. Dans un premier temps, plusieurs caractères physiologiques ont été déterminés dans les graines et/ou dans les organes de la plantule en cours de croissance hétérotrophe en présence et en absence de nitrate à la température contrôle (*i.e.* 17 °C), pour un panel réduit d'accessions. Nous avons tiré parti de l'existence de core collections emboîtées les unes dans les autres (Ronfort et al. 2006), pour sélectionner 4 accessions provenant de la CC16. Il s'agit des accessions « L000049 : SA09707 », « L000174 : SA28064 », L000550 : F11013-3 » et « L000648 : Salses42B ». En premier lieu, ces accessions présentent, des biomasses de graines (Tableau II-1) et des capacités d'allongement des hypocotyles et des racicules à l'obscurité contrastées. En second lieu, ces accessions présentent des différences significatives entre les deux régimes d'apport de nitrate (absence : N- et présence : N+) majoritairement pour longueur de la racicule. Les graines de chaque accession ont été collectées à partir de plantes cultivées en 2017 dans des conditions contrôlées en serre de l'IRHS-INEM à Angers (Lot de graines A17). Les graines de chaque accession ont été scarifiées de manière homogène, semées en boîtes de pétri puis disposées en salle verte à 17 °C pour l'imbibition. Après stratification à 4 °C, les boîtes de Pétri ont été transférées une nouvelle fois à 17 °C en salle verte pour la réalisation de la germination. Ensuite, les plantules de chaque accession ont été mises en petits pots à la serre, puis ont été repiquées dans des pots de 2 L et disposées en serre suivant un dispositif en deux blocs complets aléatoires. Le nombre de plantes mères mis en place était de 7, 40, 10 et 7 respectivement pour chacune des accessions L000049 ; L000174 ; L000550 et L000648. De même, pour la CC192, nous avons déterminé un ensemble de caractères en lien avec la graine (pourcentage en carbone, en azote et  $\delta^{15}\text{N}$ ), ainsi que des caractères liés aux plantules à la fin de la croissance (pourcentage en anions inorganiques). Les analyses réalisées sur la CC192 ont été effectuées à partir d'échantillons issus du même lot de graines que celui utilisé pour les expériences présentées dans le chapitre précédent.



## ***II-2-Protocoles expérimentaux et mesures***

### ***I-2-1-Croissance hétérotrophe de 4 accessions contrastées***

Nous avons suivi la croissance des plantules au cours du temps en hétérotrophie aux différentes conditions de nutrition azotée (*i.e.* en présence; 5 mM; et en absence de nitrate). Basé sur le protocole décrit dans le chapitre I, 50 graines par accession par réplicat biologique ont été scarifiées de manière homogène, imbibées dans l'eau pendant 3 h à 17 °C, stratifiées (4 jours à 4 °C) et mis à germination pendant 24 h à 17 °C à l'obscurité. Ensuite, dix plantules de longueur  $10 \pm 2$  mm ont été sélectionnées et transférées dans des boîtes en plastique ( $12 \times 12 \times 1,3$  cm) avec du papier filtre contenant un milieu MS modifié sans nitrate (N-), soit additionné de nitrate (5 mM KNO<sub>3</sub> :N+). Les boîtes ont été enveloppées de ParaFilm, inclinées à 85 degrés pour respecter le gravitropisme ascendant normal des plantules et placées à 17 °C en chambre verte. Les boîtes ont été organisées en deux blocs complets aléatoires contenant toutes les accessions et les deux conditions de nitrate (NC) pour chacun des jours de la croissance hétérotrophe, soit 216 boîtes (une boîte avec 10 plantules par accession, par NC et par jour). Des mesures de longueurs et de biomasses des organes ont été déterminées chaque jour du début jusqu'à la fin de la croissance hétérotrophe. Ainsi, les mesures des longueurs journalières ont permis de tracer des courbes de cinétiques d'allongements de ces organes, qui ont été modélisées grâce à la fonction Weibull (Équation II-1).

$$\text{Équation II – 1: } L(t) = \alpha \{1 - \exp[-(\beta t)^\gamma]\}$$

avec  $L(t)$  la longueur au temps  $t$ ,  $\alpha$  la longueur finale,  $\beta$  et  $\gamma$  les paramètres de la silhouette de la courbe. Le temps  $a$  a été calculé dès le transfert des jeunes plantules (*i.e.* en heures après transfert des plantules, HAT) dans le milieu nutritif avec ou sans nitrate. Ensuite, les mesures de biomasses journalières ont permis d'estimer la biomasse mobilisée depuis les graines jusqu'aux organes en croissance au cours du temps.

### ***I-2-2-Capacité respiratoire***

Dans notre étude, la biomasse perdue a été associée à la perte de biomasse par respiration. Cette dernière a été estimée par une mesure de la capacité respiratoire des organes



de la plantule en cours de croissance pour l'accession L000049 par oxygraphie grâce à l'Oxygraph DW1 associés au logiciel Oxygraph Plus v1.02 (Hansatech). Ces mesures ont été effectuées 30 min après le prélèvement d'échantillons de 5 à 10 mg de cotylédons, de l'hypocotyle et de la radicule. Les échantillons ont par la suite été découpés en morceaux d'environ 5 mm puis ont été placés dans la chambre de mesure contenant 1 mL de solution nutritive MS, sous agitation (600 rpm) et à l'obscurité. L'électrode à oxygène, a été réglée à 17°C pour simuler la température optimale de la croissance hétérotrophe. Pour chaque modalité testée, une courbe a été obtenue et sa pente détermine la vitesse de respiration (Annexe II-1). Les mesures ont été réalisées en triplicatas. A l'issue de chaque mesure, les échantillons ont été récupérés puis mis à sécher à l'étuve à 70 °C pendant 72 h et ont été pesées à l'Ultra Balance. Enfin, les pourcentages en oxygène en nmol/s obtenues par gramme de matières sèches pour chaque organe ont permis de reconstruire *in silico* la capacité respiratoire d'une plantule en hétérotrophie. Cette estimation de la capacité respiratoire a été réalisée au cours du temps (soit : J+0, J+2, J+6 et J+9 correspondants respectivement à 0, 49, 145 et 217 HAT).

### ***I-2-3- Estimation du statut carboné et azoté dans les graines et les plantules de *M. truncatula****

Nous avons mesuré en premier, le pourcentage d'azote et de carbone dans les graines pour les deux panels d'accessions. Ensuite, nous avons mesuré le pourcentage d'azote et de carbone dans les organes de la plantule au cours de croissance hétérotrophe pour le panel réduit d'accessions. Quatre points de mesures ont été choisis à partir des cinétiques de croissance des plantules au cours du temps pour faire ces mesures. La mesure du pourcentage d'azote et de carbone a été réalisée par milligramme de matière sèche de chacun des échantillons, 5 répétitions pour les graines et en triplicats pour les cotylédons, hypocotyles et radicules, en utilisant l'analyseur élémentaire FLASH 2000, en collaboration avec F. Chardon (équipe : SATURNE ; INRA, Versailles). Nous avons ensuite estimé les quantités (Équation II-2 et II-3) d'azote et de carbone dans les organes en croissance pour le panel des 4 accessions, et dans la graine pour l'ensemble des échantillons.

$$\text{Équation II - 2: } N_{mg} = \%N * MS$$

$$\text{Équation II - 3: } C_{mg} = \%C * MS$$



Ensuite, exclusivement pour le panel des 4 accessions, nous avons estimé le pourcentage d'azote et de carbone dans les organes puits (hypocotyle, racicule) par rapport à celui présent dans les organes sources (cotylédons) (Équation II-4 et II-5).

$$\text{Équation II - 4: } Part. N = \frac{N_{mg \text{ organe}}}{\sum N_{mg \text{ organes de la plantule}}}$$

$$\text{Équation II - 5: } Part. C = \frac{C_{mg \text{ organe}}}{\sum C_{mg \text{ organes de la plantule}}}$$

De même, nous avons estimé l'indice d'utilisation de l'azote endogène (Équation II-6) ou de l'azote endogène et exogène (Équation II-7) par les organes de la plantule au cours de la croissance hétérotrophe :

$$\text{Équation II - 6 : } UI_{endo} = \frac{N_{mg \text{ organe en N-}}}{N_{mg \text{ graine}}}$$

$$\text{Équation II - 7 : } UI_{endo+exo} = \frac{N_{mg \text{ organe en N+}}}{N_{mg \text{ graine}}}$$

avec,  $N(C)_{mg}$  la quantité d'azote ou de carbone en mg par organe, %N (C) le pourcentage en azote ou en carbone par milligramme de matière sèche MS : la biomasse sèche par organe en mg,  $Part_{N(C)}$  la répartition de l'azote ou du carbone dans les compartiments de la plantule.  $UI_{endo}$  et  $UI_{endo+exo}$ , respectivement l'indice d'utilisation de l'azote endogène seul et de l'azote endogène et exogène simultanément.

#### ***I-2-4-Estimation de la composition isotopique dans les graines***

L'azote des graines a plusieurs origines possibles, il peut provenir de la remobilisation depuis les organes en sénescence et/ou de l'acquisition d'azote exogène par la plante mère soit directement du sol soit *via* la fixation symbiotique de N<sub>2</sub> atmosphérique. L'abondance naturelle du <sup>15</sup>N étant différente entre ces sources d'azote, il est possible, par la mesure du δ<sup>15</sup>N des graines d'être renseigné sur l'origine de l'azote de la graine. L'objectif est de déterminer le lien possible entre la source d'azote des graines et la performance des plantules lors de la croissance hétérotrophe. Ainsi, nous avons mesuré la discrimination isotopique de l'azote dans les graines (δ<sup>15</sup>N) à l'aide d'un analyseur élémentaire couplé à un différentiateur d'origine AE-IRMS (FLASH 2000, Thermo Fisher), suivant l'équation II-8.



$$\text{Équation II - 8: } \delta^{15}\text{N} = \frac{\frac{^{15}\text{N}}{^{14}\text{N}} \text{échantillon} - \frac{^{15}\text{N}}{^{14}\text{N}} \text{standard}}{\frac{^{15}\text{N}}{^{14}\text{N}} \text{standard}}$$

### ***I-2-5-Mesures des anions inorganiques***

Nous avons mesuré le pourcentage en anions inorganiques dans la plantule en fin de croissance. L'objectif était de déterminer le lien entre la performance des plantules et le profil des anions inorganiques dans les organes de la plantule de *M. truncatula* à la fin la croissance. Dans ce cadre, un dosage des concentrations en anions nitrate, chlorure et phosphate a été réalisé sur des plantules provenant des deux sets d'accessions. Le dosage a été réalisé dans les deux conditions nutritives, sur les trois organes de la plantule (*i.e.* cotylédons, hypocotyle, racicule) pour le panel réduit d'accessions. Ensuite, le dosage a été élargi à l'ensemble de la CC192, sur l'hypocotyle et la racicule en condition d'azote optimale (N+). Pour chaque échantillon, deux réplicats comprenant 10 organes en moyenne sont utilisés. Les anions ont été extraits des matières sèches en additionnant 1 ml de méthanol à 80 % à 5–15 mg d'échantillons en poudre. Ces derniers sont chauffés au bain-marie à 76 °C durant 15 min. Le méthanol a été ensuite évaporé sous vide (SpeedVac) pendant 5h à 40 °C. Ensuite, le mélange est centrifugé pendant 3 min à 14 000 × g. Le surnageant a été prélevé et additionné à 500 µL et 1 ml d'eau ultrapure (qualité milliQ) en fonction du poids initial des échantillons. Ce dosage des anions a été effectué par HPLC-PAD dans une colonne échangeuse d'ions CarboPac (Dionex Corp., Sunnyvale, CA, USA). Un standard a été additionné afin de déduire la concentration en anions chlorure, nitrate et phosphate.

### ***I-2-6-Analyses statistiques***

À l'échelle du panel réduit d'accessions, des analyses de comparaison de moyennes ont été réalisées *via* des tests de Student afin de déterminer la différence entre les accessions, les conditions nitrate et les stades de croissance. Ensuite, à l'échelle de la core collection complète, les caractéristiques métaboliques étudiées (statut azoté et carboné des graines et des



plantules ainsi que le profil des plantules en anions inorganiques) ont été analysés *via* des ANOVA, afin de déterminer l'effet de plusieurs facteurs (accession, groupe de comportement...). De même, à l'échelle de la CC192, des tests de corrélation et des analyses multivariées ont été réalisés *via* des ACPs sur l'ensemble des caractères de la performance des plantules et des caractéristiques métaboliques étudiées. À partir de ces analyses multivariées, de nouveaux groupes de comportements physiologiques ont été identifiés. Enfin, nous avons recherché les loci associés aux caractéristiques métaboliques par GWAS. Les nouveaux loci ont été projetés sur la carte physique de *M. truncatula* avec les loci de la performance des plantules identifiés dans le chapitre I. L'ensemble des analyses statistiques (ANOVA, ACPs, GWAS...) a été réalisé grâce au logiciel R Studio, en utilisant les modèles statistiques et packages cités dans le précédent chapitre.

### ***III-Résultats***

#### ***III-1- Caractérisation du statut azoté et carboné des graines et des plantules pour un panel réduit d'accessions de *M. truncatula****

##### ***III-1-1- Caractéristiques liées à la graine***

Les accessions du petit panel ont été choisies sur la base de SM contrastées, avec et dans un ordre décroissant L000174, L000049, L000648 et L000550. Le tableau II-1, synthétise les valeurs moyennes du pourcentage d'azote (%N) et de carbone (%C) ainsi que la masse de la graine (SM) pour ces quatre accessions. Les résultats montrent que malgré la différence de la SM entre les accessions, il n'y a pas de différence génotypique pour le %N. Ainsi, à l'échelle de ce petit panel d'accessions aucun lien putatif ne peut être déduit entre la teneur en azote total des graines et la SM.

##### ***III-1-2- Caractéristiques liées à la plantule au cours du temps***

###### ***III-1-2-1- Croissance hétérotrophe***

###### ***III-1-2-1-1- Cinétique d'allongement de l'hypocotyle et de la radicule***

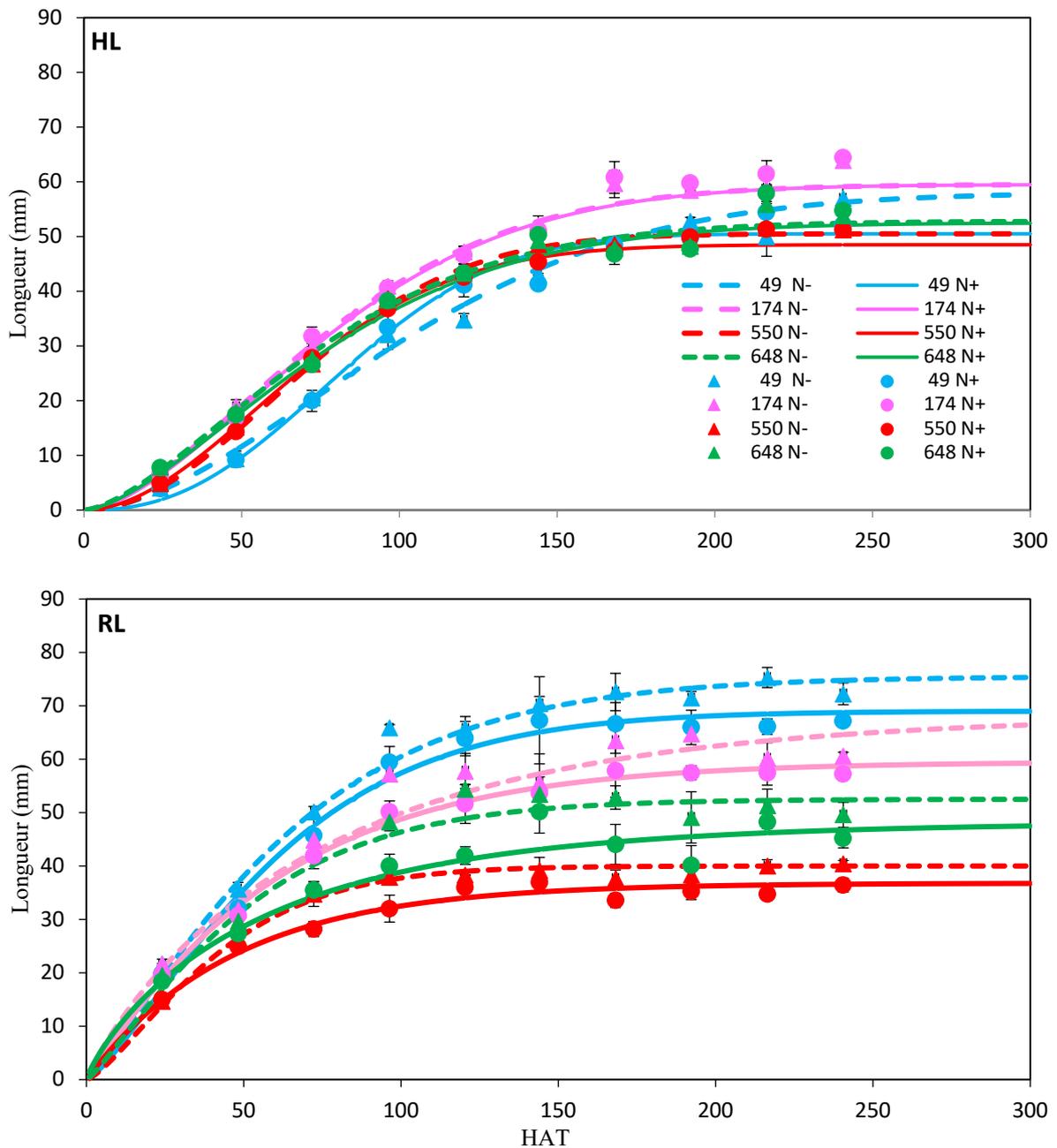
**Tableau II-1 : Moyennes de la biomasse et du pourcentage en azote et en carbone des graines des quatre accessions du panel réduit.** Biomasse moyenne des graines (SM), pourcentage en azote (%N) et en carbone (%C). †, \*, ~, Δ symboles représentant la différence statistiquement significative entre les accessions L000049 et L000550, L000174 et L000550, L000174 et L000648 et L000049 et L000648, respectivement. Seules les différences significatives *via* le test de « Student » avec  $P < 0,001$  sont considérées. Pour chacun des trois caractères, n (nombre de graines) = 5.

<b>Accessions</b>	<b>SM (mg)</b>	<b>%N (%)</b>	<b>%C (%)</b>
L000049	4,8 <sup>†</sup>	7,3	50,1 <sup>Δ</sup>
L000174	*5,4 <sup>~</sup>	7,6	49,9
L000550	*3,5 <sup>†</sup>	7,6	50,0
L000648	4,2 <sup>~</sup>	7,6	49,7 <sup>Δ</sup>

La mesure des longueurs de l'hypocotyle et de la racicule tout au long de la croissance hétérotrophe à la température contrôle (17 °C) en absence (N-) et en présence (N+) de nitrate pour les 4 accessions, a permis d'établir des cinétiques d'allongement de ces organes à l'obscurité (Figure II-1). Comme attendu, celles-ci ont une forme sigmoïdale avec un allongement lent au départ, puis une phase exponentielle d'allongement suivie d'un ralentissement de la vitesse jusqu'à atteindre un plateau correspondant à l'allongement maximal possible dans les conditions environnementales étudiées.

L'allongement des organes est comparé entre les accessions, les organes et les modalités d'azote. Dans un premier temps, nous observons que la variabilité génétique de la longueur des racines est plus importante que celle de l'hypocotyle. Par exemple, au plateau d'allongement, la longueur de l'hypocotyle (valeur mesurée) varie de 51,2 à 64,4 mm en N+ et de 51,2 à 63,9 mm en N- alors que celle de la racicule variait de 36 à 67 mm en N+ et 40 à 72 mm en N-. Ensuite, en condition N-, nous observons que les quatre accessions atteignent dans un ordre précis le plateau d'allongement de l'hypocotyle (*i.e.* L000174> L000049> L000648> L000550). Pour la racicule, quelle que soit la condition nutritive, le classement des accessions L000049 et L000174 est inversé. Ainsi, en condition N- à l'exception de L000049, l'ordre des performances des autres accessions est conservé, quel que soit l'organe en croissance.

L'allongement de l'hypocotyle n'est pas impacté par le changement de la condition azotée et ce pour les 4 accessions étudiées. Concernant cet allongement de l'hypocotyle, aucune différence significative n'est observée ni au cours, ni en fin de croissance hétérotrophe (sauf : L000174 à 49 HAT ; L000049 à 121 HAT et L000550 à 145 HAT). En revanche, l'allongement de la racicule est modifié par la condition azotée et cette modification est dépendante de l'accession. En effet, nous pouvons constater que la longueur de la racicule des accessions L000049 et L000174 augmente significativement en absence de nitrate dès 25 HAT, alors que pour L000550 et L000648 aucune différence n'est observée. Au plateau d'allongement, nous constatons que la longueur de la racicule est significativement supérieure en N- qu'en N+; de façon plus marquée qu'aux stades de début de croissance hétérotrophe; et ce pour les quatre accessions. De plus, au plateau d'allongement, l'absence de nitrate impacte dans un ordre d'importance, d'abord les accessions L000049 et L000174, ensuite L000550 et enfin L000648. Ces résultats suggèrent un possible lien entre le potentiel d'allongement de la racicule en absence de nitrate et l'intensité de réponse de la plantule à l'absence de nitrate.



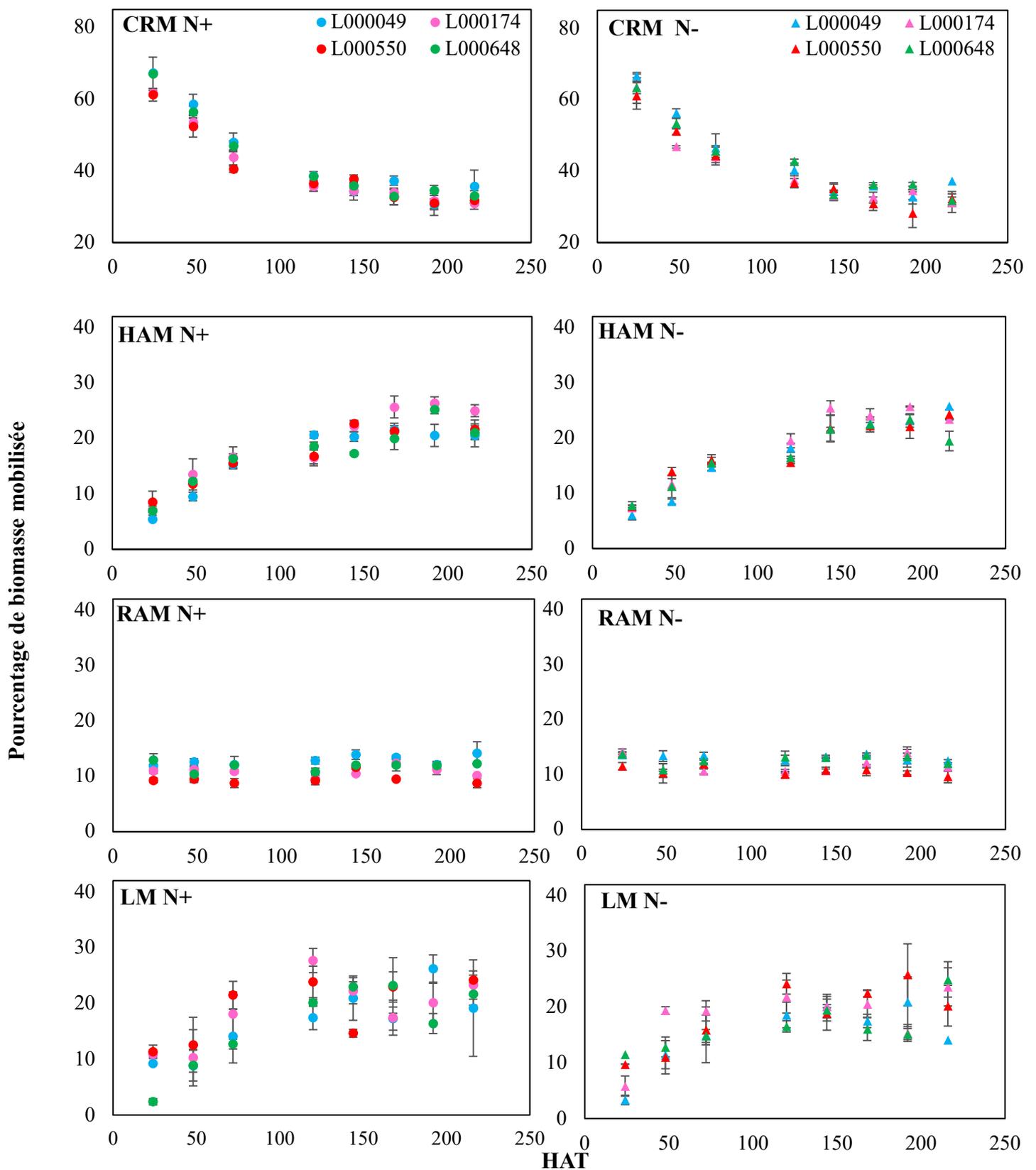
**Figure II-1** : Cinétiques d’allongement de l’hypocotyle (HL) et de la radicule (RL) en absence et en présence de nitrate à la température contrôlée (17°C) pour les quatre accessions du panel réduit. Les courbes sont une représentation modélisée grâce à la fonction Weibull des cinétiques d’allongement de chacune des accessions L000049 (bleu), L000174 (rose), L000550 (rouge) et L000648 (vert), en présence (N+ : trait plein) et en absence de nitrate (N- : pointillés). Les différents symboles (● : N+ et ▲ : N-) représentent les neuf points expérimentaux à 25, 49, 73, 97, 121, 145, 169, 193 et 217 heures après transfert (HAT). Chacun de ces points correspond à la moyenne  $\pm$  les SD (n= 3 répétitions biologiques x 10 plantules).

### ***III-1-2-1-2- Cinétique d'utilisation de la biomasse de la graine***

L'utilisation de la biomasse de la graine par les parties de la plantule a été estimée au cours de la croissance hétérotrophe à 17 °C pour les deux conditions de nitrate (N+ et N-). À partir de ces mesures, des courbes d'évolution de la mobilisation de la biomasse des graines dans les différents compartiments de la plantule et de la biomasse perdue sont établies (Figure II-2). Ces dernières montrent la même tendance générale quelle que soit la condition azotée ou l'accession. La biomasse résiduelle dans les cotylédons (CRM) diminue au cours du temps jusqu'à stabilisation à 145 HAT (*e.g.* pour L000550 : 37,7 % en N+ et 35,0 % en N-). En parallèle, la proportion de biomasse allouée à l'hypocotyle (HAM) augmente dès le début de croissance et se stabilise autour de 145 HAT (*e.g.* pour L000550 : 22,7 % en N+ et 21,7 % en N-) alors que la biomasse allouée à la radicule (RAM) atteint le plateau dès 25 HAT (*e.g.* pour L000550 : 9,3 % en N+ et 11,5 % en N-). Enfin, suivant la même tendance que HAM, la biomasse perdue (LM) augmente au début de croissance et se stabilise dès 121 HAT pour certains génotypes (*e.g.* pour L000550 : 23,9 % en N+ et 24,2 % en N-). Mais très peu de différences significatives sont observées pour ces caractères entre les deux conditions azotées. Les seules différences constatées concernent en premier lieu, la diminution significative du CRM en N- pour L000174 (*i.e.* 53,5 % N+ vs 46,8 % N-) et L000648 (*i.e.* 38,5 % N+ vs 42,8 % N-) respectivement à 49 HAT et 121 HAT. En second lieu, nous constatons une augmentation du HAM en N- pour L000648 à 145 HAT (*i.e.* 17,3 % N+ vs 21,6 % N-). De même, la RAM augmente en N- à 49 HAT pour L000550 (*i.e.* 9,5 % N+ vs 10,2 % N-), et à 145 HAT pour L000648 (*i.e.* 12,0 % N+ vs 13,5 % N-).

### ***III-1-2-1-3-Biomasse de la graine perdue et capacité respiratoire***

Lors des expériences réalisées précédemment en fin de croissance hétérotrophe sur la CC192, nous avons considéré que la biomasse perdue était liée à la respiration des plantules. Nous avons ici exploré l'évolution de la capacité respiratoire des plantules au cours de la croissance hétérotrophe afin de la comparer à l'évolution de la biomasse perdue (LM). Pour cela, nous avons mesuré la capacité respiratoire dans chaque compartiment de la plantule. Cela nous a permis de



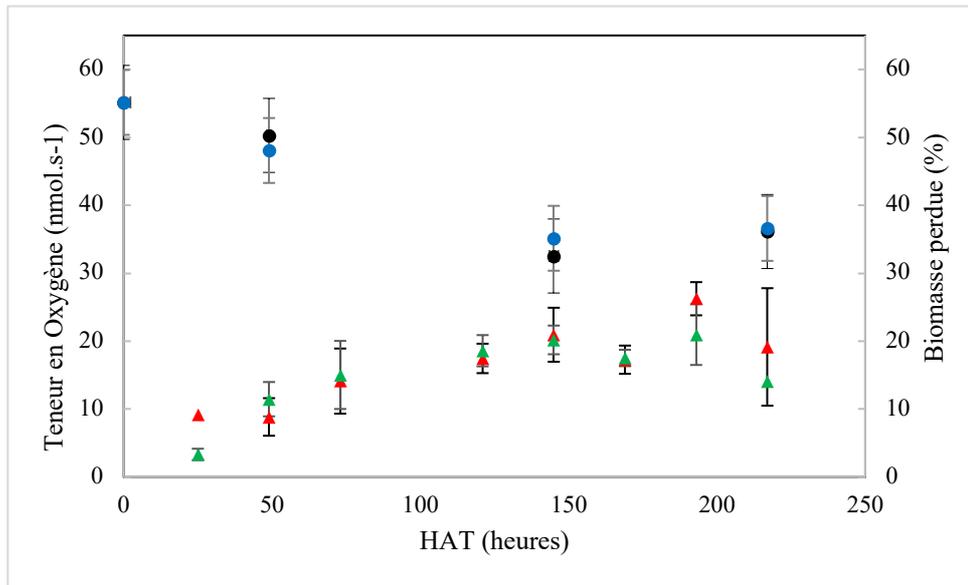
**Figure II-2** : Evolution de la mobilisation de la biomasse des graines au cours de la croissance hétérotrophe pour un panel de quatre accessions, L000049 (bleu), L000174 (rose), L000550 (rouge) et L000648 (vert) à 17 °C. CRM, biomasse résiduelle dans les cotylédons ; HAM, biomasse allouée à l’hypocotyle ; RAM, biomasse allouée à la radicule ; LM, biomasse perdue, en présence de nitrate (N+) et en absence de nitrate (N-). Les différents symboles (● : N+ et ▲ : N-) représentent les huit points expérimentaux correspondant à 25, 49, 73, 121, 145, 169, 193 et 217 HAT, ont été étudiés. Chacun de ces points représente la moyenne ± les SD (n= 3 répétitions biologiques x 10 plantules groupées).

reconstruire *in silico* (cumule de la capacité respiratoire de chacun des trois organes), la capacité respiratoire à l'échelle de toute la plantule en hétérotrophie et ce, pour l'accession L000049. Les mesures sont faites dans les deux conditions de nitrate contrastées à 0 HAT (au moment du transfert des plantules), à 49 HAT, à 145 HAT et 217 HAT (*i.e.* à la fin de la croissance hétérotrophe). Le résultat montre que, quelle que soit la condition nitrate, la capacité respiratoire est au maximum de sa valeur en début de croissance et que cette dernière diminue régulièrement jusqu'à 145 HAT (*e.g.* diminution en N<sup>+</sup> de 15 nmol d'O<sub>2</sub>/s entre 49 et 145 HAT).

Comme le montrent les courbes du LM (Figure II-3), l'évolution de la capacité respiratoire concorde bien avec l'évolution de la biomasse perdue. En effet, au début de la croissance hétérotrophe, la capacité respiratoire est à son maximum lorsque la biomasse perdue est en cours d'augmentation. Ensuite, à la fois la capacité respiratoire et la biomasse perdue sont stables au stade 150 HAT. De même, comme il est observé pour la biomasse perdue, la capacité respiratoire de l'accession L000049 ne dévoile aucune différence statistique entre les deux conditions nitrate. Ainsi, ces résultats montrent que quelle que soit la condition nitrate, la capacité respiratoire peut expliquer la variation de la biomasse perdue par la plantule.

### ***III-1-2-2- Statut carboné et azoté des plantules***

La cinétique d'allongement des plantules et de mobilisation de la biomasse au cours du temps permet de sélectionner trois stades clés de la croissance hétérotrophe. Selon les accessions, ces trois stades permettent de montrer des différences de comportement en réponse à l'absence de nitrate. Nous choisissons en premier le stade 49 HAT, qui permet de montrer des différences de comportements en absence de nitrate (*e.g.* pour l'accession L000174 pour HL, RL, CRM). Ensuite, nous choisissons le stade 150 HAT, aux environs duquel des différences de comportement en absence de nitrate sont également constatés (*e.g.* à 145 HAT : variation HAM et RAM pour l'accession L000648). Enfin nous choisissons le stade 217 HAT, qui marque la fin de la croissance et pour lequel l'ensemble des accessions montrent une variation du RL en absence de nitrate. Nous avons déterminé des caractères potentiellement explicatifs primaires de la croissance des plantules au cours du temps, à savoir, le statut carboné et azoté des compartiments de plantule en présence (N<sup>+</sup>) et en absence de nitrate (N<sup>-</sup>) pour les quatre accessions étudiées sur la base de ces trois stades.



**Figure II-3 :** Evolution de la capacité respiratoire des plantules et de la biomasse perdue au cours de la croissance hétérotrophe, avec et sans apport de nitrate, à la température contrôlée (17 °C) pour l'accession L00049. Pour la capacité respiratoire, quatre points expérimentaux correspondant respectivement à 0, 49, 145 et 217 HAT ont été étudiés dans les deux conditions (N+ ● et N- ●). Chacun point représente la moyenne  $\pm$  les SD ( $n = 3 \times 5$  organes groupés). Pour la biomasse perdue, huit points expérimentaux correspondant respectivement à 25, 49, 73, 121, 145, 169, 193 et 217 HAT ont été étudiés dans les deux conditions (N+ ▲ et N- ▲). Chaque point représente la moyenne  $\pm$  les SD ( $n = 3 \times 10$  organes groupés).

### ***III-1-2-2-1- Evolution du statut carboné et azoté au cours du temps***

Une estimation des pourcentages de C et N dans les compartiments de la plantule, nous permet de suivre son évolution depuis le début de la croissance hétérotrophe (Tableau II-2, II-3). Premièrement, en moyenne pour les quatre accessions, les résultats montrent que l'évolution de Part.C et Part.N suit la même tendance au cours du temps quelle que soit la condition nitrate (Tableau II-2). Les Part.C et Part.N diminuent dans les cotylédons (*e.g.* en N<sup>+</sup>: Part.C de 87,3 à 47,1 % et Part.N de 89,1 à 45,1 %). En parallèle, les Part.C et Part.N augmentent au cours de la croissance dans l'axe embryonnaire (hypocotyle et radicule) (*e.g.* en N<sup>+</sup>: Part.C de 12,7 à 52,9 % et Part.N de 10,9 à 54,9 %). Ensuite, l'observation %C et %N à l'échelle de chaque accession, montre, que ces deux éléments sont plus élevés dans les cotylédons (*e.g.* en N<sup>+</sup> : 43 % de C et 9 % de N) que dans l'hypocotyle et la radicule, pour lesquels le %C, est de même ordre de grandeur (*e.g.* en N<sup>+</sup> : 35 % de C). Ensuite, nous constatons que le %C diminue significativement au cours du temps dans tous les compartiments de la plantule dans toutes les conditions, alors que le %N au cours du temps dépend de l'organe, de l'accession et de la condition nutritive. Mais globalement, ces évolutions Part.C et Part.N ainsi que %C et %N dans les compartiments de la plantule concordent bien avec l'évolution de la mobilisation de la biomasse de la graine et l'allongement de la plantule.

### ***III-1-2-2-2- Evolution du statut carboné et azoté en interaction avec la disponibilité en nitrate***

Nous constatons que la condition azotée du milieu affecte significativement la répartition de N et de C dans la plantule en fonction du stade de croissance (Tableau II-2). Les différences apparaissent tardivement, après 150 HAT. Les Part.C et Part.N dans les cotylédons sont significativement plus faibles en absence de nitrate par rapport à sa présence (*i.e.* Part.C: 47,1 % N<sup>+</sup> vs 39,5 % N<sup>-</sup> et Part.N: 45,1 % N<sup>+</sup> vs 35,1 % N<sup>-</sup>) et plus élevées dans l'axe embryonnaire (*i.e.* Part.C: 52,9 % N<sup>+</sup> vs 60,5 % N<sup>-</sup> et Part.N: 54,9 % N<sup>+</sup> vs 64,9 % N<sup>-</sup>). De même, l'observation de l'évolution des %C et %N de la plantule à l'échelle de chaque accession montre des différences liées à la condition azotée du milieu (Tableau II-3). Concernant le %C, nous constatons que sa diminution dans

**Tableau II-2 :** Évolution en pourcentage de la répartition du carbone et de l'azote entre les cotylédons et l'axe embryonnaire au cours du temps, en présence (N+) et en absence de nitrate (N-). Chaque point correspond à la moyenne des mesures réalisées sur les quatre accessions L000049, L000174, L000550 et L000648 (n = 3 x échantillon groupés). Le niveau de significativité pour la différence significative constatée entre les conditions N+ et N- : \*\*\*  $P < 0,001$  ; \*\*  $P < 0,01$  ; ns, non significatif.

Caractères	HAT	Cotylédons		Axe embryonnaire	
		N+	N-	N+	N-
Carbone (%)	0	87,3	87,3	12,7	12,7
	49	66,9	67,9	33,1	32,1
	145	49,4	47,5	50,6	52,5
	217	47,1***	39,5***	52,9***	60,5***
Azote (%)	0	89,1	89,1	10,9	10,9
	49	69,8	74,0	30,2	26,0
	145	47,2	47,3	52,8	52,7
	217	45,1***	35,1***	54,9***	64,9***

les cotylédons au cours du temps s'accroît en absence de nitrate à la fin de la croissance pour l'ensemble des accessions sauf pour L000648. Le %C diminue au cours du temps dans l'hypocotyle et dans la radicule mais de manière moins prononcée en absence de nitrate. Une différence significative de l'absence de nitrate est observée dans l'hypocotyle pour l'accession L000049 à 217 HAT et dans la radicule pour l'accession L000648 à 150 HAT.

Les résultats obtenus pour le %N sont différents par rapport à ceux obtenus pour le %C. En premier, pour les cotylédons, en condition N+, le %N des cotylédons reste stable au cours de la croissance, alors qu'en N- elle diminue pour les accessions L000550 et L000648. Ensuite, le %N de l'hypocotyle augmente en particulier en début de croissance, alors que celle de la radicule a tendance à diminuer. La radicule présente ponctuellement des différences significatives du %N entre les deux conditions nutritives. Par conséquent, les différences d'allongement de la plantule et de mobilisation de la biomasse de la graine liées à l'absence de nitrate observées, sont probablement expliquées par la différence de mobilisation des réserves vers l'axe embryonnaire en croissance en particulier les réserves azotées.

### ***III-1-2-2-3- Evolution de l'indice d'utilisation de l'azote par l'axe embryonnaire***

Étant donné qu'en hétérotrophie nos plantules sont soumises à deux sources d'azote, l'une endogène (réserves de la graine) et l'autre exogène (nitrate du milieu), nous avons estimé un indice d'utilisation des différentes formes d'azote par les organes de plantule (Figure II-4). Globalement à l'échelle de l'ensemble des accessions et quelle que soit l'origine de l'azote, l'indice d'utilisation de l'azote (UI) augmente pour l'axe embryonnaire en concordance avec sa diminution dans les cotylédons au cours de la croissance hétérotrophe. Bien que, l'augmentation du UI de l'axe embryonnaire soit commune à toutes les accessions, son intensité diffère selon les accessions. Le UI du L000049 se distingue significativement de celui des accessions L000174 (N+) et L000648 (N-) à 49 HAT, ainsi que de celui de des accessions L000550 (N-) et L000648 (N-) à 217 HAT. Ces résultats suggèrent que l'utilisation de l'azote par l'axe embryonnaire au cours du temps de l'accession L000049 est globalement plus importante que celle des autres accessions. De plus, l'évolution de l'indice d'utilisation de l'azote correspond davantage aux cinétiques d'allongement des organes car il continue d'évoluer même après 150 HAT pour l'ensemble des accessions.

**Tableau II-3** : Pourcentage en carbone et en azote observés au cours de la croissance hétérotrophe dans les différents organes de la plantule (cotylédons, hypocotyle et radicule) pour les quatre accessions étudiées, en présence (N+) et en absence de nitrate (N-). <sup>1</sup> représente les trois stades de mesure 49, 150 et 217 HAT des plantules dans un milieu contenant (N+) ou non (N-) du nitrate. <sup>2, 3</sup> représentent respectivement la moyenne des pourcentages de carbone et d'azote observés en N+ et N- (n=3 x échantillon groupés). Les moyennes sont suivies de symboles représentant le résultat du test de « Student », réalisé pour chaque accession, montrant la différence entre les conditions de nitrate (<sup>a/b</sup>) et la différence entre deux stades de croissance (\*).

Organes	Accessions	HAT <sup>1</sup>	Carbone (%) <sup>2</sup>		Azote (%) <sup>3</sup>	
			N+	N-	N+	N-
Cotylédons	L000049	49	45,3*	43,9*	8,6	9,0
		150	41,1*	40,9*	8,1	8,2
		217	42,8	40,1	8,5	7,8
	L000174	49	43,6*	44,1	<sup>a</sup> 9,1	<sup>b</sup> 10,2
		150	40,7*	41,4	9,0	9,1
		217	39,4	37,2	9,5	8,3
	L000550	49	45,9*	45,0*	<sup>a</sup> 9,1	<sup>b</sup> 10,0
		150	42,6*	41,7*	9,2	9,6*
		217	42,2	37,9*	<sup>a</sup> 9,5	<sup>b</sup> 8,3*
	L000648	49	45,1	44,5	<sup>a</sup> 8,7	<sup>b</sup> 10,1
		150	43,1	41,4*	9,5	9,7*
		217	<sup>a</sup> 41,3	<sup>b</sup> 36,5*	<sup>a</sup> 9,9	<sup>b</sup> 7,9*
Hypocotyle	L000049	49	38,1	39,9	6,4*	6,8
		150	34,2	36,5	8,3*	8,4
		217	<sup>a</sup> 32,4	<sup>b</sup> 35	9,5	9,8
	L000174	49	40,1*	38,1	7,0*	6,9*
		150	32,3*	32,0	9,2*	8,4*
		217	32,9	34	8,9	9,9*
	L000550	49	39,2	40,1*	6,6	6,7*
		150	35,9	35,5*	9,0	9,0*
		217	32,7	34,9	9,8	10,0
	L000648	49	37,7*	37,8	6,9*	6,4*
		150	31,3*	33,9	8,9*	9,4*
		217	30,5	33,2	9,5	9,8
Radicule	L000049	49	38,7	37,8	6,5	6,0*
		150	35,5	35,6	<sup>a</sup> 5,8	<sup>b</sup> 5,1*
		217	34,4	33,4	5,5	5,5
	L000174	49	36,4	38,0*	6,4	7,0*
		150	34,7	33,8*	5,7	5,9*
		217	33,3	33,4	5,8	6,3
	L000550	49	35,6	36,6	5,7	5,6
		150	34,2	35,4	5,4	5,4
		217	32,8	36,3	<sup>a</sup> 5,9	<sup>b</sup> 5,0
	L000648	49	38,9*	37,0	<sup>a</sup> 6,9*	<sup>b</sup> 5,6
		150	<sup>a</sup> 30,3*	<sup>b</sup> 33,9	5,0*	5,5
		217	33,3	33,0	5,2	5,5

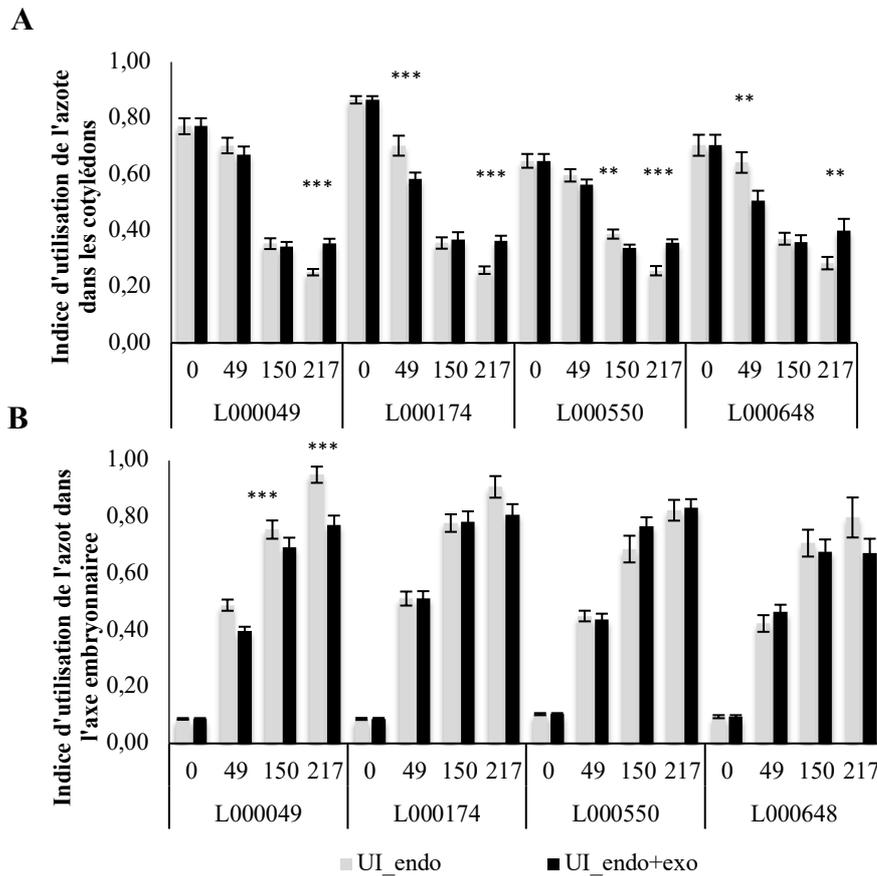
En outre, nous avons analysé la différence statistique entre l'indice d'utilisation de l'azote endogène ( $UI_{\text{endo}}$ ) et l'indice d'utilisation de l'azote endogène et exogène ( $UI_{\text{endo+exo}}$ ) (Figure II-4). En moyenne, au début de la croissance (49 et 150 HAT), les accessions L000174, L000550 et L000648 mobilisent plus d'azote depuis les cotylédons en présence d'azote exogène et inversement à la fin de la croissance hétérotrophe (à 217 HAT). Quel que soit le niveau de mobilisation de l'azote, les deux sources d'azote contribuent de la même façon à la croissance de l'axe embryonnaire pour ces trois accessions. Mais pour l'accession L000049, on observe qu'au stade (217 HAT), l'absence d'azote exogène favorise plus la mobilisation de l'azote depuis les cotylédons vers l'axe embryonnaire qu'en présence d'azote exogène (*i.e.* pour l'axe embryonnaire à 217 HAT  $UI_{\text{endo}} > UI_{\text{endo+exo}}$ ; figure II-4). Ainsi, pour le cas de l'accession L000049, la présence de l'azote exogène (Nitrate) a probablement un effet stimulateur sur la mobilisation de l'azote des cotylédons au début de la croissance et a l'effet inverse à la fin de la croissance, au détriment de la croissance de l'axe embryonnaire. De ce fait, selon les accessions, il existe probablement différentes utilisations des sources d'azote pour répondre aux besoins de croissance de l'axe embryonnaire.

### ***III-1-3- Composition isotopique du $\delta^{15}\text{N}$ dans la graine***

Nous avons exploré la composition isotopique  $\delta^{15}\text{N}$  dans la graine à l'échelle du petit panel des quatre accessions. Le résultat principal de cette investigation montre qu'il existe une différence significative dans le comportement des accessions concernant la discrimination des formes d'azote dans les graines. En effet, comme le montre la figure II-5, l'accession L000049 se distingue par un  $\delta^{15}\text{N}$  significativement plus élevé (0,8) que celui des accessions L000174 (-2,4) et L000550 (-1,7). Autrement dit, contrairement aux autres accessions, L000049 effectue une discrimination isotopique en défaveur de l'isotope lourd  $^{15}\text{N}$  par rapport au  $^{14}\text{N}$  probablement lors du développement des graines.

### ***III-1-4- Anions inorganiques dans la plantule***

Globalement, au niveau des quatre accessions, les concentrations en anions inorganiques à la fin de la croissance hétérotrophe sont différentes selon le compartiment de la plantule (Figure II-6). Quelle que soit la condition nitrate, les concentrations les plus élevées en anions



**Figure II-4.** Evolution de l'indice d'utilisation de l'azote (UI) endogène (absence d'azote exogène ; barre grise) et de l'azote endogène+exogène (présence d'azote exogène ; barre noire) dans les cotylédons (A) et l'axe embryonnaire (B) aux stades 0, 49, 150 et 217 HAT. Chaque barre représente pour chacune des quatre accessions, L000049, L000174, L000550 et L000648 représentent la moyenne des mesures  $\pm$  SE (n=3). Les astérisques représentent le résultat du test de « Student » montrant la différence entre UI endogène et UI endogène+exogène pour chaque accession. Le niveau de significativité est indiqué comme suit : \*\*\*  $P < 0,001$  ; \*\*  $P < 0,01$  ; ns, non significatif.

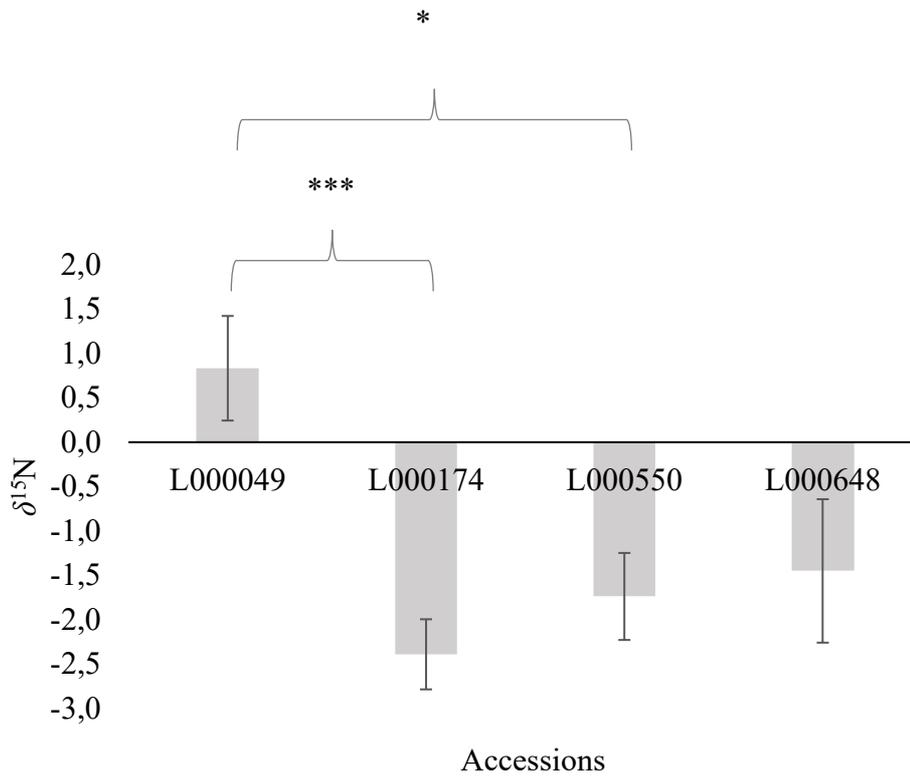
chlorure et nitrate sont dans l'hypocotyle (*e.g.* N+: 55 et 76 mg/g respectivement de Cl<sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), puis dans la radicule (*e.g.* N+: 13 et 27 mg/g respectivement de Cl<sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) et enfin dans les cotylédons (*e.g.* N+: 1 et 2 mg/g respectivement de Cl<sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). En revanche, quelle que soit la condition nitrate, aucune différence n'est constatée pour la concentration en anion phosphate entre les trois organes (*e.g.* concentration moyenne en N+ de 44 mg/g de PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>).

De plus, les concentrations en anions inorganiques varient en fonction des conditions nutritives. En premier, les concentrations en nitrate sont significativement plus élevées dans les trois compartiments de la plantule en situation d'apport de nitrate (*e.g.* pour hypocotyle : en N+ 75,8 vs en N- 11,1 mg/g de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). De même en situation d'apport de nitrate, les concentrations en chlorure sont significativement plus élevées dans les cotylédons (*i.e.* en N+ 2,4 vs en N- 0,7 mg/g de Cl<sup>-</sup>). En revanche, quel que soit le compartiment de la plantule, la variation de la condition nutritive azotée ne modifie pas leurs concentrations en anion phosphate. Enfin, les accessions présentent des différences de pourcentages en anions inorganiques. A titre d'exemple pour l'hypocotyle quel que soit la condition nutritive (NC), l'accession L000648 se distingue avec la concentration la plus élevée en anions inorganiques par rapport aux autres accessions et inversement pour le L000174.

### ***III-2- Caractérisation du statut azoté et carboné des graines et des plantules à l'échelle de la CC192***

#### ***III-2-1-Variation naturelle des caractéristiques liées la croissance hétérotrophe***

Compte tenu des résultats obtenus pour le panel réduit d'accessions et de leur pertinence, la majorité des caractères sont explorés pour la CC192. Ces caractères représentent, le statut azoté (*i.e.* %N, δ<sup>15</sup>N) et carboné (%C) des graines, ainsi que le profil des anions inorganiques dans les organes en croissance (*e.g.* hypocotyle, radicule). Ces caractères sélectionnés révèlent une large variabilité génétique naturelle (Tableau II-4), avec un effet accession significatif, à l'exception du pourcentage en nitrate dans la radicule (N<sub>r</sub>). Le pourcentage en carbone pouvait atteindre jusqu'à 60 % de la masse. La graine se distingue également par un pourcentage non négligeable d'azote pouvant atteindre



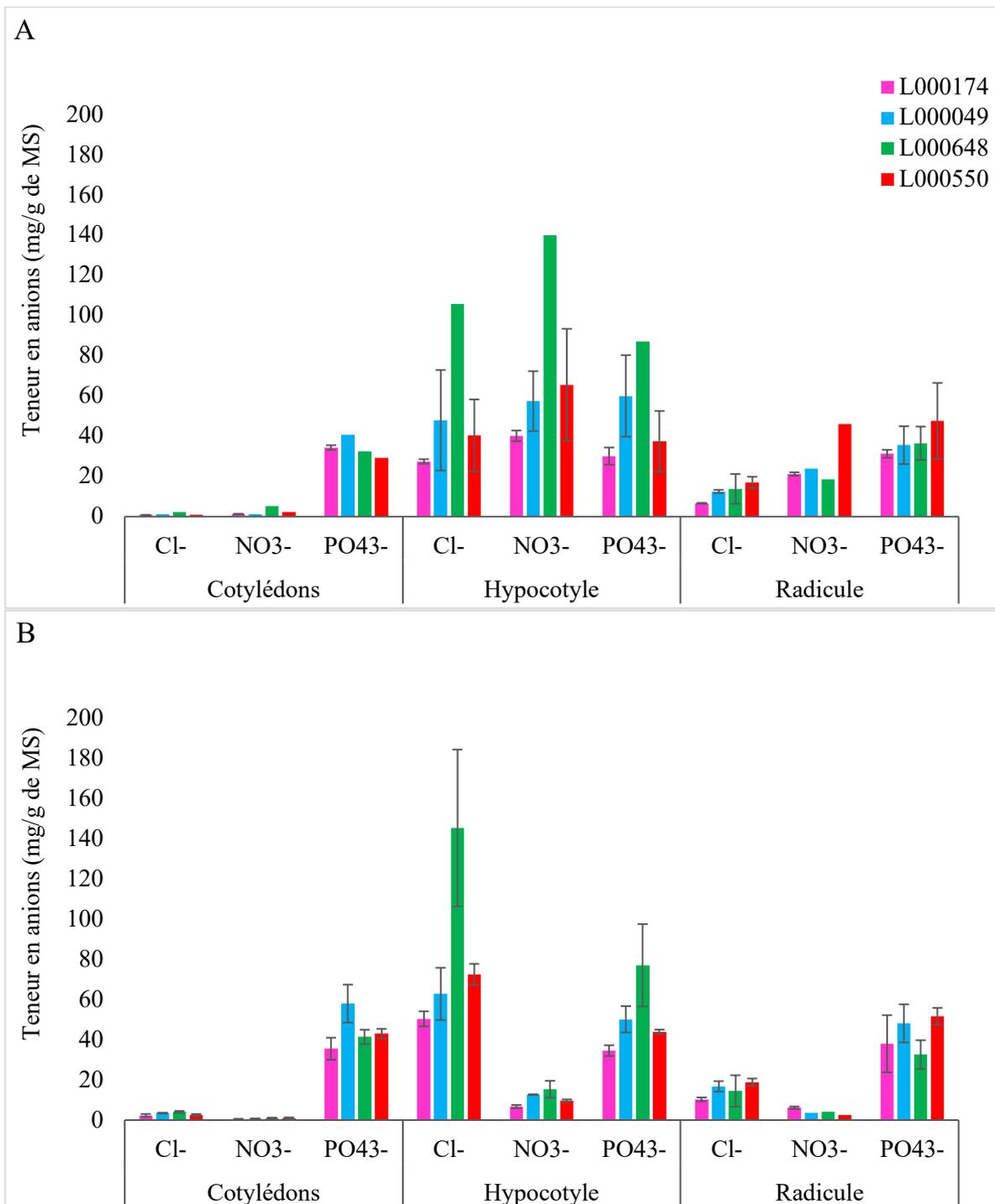
**Figure II-5.**  $\delta^{15}\text{N}$  dans les graines des accessions L000049, L000174, L000550 et L000648. Chaque valeur correspond à la moyenne du  $\delta^{15}\text{N}$  mesuré  $\pm$  SE, n=5 graines. La différence statistique entre  $\delta^{15}\text{N}$  des accessions L000049 et L000174 et des accessions L000049 et L000550 est indiquée par les astérisques suivant les niveaux de significativités : \*\*\*,  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; ns, non significatif.

jusqu'à 9 % pour certaines accessions. Parallèlement à la variabilité de la masse de la graine présentée dans le chapitre I, chacune des quantités d'azote et de carbone de la graine varie significativement en fonction des accessions (0,2 à 0,7 mg pour le N et 1,5 à 4,5 mg pour le C). Concernant les anions inorganiques en fin de croissance, une large gamme de variabilité génétique est observée que ce soit dans l'hypocotyle (*e.g.* 15 à 56 % de phosphate) ou la radicule (*e.g.* 20 à 89 % de phosphate). En plus, des variations liées aux accessions, les pourcentages en anions inorganiques varient aussi en fonction du compartiment de la plantule à la fin de la croissance hétérotrophe. Les pourcentages en anions nitrate et chlorure sont plus importants dans l'hypocotyle que dans la radicule et inversement pour l'anion phosphate.

### ***III-2-2- Relation entre les caractéristiques métaboliques étudiées et la performance des plantules***

Afin d'identifier les liens physiologiques putatifs entre les caractéristiques métaboliques étudiées (Tableau II-5) et la performance des plantules aux différentes conditions azotées, des corrélations phénotypiques ont été recherchées dans un premier temps (Annexe II-2). Plusieurs corrélations positives sont mises en avant. Celles-ci sont fortes entre la quantité d'azote, la quantité de carbone et la masse de la graine (Tableau II-5 ;  $r^2 > 0,97$ ). Des corrélations plus modestes sont mises en avant entre la quantité d'azote et le pourcentage d'azote d'une part, ainsi qu'entre le pourcentage en carbone et le pourcentage en azote d'autre part. Les anions inorganiques mesurées en fin de croissance hétérotrophe en présence de nitrate, sont également fortement corrélées, quel que soit l'organe étudié.

Par ailleurs, il existe peu de corrélations entre les caractéristiques métaboliques étudiées et la performance des plantules. Parmi ces corrélations, on observe que l'allocation de biomasse de la graine à l'hypocotyle (HAM N+) est corrélée à la fois à %N dans la graine et  $P_h$  en fin de croissance hétérotrophe. Autrement dit, en présence de nitrate l'allocation de la biomasse de la graine à l'hypocotyle peut dépendre du pourcentage initial en azote et influencer le pourcentage en phosphate dans cet organe. De même, l'allocation de la biomasse de la graine à la radicule est corrélée au pourcentage en anion chlorure dans la radicule.



**Figure II-6 :** Pourcentage en anions nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), chlorure (Cl<sup>-</sup>) et phosphate (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) dans les trois compartiments de la plantule (cotylédons, hypocotyle et radicule) à la fin de la croissance hétérotrophe réalisée en présence (A) et en absence (B) de nitrate. Les barres verticales représentent la moyenne des mesures ( $\pm$  SD, n= 2) pour les accessions L000049 (bleu), L000174 (rose), L000550 (rouge) et L000648 (vert).

Dans un deuxième temps, la relation entre les physiotypes de réponse à l'absence de nitrate révélés précédemment (Chapitre I; Tableau I-3) et les caractéristiques métaboliques étudiées a été recherchée. Pour cela, nous avons évalué s'il existait des différences significatives entre les groupes d'accessions caractérisant les différents physiotypes pour chaque caractère lié à la graine, *i.e.* masse de la graine, pourcentage et quantité en azote et en carbone. Aucune des caractéristiques métaboliques étudiées ne différencie les physiotypes déterminées précédemment (Tableau I-3). Ces résultats nous ont incité à réaliser de nouvelles analyses multivariées intégrant les caractéristiques métaboliques étudiées afin d'obtenir une vue globale des corrélations entre ces caractères et celles associées à la performance des plantules, et de rechercher l'existence de nouveaux physiotypes.

### ***III-2-3-Les caractéristiques métaboliques étudiées permettent une nouvelle distinction des physiotypes***

Nous avons réalisé une ACP en intégrant, d'une part les caractéristiques métaboliques étudiées, et d'autre part les caractères de la performance des plantules en présence de nitrate (Figure II-7). Les cinq premiers axes de l'ACP expliquent 69 % de la variance phénotypique totale. L'axe 1 explique environ 18 % de la variation globale. Il est positivement corrélé aux caractères  $P_h$ ,  $N_h$ ,  $C_h$  et LM et négativement corrélé à CRM et HAM. L'axe 2 explique environ 16 % de la variation et les accessions sont séparées en fonction de la RAM (positivement corrélée), et la SM, RL, HL et LM (négativement corrélées). L'axe 3, explique environ 15 % de la variation et les accessions se séparent en fonction de l'HAM (positivement corrélée), et  $N_r$ ,  $P_r$  et  $C_r$  (négativement corrélée). L'axe 4 de l'ACP explique environ 12 % de la variation globale. Il est négativement corrélé aux caractères RL, RHL,  $N_h$  et  $C_h$ . Enfin, l'axe 5 explique environ 9 % de la variation et sépare les accessions en fonction des caractères RHL, %C et %N (haut du point d'intersection) ainsi qu'en fonction de HL, HAM et  $P_r$  (bas du point d'intersection).

Grâce à la distribution des accessions le long des composantes principales de l'ACP, une nouvelle structuration de la diversité naturelle est établie par le biais de la méthode des K-means. Les accessions sont subdivisées en trois groupes de comportement physiologique (P). Globalement, ces accessions se séparent à la fois en fonction des caractéristiques d'allongement et de mobilisation de la biomasse de la graine ainsi qu'en fonction des caractéristiques métaboliques étudiées (Figure II-7, Tableau II-6). Le groupe P1 (vert), assure l'allongement de la plantule et se distingue des autres physiotypes par de plus fortes valeurs de CRM et HAM ainsi que de plus faibles valeurs de LM, %N,  $N_h$ ,  $P_h$  et  $C_h$ . Ainsi, malgré un pourcentage en azote faible dans les graines, les accessions du P1,

**Tableau II-4 :** Moyenne des caractéristiques potentiellement explicatives de la croissance hétérotrophe à l'échelle de la CC192. Les caractères sont (A) pourcentage en azote (%N) et carbone (%C) dans la graine en %, masse de la graine en mg (SM), quantité d'azote ( $N_{mg}$ ) et de carbone ( $C_{mg}$ ) en mg. (B) Delta  $^{15}N$  dans les graines ( $\delta^{15}N$ ); composition en anions inorganiques de l'axe embryonnaire à la fin de la croissance hétérotrophe en présence de nitrate 5 mM ( $N^+$ ) : pourcentage en anions nitrate  $NO_3^-$  ( $N_h$ ), chlorure  $Cl^-$  ( $C_h$ ), phosphate  $PO_4^{3-}$  ( $P_h$ ) dans l'hypocotyle et pourcentage en anions nitrate  $NO_3^-$  ( $N_r$ ), chlorure  $Cl^-$  ( $C_r$ ), phosphate  $PO_4^{3-}$  ( $P_r$ ) dans la radicule. <sup>1</sup>Moyennes sur toute la collection pour les caractères représentent les caractéristiques primaires potentiellement explicatives de la croissance hétérotrophe ( $n= 3 \times 5$  graines) et les caractéristiques potentiellement explicatives secondaires de la croissance hétérotrophe ( $n= 2 \times 10$  organes). Suivi des seuils de significativité pour l'effet génotype : \*\*\*,  $P < 0,001$  ; \*\*  $P < 0,01$  ; ns, non significatif. <sup>2</sup>valeurs minimale et maximale pour chaque caractère. <sup>a</sup> et <sup>b</sup> groupes SNK après Anova de l'effet de l'organe.

Caractères	Moy <sup>1</sup>	Min-Max <sup>2</sup>
<b>A</b>		
%N (%)	7,6***	5,9/9,2
%C (%)	49,3***	45,1/60,4
SM (mg)	5,1***	3,4/7,6
$N_{mg}$ (mg)	0,4***	0,2/0,7
$C_{mg}$ (mg)	2,5***	1,5/4,5
<b>B</b>		
$\delta^{15}N$	-1,6***	-7,3 / 2,1
$N_h$ (%)	<sup>a</sup> 46,6***	21,1/84,9
$C_h$ (%)	<sup>a</sup> 29,8***	9,6/45,9
$P_h$ (%)	<sup>a</sup> 34,5***	14,7/56,1
$N_r$ (%)	<sup>b</sup> 21,3	8,2/37,4
$C_r$ (%)	<sup>b</sup> 8,1***	3,5/18,8
$P_r$ (%)	<sup>b</sup> 41,9***	20,4/89,2

favorisent la croissance de leur hypocotyle avec une importante allocation de la biomasse et utilisation des ressources N, P et C. Les accessions du groupe P2 (rose), présentent une biomasse de la graine (SM) et un allongement des organes (HL, RL) plus élevés avec une faible allocation de la biomasse à la radicule (RAM) que les autres groupes d'accessions. Pour ce groupe, comme les  $N_h$  et  $P_h$  sont élevées, ces accessions pourraient être capables de favoriser l'allongement de l'hypocotyle par la mobilisation des réserves de la graine mais moins par l'utilisation du nitrate et phosphate. Enfin, les accessions du groupe P3 (violet) se distinguent par de fortes LM, %C,  $N_h$ ,  $C_h$ ,  $P_h$  et de faibles RL, CRM, HAM. Ce groupe d'accessions perd une grande partie de la biomasse de la graine mobilisée. Il n'est pas efficace pour allouer cette biomasse mobilisée aux organes en croissance et pour utiliser les anions inorganiques.

### ***III-2-4- La composition isotopique $\delta^{15}N$ dans la graine est une caractéristique explicative de l'allongement de la radicule***

Dans cette partie de l'étude nous avons déterminé le  $\delta^{15}N$  dans les graines de la CC192 (Tableau II-4). En premier lieu, la large variabilité génétique et l'effet accession très hautement significatif du  $\delta^{15}N$ , suggèrent une variabilité génétique de la discrimination isotopique de l'azote lors du développement de la graine chez *M. truncatula*. De plus, la gamme de variabilité révélée montre que certaines accessions font une discrimination isotopique en défaveur de l'isotope lourd  $^{15}N$  par rapport au  $^{14}N$  (valeur du minimum : -7,3) alors que d'autres ne discriminent pas, ou discriminent en défaveur de l'isotope léger  $^{14}N$  (valeur du maximum : +2,1). Ainsi, selon les accessions différentes sources d'azote auraient été utilisés lors du développement de la graine chez *M. truncatula*.

En second lieu, le  $\delta^{15}N$  et la performance des plantules ne montrent pas de lien de corrélation évident lors des analyses de corrélation et multivariées précédentes. En particulier, il n'existe aucune corrélation entre le  $\delta^{15}N$  des graines et les caractères de mobilisation de la biomasse dans les plantules. Ce qui suggère que la redistribution de la biomasse de la graine dans la plantule est indépendante du processus de composition isotopique de l'azote dans la graine. Pour les caractères d'allongement de la plantule, les résultats montrent que l'allongement de l'hypocotyle n'est pas corrélé au  $\delta^{15}N$ . En revanche une corrélation positive faible entre le  $\delta^{15}N$  des graines et l'allongement de la radicule (RL) est observée quelle que soit la condition environnementale (Annexe II-2,  $0,21 < r < 0,31$ ).

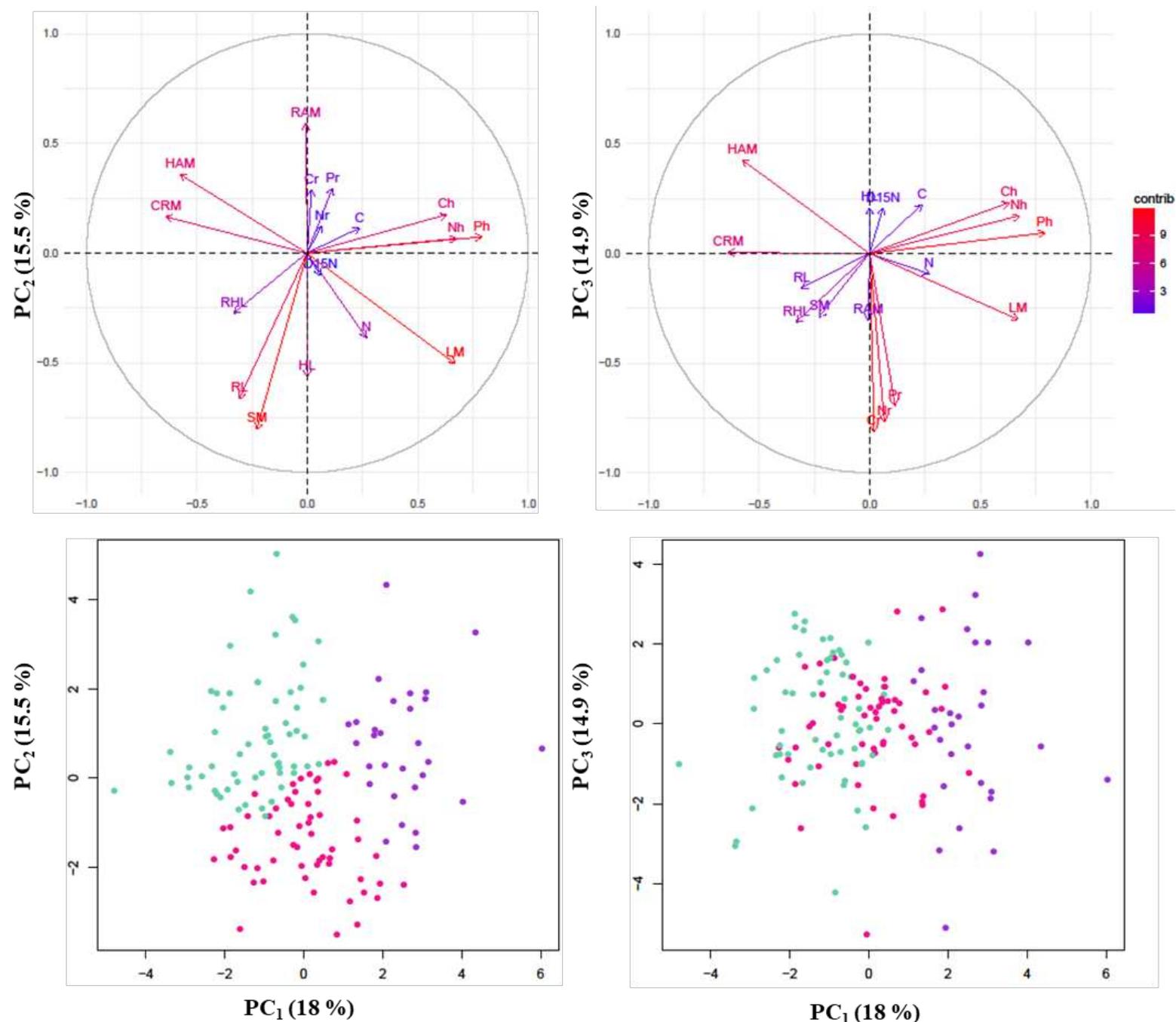
**Tableau II-5 :** Corrélations phénotypiques entre des différentes caractéristiques potentiellement explicatives de la croissance hétérotrophe de la CC192. (A) pourcentage en azote (%N) et carbone (%C) dans la graine en %, masse de la graine en mg (SM), quantité d'azote ( $N_{mg}$ ) et de carbone ( $C_{mg}$ ) en mg.(B) Delta  $^{15}N$  dans les graines ( $\delta^{15}N$ ) ; composition en anions inorganiques de l'axe embryonnaire à la fin de la croissance hétérotrophe en présence de nitrate 5 mM ( $N^+$ ) : pourcentage en anions nitrate  $NO_3^-$  ( $N_h$ ) , chlorure  $Cl^-$  ( $C_h$ ), phosphate  $PO_4^{3-}$  ( $P_h$ ) dans l'hypocotyle et pourcentage en anions nitrate  $NO_3^-$  ( $N_r$ ), chlorure  $Cl^-$  ( $C_r$ ), phosphate  $PO_4^{3-}$  ( $P_r$ ) dans la radicule. Les corrélations significatives considérées étaient  $p < 0,001$ ,  $r \leq -0,3$  et  $r \geq 0,30$ .  $n = 185$  accessions, avec des seuils de significativité : \*\*\*,  $P < 0,001$ ; \*\*,  $P < 0,01$ ; ns, non significative.

Caractères	Coefficient de corrélation de Pearson (r)		
<b>A</b>			
	SM	$N_{mg}$	%N
$N_{mg}$	0,91***		
$C_{mg}$	0,93***	0,97***	
%N		0,36***	
%C			0,30***
<b>B</b>			
	$N_h$	$C_h$	
$C_h$	0,77***		
$P_h$	0,62***	0,57***	
	$N_r$	$C_r$	
$C_r$	0,5***		
$P_r$	0,53***	0,59***	

Etant donné que l'exploration de la diversité naturelle de la CC192 met en avant que la discrimination isotopique de l'azote dans la graine est accession dépendante, nous voulons décortiquer la relation entre  $\delta^{15}\text{N}$  et la longueur de la racine. Pour cela, nous séparons les accessions en deux groupes selon la tendance de corrélation (Figure II-8). Nous observons, un premier groupe d'accessions (soit 29 accessions) ayant un fort lien entre le  $\delta^{15}\text{N}$  et la longueur de la racine (bleue) et inversement pour un deuxième groupe d'accessions (couleur jaune ; soit 157 accessions). De plus, nous pouvons noter, que ces groupes d'accessions se comportent de la même façon quelle que soit la condition nitrate. Cela suggère, qu'il pourrait exister une forme isotopique particulière de l'azote qui est en lien avec l'allongement de la racine en hétérotrophie pour certaines accessions.

### ***III-2-5-Identification des loci associés au statut carboné et azoté des graines***

Une analyse GWAS a été menée afin de détecter les loci associés aux caractéristiques métaboliques étudiées et de les comparer avec ceux détectés pour les caractères associés à la performance des plantules. Le tableau II-7, synthétise le détail des loci identifiés (chromosome, position...). Nous avons identifié 3 loci associés à  $C_{\text{mg}}$ ,  $N_{\text{mg}}$  et %C, positionnés sur les chromosomes 6, 7 et 8. Etant donné que les caractères  $N_{\text{mg}}$  et  $C_{\text{mg}}$  sont fortement corrélés l'un avec l'autre, elles présentent les mêmes signaux d'association sur les chromosomes 7 et 8. De même, 19 loci réparties sur l'ensemble du génome sont identifiés comme associés au  $\delta^{15}\text{N}$ ,  $N_{\text{h}}$ ,  $P_{\text{h}}$ ,  $P_{\text{r}}$  et  $C_{\text{r}}$ . Ensuite, les loci identifiés pour les caractéristiques métaboliques étudiées et ceux identifiés pour les caractères de performance des plantules en présence et absence de nitrate ont été projetés sur la carte physique du génome de *M. truncatula* Mt4.0 (Figure II-9). Cette projection nous permet de constater la présence de certaines co-localisations de loci pour les différents caractères. Tout d'abord, deux loci associés à la réponse de la biomasse allouée à l'hypocotyle à l'absence de nitrate (rHAM), positionnés au niveau du chromosome 5, co-localisent avec les loci associés au caractère  $C_{\text{r}}$ . Ensuite, les loci contrôlant l'allocation de la biomasse à la racine en absence de nitrate (RAM N-) et l'allongement de la racine en présence de nitrate (RL N+) co-localisent respectivement avec les loci associés au  $P_{\text{r}}$  et au  $N_{\text{h}}$ . Les loci associés aux caractères liés à l'allocation de la biomasse à l'hypocotyle en présence de nitrate, et à son allongement en absence de nitrate, co-localisent respectivement avec les loci contrôlant les caractères  $C_{\text{mg}}$ ,  $N_{\text{mg}}$  et  $P_{\text{h}}$ . Enfin, la région génomique en haut du chromosome 1 contient des loci associés à rLM et le  $\delta^{15}\text{N}$ .



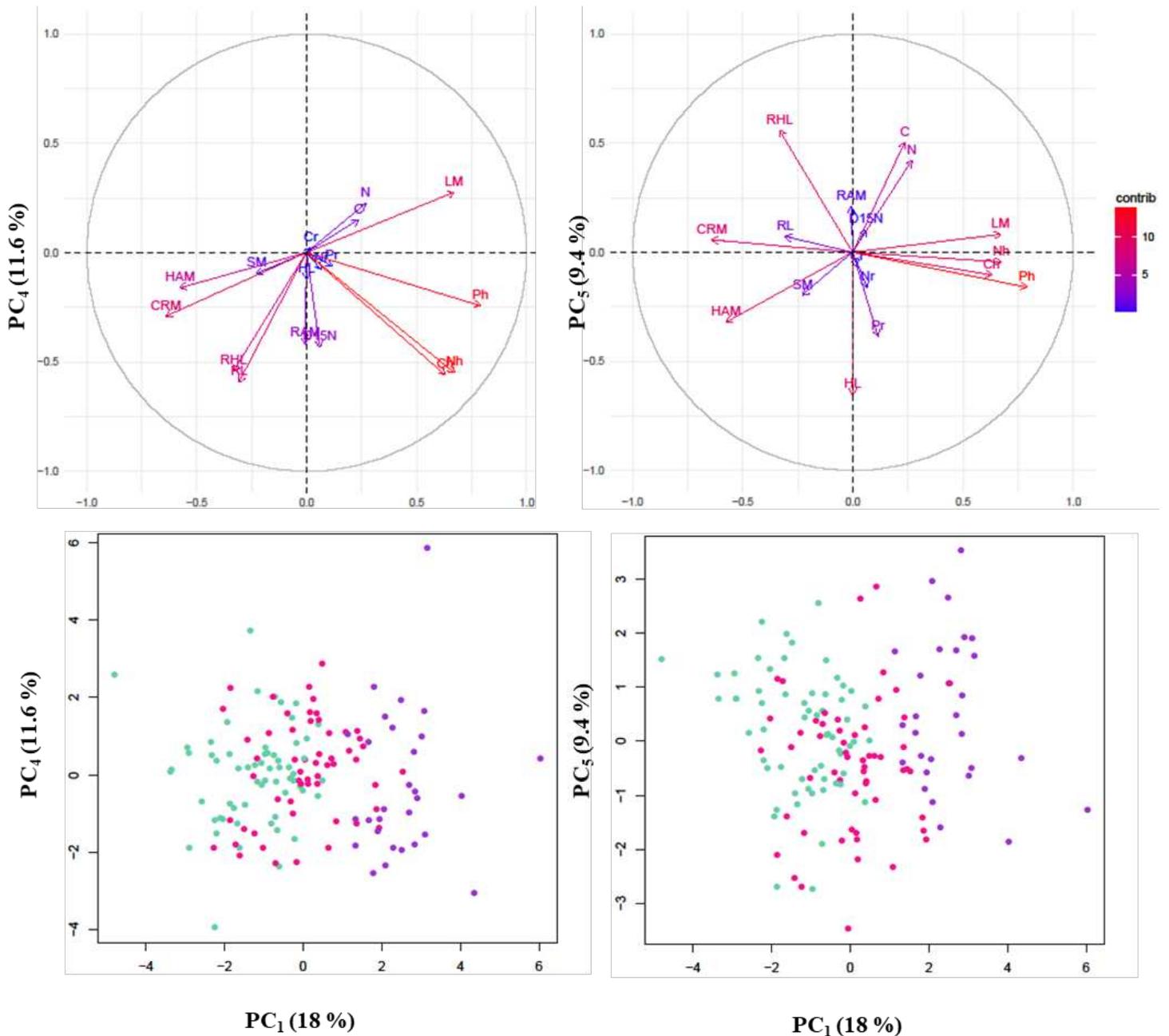
**Figure II-7-A** Composantes principales 1 (PC1), 2 (PC2) et 3 (PC3) avec la projection des caractères de performance des plantules en présence de nitrate ( $N^+$ , 5 mM) ainsi que des caractéristiques explicatives de la croissance hétérotrophe (haut) et des 175 accessions représentant la diversité naturelle de *M. truncatula* (bas). Les caractères projetés : longueur de l'hypocotyle (HL) et de la racine (RL) ; pourcentage de biomasse résiduelle dans les cotylédons (CRM), allouée à l'hypocotyle (HAM), allouée à la racine (RAM) et perdue (LM) en % ; pourcentage en azote (N) et carbone (C) dans la graine en % ; masse de la graine en mg (SM) ; Delta  $^{15}N$  dans les graines ( $\delta^{15}N$ ) ; composition en anions inorganiques de l'axe embryonnaire à la fin de la croissance hétérotrophe en présence de nitrate 5 mM ( $N^+$ ): pourcentage en anions nitrate  $NO_3^-$  ( $N_h$ ), chlorure  $Cl^-$  ( $C_h$ ), phosphate  $PO_4^{3-}$  ( $P_h$ ) dans l'hypocotyle et pourcentage en anions nitrate  $NO_3^-$  ( $N_r$ ), chlorure  $Cl^-$  ( $C_r$ ), phosphate  $PO_4^{3-}$  ( $P_r$ ) dans la racine. Les trois premières PCs explique 48 % de l'inertie totale. Les couleurs des points correspondent aux couleurs des trois groupes distincts à partir des caractères étudiés (P1 (vert), P2 (rose) P3 et (violet)). Le gradient de couleur pour le graphique des variables indique le pourcentage de contributions de ces variables à la définition de chacun des axe (0 %, violet et 100% rouge).

## ***IV-Discussion***

La croissance des plantules hétérotrophes dépend des caractéristiques telles que la qualité et la quantité des réserves de la graine, de leur mobilisation et de leur utilisation par ces plantules. Ici, nous avons traduit les réserves de la graine par sa biomasse et sa composition en carbone et en azote. Ces réserves entrent en interaction avec les nutriments exogènes. Ainsi, pour différents panels d'accessions de *M. truncatula*, nous avons recherché l'existence des liens entre l'ensemble de ces caractéristiques et la performance des plantules en hétérotrophie et ce, en interaction avec les conditions azotées du milieu.

### ***IV-1- Relation entre l'évolution de la croissance hétérotrophe au cours du temps et la dynamique des réserves de la graine***

La performance des plantules de *M. truncatula* a été évaluée au cours du temps pour un panel réduit d'accessions. Globalement pour ces accessions et quelle que soit la condition nutritive, l'allongement de l'hypocotyle et de la racine suit la même tendance au cours du temps. Cependant, seul l'hypocotyle augmente sa biomasse, allouée depuis les cotylédons, durant la phase exponentielle d'allongement. Cette phase coïncide également avec une période de perte de biomasse que nous avons associée à une capacité respiratoire élevée de la plantule (Figure II-1-à 3) en adéquation avec l'étude (Soltani et al. 2006). De même, l'évolution de cette respiration est en concordance avec la diminution significative du taux de carbone au cours de la croissance hétérotrophe dans tous les compartiments de la plantule quelles que soient les conditions. Dans l'étude de Brunel-Muguet et al. (2015) sur la croissance hétérotrophe d'accessions différentes de *M. truncatula*, la réduction du taux de carbone mise en évidence depuis les cotylédons était également liée à la respiration. Dans notre étude, le pourcentage en azote des cotylédons se vidait en concordance avec son utilisation par l'axe embryonnaire au cours de la croissance hétérotrophe (Tableau II-2). Ainsi, les réserves de la graine (SM, C, N ; Figure II-2, Tableau II-1) stockées dans les cotylédons étaient en partie mobilisées (Tableau II-2) pour couvrir la demande d'énergie (*i.e.* début de croissance et croissance exponentielle) (Figure II-3) pour assurer les processus physiologiques nécessaires à la croissance de l'hypocotyle (Figures II-1, II-2). Par ailleurs, la principale variation dans la performance des plantules en fonction



**Figure II-7-B:** Composantes principales 1 (PC1), 2 (PC2) et 3 (PC3) avec la projection des caractères de performance des plantules en présence de nitrate (N<sup>+</sup>, 5 mM) ainsi que des caractéristiques explicatives de la croissance hétérotrophe (haut) et des 175 accessions représentant la diversité naturelle de *M. truncatula* (bas). Les caractères projetés : longueur de l’hypocotyle (HL) et de la radicule (RL) ; pourcentage de biomasse résiduelle dans les cotylédons (CRM), allouée à l’hypocotyle (HAM), allouée à la radicule (RAM) et perdue (LM) en % ; pourcentage en azote (N) et carbone (C) dans la graine en % ; masse de la graine en mg (SM) ; Delta <sup>15</sup>N dans les graines ( $\delta^{15}\text{N}$ ) ; composition en anions inorganiques de l’axe embryonnaire à la fin de la croissance hétérotrophe en présence de nitrate 5 mM (N<sup>+</sup>): pourcentage en anions nitrate NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (N<sub>h</sub>), chlorure Cl<sup>-</sup> (C<sub>h</sub>), phosphate PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> (P<sub>h</sub>) dans l’hypocotyle et pourcentage en anions nitrate NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (N<sub>r</sub>), chlorure Cl<sup>-</sup> (C<sub>r</sub>), phosphate PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> (P<sub>r</sub>) dans la radicule. Les trois PCs (1, 4 et 5) explique 39 % de l’inertie totale. Les couleurs des points correspondent aux couleurs des trois groupes distincts à partir des caractères étudiés (P1 (vert), P2 (rose) P3 et (violet)). Le gradient de couleur pour le graphique des variables indique le pourcentage de contributions de ces variables à la définition de chacun des axe (0 %, violet et 100% rouge).

des conditions azotées, a été constatée pour l'allongement de la racine. Pour le petit panel d'accessions (au plateau d'allongement ; Figure II-1), comme pour la majorité des accessions de la CC192 (à la fin de la croissance ; Tableau I-1), une augmentation de l'allongement de la racine a été révélée en absence de nitrate, en accord avec les travaux ayant montré un effet inhibiteur du nitrate en tant que signal sur l'allongement de la racine primaire de *Medicago truncatula* (Morère-Le Paven et al. 2011; Pellizarro et al. 2014; Zang et al. 2020). Enfin, nous avons constaté que la majorité des accessions de ce panel montrait une diminution du taux de carbone dans les cotylédons, qui s'accroît en absence de nitrate et à la fin de la croissance. Ce carbone des cotylédons vient probablement appuyer l'allongement de la racine en absence du signal nitrate.

#### ***IV-2- La relation entre les biomarqueurs de la croissance hétérotrophe et la performance des plantules varie selon les caractéristiques génotypiques***

L'observation du petit panel d'accessions de *M. truncatula* permet de mettre en avant une variabilité génotypique pour les caractères liés à la croissance hétérotrophe au cours du temps. Tout d'abord, une gamme de variabilité a été observée pour les caractères de performance des plantules, en particulier l'allongement de la racine. Deux génotypes, L000049 et L000174, répondent de façon très précoce à l'absence de nitrate par l'allongement de leurs racines (dès 25 HAT, Tableau II-3). L'étude de Zang et al. (2020) a montré pour deux génotypes de *M. truncatula* (i.e. A17 et R108) que l'inhibition de la croissance des racines induite par le nitrate n'était significative qu'après 6 jours de transfert sur un milieu avec nitrate. A noter cependant que, dans l'étude de Zang et al. (2020) les plantules étaient en condition d'autotrophie car soumises à une photopériode. Il est donc probable qu'en fonction des accessions, la mise en place des voies de signalisation par le nitrate et l'allongement racinaire soient influencés par la lumière et/ou par la nature du régime trophique. Concernant les caractères de mobilisation de la biomasse, il n'y avait globalement pas de différences qu'il y ait eu, ou non, un apport de nitrate, à l'exception de quelques cas. Tout d'abord une diminution significative du CRM a été constatée en absence de nitrate pour L000174 et L000648 respectivement à 49 HAT et 121 HAT et une augmentation du HAM en absence de nitrate a été constatée pour L000648 à 145 HAT. Ensuite, une augmentation de la RAM en absence de nitrate a été constatée à 49 HAT pour L000550 et à 145 HAT pour L000648.

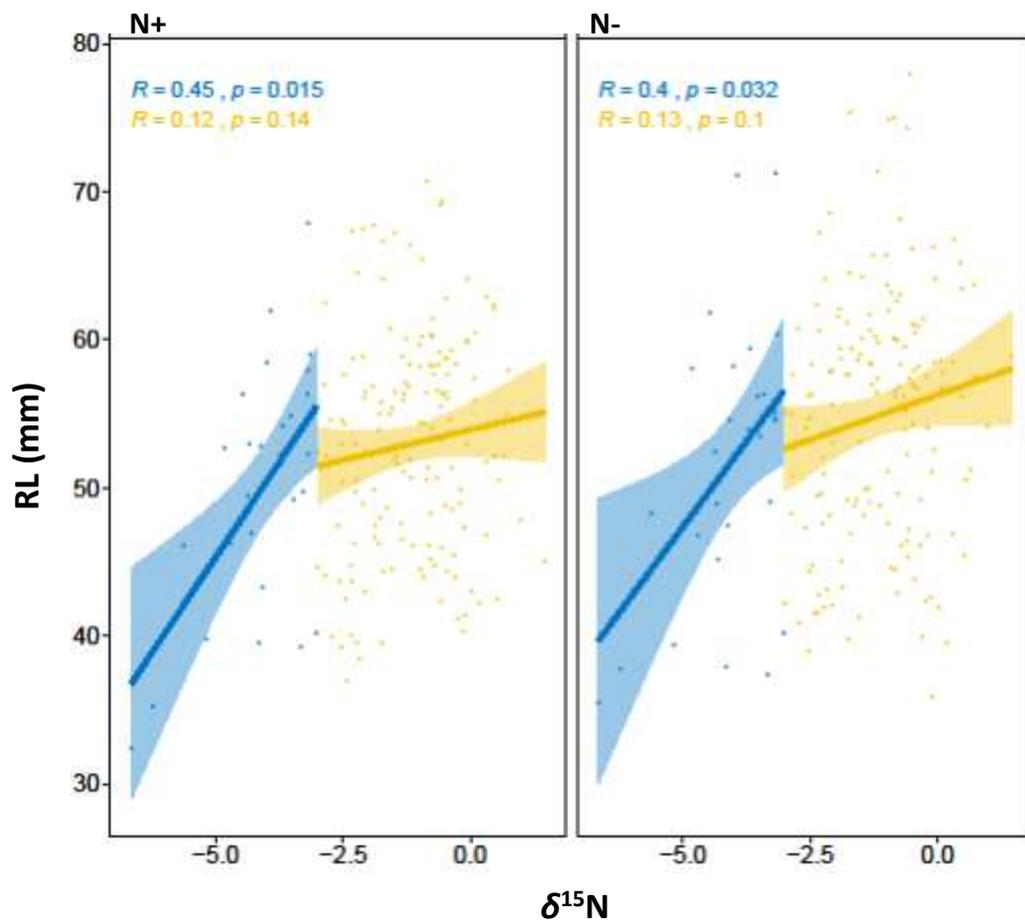
Par ailleurs, une variabilité est observée pour les caractéristiques métaboliques étudiées (%C, %N, pourcentage en anions,  $\delta^{15}\text{N}$ ). Sur la base de cette variabilité, plusieurs profils génotypiques

**Tableau II-6 :** Moyennes des caractères de performance des plantules en présence de nitrate (N+, 5 mM) ainsi que les caractéristiques potentiellement explicatives de la croissance hétérotrophe pour les trois phénotypes P1, P2 et P3. Les couleurs mentionnées se réfèrent aux couleurs des groupes sur la figure II-7. Les caractères analysés : (A) longueur de l'hypocotyle (HL) et de la racine (RL) ; pourcentage de biomasse résiduelle dans les cotylédons (CRM), allouée à l'hypocotyle (HAM), allouée à la racine (RAM) et perdue (LM) en %. (B) pourcentage en azote (%N) et carbone (%C) dans la graine en % ; masse de la graine en mg (SM). (C) Delta <sup>15</sup>N dans les graines ( $\delta^{15}\text{N}$ ) ; composition en anions inorganiques de l'axe embryonnaire à la fin de la croissance hétérotrophe en présence de nitrate 5 mM (N+): pourcentage en anions nitrate NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (N<sub>h</sub>) , chlorure Cl<sup>-</sup> (C<sub>h</sub>), phosphate PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> (P<sub>h</sub>) dans l'hypocotyle et pourcentage en anions nitrate NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (N<sub>r</sub>), chlorure Cl<sup>-</sup>(C<sub>r</sub>), phosphate PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>(P<sub>r</sub>) dans la racine. <sup>a, b, c</sup> représentent les groupes indiqués par la méthode de « Student-Newman-Keuls » basée sur l'effet du groupe obtenu grâce à l'ANOVA, *p* < 0,001).

Caractères	P1 (vert)	P2 (rose)	P3 (violet)
<b>A</b>			
HL (mm)	67,5 <sup>b</sup>	75,2 <sup>a</sup>	66,7 <sup>b</sup>
RL (mm)	51,7 <sup>b</sup>	56,4 <sup>a</sup>	48,5 <sup>c</sup>
RHL	0,8 <sup>a</sup>	0,8 <sup>a</sup>	0,7 <sup>a</sup>
CRM (%)	31,0 <sup>a</sup>	28,0 <sup>b</sup>	24,8 <sup>c</sup>
HAM (%)	39,1 <sup>a</sup>	34,6 <sup>b</sup>	31,1 <sup>c</sup>
RAM (%)	9,2 <sup>a</sup>	8,1 <sup>b</sup>	9,4 <sup>a</sup>
LM (%)	13,2 <sup>c</sup>	21,5 <sup>b</sup>	23,9 <sup>a</sup>
<b>B</b>			
%N (%)	7,5 <sup>b</sup>	7,7 <sup>a</sup>	7,7 <sup>a</sup>
%C (%)	49,3 <sup>b</sup>	48,9 <sup>b</sup>	50,0 <sup>a</sup>
SM (mg)	4,5 <sup>b</sup>	5,7 <sup>a</sup>	4,2 <sup>b</sup>
<b>C</b>			
$\delta^{15}\text{N}$	-1,6 <sup>a</sup>	-1,5 <sup>a</sup>	-1,4 <sup>a</sup>
N <sub>h</sub> (%)	42,4 <sup>c</sup>	46,7 <sup>b</sup>	58,2 <sup>a</sup>
C <sub>h</sub> (%)	27,9 <sup>b</sup>	29,2 <sup>b</sup>	36,7 <sup>a</sup>
P <sub>h</sub> (%)	31,6 <sup>c</sup>	34,4 <sup>b</sup>	41,4 <sup>a</sup>
N <sub>r</sub> (%)	21,0 <sup>a</sup>	22,1 <sup>a</sup>	21,5 <sup>a</sup>
C <sub>r</sub> (%)	8,4 <sup>a</sup>	7,5 <sup>a</sup>	8,4 <sup>a</sup>
P <sub>r</sub> (%)	41,8 <sup>a</sup>	41,1 <sup>a</sup>	43,9 <sup>a</sup>

ont été distingués et ont permis de mettre en avant des liens putatifs entre ces caractéristiques et la performance de la plantule. Tout d'abord, au cours de la croissance hétérotrophe, nous avons identifiés deux accessions (L000550 et L000648 tableau II-1, Figure II-2) ayant une faible biomasse de la graine et un faible potentiel d'allongement de la plantule, qui ont une réponse faible face à l'absence en nitrate. Pour ces accessions, on observe une diminution du pourcentage en azote dans leurs cotylédons à la fin de la croissance, en absence de nitrate. Ce comportement indique que les accessions ayant une biomasse initiale et un potentiel d'élongation faible puisent davantage dans leurs réserves azotées en absence d'azote exogène. Ensuite, nous avons observé d'autres comportements génotypiques. Par exemple, en condition N-, l'accession L000174 possède un potentiel d'allongement plus élevé pour l'hypocotyle que celui de L000049 et inversement pour la radicule. L'accession L000049 se distingue aussi par un %C dans la radicule et un  $\delta^{15}\text{N}$  plus élevés que pour l'accession L000174 (Tableau II-3, Figure II-5). Cela suggère un lien entre le potentiel d'allongement de la radicule et le  $\delta^{15}\text{N}$  dans la graine.

Afin de confirmer ces liens putatifs et mettre en avant des biomarqueurs de la croissance hétérotrophe, une exploration a été effectuée à l'échelle de toute la population (CC192). À travers une analyse ACP englobant ces caractéristiques potentiellement explicatives de la croissance hétérotrophe et la performance des plantules en présence de nitrate, de nouveaux phénotypes ont été mis en avant (Figure II-7, Tableau II-6). Certains d'entre eux (P2, P3) indiquent qu'il y a des liens entre la croissance de la plantule (*e.g.* hypocotyle) et certains caractères liés à la graine (*i.e.* %N et SM). Ce lien est également confirmé par GWAS, grâce à une co-localisation entre des SNPs associés, d'une part à l'allocation de la biomasse vers l'hypocotyle (HAM en N+) et d'autre part aux quantités d'azote (Nmg) et de carbone (Cmg) dans la graine. Ainsi, la quantité de carbone et d'azote de la graine est un biomarqueur efficace pour la croissance des organes en hétérotrophie, en particulier l'hypocotyle. Ensuite, à travers le phénotype P1, un lien a été mis en avant entre la croissance de la plantule et le pourcentage en anions phosphate et nitrate dans l'hypocotyle à la fin de la croissance hétérotrophe. En effet, des co-localisations entre les SNPs associés à l'allongement de l'hypocotyle et la radicule et ceux associés au pourcentage en phosphate et nitrate dans l'hypocotyle ont été identifiées. Ainsi, le pourcentage en anions dans l'hypocotyle peut jouer un rôle de biomarqueur de l'allongement de la plantule en hétérotrophie. Enfin, comme pour l'accession L000049 du petit panel, un lien entre le  $\delta^{15}\text{N}$  dans la graine et l'allongement de la radicule a été mis en évidence chez certaines accessions de la CC192 (Figure II-8). Ceci suggère un lien entre une des formes isotopiques de l'azote et l'allongement de la radicule en hétérotrophie. Par conséquent, le  $\delta^{15}\text{N}$  pourrait être un bon candidat biomarqueur de l'influence de l'alimentation azoté lors du remplissage graine sur l'allongement racinaire chez *M. truncatula*.



**Figure II-8** : Régression entre le  $\delta^{15}\text{N}$  et la longueur de la racine (RL) en présence de nitrate (gauche) et en absence de nitrate (droite). Chaque point représente une accession. Les deux groupes (bleu et jaune) mis en évidence sont entourés par un intervalle de confiance de corrélation. Pour chaque groupe, le coefficient de corrélation (R) entre les deux caractères et la probabilité (p-value) du test de corrélation de « Pearson », sont indiqués.

## ***V- Idées principales du chapitre II***

La variabilité génotypique révélée au sein de la CC192, a permis de mettre en avant un ensemble de facteurs influençant la performance des plantules :

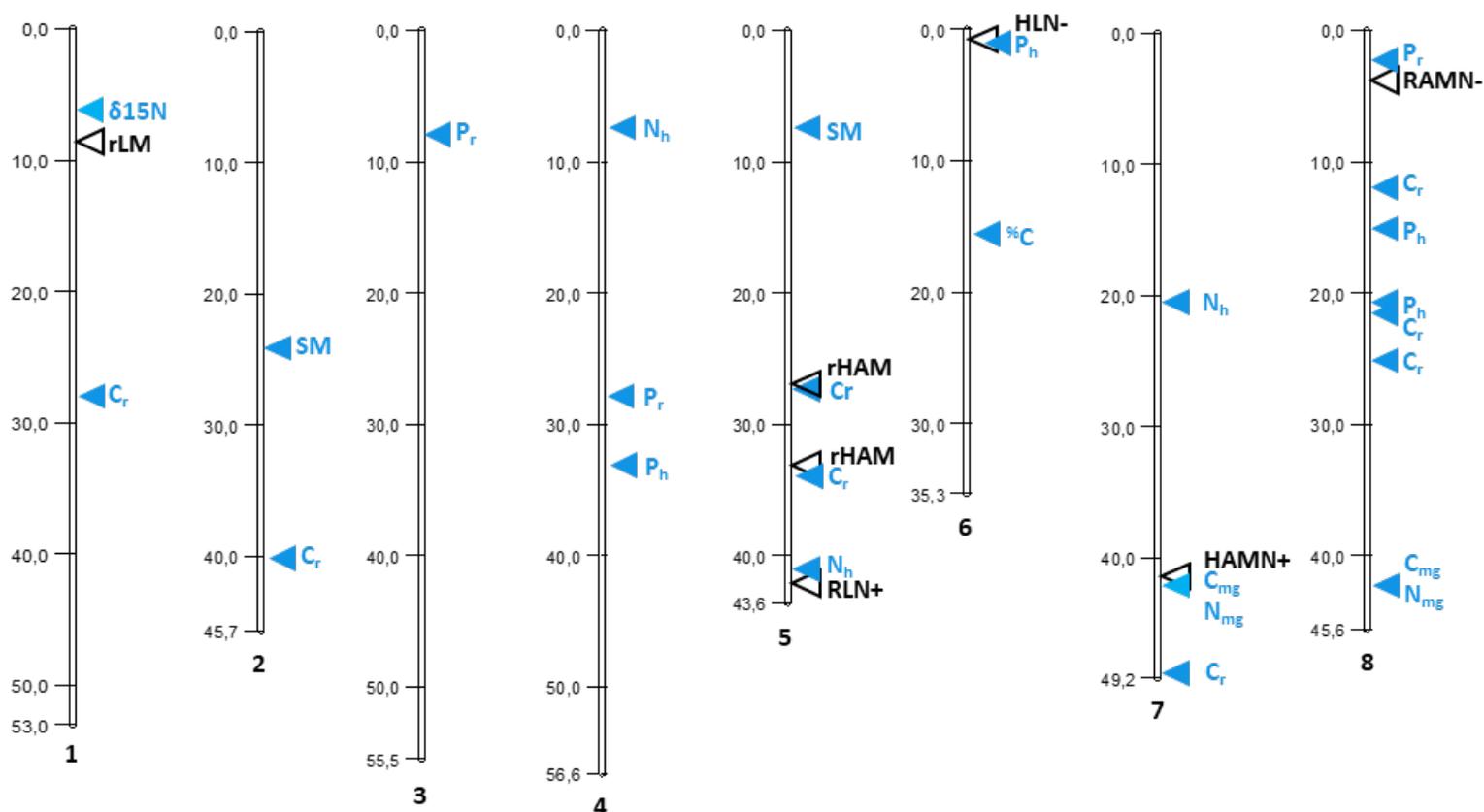
- La biomasse mobilisée depuis des cotylédons, est majoritairement dirigée vers l'hypocotyle tout au long de sa croissance et en partie perdue (en lien avec la capacité respiratoire de la plantule).
- La réponse de la racicule à l'absence de nitrate est influencée par le potentiel d'allongement des organes de chaque accessions d'une part et par la dynamique du carbone et de l'azote dans la plantule d'autre part.
- La composition carbonée et azotée des réserves de la graine, ainsi que le pourcentage en anions inorganiques dans l'hypocotyle sont des potentiels candidats biomarqueurs de la croissance des organes en hétérotrophie
- Le  $\delta^{15}\text{N}$  est également un bon candidat biomarqueur de l'allongement racinaire chez *M. truncatula*.

**Tableau II-7** : SNPs identifiés pour les caractéristiques primaires et secondaires potentiellement explicatives de la croissance hétérotrophe. Les SNP ont été révélés par l'analyse MLM à l'aide de 175 accessions en tenant compte de la structuration et de l'apparentement comme co-variables. Les caractères représentent des signaux d'associations significatifs sont: quantité d'azote en mg ( $N_{mg}$ ) et de carbone ( $C_{mg}$ ) en mg ; pourcentage en carbone dans la graine (C), delta  $^{15}N$  dans les graines ( $\delta^{15}N$ ), composition en anions inorganiques de l'axe embryonnaire à la fin de la croissance hétérotrophe en présence de nitrate 5 mM ( $N^+$ ): pourcentage en anions nitrate  $NO_3^-$  ( $N_h$ ), phosphate  $PO_4^{3-}$  ( $P_h$ ) dans l'hypocotyle et pourcentage en anions chlorure  $Cl^-$  ( $C_r$ ) et phosphate  $PO_4^{3-}$  ( $P_r$ ) dans la radicule. Le détail des SNPs associés à la SM est présenté dans le tableau I-4. <sup>1</sup>identifiant des SNPs pour la version Mt4.0 du génome, <sup>2</sup>numéros de chromosome, <sup>3</sup>Position chromosomique du SNP en paires de bases, <sup>4</sup> $-\log_{10}$  (valeur- $P$ ) valeur du logarithme décimal de valeur  $P$  obtenue grâce au modèle MLM.

Caractères	SNP <sup>1</sup>	Chr. <sup>2</sup>	Position <sup>3</sup>	$-\log_{10}$ (P)
$C_{mg}$	chr8_42229281	8	42229281	8,8
	chr7_42241711	7	42241711	7,6
$N_{mg}$	chr8_42229281	8	42229281	8,4
	chr7_42241711	7	42241711	7,5
%C	chr6_15430680	6	15430680	13,3
$\delta^{15}N$	chr1_5973210	1	5973210	7,7
$N_h$	chr4_7358394	4	7358394	7,8
	chr5_41341940	5	41341940	7,4
	chr7_20455468	7	20455468	7,1
$P_h$	chr6_878006	6	878006	7,9
	chr8_20708666	8	20708666	7,9
	chr4_33167525	4	33167525	7,6
	chr8_15035241	8	15035241	7,2
$P_r$	chr3_7880674	3	7880674	9,3
	chr8_2145788	8	2145788	7,4
	chr4_27985925	4	27985925	7,1
$C_r$	chr2_40195893	2	40195893	7,7
	chr8_11836971	8	11836971	7,2
	chr5_27376022	5	27376022	7,2
	chr1_28050707	1	28050707	7,2
	chr8_21386450	8	21386450	7,1
	chr7_48813615	7	48813615	7,1
	chr5_34085070	5	34085070	7
	chr8_25016542	8	25016542	7

## **Chapitre III : Effet Du Froid Sur La Performance Des Plantules En Interaction Avec La Plasticité De Réponse A L'absence De Nitrate**

---



**Figure II-9:** Localisation sur la carte physique la version Mt4.0. v2 du génome des SNP significatifs associés aux caractères liés aux caractéristiques potentiellement explicatives de la croissance hétérotrophe (bleu). Les barres verticales représentent les huit chromosomes du génome de *M. truncatula*. Les positions des loci sont indiquées à leur droite par un triangle. Les caractères représentés des signaux d'association significatifs sont : quantité d'azote ( $N_{mg}$ ) et de carbone en mg ( $C_{mg}$ ) ; pourcentage en carbone dans la graine (C) ; delta  $^{15}N$  dans les graines ( $\delta^{15}N$ ) ; composition en anions inorganiques de l'axe embryonnaire à la fin de la croissance hétérotrophe en présence de nitrate 5 mM ( $N^+$ ) : pourcentage en anions nitrate  $NO_3^-$  ( $N_h$ ), phosphate  $PO_4^{3-}$  ( $P_h$ ) dans l'hypocotyle et pourcentage en anions chlorure  $Cl^-$  ( $C_r$ ) et phosphate  $PO_4^{3-}$  ( $P_r$ ) dans la radicule. Les caractéristiques détaillées des SNPs sont présentées dans le Tableau II-7. Les SNPs associés aux caractères performance de la plantule représentants colocalisations sont également projetés (noire) et dont dans le détail est présentés tableau I-4 : longueur de l'hypocotyle (HL) et de la radicule (RL) en mm ; allocation de biomasse à l'hypocotyle (HAM), à la radicule (RAM) en % ; indice de réponse à l'absence de nitrate de l'allocation de la biomasse à l'hypocotyle (rHAM), de la biomasse perdue (rLM) en % ; avec N- et N+ condition de présence et d'absence de nitrate respectivement. Les barres verticales représentent les différents chromosomes.

## ***I-Introduction***

La température est l'un des facteurs environnementaux les plus importants pour la germination des graines et pour la croissance hétérotrophe des plantules. Le présent chapitre porte sur l'analyse des déterminants physiologiques et génétique liés au stress froid en interaction avec les effets liés à l'absence du nitrate à l'échelle de toute la plantule de *M. truncatula*.

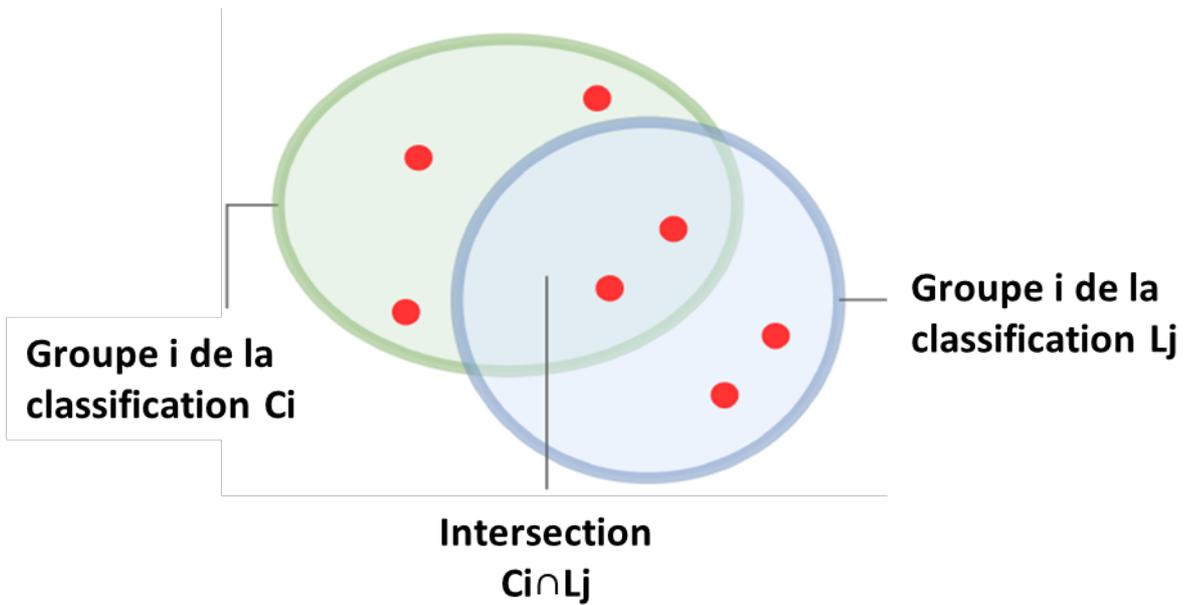
Le premier objectif est d'évaluer l'influence du froid (10 °C) sur la performance des plantules sous deux conditions d'approvisionnement en nitrate (avec et sans apport). Pour répondre à cet objectif, nous avons tout d'abord déterminé l'effet du froid sur la performance des plantules sous les deux conditions de nitrate i) au cours de la croissance hétérotrophe pour un panel de trois accessions et ii) à la fin de la croissance hétérotrophe pour la CC192. Ensuite, pour la CC192 nous avons comparé la plasticité de réponse des plantules au froid entre les deux conditions de nitrate, à partir d'indices de plasticité de réponse au froid calculés. Enfin, nous avons comparé les loci identifiés contrôlant l'ensemble des caractères étudiés aux deux températures.

Le deuxième objectif était d'évaluer la réponse des plantules à l'absence de nitrate en interaction avec la réponse au froid. Pour répondre à cet objectif, nous avons tout d'abord déterminé l'effet de l'absence de nitrate à 10 °C, que nous avons comparé aux résultats préalablement obtenus à 17 °C, et ce i) au cours de la croissance hétérotrophe pour le panel de trois accessions et ii) à la fin de la croissance hétérotrophe pour la CC192. Ensuite, pour la CC192, nous avons comparé les indices de plasticité de réponse à l'absence de nitrate entre les deux températures. Enfin, des phénotypes de réponse à l'absence de nitrate au froid ont été déterminés et comparés à ceux obtenus précédemment à 17 °C.

## ***II-Matériel et méthodes***

### ***II-1-Matériel biologique***

Cette partie de l'étude a été basée sur la variabilité naturelle de *Medicago truncatula* via deux sets d'accessions. Nous avons utilisé, d'une part, trois des quatre accessions sélectionnées précédemment à partir de la CC16, à savoir les accessions « L000174 : SA28064 », « L000550 : F11013-3 », « L000648 : Salses42B » et, d'autre part, la CC192. Les graines utilisées provenaient des mêmes lots que ceux qui ont servis pour le travail réalisé à 17 °C.



**Figure III-1 :** Schéma représentatif de l'intersection ( $C_i \cap L_j$ ) entre un groupe i trouvé à partir de la classification  $C_i$  (classification de référence) à la température contrôlée (vert : C1, C2, C3, C4) et un groupe j trouvé à partir de la classification  $L_j$  au froid (bleu : L1, L2, L3). Chaque point représente une accession. Le F-score est compris entre 0 (aucune accession commune entre  $C_i$  et  $L_j$ ) et 1 (toutes les accessions sont communes entre  $C_i$  et  $L_j$ ).

## ***II-2-Croissance hétérotrophe des plantules au froid en présence et en absence de nitrate***

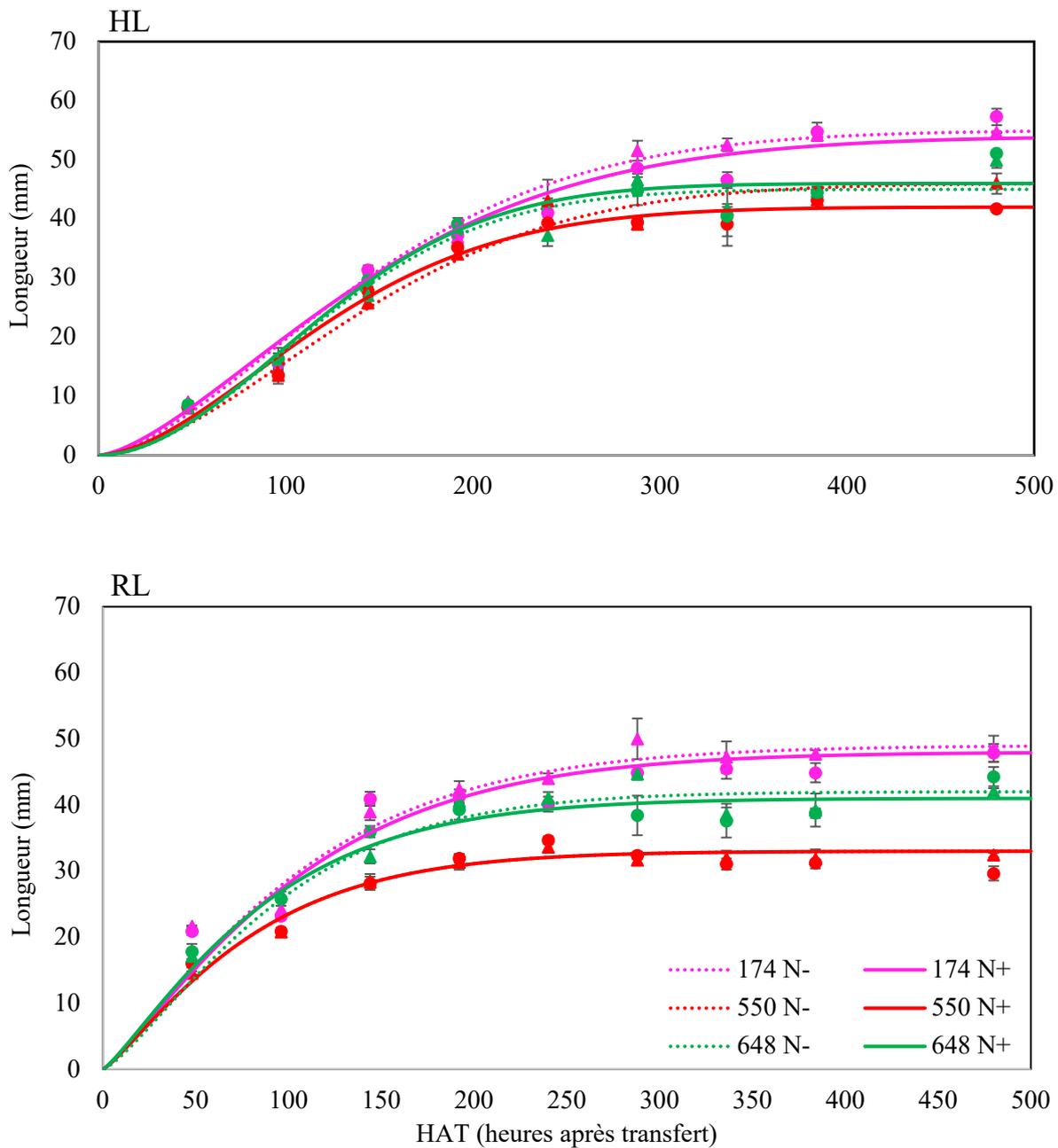
Les expériences réalisées pour analyser la croissance hétérotrophe des plantules au froid (10 °C) ont été basées sur le même protocole que celui décrit précédemment (Cf. chapitre I : I-). Seule la durée de l'expérience a changé (20 jours à 10 °C, au lieu de 10 jours à 17 °C). La croissance des plantules a été caractérisée au cours du temps pour les trois accessions sélectionnées et à la fin de la croissance hétérotrophe pour la CC192 sous les deux conditions nutritives (N+ : présence de nitrate 5mM ; N- : absence de nitrate). Pour les trois accessions, l'estimation des caractères de longueur a permis d'établir les cinétiques d'allongement des organes. Pour la core collection, l'estimation des caractères de longueur, des caractères de mobilisation de la biomasse de la graine ainsi que des indices de plasticité de réponse en l'absence de nitrate (*r*Traits) a été réalisée suivant les mêmes calculs que dans le chapitre I : I-.

## ***II-3-Analyses statistiques et identification de phénotypes***

En premier lieu, pour le panel réduit d'accessions et pour chacun des points de la cinétique, des tests de Student ont été réalisés pour analyser la différence entre les deux conditions nutritives contrastées. En second lieu pour la CC192, toutes les analyses statistiques ont été effectuées suivant les modèles et tests statistiques décrits dans le chapitre I. Ces analyses ont permis de définir l'effet de la condition nitrate (NC), l'effet du génotype (G), et l'interaction entre ces deux facteurs (NC x G). Une ACP (Analyse en Composantes Principales) et une classification des accessions par la méthode des K-Means basée sur les indices de plasticité des plantules en réponse à l'absence de nitrate (*r*Traits) au froid, ont été réalisées afin de mettre en évidence de nouveaux phénotypes.

Nous avons ensuite évalué l'impact du froid sur la performance des plantules selon les deux conditions d'apport en nitrate. Pour cela, par le biais d'un modèle GLM (Équation III-1), une ANOVA a été conduite pour déterminer l'effet du génotype (G), de la température de culture (TC) et l'effet de leur interaction (G x TC) dans chaque condition nutritive (N- et N+) :

$$\text{Équation III - 1 : } Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + E_{ijk}$$



**Figure III-2 :** Courbes d'allongement modélisées de l'hypocotyle (HL) et de la radicule (RL) au cours du temps pour les trois accessions L000174 (violet), L000550 (rouge) et L000648 (vert) au froid (10 °C) en présence de nitrate (trait plein) et en absence de nitrate (pointillés). Les symboles (▲, ●) et les barres verticales représentent respectivement les moyennes et les erreurs standards des points expérimentaux par accession et par condition de nitrate (n= 3 répétitions biologiques x 10 plantules).

avec  $Y_{ijk}$  correspond à la  $k^{\text{ième}}$  valeur du caractère pour le  $i^{\text{ième}}$  génotype de la  $j^{\text{ième}}$  condition nitrate ou température,  $\mu$  la moyenne générale du caractère pour la population d'accessions,  $\alpha_i$  est l'effet fixe de  $i^{\text{ième}}$  génotype (l'effet G),  $\beta_j$  est l'effet fixe de la  $j^{\text{ième}}$  condition nitrate ou de température (l'effet NC / T),  $\alpha\beta_{ij}$  est l'effet de l'interaction entre le  $i^{\text{ième}}$  génotype e et la  $j^{\text{ième}}$  condition nitrate ou de température (effet G x NC / G x T), et  $E_{ijk}$  représente l'erreur résiduelle aléatoire. De plus, pour chacun des caractères, un indice de plasticité de réponse au froid a été déterminé (rtTrait ; Équation III-2).

$$\text{Équation III - 2: } rtTrait = \frac{(\text{Trait } 10^{\circ}\text{C}) - (\text{Moyenne Trait } 17^{\circ}\text{C})}{\text{Moyenne Trait } 17^{\circ}\text{C}} \times 100$$

avec « rtTrait » : l'indice de réponse d'un caractère d'allongement des organes ou d'allocation de la biomasse au froid par rapport à la température de croissance contrôle, 17 °C (exprimé en %) ; « Trait 10 °C » et « Moyenne Trait 17 °C » représentent respectivement la valeur du caractère pour chaque accession par plantule à 10°C et sa moyenne sur l'ensemble des plantules à 17 °C. Des corrélations phénotypiques ont également été recherchées entre les caractères aux deux températures. Seules les corrélations dont le coefficient (r) (test de Pearson) étaient significatives au seuil de 1 % et modérées à fortes ( $r \leq -0,40$  et  $r \geq 0,40$ ) ont été considérées. De même, l'effet du génotype a été évalué pour les indices de plasticité (rtTraits), suivant le même modèle que celui utilisé pour les indices rTraits.

#### ***II-4-Analyse de l'effet du froid sur le comportement des accessions en réponse à l'absence de nitrate***

Une analyse de l'influence du froid sur la répartition des accessions dans les groupes de typologies de comportements en réponse à l'absence de nitrate a été effectuée. A cette fin, les accessions se situant aux intersections entre les groupes génotypiques obtenus à partir de la classification  $C_i$  (classification de référence) à 17 °C (Physiotype 1, 2 , 3 et 4 respectivement pour C1, C2, C3, C4. Chapitre I-Tableau I-3) et les groupes trouvés pour la classification  $L_j$  à 10 °C (L1, L2, L3 ; Chapitre III-Tableau III-5) ont pu être identifiées ( $C1 \cap L1$ ,  $C1 \cap L2$ ,... ,  $C4 \cap L3$ ) (Figure III-1). La congruence des classifications d'accessions entre les



températures a été quantifiée en utilisant la méthode des F-scores, méthode habituellement utilisée pour évaluer l'exactitude des classifications. Le F-score est une moyenne harmonique où cette exactitude dépend de deux paramètres, la sensibilité et la précision (Bernardes et al. 2016). La sensibilité ( $R_{ij}$ ; Équation III-3) permet de définir la capacité de la méthode de classification à affecter les accessions trouvées dans les groupes  $L_j$  de la même manière que les groupes de référence  $C_i$  :

$$\text{Équation III - 3: } R_{ij} = \frac{C_i L_j}{L_j}$$

La précision ( $P_{ij}$ ; Équation III-4) permet de spécifier si la méthode de classification est capable d'inclure exclusivement dans un groupe les accessions ayant le même comportement.

$$\text{Équation III - 4: } P_{ij} = \frac{C_i L_j}{C_i}$$

Les deux paramètres ont ensuite été combinés pour calculer le F-score à l'aide d'un programme développé en langage Python par C. Landès de l'équipe Bidéfi de l'IRHS selon l'équation III-5:

$$\text{Équation III - 5: } F = \frac{1}{N} \sum_{ij} n_i \max_j \left( \frac{2P_{ij}R_{ij}}{P_{ij}+R_{ij}} \right)$$

où  $N$  représente le nombre total d'accessions du groupe de référence,  $C_i$  ( $i: 1 \rightarrow 4$ ) et  $L_j$  ( $j: 1 \rightarrow 3$ ) représente les groupes classifiés respectivement à la température contrôle (C) et au froid (L),  $P$  et  $R$  représentent respectivement les paramètres de précision et de sensibilité. La valeur du F-score est comprise entre 0 et 1 (1 correspondant au nombre maximum d'accessions communes entre deux classes comparées).

### ***II-5-Identification de loci associés aux caractéristiques de la performance des plantules au froid***

Tous les caractères déterminés au froid ont été analysés par GWAS suivant le modèle et les critères de sélection des SNPs décrits dans l'article présenté dans le chapitre I. L'ensemble des loci détectés comme associés aux caractères étudiés au froid a été par la suite projeté sur la carte physique du génome de M.tr V04 grâce à MapChart V2,1 (Voorrips 2002).



### ***III-Résultats***

#### ***III-1-Influence du froid sur la performance des plantules indépendamment des conditions nutritives***

##### ***III-1-1-Influence sur le potentiel d'allongement au cours de la croissance hétérotrophe***

Des cinétiques d'allongement de l'hypocotyle et de la racicule tout au long de la croissance hétérotrophe au froid (10 °C), en absence et en présence de nitrate, ont été réalisées pour 3 accessions (Figure III-2). Les résultats montrent que l'allongement des deux organes suit la même tendance que la courbe d'allongement à 17 °C (Figure II-1), mais que ces organes sont raccourcis par le froid. A titre d'exemple, pour l'accession L000648 en présence de nitrate l'allongement maximal atteint 46,0 mm pour les hypocotyles et 41,0 mm pour les racicules à 10 °C, tandis qu'à 17 °C, l'allongement maximal atteint 52,4 mm pour les hypocotyles et 48,0 mm pour les racicules.

Comme pour la température contrôle et en présence ou en absence de nitrate, nous observons des différences de potentiel d'allongement entre les trois accessions analysées au froid (Figure III-2). Ces différences d'allongement des organes selon les accessions permettent de les classer. L000174, L000648 et L000550 atteignent dans cet ordre le plateau d'allongement pour l'hypocotyle ainsi que pour la racicule. Cependant ce classement ne change pas d'une température à l'autre. L'ensemble de ces résultats suggère que le froid diminue l'allongement de l'hypocotyle et de la racicule au cours du temps pour chaque accession, mais ne change pas leur potentiel d'allongement. De plus, en présence comme en absence de nitrate, plus le potentiel d'allongement est grand, plus il est affecté par le froid (Figure III-2 vs II-1) (e.g. RL N+ : réduction au froid par rapport à la température de contrôle de 18 mm, 10 mm et 7 mm, respectivement, pour L000174, L000648 et L000550).

**Tableau III-1.** Analyse comparative de l'élongation des plantules et du devenir de la biomasse de la graine sur la CC192 en fin de la croissance hétérotrophe dans des conditions d'approvisionnement contrastées en nitrate (NC : N +, présence et N-, absence de nitrate) et à deux températures (contrôle, 17 °C et froid, 10 °C) et détermination des indices de plasticité de réponse au froid (rtTraits). Les caractères sont : longueur de l'hypocotyle (HL) et de la radicule (RL), ratio de longueur de la radicule :hypocotyle (RHL), pourcentage de biomasse résiduelle dans les cotylédons (CRM), de biomasse allouée à l'hypocotyle (HAM), de biomasse allouée à la radicule (RAM) et de biomasse perdue (LM), indice de réponse au froid de la biomasse résiduelle dans les cotylédons (rtCRM), de la biomasse allouée à l'hypocotyle (rtHAM), de la biomasse allouée à la radicule (rtRAM) et de la biomasse perdue (rtLM).<sup>a</sup>Moyennes ajustées obtenues par régression sur l'effet de réplication suivi du niveau de significativité pour l'effet du génotype. <sup>b</sup> Valeurs de Fisher de l'effet du génotype (G), de la température (T) et de l'interaction entre le génotype et la température (GxT), suivies des niveaux de significativité. \*\*\*,  $P < 0,001$ ; \*\*,  $P < 0,01$ ; ns, non significatif.

Caractères	NC	Temp.	Moyenne <sup>a</sup>	Min/Max	Valeur de Fisher <sup>b</sup>		
					G	T	GxT
<b>Caractères de performance des plantules</b>							
HL (mm)	N+	17 °C	69,5***	49/87	55***	1413***	5***
		10°C	65,2***	45/83			
	N-	17 °C	68,2***	47/86	55 ***	554 ***	4 ***
		10°C	64,8***	51/80			
RL (mm)	N+	17 °C	52,5***	32/71	46 ***	918 ***	4 ***
		10°C	47,1***	31/64			
	N-	17 °C	54,4***	36/78	51 ***	2455 ***	5 ***
		10°C	48***	30/67			
RHL	N+	17 °C	0,76***	0,6/1,1	33***	20 ***	3 ***
		10°C	0,73***	0,5/1			
	N-	17 °C	0,8***	0,6/1,2	32 ***	788 ***	4 ***
		10°C	0,75***	0,5/1,1			
CRM (%)	N+	17°C	28,5***	17/39	9 ***	71 ***	3 ***
		10°C	27***	13/39			
	N-	17°C	25,4***	15/35	10 ***	46 ***	4***
		10°C	24,2***	10/37			
HAM (%)	N+	17°C	35,7***	21/52	13***	240 ***	5 ***
		10°C	33***	12/47			
	N-	17°C	32,2***	4/54	7 ***	ns	3 ***
		10°C	32,1***	13/42			
RAM (%)	N+	17°C	8,9***	6/12	11***	60 ***	3 ***
		10°C	9,3***	4/14			
	N-	17°C	9***	5/15	12 ***	51***	5 ***
		10°C	8,6***	5/16			
LM (%)	N+	17°C	18,5***	3/40	9 ***	118 ***	3 ***
		10°C	21,6***	6/39			
	N-	17°C	23,9***	7/39	6 ***	19 ***	3 ***
		10°C	26,1***	7/56			
<b>Indices de plasticité de réponse au froid<sup>f</sup> (rtTraits)</b>							
rtHL (%)	N+		-6,3***	-18,6/17,1			
	N-		-5***	-17,8/19,8			
rtRL (%)	N+		-10,1***	-26,3/11,2			
	N-		-11,1***	-31,4/15,7			
rtRHL (%)	N+		-3,7***	-25,5/15,4			
	N-		-6,2***	-28,1/19			
rtRCM (%)	N+		-3,9***	-63,5/39,7			
	N-		-3,9***	-49/54,8			
rtHAM (%)	N+		-6,3***	-62/46,6			
	N-		0,9***	-59,9/44,4			
rtRAM (%)	N+		5,4***	-58,9/54,6			
	N-		-2,5***	-41,3/60,9			
rtLM (%)	N+		19,3***	-52,6/119,2			
	N-		9,9***	-51,4/115			

### ***III-1-2- Influence sur les potentiels d'allongement et de mobilisation de la biomasse de la graine en fin de la croissance hétérotrophe au sein de la CC192***

Nous avons d'une part, comparé, les caractères liés à la réponse de la performance des plantules de la CC192 en fin de la croissance hétérotrophe à 10 °C par rapport à celle obtenue à 17 °C en présence ou non de nitrate et, d'autre part, analysé les indices de plasticité de réponse au froid (Tableau III-1). L'évaluation de ces caractères aux deux conditions d'apport en nitrate indique l'existence d'un effet significatif du facteur froid (à l'exception d'HAM en N-), du génotype et de l'interaction entre ces deux facteurs. En moyenne, en présence comme en absence de nitrate, le froid a réduit la longueur des organes (*e.g.* HL N+ : 4,3 mm). Toutefois, pour la racine cette réduction était en moyenne plus importante en absence de nitrate (*i.e.* RL de 5,3 mm et 6,4 mm respectivement pour N+ et N-). La biomasse allouée depuis les cotylédons vers les organes en croissance varie très peu en réponse au froid. (*e.g.* au froid en N-: réduction d'en moyenne 0,1 % et 0,4 de l'HAM et la RAM respectivement). Alors que, la biomasse perdue varie plus que les autres caractères d'utilisation de la biomasse en réponse au froid et ce quel que soit la condition NC (*e.g.* au froid en N-: augmentation d'en moyenne 2 % de LM). Concernant, les indices de plasticité de réponse au froid (rtTraits) (Tableau III-1), ils montrent une plasticité de réponse au froid plus ou moins importante selon les caractères étudiés, avec une gamme de variabilité allant de -63 à 119 % pour toutes les conditions nutritives confondues. Sur cette base, les caractères les plus plastiques en réponse au froid sont la biomasse perdue (*e.g.* valeur moyenne de rtLM en N+ 19,3 %) et la longueur de la racine (*e.g.* valeur moyenne de rtRL -10,1 % en N+).

### ***III-2-Réponse combinée du froid et de l'absence de nitrate sur les déterminants de la performance des plantules***

#### ***III-2-1-Le froid modifie l'amplitude de la réponse des plantules à l'absence du nitrate***

Nous avons évalué l'influence du froid sur la réponse des plantules à l'absence de nitrate. Tout d'abord pour les trois accessions du petit panel (Figure III-2), les courbes d'allongement obtenues en condition N+ et N- au cours du temps se superposent. Ainsi, pour les accessions caractérisées, les différences entre les conditions d'apport en nitrate disparaissent à 10 °C en comparaison avec les différences notées à 17 °C (Figure II-1). Les tests statistiques confirment

**Tableau III-2** Analyse phénotypique de la CC192 à la fin de la croissance hétérotrophe au froid (10 °C) pour les caractères de performance des plantules dans des conditions d'apport en nitrate contrastées (NC), absence (N-) et présence (N+) et pour l'indice de réponse à l'absence de nitrate. (A) Longueur de l'hypocotyle (HL) et de la radicule (RL) en mm, ratio de longueur de la radicule :hypocotyle (RHL), pourcentage de biomasse résiduelle dans les cotylédons (CRM), de biomasse allouée à l'hypocotyle (HAM), de biomasse allouée à la radicule (RAM) et de biomasse perdue (LM) en %. (B) Indice de réponse à l'absence de nitrate de la longueur de l'hypocotyle (rHL) et de la longueur de la radicule (rRL), du ratio de longueur de la radicule :hypocotyle (rRHL), de la biomasse résiduelle dans les cotylédons (rCRM), de la biomasse allouée à l'hypocotyle (rHAM), de la biomasse allouée à la radicule (rRAM), de la biomasse perdue (rLM). <sup>a</sup>Moyennes ajustées obtenues par régression sur l'effet de la répétition biologique, suivies du niveau de significativité pour l'effet du génotype. <sup>b</sup>Les valeurs Fisher de l'effet du génotype (G), de la condition d'approvisionnement en nitrate (NC) et de l'interaction entre le génotype et la condition nitrate (G x NC) sont obtenues à partir des ANOVAs. Les valeurs F sont suivies du niveau de significativité : \*\*\*,  $P < 0,001$ ; \*\*,  $P < 0,01$ ; ns, non significatif.

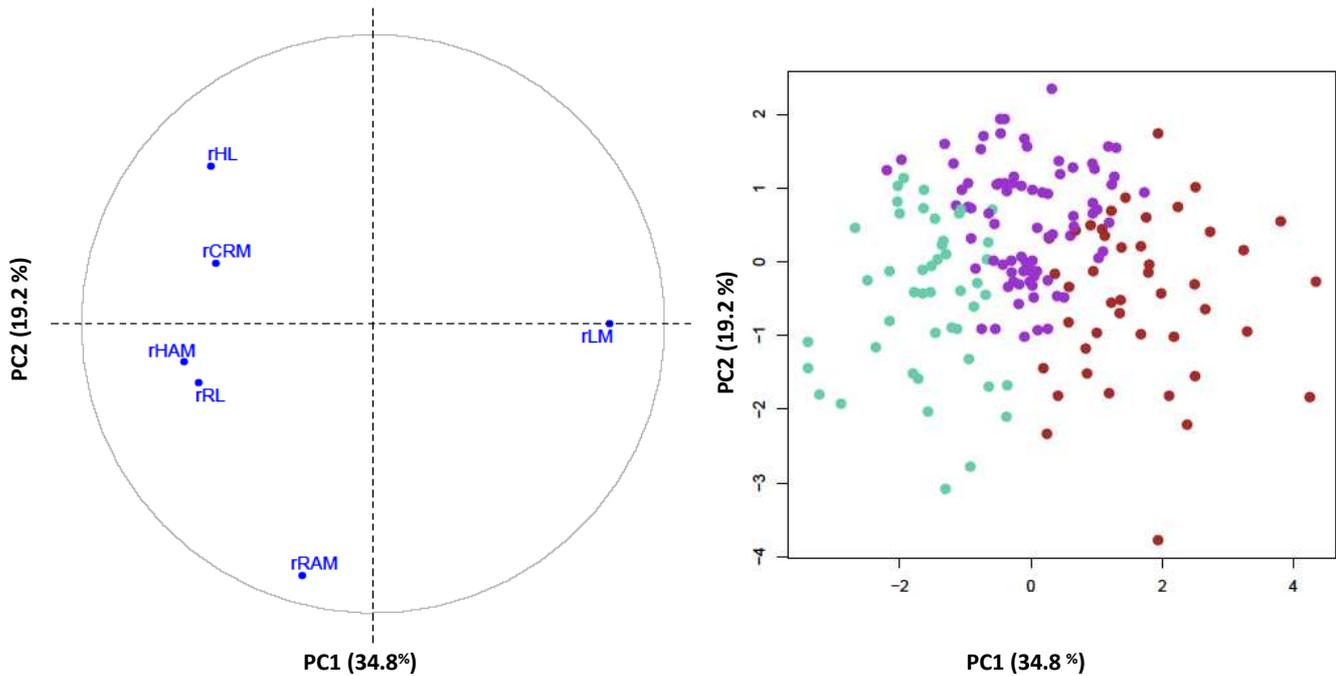
Caractères (unité)	NC	Moy <sup>a</sup>	Min/Max	Valeur-F <sup>b</sup>		
				G	NC	GxNC
<b>A</b>						
HL (mm)	N+	65,2***	45/83	63 ***	10 **	2***
	N-	64,8***	51/80			
RL (mm)	N+	47,1***	31/64	44 ***	50 ***	2 ***
	N-	48***	30/67			
RHL	N+	0,73***	0,5/1	32 ***	60 ***	2 ***
	N-	0,75***	0,5/1,1			
CRM (%)	N+	27***	13/39	8***	237***	4***
	N-	24,2***	10/37			
HAM (%)	N+	33***	12/47	8***	12***	2***
	N-	32,1***	13/42			
RAM (%)	N+	9,3***	04/14	11***	141***	3***
	N-	8,6***	05/16			
LM (%)	N+	21,6***	06/39	7***	145***	2***
	N-	26,1***	07/56			
<b>B</b>						
rHL (%)		-0,4***	-12/14			
rRL (%)		2,3***	-14/19			
rRHL (%)		3***	-13/24			
rCRM (%)		-7,5***	-50/48			
rHAM (%)		0,5***	-27/48			
rRAM (%)		-4,9***	-32/43			
rLM (%)		19,5***	-42/133			

qu'aucune différence significative d'allongement des organes entre les deux conditions de nitrate n'est observée au froid. Ensuite, à l'échelle de la CC192, l'analyse de variance des caractères de performance des plantules en fin de la croissance hétérotrophe au froid, montre l'existence d'un effet significatif du génotype, de l'apport en nitrate et de l'interaction entre ces deux facteurs. (Tableau III-4). Le comportement moyen de la population et la gamme de variabilité indiquait que l'absence de nitrate augmentait la longueur la racicule (*i.e.* valeur maximale RL 64 mm en N+ vs 67 mm en N-), la biomasse mobilisée depuis les cotylédons (*i.e.* valeur moyenne CRM de 3 %) et celle perdue (*i.e.* valeur moyenne LM de 5 %). En revanche, une diminution de la longueur de l'hypocotyle (*i.e.* valeur maximale HL 83 mm en N+ vs 80 mm en N-) et de la biomasse allouée aux organes en croissance (*e.g.* valeur maximale HAM 47 % en N+ vs 42 % en N-) est constaté en absence de nitrate. Les indices de plasticité de réponse à l'absence de nitrate au froid ont montré une large gamme de variabilité en particulier pour la biomasse perdue (Tableau III-2).

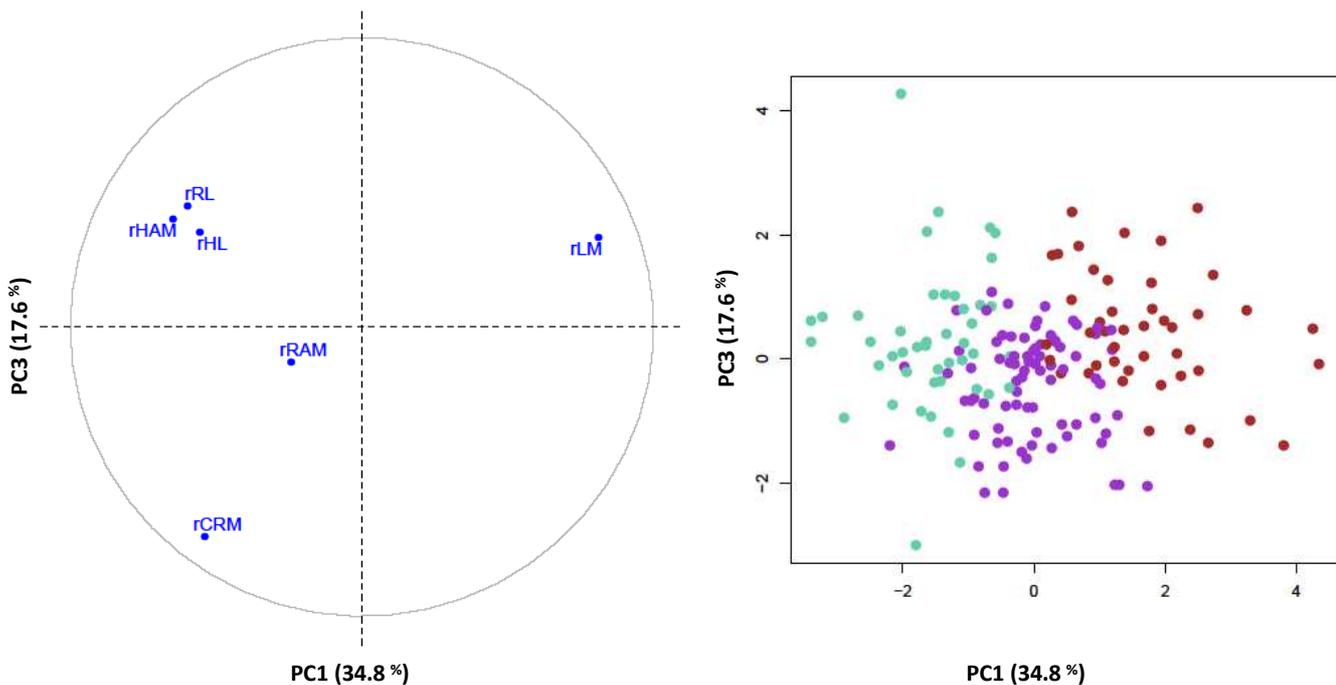
Quand on compare ces résultats avec ceux obtenus pour la température contrôle, on observe que les caractères étudiés présentent le même type de réponse à l'absence de nitrate au froid, à l'exception de RAM. En effet, pour la RAM, aucune différence n'était observée entre les deux conditions nitrate à la température de contrôle (Tableau I-1), alors qu'au froid cette différence s'est révélée significative (Tableau III-1, III-2). Cependant, ces réponses à l'absence de nitrate sont moins prononcées au froid, comme le montrent les indices de plasticité de réponse accessions en absence de nitrate (*e.g.* pour rRL entre -16 % à 34 % à 17 °C mais entre -14 % à 19 % à 10 °C). Toutefois, les gammes de variabilité en présence de nitrate étaient également moins importantes au froid. A titre d'exemple, en présence de nitrate, la RL variait de 32 à 71 mm à 17 °C, et de 31 et 64 mm à 10 °C. Par ailleurs, nous avons comparé la plasticité de réponse de la CC192 à l'absence de nitrate en condition de température optimale (*i.e.* 17 °C), avec sa plasticité de réponse au froid en condition nutritive optimale (*i.e.* N+). Pour les caractères exprimant l'allongement, la plasticité de réponse de la CC192 au froid est plus importante que sa plasticité de réponse à l'absence de nitrate (*e.g.* rtRL: -10 % vs rRL: 4 %). A l'inverse, pour les caractères exprimant la mobilisation de biomasse de la graine, c'est la plasticité de réponse à l'absence de nitrate qui est plus élevée que la plasticité de réponse au froid (*e.g.* rtLM: 19 % vs rLM : 32 %).

### ***III-2-2-Le froid modifie la réponse des accessions à l'absence de nitrate***

### PC1 vs. PC2



### PC1 vs. PC3



**Figure III-3.** Analyse en composantes principales (ACP) effectuée pour les caractères de croissance hétérotrophe au froid (10 °C). Les trois composantes principales expliquent 72 % de variance totale. Les t caractères (gauche) et les individus (droite) sont affichés sur le même plan PCA mais présents sur des figures distinctes. Les projections individuelles sont représentées par des points. Chaque point est une accession et la couleur représente des groupes distincts (L1, bleu ; L2, marron ; L3, violet). Les caractères projetés sont : l'indice de réponse à l'absence de nitrate de la longueur de l'hypocotyle (rHL), de la longueur de la racicule (rRL), de l'allocation de biomasse à l'hypocotyle (rHAM), de l'allocation de biomasse à la racicule (rRAM), de la biomasse résiduelle dans les cotylédons (rCRM) et de la biomasse perdue (rLM).

Comme le montrent les valeurs moyennes de la population pour les rTraits et l'interaction (G x NC), la réponse à l'absence de nitrate au froid est dépendante des accessions (Tableau III-2). De ce fait, le comportement moyen de la population pour chaque caractère s'explique par le comportement observé pour une large proportion des accessions, mais masque également d'autres comportements (Tableau III-2, Annexe III-1, rTraits). Ainsi, une ACP et une classification (Figure III-3) des accessions ont été réalisées en combinant la réponse à l'absence de nitrate de l'ensemble des caractères étudiés au froid.

Cette analyse montre une structuration de la diversité génétique différente de ce qui a été mis en évidence à 17 °C (Figures I-2 et III-3). Tout d'abord les différents caractères se répartissent différemment sur les trois premiers axes retenus. L'axe 1 de l'ACP, explique environ 35 % de la variation globale et est positivement corrélé à rLM et négativement à rHAM et rRL. L'axe 2 explique environ 19 % de la variation et les accessions sont séparées en fonction de la rHL (positivement corrélée à l'axe 2) et la rRAM (négativement corrélée à l'axe 2). Enfin, l'axe 3 explique environ 18 % de la variation et sépare les accessions en fonction de la rCRM (négativement corrélée à l'axe 3).

Ensuite, les accessions sont structurées selon trois groupes physiologiques différents en réponse à l'absence de nitrate (Figure III-3, Tableau III-3). Les accessions du groupe L1 (bleu) sont peu impactées par l'absence de nitrate. Seule leur allocation de biomasse à l'hypocotyle est affectée (HAM), ces accessions étant capables de l'augmenter (rHAM, + 13,2 %). Les accessions du groupe L2 (marron), mobilisent plus de biomasse depuis les cotylédons (rCRM, -27 %) tout en augmentant leur perte de biomasse (rLM, 50 %). Par ailleurs ces accessions réduisent l'allocation de biomasse vers l'hypocotyle en réponse à l'absence de nitrate (rHAM, -5 %). Enfin, alors que les accessions du groupe L3 (violet) ne sont pas affectées dans la mobilisation de la biomasse (rCRM, 0,4 %), elles se distinguent par une perte de biomasse importante (environ 16 %) et une diminution du pourcentage de biomasses allouées aux organes en croissance (HAM : -4 % et RAM : -9 %). A noter que pour ces trois groupes physiologiques, aucune différence significative n'est observée entre leur SM (*i.e.* SM de 5, 4,8 et 4,8 respectivement pour L1, L2 et L3). C'est ainsi que de nouveaux phénotypes de réponse à l'absence de nitrate ont été mis en évidence au froid, essentiellement par rapport à l'utilisation de la biomasse des graines.

Une comparaison des groupes d'accessions issus de la classification Ci à la température contrôle {C1, C2, C3, C4} et ceux issus de la classification Lj au froid {L1, L2, L3} a été réalisée en

**Table III-3:** Moyenne des indices de plasticité de réponse à l'absence de nitrate des caractéristiques d'élongation des plantules et des caractéristiques liées à la biomasse de la graine des trois phénotypes L1, L2, L3 identifiés au froid. Indices de réponse à l'absence de nitrate : de la longueur de l'hypocotyle (rHL), de la longueur de la racine (rRL), de l'allocation de biomasse à l'hypocotyle (rHAM), de l'allocation de biomasse à la racine (rRAM), de la biomasse résiduelle dans les cotylédons (rCRM) et de la biomasse perdue (rLM).

Caractères	Moyenne des rTraits à 10 °C		
	L1	L2	L3
rHL (%)	1,2	-3,6	0,8
rRL (%)	7,7	-1,5	1,4
rCRM (%)	-2,4	-26,5*	0,4
rHAM (%)	13,2*	-4,8*	-3,9*
rRAM (%)	2	-4,3	-9,8*
rLM (%)	-3,9	49,8*	16,2*

\* différence significative entre les valeurs observées en présence de nitrate (N+) et en absence de nitrate N-.

déterminant le nombre d'accessions aux intersections des groupes  $C_i$  et  $L_j$  ( $C_i \cap L_j$ , Tableau III-4). Les F-scores, qui indiquent la taille des intersections, varient de 0,11 à 0,35. Étant donné qu'aucune intersection ne tend vers 1, alors aucune des classifications  $C_i$  ne comprend le nombre total (ou maximal) des accessions présentes dans les classifications  $L_j$  auxquelles elles sont comparées. En d'autres termes, les accessions des quatre groupes de la classification  $C_i$  sont réparties dans l'ensemble des trois groupes de la classification  $L_j$ . De plus, la réponse à l'absence de nitrate des quatre groupes de la classification  $C_i$  (*i.e.* à la température de contrôle), est différente de celle des trois groupes de la classification  $L_j$  (*i.e.* au froid), à l'exception des groupes C2 et L2. De ce fait, l'intersection  $C2 \cap L2$  comprend des accessions qui ont des comportements similaires aux deux températures étudiées. Dans cette intersection, les accessions sont très peu affectées par l'absence de nitrate en terme d'allongement de l'hypocotyle (C2: +0,1 % vs L2: -3,6 %) et de la radicule (C2: -1,6 % vs L2: -1,5 %). Ces accessions sont plutôt affectées dans leurs variables de mobilisation de la biomasse de la graine en réponse à l'absence de nitrate, avec une augmentation de la valeur de rLM (C2: +75,1 % vs L2: + 49,8 %), et une diminution de la valeur de rCRM (C2: -13 % vs L2: -26,5 %) et HAM (C2: -19,3 % vs L2: -4,8 %) (Tableau I-3 et Tableau III-3). Or, pour cette intersection le nombre d'accession et le F-score (Table III-4) est faible par rapport aux autres intersections (*e.g.* 8 accessions et un F-score de 0,22 pour  $C2 \cap L2$  vs 25 accessions et un F-score de 0,35 pour  $C3 \cap L3$ ). Par conséquent, à l'exception des accessions présentes dans l'intersection  $C2 \cap L2$ , le froid provoque une modification du comportement des accessions en réponse à l'absence de nitrate et les assignant dans différents groupes phénotypiques.

### ***III-3- Influence du froid sur les loci identifiés***

Une analyse GWAS a été réalisée sur les caractères liés à la croissance hétérotrophe des plantules au froid (10 °C) dans les deux conditions d'apport en nitrates contrastées, ainsi que sur les caractères d'indice de réponse à l'absence de nitrate. Le tableau III-5 présente la liste des SNPs associés à ces caractères et leurs caractéristiques (position et seuil de significativité). La figure III-4 indique les positions de chacun des SNPs significatifs associés aux caractères évalués au froid ainsi que les éventuelles co-localisations avec les SNPs détectés à 17 °C projetés sur une carte physique représentant le génome de *M. truncatula* Mt0,4. Les résultats montrent 31 SNPs significativement associés aux caractères analysés. Nous avons trouvé 13 SNPs associés à des caractères de la performance des plantules au froid en conditions N (*i.e.* en condition N<sup>+</sup> : pour RL, RHL, RAM, CRM, LM et en condition N<sup>-</sup> : pour HL, RHL, CRM) répartis sur les chromosomes 2, 3, 5, 6 et 8 (Figure III-4). Nous avons également identifié 10 SNPs associés à l'indice de réponse de la

**Table III-4:** Détermination du nombre d’accessions aux intersections ( $C_i \cap L_j$ ) entre les 4 groupes de la classification de référence ( $C_i$ ) à la température contrôle (vert figure III-1: C1, C2, C3, C4) et les 3 groupes de la classification  $L_j$  au froid (bleu figure III-1: L1, L2, L3).

<b>ID<sup>a</sup></b>	<b>F-score<sup>b</sup></b>	<b>Nb<sup>c</sup></b>
<b>C1∩L1</b>	0,19	7
<b>C1∩L2</b>	0,11	4
<b>C1∩L3</b>	0,28	15
<b>C2∩L1</b>	0,18	7
<b>C2∩L2</b>	0,22	8
<b>C2∩L3</b>	0,22	12
<b>C3∩L1</b>	0,3	16
<b>C3∩L2</b>	0,25	13
<b>C3∩L3</b>	0,35	25
<b>C4∩L1</b>	0,31	16
<b>C4∩L2</b>	0,26	13
<b>C4∩L3</b>	0,35	24

<sup>a</sup>Identifiant des intersections  $C_i \cap L_j$ ,

<sup>b</sup>valeur de F-score,

<sup>c</sup>nombre d’accessions par intersection.

performance des plantules à l'absence de nitrate au froid (rTraits) (*i.e.* rCRM, rRAM, rLM) répartis sur les chromosomes 2, 3, 4, 5, 7 et 8. De même, 8 SNPs associés à l'ensemble des rTraits-combinés au froid (*i.e.* PC<sub>1</sub>, PC<sub>2</sub> et PC<sub>3</sub>) ont été identifiés sur tous les chromosomes exceptés sur le chromosome 4.

La projection des loci sur la carte physique du génome de *M. truncatula* (Figure III-4), montre l'existence de 11 régions de co-localisations entre les SNPs associés aux caractères estimés à la température contrôle (17 °C) et ceux associés aux caractères estimés au froid (10 °C). Parmi ces co-localisations, on note que, l'indices rTraits-combinés "PC3" corrélés à rRL à la température de contrôle (Figures I-2) et à rCRM au froid (Figure III-3) est contrôlé par une région restreinte autour du SNP "chr7\_23831505". Ce qui signifie que cette région est fortement associée à la réponse de la plantule à l'absence de nitrate et ce quelle que soit la température. On note également que, les caractères "RHL N+" et "RL N+" sont associés respectivement aux SNPs "chr3\_4207635" et "chr5\_42057552", quelle que soit la température (*i.e.* 17 et 10 °C). Suggérant que ces deux SNPs (*i.e.* chr3\_4207635, chr5\_42057552) contrôlent la réponse de l'allongement de la radicule à la présence de nitrate.

## ***IV-Discussion***

### ***IV-1-Le froid modifie la performance des plantules***

Le froid est un facteur limitant pendant la germination des graines (Nykiforuk & Johnson-Flanagan 1998; Finch-Savage et al. 2001) et pendant l'installation des plantules (Brunel et al. 2009; Dias et al. 2011; Pan et al. 2015). Cette installation peut être compromise, allant du simple ralentissement de la croissance hétérotrophe jusqu'à la limitation de la levée des plantules (Singh et al. 2016). Dans ce chapitre, les caractères sous-jacents à la variation de la croissance hétérotrophe (*e.g.* longueur des organes et mobilisation de la biomasse de la graine) et à la réponse des plantules à l'absence de nitrate ont été caractérisés pour la CC192 de *M. truncatula*, au froid (*i.e.* 10 °C).

A l'échelle du petit panel d'accession (Lot de graines A17) et de la CC192 (Lot de graines M14), nous constatons que le froid réduit l'allongement des organes de la plantule de *M. truncatula* (Tableau III-1, Figure III-2). Au niveau de l'ensemble des accessions, nous constatons que le froid a entraîné une réduction de l'allongement de l'hypocotyle avec des accessions plus sensibles que d'autres. Ce résultat est en concordance avec ce qui a été observé pour des accessions de *M. truncatula*

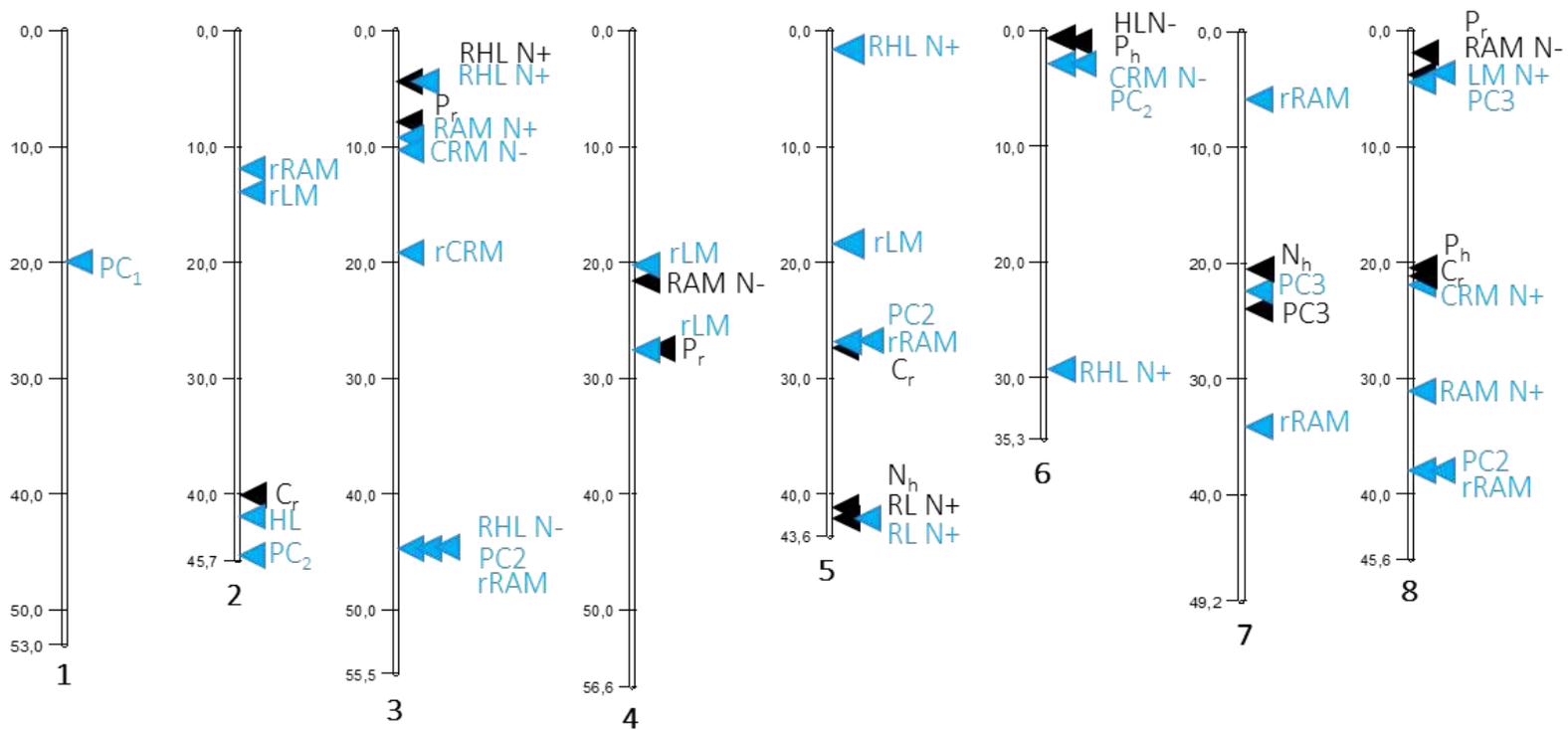
**Tableau III-5:** Liste des SNPs identifiés au froid (10 °C) associés aux (A) caractères de performance des plantules en absence (N-) et en présence (N+) de nitrate, (B) aux indices rTraits de performance des plantules (C) aux indices rTraits-combinés. Les caractères sont : longueur de l'hypocotyle (HL) et de la racicule (RL) en mm, ratio de longueur de la racicule :hypocotyle (RHL), pourcentage de biomasse résiduelle dans les cotylédons (CRM), de biomasse allouée à l'hypocotyle (HAM), de biomasse allouée à la racicule (RAM) et de biomasse perdue (LM) en %, indice de réponse à l'absence de nitrate de la biomasse résiduelle dans les cotylédons (rCRM), de la biomasse allouée à l'hypocotyle (rHAM), de la biomasse allouée à la racicule (rRAM) et de la biomasse perdue (rLM) en %, indices rTraits-combinées (PC<sub>1</sub>), (PC<sub>2</sub>) et (PC<sub>3</sub>) en %, <sup>a</sup> descripteur des SNPs : Identifiant des SNPs pour la version Mt4.0 du génome, Chr : numéro du chromosome ; Pos : position du SNP sur le chromosome en paires de bases <sup>b</sup> -Log<sub>10</sub>(P) : valeur du logarithme décimal de valeur P obtenue grâce au modèle MLM

Caractères	SNP <sup>a</sup>				Nb.	-Log <sub>10</sub> (P) <sup>b</sup>	
	Chr.	Position	ID				
<b>A</b>							
HL	N-	2	41977869	chr2_41977869		7	
RL	N+	5	42057552	chr5_42057552		7,4	
RHL	N+	3	4207635	chr3_4207635		7	
		5	1403063	chr5_1403063		7,6	
		6	29368458	chr6_29368458		7,5	
		3	44588276	chr3_44588276		7	
CRM	N+	8	21926225	chr8_21926225		7	
		N-	3	10344074	chr3_10344074		7
			6	2959983	chr6_2959983		7
RAM	N+	3	9356246	chr3_9356246	2	7,9	
		8	31177915	chr8_31177915		7,3	
LM	N+	4	27810776	chr4_27810776		7,1	
		8	3599783	chr8_3599783		7	
<b>B</b>							
rCRM		3	18979652	chr3_18979652		8,3	
rRAM		2	11807858	chr2_11807858	2	7,6	
		3	44598734	chr3_44598734		7,1	
		5	26996355	chr5_26996355		7,1	
		7	6023163	chr7_6023163	2	7,5	
		7	34207950	chr7_34207950		7,5	
rLM		8	38201604	chr8_38201604		7,6	
		2	13930455	chr2_13930455		7	
		4	20497760	chr4_20497760		7,6	
		5	18433002	chr5_18433002	2	7,1	
<b>C</b>							
PC <sub>1</sub>		1	20177330	chr1_20177330	1	7,3	
		2	45318722	chr2_45318722	1	7,2	
		3	44598734	chr3_44598734	1	7,6	
PC <sub>2</sub>		5	26996355	chr5_26996355	1	7,1	
		6	2910521	chr6_2910521	2	7,1	
		8	38087218	chr8_38087218	1	7,6	
PC <sub>3</sub>		7	22325025	chr7_22325025	1	7,1	
		8	4364193	chr8_4364193	1	7	

contrastées pour la longueur maximale de leur hypocotyle, où le froid (10 °C) ralentissait la vitesse de croissance et la longueur maximale de l'hypocotyle (Dias et al. 2011; Pierre et al. 2014). Cette réduction de la longueur de l'hypocotyle provoquée par le froid, a été liée à la réduction de la longueur des cellules (Pierre et al. 2014). Dans la présente étude, le froid impacte l'organe clé de la levée, ce qui peut compromettre le taux de levée des plantules, comme il a été constaté dans l'étude de De Ron et al. (2016). De même, l'allongement de la radicule a été réduit au cours et à la fin de la croissance avec des accessions plus sensibles que d'autres, qu'il y ait eu un apport de nitrate ou non. Ce résultat rejoint celui obtenu par Brunel et al. (2009) montrant que le froid (10 °C) diminuait l'allongement des plantules de *M. truncatula*. L'effet inhibiteur du froid sur la croissance du système racinaire, en particulier aux stades précoces, a été également mis en évidence par Lahti et al. (2005). À l'échelle des trois accessions étudiées, nous avons constaté que le potentiel d'allongement des accessions les unes par rapport aux autres pour les deux organes en croissance était conservé quelle que soit la condition nutritive et la température testée. Dans les deux conditions nutritives étudiées, le froid a eu pour effet d'augmenter non seulement la mobilisation de la biomasse depuis les cotylédons, mais aussi sa perte (Tableau III-1). Comme cette perte est liée au processus de respiration, alors ce résultat est en concordance avec l'étude de Pierre et al. (2014) qui suggérait qu'au froid, l'énergie nécessaire pour atteindre le potentiel d'allongement maximale de l'hypocotyle devait être plus élevée qu'à température optimale. En lien avec ce surplus de dépense d'énergie, il a été montré que le froid favorise l'accumulation des réserves dans la plantule, notamment les carbohydrates (Repo et al. 2004).

#### ***IV-2-Le froid modifie la réponse des caractères à l'absence de nitrate***

Le froid comme l'absence du signal nitrate sont susceptibles, individuellement ou en combinaison, d'influencer l'établissement des plantules en affectant l'élongation des organes (hypocotyle et radicule) et la mobilisation de la biomasse de la graine à ces organes. Dans cette étude, nous avons évalué l'influence de la combinaison de ces deux conditions environnementales sur la performance des plantules en hétérotrophie (Tableau III-2). Aux deux températures, l'absence de nitrate provoque d'une part, l'augmentation de l'allongement de la radicule (3 accessions et CC192) et l'augmentation de la mobilisation de la biomasse depuis les cotylédons ainsi que sa perte et provoque d'autre part une réduction de l'allongement de l'hypocotyle (CC192).



**Figure III-4** : Localisation sur la carte physique la version Mt4.0. v2 du génome des SNPs significatifs associés aux caractères de performance des plantules (allongement et mobilisation de la biomasse) en absence (N-) et en présence (N+) de nitrate, des indices rTraits de performance des plantules, des indices rTraits-combinés à 10 °C (bleu). Les SNPs associés aux caractères performance de la plantule et les concentrations en anions inorganiques dans la plantule à 17 °C représentant colocalisations sont également projetés (noire) et dont dans le détail est présentés les tableaux II-7 et tableau I-4. Les barres verticales représentent les huit chromosomes du génome de *M. truncatula*. Les positions des loci sont indiquées à leur droite par un triangle. Les caractères sont : longueur de l'hypocotyle (HL) et de la racine (RL) en mm, ratio de longueur de la racine :hypocotyle (RHL), pourcentage de biomasse résiduelle dans les cotylédons (CRM), de biomasse allouée à l'hypocotyle (HAM), de biomasse allouée à la racine (RAM) et de biomasse perdue (LM) en %, indice de réponse à l'absence de nitrate de la biomasse résiduelle dans les cotylédons (rCRM), de la biomasse allouée à l'hypocotyle (rHAM), de la biomasse allouée à la racine (rRAM) et de la biomasse perdue (rLM) en %, indices rTraits-combinées (PC<sub>1</sub>), (PC<sub>2</sub>) et (PC<sub>3</sub>) en %,., pourcentage en carbone dans la graine en %, (C); composition en anions inorganiques de l'axe embryonnaire à la fin de la croissance hétérotrophe en présence de nitrate 5 mM (N+) : pourcentage en anions nitrate NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (N<sub>h</sub>), phosphate PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> (P<sub>h</sub>) dans l'hypocotyle en %, et pourcentage en anions chlorure Cl<sup>-</sup> (C<sub>r</sub>) et phosphate PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> (P<sub>r</sub>) dans la racine en %.

Toutefois, cette réponse à l'absence de nitrate pour les caractères de longueurs des organes et de mobilisation de la biomasse des graines, étaient moins importants au froid en comparaison avec la température contrôle. De plus, le stress froid combiné à l'absence de nitrate stimule davantage la respiration (LM à 10 °C N- : 26,1 %) qu'en cas de stress séparé (LM à 10 °C N+ : 21,6 %) et ce, pour maintenir les fonctions biologiques liés à la croissance hétérotrophe. Ce qui confirme l'existence d'une interaction entre l'absence du signal nitrate et l'effet du froid.

Une analyse multivariée, combinant des différents profils de plasticité de réponse (indices rTraits) de la performance des plantules à l'absence de nitrate a été réalisé au froid (Figure III-3 ; Table III-3). Cette analyse a fait émerger une nouvelle typologie de comportement des accessions, ce qui a permis de définir trois phénotypes aux comportements contrastés en réponse à l'absence de nitrate en condition de froid. Le phénotype L1, favorise l'allocation de la biomasse allouée aux organes. Le phénotype L2 maintient l'allongement de sa racine en dépensant plus d'énergie (augmentation de LM) fournie par la biomasse provenant des cotylédons, mais subit une réduction d'allocation de biomasse à l'hypocotyle. Enfin, le phénotype L3 se distingue, d'une part par sa perte de biomasse et d'autre part par une stabilité de l'allongement de son hypocotyle et de sa racine, malgré une réduction de la biomasse qui leur ait alloué. Cette analyse montre que l'essentiel de la variance était expliquée par les mêmes caractères (rHL, rHAM et rLM) quelle que soit la température (17 °C, Figure I-2; 10 °C, Figure III-3). Seulement, le froid modifie la répartition des accessions dans les groupes des phénotypes définis à la température contrôle (Tableau III-4). La comparaison des groupes d'accessions définis aux deux températures, montre que les accessions des trois phénotypes définis à 10 °C (Lj) étaient redistribuées dans l'ensemble des quatre de phénotypes définis à 17 °C (Ci). Ce qui indique que le froid provoque une modification du comportement de la majorité des accessions en réponse à l'absence de nitrate et les assignent dans différents groupes phénotypiques. Enfin, la comparaison des différents phénotypes, permet de mettre en avant des accessions d'intérêt physiologique, capable de maintenir un allongement normal de la plantule en réponse à l'absence de nitrate quelle que soit la température (*i.e.* accessions de l'intersection C2∩L2).

### ***IV-3-Identification des loci associés aux caractéristiques de performance des plantules au froid***

La réponse des plantules aux basses températures est soumise à un contrôle génétique complexe en particulier aux stades primaires de leur vie. Pour disséquer ce contrôle génétique des plantules au froid, la cartographie d'association a été appliquée à une vaste gamme de caractères



complexes d'importance (Pan et al. 2015; Lv et al. 2015). Outre la cartographie d'association, la cartographie de liaison a permis l'identification des QTLs liés à la réponse au froid au stade plantules, notamment chez *M. truncatula* (Dias et al. 2011; Youssef et al. 2016).

Dans la présente étude, l'analyse GWAS utilisée a montré que les caractères liés à la performance des plantules au froid en présence ou non de nitrate et que les indices de réponse à l'absence de nitrate étaient contrôlés par de multiples régions génomiques (31 loci) réparties sur l'ensemble des chromosomes (Figure III-4; Tableau III-5). Ensuite, bien que la baisse de la température a modifié le contrôle génétique d'un ensemble des caractères, de nombreux caractères sont associés aux mêmes SNPs quelle que soit la température. Par exemple, en présence de nitrate, quelle que soit la température, les mêmes loci étaient associés aux caractères RHL (SNP chr3\_4207635) et RL (SNP chr5\_42057552). Ces deux SNPs se trouvent à proximité de deux gènes de transporteurs de nitrate. Le premier gène *Medtr3g014790* est proche du SNP chr3\_4207635, associé au ratio d'allongement de la racicule par rapport à l'allongement de l'hypocotyle. Le second, localisé à proximité du SNP chr5\_42057552, est le gène codant le transporteur de nitrate MtNPF6.8 et qui est impliqué dans l'allongement de la racicule de *M. truncatula*, en présence de nitrate (Morère-Le Paven et al. 2011). De plus, le SNP (chr5\_42057552) est également très proche du SNP (chr5\_41341940 à 17 °C) associé à la concentration en nitrate dans l'hypocotyle à la fin de la croissance. Ainsi, bien que la réponse à l'absence de nitrate de l'allongement de la plantule en hétérotrophie soit moins intense au froid, il est probable qu'elle soit contrôlée par les mêmes voies de signalisation qu'en température contrôlée.

Enfin, la comparaison des QTLs identifiés par Dias et al. (2011) et Youssef et al. (2016), avait mis en avant trois co-localisations importantes pour la longueur maximale de l'hypocotyle (MaxHL) à basse température, qui montrent que la longueur des cellules serait à l'origine de la variation de la longueur maximale de l'hypocotyle au froid. Or, dans la présente étude seulement un QTL a été identifié comme associé à la longueur finale de l'hypocotyle (HL) et qui était différent de ceux identifiés par Dias et al. (2011) et Youssef et al. (2016). Cela est en premier lieu, aux conditions de croissance des plantules qui étaient différentes (*i.e.* Milieu de culture : MS vs H<sub>2</sub>O) et de l'astringence de détection de QTLs dans notre méthode. Cela est également lié, au fond génétique utilisé dans notre étude (*i.e.* collection naturelle) qui est différent de celui utilisé par l'étude de Dias et al. (2011) et Youssef et al. (2016) (*i.e.* population de RIL issue d'un croisement entre le génotype Jemalong A17 et F83005-5 contrastés pour MaxHL).



### ***V- Idées principales du chapitre III***

Le froid administré aux plantules de *M. truncatula* durant la croissance hétérotrophe en comparaison avec la température contrôle, provoque :

- Une réduction de la longueur des organes au cours et à la fin de la croissance hétérotrophe pour un panel d'accession de trois ou 192 accessions de *M. truncatula* et quelle que soit la condition nitrate.
- Une mobilisation plus importante de la biomasse depuis les cotylédons quelle que soit la condition nitrate et une augmentation de la biomasse perdue
- Une variation de l'allocation de la biomasse aux organes en fonction de la condition nutritive
- Une diminution de l'intensité de réponse à l'absence de nitrate de l'allongement des organes et de la mobilisation de la biomasse des graines (sauf pour RAM).
- Une modification des groupes de phénotypes de réponse à l'absence de nitrate et de la répartition des accessions au sein de ces groupes.
- Une modification d'une partie des loci associées aux caractères analysés.



**Chapitre IV : Influence Des Facteurs Géo-Climatiques  
Des Sites D'origine Des Accessions Et Du Lot De Graines  
Sur La Performance Des Plantules Et Sur Leur Réponse  
Aux Conditions Environnementales Pénalisantes**

---



## ***I-Introduction***

La performance des plantules dépend des caractéristiques génotypiques et physiologiques des graines et des plantules, ainsi que de l'environnement azoté et thermique dans lesquelles elles se développent. Nous avons considéré la composition azotée et carbonée des graines en tant que caractéristiques physiologiques qui influencent la performance des plantules. Toutefois, ces caractéristiques physiologiques peuvent évoluer d'une année à une autre chez les graines des mêmes accessions. De même, elles peuvent dépendre des propriétés géo-climatiques de leurs sites d'origines. Dans cette partie de l'étude, nous avons évalué l'influence de ces propriétés sur la performance des plantules.

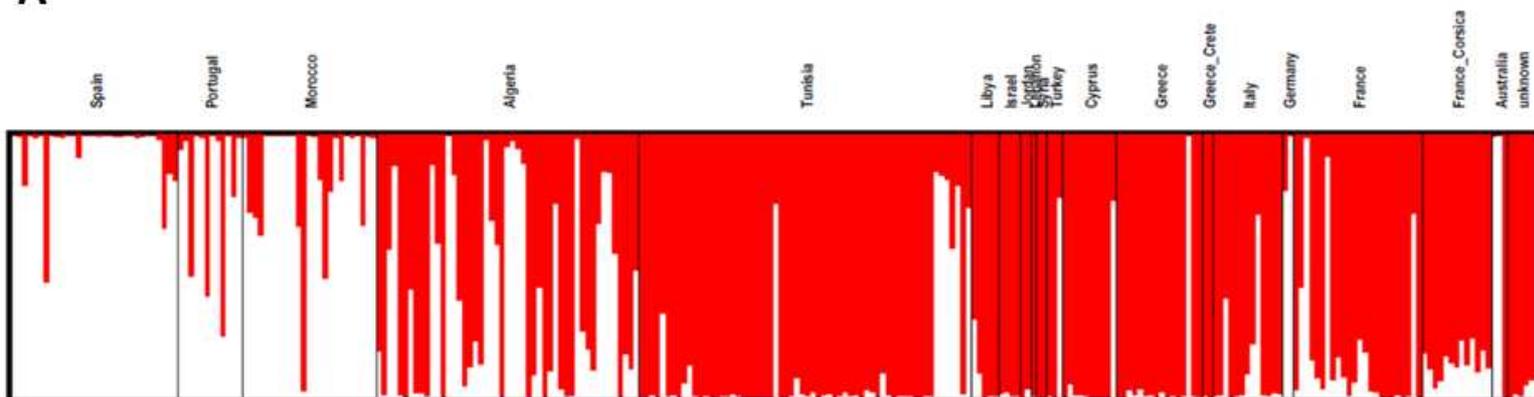
Le premier objectif était d'évaluer l'influence de l'année de production des graines sur la performance des plantules aux différentes conditions environnementales étudiées. Pour y répondre, des graines de *M. truncatula* produites sur deux années successives ont été mises en culture afin d'estimer et de comparer les déterminants de la performance des plantules (*i.e.* la longueur des organes et la mobilisation de la biomasse de la graine) à la fin de la croissance hétérotrophe.

Le deuxième objectif était d'évaluer l'influence des conditions géo-climatiques des sites d'origine des accessions de la CC192 (lignées dérivés d'écotypes adaptés aux caractéristiques de ces sites d'origine) sur la performance des plantules, aux différentes conditions environnementales étudiées. Pour y répondre, nous avons cherché s'il existait des liens entre les données géo-climatiques représentatives des sites d'origine des accessions et les déterminants de la performance des plantules selon les conditions d'apport de nitrate et des températures étudiées.

## ***II-Matériel et méthodes***

### ***I-1-Matériel***

Deux lots de graines ont été utilisés, le lot I produit en 2013 et lot II produit en 2014 dans les serres du CRB de Montpellier. Chacun de ces deux lots est constitué de la même core collection de 192 accessions (CC192). L'ensemble des travaux de thèse sur la CC192 présentés jusqu'à présent a été réalisé sur le lot II.

**A****B**

**Figure IV-1-**Distribution géographique des accessions de la CC192 (A) à l'aide du logiciel STRUCTURE (Pritchard et al. 2000) sous forme d'histogramme de probabilités d'assignation des accessions, et (B) à l'aide de la méthode DAPC (Discriminant analysis of principal components) (Jombart et al. 2010). Les accessions sont structurées en deux groupes génétiques situés à l'Ouest (blanc), et du Centre à l'Est du bassin méditerranéen (rouge) (Bonhomme et al. 2014 ; Loridon et al. 2013).

## ***II-2-Analyses statistiques et estimation des caractères***

### ***II-2-1-Influence du lot de production des graines***

L'impact de l'année de production des graines sur la performance des plantules en interaction avec la variation des conditions thermiques et nutritives, a été évalué dans ce chapitre. Pour cela, des plantules d'un lot de graines supplémentaire, le lot I, ont été caractérisées pour les caractères liés à la mobilisation de la biomasse de la graines et l'allongement des organes et ce dans les mêmes conditions hétérotrophes décrites dans chapitre I pour le lot de graines II. L'ensemble de ces caractères (estimés et mesurés) aux deux températures (17°C et 10°C) et aux deux conditions d'apport en nitrate (absence N- et présence N+ : 5 mM) ont par la suite été analysés par une ANOVA. Pour cela, par le biais d'un modèle GLM (Équation IV-1), une ANOVA a été conduite pour déterminer l'effet du génotype (G), du lot de graines (Lot) et l'effet de leur interaction (G x Lot) dans chaque condition nutritive (N- et N+) :

$$\text{Équation IV - 1 : } Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + E_{ijk}$$

avec  $Y_{ijk}$  correspond à la  $k^{\text{ième}}$  valeur du caractère pour le  $i^{\text{ème}}$  génotype de la  $j^{\text{ième}}$  du lot de graines,  $\mu$  la moyenne générale du caractère pour la population d'accessions,  $\alpha_i$  est l'effet fixe de  $i^{\text{ème}}$  génotype (l'effet G),  $\beta_j$  est l'effet fixe de la  $j^{\text{ième}}$  du lot de graines ( Lot),  $\alpha\beta_{ij}$  est l'effet de l'interaction entre le  $i^{\text{ème}}$  génotype et la  $j^{\text{ième}}$  du lot de graines( effet G x NC / G x Lot), et  $E_{ijk}$  représente l'erreur résiduelle aléatoire. Cela a permis de définir l'effet du facteur « lot de graines » et son interaction avec l'effet de l'accession. Les corrélations entre les différents caractères ont aussi été comparées entre les deux lots de graines.

### ***II-2-2- Influence des caractéristiques géo-climatiques des centres d'origine des accessions de la core collection***

La core collection étudiée a révélé l'existence d'un effet significatif des conditions environnementales lors de la croissance hétérotrophe des plantules (froid et absence de nitrate) en interaction avec l'effet de l'accession pour la majorité des caractères étudiés. L'adaptation à ces environnements pénalisants est probablement acquise par les accessions dans leur environnement d'origine par sélection naturelle. Afin de vérifier cela, nous avons estimé le lien entre le comportement des accessions lors de la croissance hétérotrophe sous deux régimes de nitrate (absence N- et présence N+ : 5 mM) et deux températures (17°C et 10°C), d'une part, et les caractéristiques géo-climatiques des sites dont sont originaires les accessions, d'autre part.

**Table IV-1 :** Effet du lot de graines sur l’allongement des organes lors de la croissance hétérotrophe de la CC192 réalisée dans différentes conditions environnementales : 17 °C et 10 °C en présence (N+) et en absence (N-) de nitrate. <sup>a</sup>Temp: Températures utilisées pour la croissance hétérotrophe, 17 °C (température de contrôle) et 10 °C (froid). <sup>b</sup>NC : conditions d’apport en nitrate : N- (absence) ; N+ (5 mM de nitrate). <sup>c</sup>Lot : numéro du lot selon l’année de production des graines. I, lot 2013 ; II, lot 2014. <sup>d</sup>Moy : Moyenne de chaque caractère par lot de graines, n = 2 répétition biologique x 7–10 organes groupés. <sup>e</sup>Min/max : gamme de variabilité représentée par la valeur minimum et maximum. <sup>f</sup>Valeurs de Fisher des facteurs : G, Génotype ; L, lot de graines ; GxL, interaction entre le Génotype et le Lot de graines. <sup>g</sup>r : coefficient de corrélation de Pearson. Seuil de significativité : \*\*\*,  $P < 0,001$  ; \*\*  $P < 0,01$  ; ns, non significatif.

Caractères	Temp <sup>a</sup>	NC <sup>b</sup>	Lot <sup>c</sup>	Moy <sup>d</sup>	Min/Max <sup>e</sup>	Valeurs de Fisher <sup>f</sup>			r <sup>g</sup>
						G	L	GxL	
HL (mm)	17 °C	N+	I	61,5	45,32/80,34	35***	2339***	4***	0,78***
			II	69,5	48,92/87,22				
RL (mm)			I	48,3	32,6/65,64	26***	509***	6***	
			II	52,5	32,44/70,74				
HL (mm)		N-	I	61,1	43,95/75,15	32***	1813***	4***	0,78***
			II	68,2	46,81/86,3				
RL (mm)			I	51,7	33,1/66,06	29***	185***	5***	
			II	54,4	35,5/77,95				
HL (mm)	10 °C	N+	I	64,5	46,7/80,33	186***	12***	4***	0,81***
			II	65,2	44,59/83,01				
RL (mm)			I	42,6	28,98/58,93	27***	907***	5***	
			II	47,1	30,85/64				
HL (mm)		N-	I	60,2	47,67/75,95	37***	963***	5***	0,73***
			II	64,8	51,31/79,82				
RL (mm)			I	45,9	28,95/63,56	26***	139***	4***	
			II	48	29,88/66,69				

Dans le cadre du consortium Hapmap, nous utilisons la core collection de 192 accessions sauvages de *M. truncatula* représentatives de la diversité naturelle de cette espèce (Figure IV-1). Parmi elle, une grande partie de la diversité de l'espèce provient de pays comme la Libye, le Maroc et la Tunisie. Bien que les accessions soient présentes avec une densité inégale le long du bassin méditerranéen, cette collection donne suffisamment d'informations sur la diversité naturelle de l'espèce et sur leurs biotopes d'origine. Dans ce cadre, la core collection de *M. truncatula* a été subdivisée en deux sous-populations (Figure IV-1b), l'une à l'extrémité ouest du bassin méditerranéen, en blanc, et l'autre au centre de la méditerranée, en rouge (Loridon et al. 2013; Bonhomme et al. 2014).

Les informations géo-climatiques des sites d'origine de la CC192 ont été collectées et modélisées pour avoir une description climatique des centres d'origine des accessions. En effet, Hijmans et al. ont généré en 2005 une banque de données climatiques à haute résolution pour les zones terrestres mondiales (à l'exception de l'Antarctique) sous le nom de 'WorldClim version 1' qui a été enrichie par Fick & Hijmans en 2017 dans la version "WorldClim version 2" disponible sur le lien <http://worldclim.org/version2>. Les données ont été produites avec une résolution spatiale de 1 km<sup>2</sup> pour capturer les variations environnementales, en particulier dans les zones à forts gradients climatiques. Ces informations géo-climatiques ont été collectées dans 60000 stations météorologiques réparties dans 23 régions pour une période de 30 ans comprise entre 1970 et 2000. Cela a permis de modéliser les informations sur la base de la géo-localisation (longitude, latitude, altitude) et de l'ensemble des données climatiques (températures, précipitations, radiations solaires, humidité et vitesse du vent) afin qu'elles soient représentatives du climat moyen de chaque site. Les données géo-climatiques utilisées dans ce chapitre ont été sélectionnées avec la collaboration de Jean-Marie Proserpi de INRAE de Montpellier.

Dans le cadre de cette thèse nous avons cherché s'il existait des relations entre ces données géo-climatiques d'une part et les caractéristiques de la croissance hétérotrophe et de la réponse à l'absence de nitrate et au froid d'autre part. Nous avons donc réalisé une analyse en composante principale (ACP), bâtie grâce à l'utilisation de 106 caractères géo-climatiques de la CC192. Ensuite, sur la base de cette ACP, nous avons projeté les caractères de performance des plantules selon les différentes conditions environnementales étudiées, ainsi que les caractères indiquant les indices de réponse à l'absence de nitrate et au froid. Ensuite, une analyse de variance ANOVA suivie d'un test post-hoc de Student–Newman–Keuls (SNK) ont été réalisés pour différencier les groupes définis suite à l'ACP.

**Table IV-2 :** Effet du lot de graines sur la mobilisation de la biomasse de la graine lors de la croissance hétérotrophe de la CC192 réalisée dans différentes conditions environnementales : 17 °C et 10 °C en présence (N+) et en absence (N-) de nitrate. <sup>a</sup>Temp: Températures utilisées pour la croissance hétérotrophe ; 17 °C (température de contrôle) et 10 °C (froid) . <sup>b</sup>NC : conditions d'apport en nitrate : N- (absence) ; N+ (5 mM de nitrate). <sup>c</sup>Lot : numéro du lot selon l'année de production des graines. I, lot 2013 ; II, lot 2014. <sup>d</sup>Moy : Moyenne de chaque caractère par lot de graines, n =3 répétition de graine x 2 répétition biologique x 7–10 organes groupés <sup>e</sup>Min/max : gamme de variabilité représentée par la valeur minimum et maximum. <sup>f</sup>Valeur de Fisher des facteurs : G, Génotype ; L, lot de graines ; GxL, interaction Génotype x lot de graines. <sup>g</sup>r : coefficient de corrélation de Pearson entre les caractères aux deux lots. Seuil de significativité : \*\*\*,  $P < 0,001$ ; \*\*,  $P < 0,01$ ; ns, non significative.

Caractères	Temp <sup>a</sup>	NC <sup>b</sup>	Lot <sup>c</sup>	Moy <sup>d</sup>	Min/Max <sup>e</sup>	Valeur de Fisher <sup>f</sup>			r <sup>g</sup>																																																																																																																																																																											
						G	L	GxL																																																																																																																																																																												
SM (mg)	17 °C	N+	I	4,5	2,5/6,7	40***	401***	5***	0,79***																																																																																																																																																																											
			II	4,8	2,3/7,9					CRM (%)	I	33,2	20,5/46,3	8***	665***	5***	0,29***	II	28,5	17,0/39,4	HAM (%)	I	33,3	21,4/43,8	11***	210***	6***	0,29***	II	35,7	20,8/52,1	RAM (%)	I	13,0	9,1/18	9***	5442***	6***	0,26***	II	8,9	6,3/12,3	LM (%)	I	11,4	0,2/32,3	6***	370***	4***	0,15	II	18,5	3,1/39,8	CRM (%)	I	36,2	25,8/46,1	9***	5222***	5***	0,32***	II	25,4	14,9/35,3	HAM (%)	I	30,8	18,7/46,8	8***	56***	4***	0,28***	II	32,3	4,1/54,5	RAM (%)	I	13,9	9,3/21,5	10***	6593***	6***	0,31***	II	9,0	4,5/15,0	LM (%)	I	10,8	0,6/29,7	5***	1576***	4***	0,01	II	23,9	6,8/39,2	CRM (%)	I	25,3	15,3/34,8	9***	134***	3***	0,47***	II	27,0	12,6/39,1	HAM (%)	I	33,9	23,7/44,7	10***	23***	5***	0,34***	II	33,0	11,7/47,2	RAM (%)	I	10,2	7,3/13,9	9***	256***	4***	0,41***	II	9,3	4,2/14,0	LM (%)	I	20,4	2,8/37,0	7***	3***	5***	0,17	II	21,6	6,4/39,1	CRM (%)	I	25,6	17,5/35,5	8***	68***	3***	0,40***	II	24,2	10,1/36,8	HAM (%)	I	30,3	22,0/49,8	6***	94***	3***	0,37***	II	32,1	13,3/42,4	RAM (%)	I	9,3	5,9/15,1	12***	167***	6***	0,34***	II	8,6	5,3/15,6	LM (%)	I	24,7	6,7/43,5	6***	8***
CRM (%)			I	33,2	20,5/46,3	8***	665***	5***	0,29***																																																																																																																																																																											
			II	28,5	17,0/39,4					HAM (%)	I	33,3	21,4/43,8	11***	210***	6***	0,29***	II	35,7	20,8/52,1	RAM (%)	I	13,0	9,1/18	9***	5442***	6***	0,26***	II	8,9	6,3/12,3	LM (%)	I	11,4	0,2/32,3	6***	370***	4***	0,15	II	18,5	3,1/39,8	CRM (%)	I	36,2	25,8/46,1	9***	5222***	5***	0,32***	II	25,4	14,9/35,3	HAM (%)	I	30,8	18,7/46,8	8***	56***	4***	0,28***	II	32,3	4,1/54,5	RAM (%)	I	13,9	9,3/21,5	10***	6593***	6***	0,31***	II	9,0	4,5/15,0	LM (%)	I	10,8	0,6/29,7	5***	1576***	4***	0,01	II	23,9	6,8/39,2	CRM (%)	I	25,3	15,3/34,8	9***	134***	3***	0,47***	II	27,0	12,6/39,1	HAM (%)	I	33,9	23,7/44,7	10***	23***	5***	0,34***	II	33,0	11,7/47,2	RAM (%)	I	10,2	7,3/13,9	9***	256***	4***	0,41***	II	9,3	4,2/14,0	LM (%)	I	20,4	2,8/37,0	7***	3***	5***	0,17	II	21,6	6,4/39,1	CRM (%)	I	25,6	17,5/35,5	8***	68***	3***	0,40***	II	24,2	10,1/36,8	HAM (%)	I	30,3	22,0/49,8	6***	94***	3***	0,37***	II	32,1	13,3/42,4	RAM (%)	I	9,3	5,9/15,1	12***	167***	6***	0,34***	II	8,6	5,3/15,6	LM (%)	I	24,7	6,7/43,5	6***	8***	3***	0,31***	II	26,1	7,3/56,0						
HAM (%)			I	33,3	21,4/43,8	11***	210***	6***	0,29***																																																																																																																																																																											
			II	35,7	20,8/52,1					RAM (%)	I	13,0	9,1/18	9***	5442***	6***	0,26***	II	8,9	6,3/12,3	LM (%)	I	11,4	0,2/32,3	6***	370***	4***	0,15	II	18,5	3,1/39,8	CRM (%)	I	36,2	25,8/46,1	9***	5222***	5***	0,32***	II	25,4	14,9/35,3	HAM (%)	I	30,8	18,7/46,8	8***	56***	4***	0,28***	II	32,3	4,1/54,5	RAM (%)	I	13,9	9,3/21,5	10***	6593***	6***	0,31***	II	9,0	4,5/15,0	LM (%)	I	10,8	0,6/29,7	5***	1576***	4***	0,01	II	23,9	6,8/39,2	CRM (%)	I	25,3	15,3/34,8	9***	134***	3***	0,47***	II	27,0	12,6/39,1	HAM (%)	I	33,9	23,7/44,7	10***	23***	5***	0,34***	II	33,0	11,7/47,2	RAM (%)	I	10,2	7,3/13,9	9***	256***	4***	0,41***	II	9,3	4,2/14,0	LM (%)	I	20,4	2,8/37,0	7***	3***	5***	0,17	II	21,6	6,4/39,1	CRM (%)	I	25,6	17,5/35,5	8***	68***	3***	0,40***	II	24,2	10,1/36,8	HAM (%)	I	30,3	22,0/49,8	6***	94***	3***	0,37***	II	32,1	13,3/42,4	RAM (%)	I	9,3	5,9/15,1	12***	167***	6***	0,34***	II	8,6	5,3/15,6	LM (%)	I	24,7	6,7/43,5	6***	8***	3***	0,31***	II	26,1	7,3/56,0																	
RAM (%)			I	13,0	9,1/18	9***	5442***	6***	0,26***																																																																																																																																																																											
			II	8,9	6,3/12,3					LM (%)	I	11,4	0,2/32,3	6***	370***	4***	0,15	II	18,5	3,1/39,8	CRM (%)	I	36,2	25,8/46,1	9***	5222***	5***	0,32***	II	25,4	14,9/35,3	HAM (%)	I	30,8	18,7/46,8	8***	56***	4***	0,28***	II	32,3	4,1/54,5	RAM (%)	I	13,9	9,3/21,5	10***	6593***	6***	0,31***	II	9,0	4,5/15,0	LM (%)	I	10,8	0,6/29,7	5***	1576***	4***	0,01	II	23,9	6,8/39,2	CRM (%)	I	25,3	15,3/34,8	9***	134***	3***	0,47***	II	27,0	12,6/39,1	HAM (%)	I	33,9	23,7/44,7	10***	23***	5***	0,34***	II	33,0	11,7/47,2	RAM (%)	I	10,2	7,3/13,9	9***	256***	4***	0,41***	II	9,3	4,2/14,0	LM (%)	I	20,4	2,8/37,0	7***	3***	5***	0,17	II	21,6	6,4/39,1	CRM (%)	I	25,6	17,5/35,5	8***	68***	3***	0,40***	II	24,2	10,1/36,8	HAM (%)	I	30,3	22,0/49,8	6***	94***	3***	0,37***	II	32,1	13,3/42,4	RAM (%)	I	9,3	5,9/15,1	12***	167***	6***	0,34***	II	8,6	5,3/15,6	LM (%)	I	24,7	6,7/43,5	6***	8***	3***	0,31***	II	26,1	7,3/56,0																												
LM (%)			I	11,4	0,2/32,3	6***	370***	4***	0,15																																																																																																																																																																											
			II	18,5	3,1/39,8					CRM (%)	I	36,2	25,8/46,1	9***	5222***	5***	0,32***	II	25,4	14,9/35,3	HAM (%)	I	30,8	18,7/46,8	8***	56***	4***	0,28***	II	32,3	4,1/54,5	RAM (%)	I	13,9	9,3/21,5	10***	6593***	6***	0,31***	II	9,0	4,5/15,0	LM (%)	I	10,8	0,6/29,7	5***	1576***	4***	0,01	II	23,9	6,8/39,2	CRM (%)	I	25,3	15,3/34,8	9***	134***	3***	0,47***	II	27,0	12,6/39,1	HAM (%)	I	33,9	23,7/44,7	10***	23***	5***	0,34***	II	33,0	11,7/47,2	RAM (%)	I	10,2	7,3/13,9	9***	256***	4***	0,41***	II	9,3	4,2/14,0	LM (%)	I	20,4	2,8/37,0	7***	3***	5***	0,17	II	21,6	6,4/39,1	CRM (%)	I	25,6	17,5/35,5	8***	68***	3***	0,40***	II	24,2	10,1/36,8	HAM (%)	I	30,3	22,0/49,8	6***	94***	3***	0,37***	II	32,1	13,3/42,4	RAM (%)	I	9,3	5,9/15,1	12***	167***	6***	0,34***	II	8,6	5,3/15,6	LM (%)	I	24,7	6,7/43,5	6***	8***	3***	0,31***	II	26,1	7,3/56,0																																							
CRM (%)			I	36,2	25,8/46,1	9***	5222***	5***	0,32***																																																																																																																																																																											
			II	25,4	14,9/35,3					HAM (%)	I	30,8	18,7/46,8	8***	56***	4***	0,28***	II	32,3	4,1/54,5	RAM (%)	I	13,9	9,3/21,5	10***	6593***	6***	0,31***	II	9,0	4,5/15,0	LM (%)	I	10,8	0,6/29,7	5***	1576***	4***	0,01	II	23,9	6,8/39,2	CRM (%)	I	25,3	15,3/34,8	9***	134***	3***	0,47***	II	27,0	12,6/39,1	HAM (%)	I	33,9	23,7/44,7	10***	23***	5***	0,34***	II	33,0	11,7/47,2	RAM (%)	I	10,2	7,3/13,9	9***	256***	4***	0,41***	II	9,3	4,2/14,0	LM (%)	I	20,4	2,8/37,0	7***	3***	5***	0,17	II	21,6	6,4/39,1	CRM (%)	I	25,6	17,5/35,5	8***	68***	3***	0,40***	II	24,2	10,1/36,8	HAM (%)	I	30,3	22,0/49,8	6***	94***	3***	0,37***	II	32,1	13,3/42,4	RAM (%)	I	9,3	5,9/15,1	12***	167***	6***	0,34***	II	8,6	5,3/15,6	LM (%)	I	24,7	6,7/43,5	6***	8***	3***	0,31***	II	26,1	7,3/56,0																																																		
HAM (%)			I	30,8	18,7/46,8	8***	56***	4***	0,28***																																																																																																																																																																											
			II	32,3	4,1/54,5					RAM (%)	I	13,9	9,3/21,5	10***	6593***	6***	0,31***	II	9,0	4,5/15,0	LM (%)	I	10,8	0,6/29,7	5***	1576***	4***	0,01	II	23,9	6,8/39,2	CRM (%)	I	25,3	15,3/34,8	9***	134***	3***	0,47***	II	27,0	12,6/39,1	HAM (%)	I	33,9	23,7/44,7	10***	23***	5***	0,34***	II	33,0	11,7/47,2	RAM (%)	I	10,2	7,3/13,9	9***	256***	4***	0,41***	II	9,3	4,2/14,0	LM (%)	I	20,4	2,8/37,0	7***	3***	5***	0,17	II	21,6	6,4/39,1	CRM (%)	I	25,6	17,5/35,5	8***	68***	3***	0,40***	II	24,2	10,1/36,8	HAM (%)	I	30,3	22,0/49,8	6***	94***	3***	0,37***	II	32,1	13,3/42,4	RAM (%)	I	9,3	5,9/15,1	12***	167***	6***	0,34***	II	8,6	5,3/15,6	LM (%)	I	24,7	6,7/43,5	6***	8***	3***	0,31***	II	26,1	7,3/56,0																																																													
RAM (%)	I	13,9	9,3/21,5	10***	6593***	6***	0,31***																																																																																																																																																																													
	II	9,0	4,5/15,0					LM (%)	I	10,8	0,6/29,7	5***	1576***	4***	0,01	II	23,9	6,8/39,2	CRM (%)	I	25,3	15,3/34,8	9***	134***	3***	0,47***	II	27,0	12,6/39,1	HAM (%)	I	33,9	23,7/44,7	10***	23***	5***	0,34***	II	33,0	11,7/47,2	RAM (%)	I	10,2	7,3/13,9	9***	256***	4***	0,41***	II	9,3	4,2/14,0	LM (%)	I	20,4	2,8/37,0	7***	3***	5***	0,17	II	21,6	6,4/39,1	CRM (%)	I	25,6	17,5/35,5	8***	68***	3***	0,40***	II	24,2	10,1/36,8	HAM (%)	I	30,3	22,0/49,8	6***	94***	3***	0,37***	II	32,1	13,3/42,4	RAM (%)	I	9,3	5,9/15,1	12***	167***	6***	0,34***	II	8,6	5,3/15,6	LM (%)	I	24,7	6,7/43,5	6***	8***	3***	0,31***	II	26,1	7,3/56,0																																																																										
LM (%)	I	10,8	0,6/29,7	5***	1576***	4***	0,01																																																																																																																																																																													
	II	23,9	6,8/39,2					CRM (%)	I	25,3	15,3/34,8	9***	134***	3***	0,47***	II	27,0	12,6/39,1	HAM (%)	I	33,9	23,7/44,7	10***	23***	5***	0,34***	II	33,0	11,7/47,2	RAM (%)	I	10,2	7,3/13,9	9***	256***	4***	0,41***	II	9,3	4,2/14,0	LM (%)	I	20,4	2,8/37,0	7***	3***	5***	0,17	II	21,6	6,4/39,1	CRM (%)	I	25,6	17,5/35,5	8***	68***	3***	0,40***	II	24,2	10,1/36,8	HAM (%)	I	30,3	22,0/49,8	6***	94***	3***	0,37***	II	32,1	13,3/42,4	RAM (%)	I	9,3	5,9/15,1	12***	167***	6***	0,34***	II	8,6	5,3/15,6	LM (%)	I	24,7	6,7/43,5	6***	8***	3***	0,31***	II	26,1	7,3/56,0																																																																																					
CRM (%)	I	25,3	15,3/34,8	9***	134***	3***	0,47***																																																																																																																																																																													
	II	27,0	12,6/39,1					HAM (%)	I	33,9	23,7/44,7	10***	23***	5***	0,34***	II	33,0	11,7/47,2	RAM (%)	I	10,2	7,3/13,9	9***	256***	4***	0,41***	II	9,3	4,2/14,0	LM (%)	I	20,4	2,8/37,0	7***	3***	5***	0,17	II	21,6	6,4/39,1	CRM (%)	I	25,6	17,5/35,5	8***	68***	3***	0,40***	II	24,2	10,1/36,8	HAM (%)	I	30,3	22,0/49,8	6***	94***	3***	0,37***	II	32,1	13,3/42,4	RAM (%)	I	9,3	5,9/15,1	12***	167***	6***	0,34***	II	8,6	5,3/15,6	LM (%)	I	24,7	6,7/43,5	6***	8***	3***	0,31***	II	26,1	7,3/56,0																																																																																																
HAM (%)	I	33,9	23,7/44,7	10***	23***	5***	0,34***																																																																																																																																																																													
	II	33,0	11,7/47,2					RAM (%)	I	10,2	7,3/13,9	9***	256***	4***	0,41***	II	9,3	4,2/14,0	LM (%)	I	20,4	2,8/37,0	7***	3***	5***	0,17	II	21,6	6,4/39,1	CRM (%)	I	25,6	17,5/35,5	8***	68***	3***	0,40***	II	24,2	10,1/36,8	HAM (%)	I	30,3	22,0/49,8	6***	94***	3***	0,37***	II	32,1	13,3/42,4	RAM (%)	I	9,3	5,9/15,1	12***	167***	6***	0,34***	II	8,6	5,3/15,6	LM (%)	I	24,7	6,7/43,5	6***	8***	3***	0,31***	II	26,1	7,3/56,0																																																																																																											
RAM (%)	I	10,2	7,3/13,9	9***	256***	4***	0,41***																																																																																																																																																																													
	II	9,3	4,2/14,0					LM (%)	I	20,4	2,8/37,0	7***	3***	5***	0,17	II	21,6	6,4/39,1	CRM (%)	I	25,6	17,5/35,5	8***	68***	3***	0,40***	II	24,2	10,1/36,8	HAM (%)	I	30,3	22,0/49,8	6***	94***	3***	0,37***	II	32,1	13,3/42,4	RAM (%)	I	9,3	5,9/15,1	12***	167***	6***	0,34***	II	8,6	5,3/15,6	LM (%)	I	24,7	6,7/43,5	6***	8***	3***	0,31***	II	26,1	7,3/56,0																																																																																																																						
LM (%)	I	20,4	2,8/37,0	7***	3***	5***	0,17																																																																																																																																																																													
	II	21,6	6,4/39,1					CRM (%)	I	25,6	17,5/35,5	8***	68***	3***	0,40***	II	24,2	10,1/36,8	HAM (%)	I	30,3	22,0/49,8	6***	94***	3***	0,37***	II	32,1	13,3/42,4	RAM (%)	I	9,3	5,9/15,1	12***	167***	6***	0,34***	II	8,6	5,3/15,6	LM (%)	I	24,7	6,7/43,5	6***	8***	3***	0,31***	II	26,1	7,3/56,0																																																																																																																																	
CRM (%)	I	25,6	17,5/35,5	8***	68***	3***	0,40***																																																																																																																																																																													
	II	24,2	10,1/36,8					HAM (%)	I	30,3	22,0/49,8	6***	94***	3***	0,37***	II	32,1	13,3/42,4	RAM (%)	I	9,3	5,9/15,1	12***	167***	6***	0,34***	II	8,6	5,3/15,6	LM (%)	I	24,7	6,7/43,5	6***	8***	3***	0,31***	II	26,1	7,3/56,0																																																																																																																																												
HAM (%)	I	30,3	22,0/49,8	6***	94***	3***	0,37***																																																																																																																																																																													
	II	32,1	13,3/42,4					RAM (%)	I	9,3	5,9/15,1	12***	167***	6***	0,34***	II	8,6	5,3/15,6	LM (%)	I	24,7	6,7/43,5	6***	8***	3***	0,31***	II	26,1	7,3/56,0																																																																																																																																																							
RAM (%)	I	9,3	5,9/15,1	12***	167***	6***	0,34***																																																																																																																																																																													
	II	8,6	5,3/15,6					LM (%)	I	24,7	6,7/43,5	6***	8***	3***	0,31***	II	26,1	7,3/56,0																																																																																																																																																																		
LM (%)	I	24,7	6,7/43,5	6***	8***	3***	0,31***																																																																																																																																																																													
	II	26,1	7,3/56,0																																																																																																																																																																																	

### ***III-Résultats***

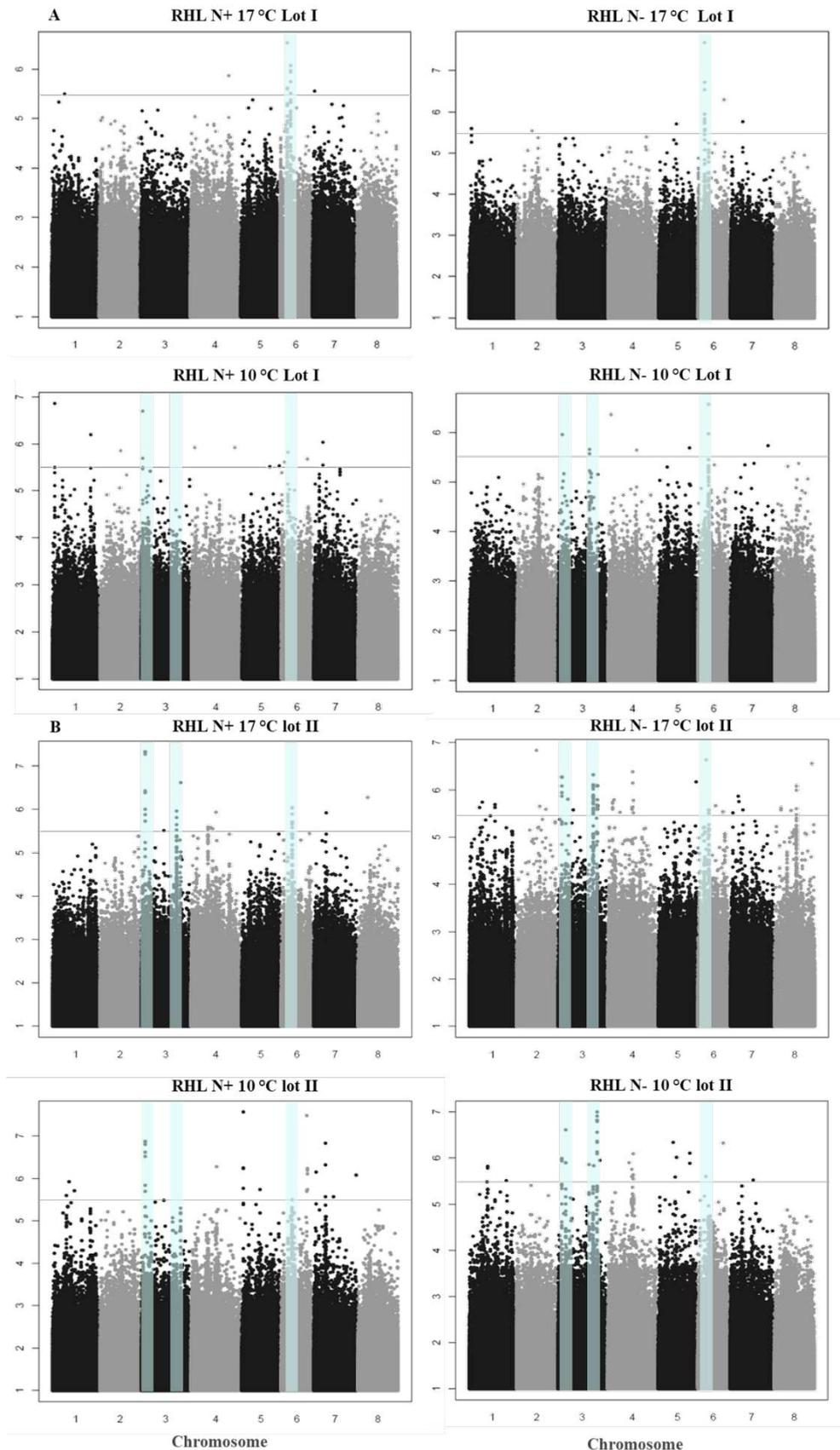
#### ***III-1-Influence du lot de graines***

##### ***III-1-1-Effet sur la performance des plantules de la CC192***

Un effet de l'année de production sur la performance des plantules en hétérotrophie et sur leur réponse à l'apport, ou non, de nitrate (N<sup>+</sup> et N<sup>-</sup>) à deux températures (17°C et 10°C) a été évalué pour la CC192 (Tableau IV-1). Pour l'ensemble de ces caractères, les analyses de variance ont montré l'existence d'un effet significatif à la fois des facteurs « accessions », « lot de graines » et de l'interaction entre ces deux facteurs quelles que soient les conditions environnementales. De plus, dans toutes les conditions l'effet du lot (L) de graines est plus important que l'effet du génotype (G) ou de l'interaction (G x L).

Les caractères exprimant la longueur des organes ont été significativement influencés par le facteur « lot de graines » (Tableau IV-1). En effet, la longueur de l'hypocotyle (HL) et celle de la radicule (RL) sont plus élevées pour le lot II, passant par exemple pour HL à 17°C de 61,5 mm pour le lot I à 69,5 mm pour le lot II. Toutefois, malgré cette tendance dans toutes les conditions testées, la différence de longueur de l'hypocotyle entre les deux années de production est réduite au froid. Enfin, l'ensemble des caractères liés à la longueur des organes a montré une corrélation positive entre les deux lots de graines quelles que soient les conditions environnementales ( $r : 0,61$  à  $0,81$ ). L'ensemble de ces analyses indique que, malgré des valeurs et une gamme de variabilité différentes selon l'année de production des graines, le comportement des accessions au niveau de l'allongement des organes suit la même tendance d'une année à l'autre.

Par ailleurs, des différences significatives pour l'ensemble des caractères entre les deux conditions d'apport en nitrate ont été constatés quelle que soit la température, à l'exception de la longueur de l'hypocotyle (HL) à 17°C. Pour la longueur de la radicule (RL), la différence entre N<sup>+</sup> et N<sup>-</sup> est plus élevée pour le lot I que pour le lot II, aux deux températures étudiées. C'est également le cas pour de HLt à 10°C. Ces résultats suggèrent que pour la majorité des caractères de longueur, la différence entre N<sup>-</sup> et N<sup>+</sup> suit la même tendance dans les deux lots de graines, mais que l'intensité de la réponse à l'absence de nitrate est différente. L'effet de l'année de production sur les caractères liés à la biomasse de la graine et sa mobilisation dans la plantule aux deux températures et en présence ou en absence de nitrate, a également été étudié (Tableau IV-2). La masse moyenne de la graine du lot II est significativement plus importante que celle du lot I, ce qui explique que l'ensemble des



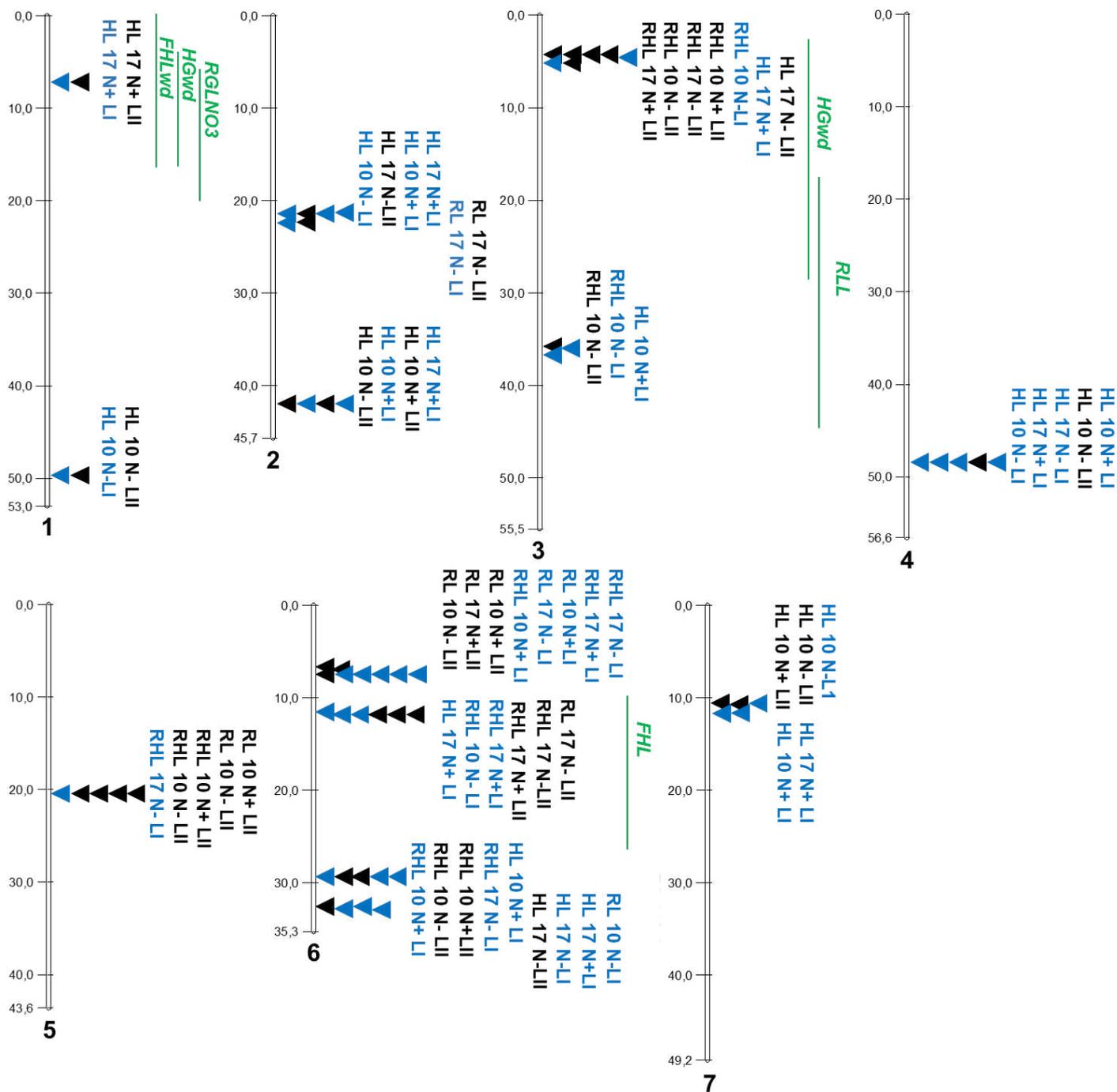
**Figure IV-2 :** Manhattan plots résultant de l'analyse GWAS basée sur le modèle « single-locus mixed model » pour le caractère ratio des longueurs radicule/hypocotyle (RHL). RHL est déterminées en présence (N+) et en absence (N-) de nitrate à la température contrôlée (17 ° C) et au froid (10 ° C), (A) pour le lot de graines I (2013), (B) pour le lot de graines II (2014) . Les QTN significatifs sont situés au-dessus de la ligne horizontale grise ( $-\log_{10}(\text{valeur } P) \geq 5,5$ ). Les barres bleues indiquent la position des pics de SNPs significatifs sur les chromosomes 3 et 6 retrouvés dans différentes conditions environnementales et pour les deux lots de graines. Les caractéristiques détaillées du SNPS sont présentées dans l'annexe IV-1.

longueurs des organes soit plus élevé pour le lot II quelles que soient les conditions (*e.g.* HL en N<sup>+</sup> : 61,5 mm lot I vs 69,5 mm lot II; Tableau IV-1). En revanche, cette tendance n'est pas systématiquement retrouvée pour les caractères liés à la mobilisation de la biomasse dans la plantule. Quelles que soient les conditions, la biomasse perdue (LM) est plus importante dans le lot II et alors que c'est l'inverse pour la biomasse allouée à la racicule (RAM). Dans toutes les conditions testées, excepté à 10 °C en présence de nitrate, la biomasse allouée à l'hypocotyle (HAM) est plus importante dans le lot II par rapport au lot I et *vice versa* pour la biomasse résiduelle CRM. Pour l'ensemble des caractères associés à l'utilisation de la biomasse de la graine, il existe une corrélation entre les Lots, à l'exception de la LM dans la plupart des conditions environnementales.

Enfin, pour tous les caractères liés à la biomasse de la graine, des différences significatives sont constatées aux deux températures entre les deux conditions d'apport en nitrate (niveaux de significativité non montrés). Comme pour les caractères liés à la longueur des organes, certains caractères ont des réponses similaires à l'absence de nitrate dans les deux lots de graines (*e.g.* à 17 °C HAM diminue en N<sup>-</sup> par rapport à N<sup>+</sup> de 2,5 et 3,4 % respectivement pour les lots I et II). Cependant, d'autres caractères répondent différemment à l'absence de nitrate (*e.g.* à 17 °C CRM augmente de 3 % en N<sup>-</sup> par rapport à N<sup>+</sup> pour le lot I et diminue de 3,1 % pour le lot II). L'ensemble de ces résultats suggère que, contrairement aux caractères liés à la longueur des organes, les caractères liés à la biomasse de la graine sont moins homogènes d'une année à l'autre.

### ***III-1-2-Influence sur la détection de QTL***

Une analyse GWAS a été réalisée sur les caractères d'allongement des plantules en hétérotrophie issues du lot de graines produit en 2013 et soumises aux différentes conditions d'apport en nitrate et de températures. Le but de cette analyse était de rechercher des SNPs associés à l'allongement des plantules en hétérotrophie, quel que soit le lot de graines. La comparaison des résultats de GWAS pour les caractères entre les deux lots de graines ne permet pas la détection de SNPs commun au seuil de  $-\log_{10}$  (valeur-P) de 7. Or, les Manhattan plots obtenus pour ces caractères d'allongement montrent l'existence de pics de SNPs qui co-localisent pour les deux lots de graines. A titre d'exemple, la figure IV-2 montre trois principaux pics de SNPs pour le caractère RHL dans différentes conditions. Par conséquent, nous avons diminué le seuil de détection des SNPs



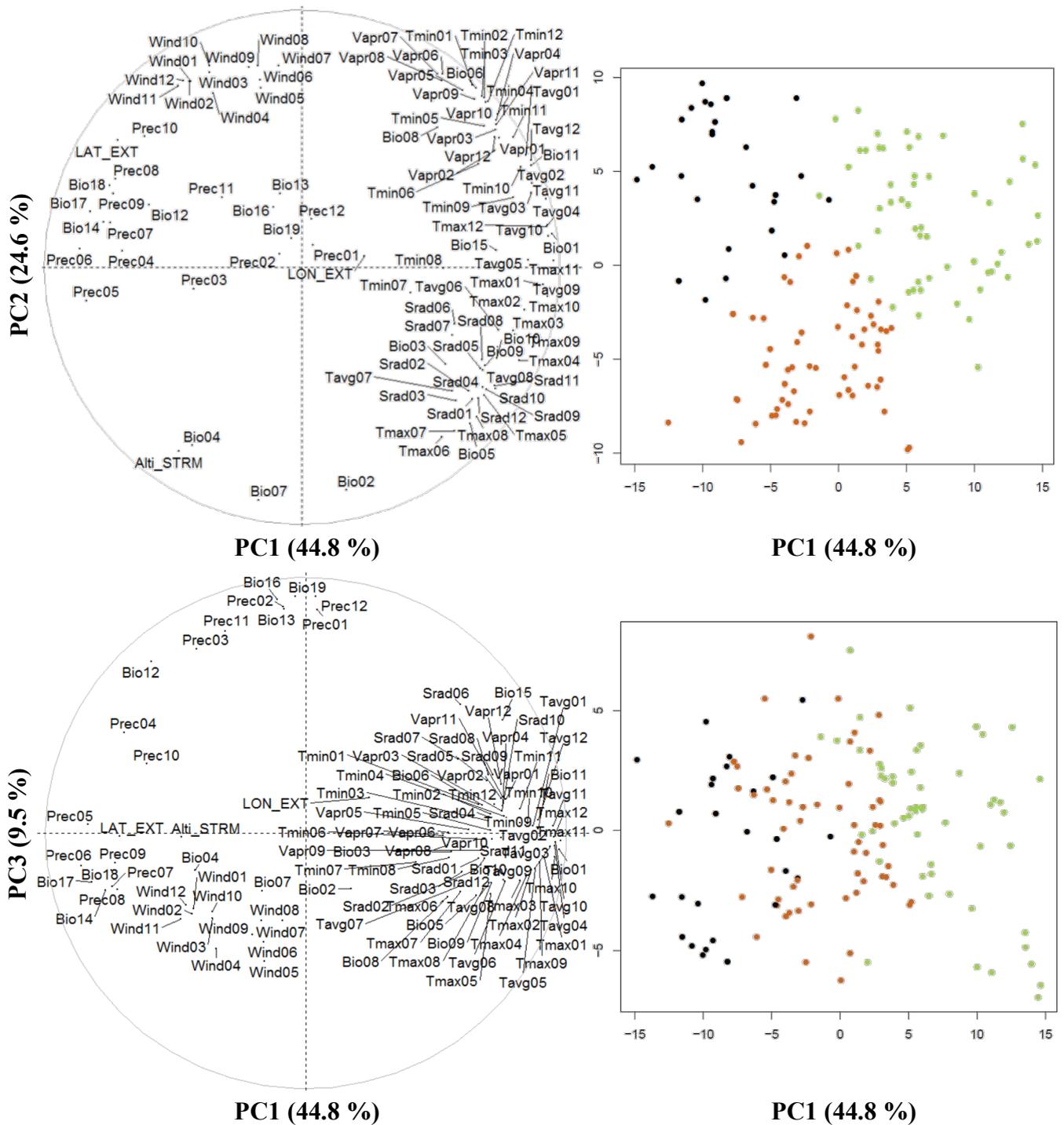
**Figure IV-3** : Localisation sur la carte physique de *M. truncatula*, version Mt4.0. v2, des SNPs significatifs associés à l'allongement des plantules en hétérotrophie identifiés pour les lots de graines I (2013, bleu) et II (2014, noir). Les barres verticales représentent les différents chromosomes. Les positions des loci sont indiquées par une flèche sur leur droite (pour les caractéristiques détaillées du SNP, voir l'annexe IV-1). HL, longueur de l'hypocotyle ; RL, longueur de radicule ; RHL, rapport entre les longueurs de la radicule et de l'hypocotyle ; N+, présence de nitrate, N- absence de nitrate, 10 et 17, 10 °C et 17 °C (température contrôlée) respectivement ; L1, lot 1 (bleu) ; L2, lot 2 (noir). La projection des intervalles de confiance des QTL précédemment identifiés à l'aide de populations RILs est indiquée à droite des chromosomes (barres vertes) : *RLL*, longueur de la radicule en mm (16 h de lumière); *RGLNO3*, taux de croissance de la radicule en présence de 5 mM de KNO<sub>3</sub> (photopériode 16 h jour/8 h obscurité) ; *FHLwd*, longueur finale de l'hypocotyle sous déficit hydrique (-0,5 MPa, obscurité) ; *HGwd*, taux de croissance de l'hypocotyle sous déficit hydrique (-0,5 MPa, obscurité) ; *FHL*, longueur finale de l'hypocotyle (obscurité).

significativement associé à ces caractères d'allongement des plantules à une valeur de  $-\log_{10}$  (valeur-P) de 5,5. La figure IV-3, résume ainsi les co-localisations sur la carte physique des SNPs associés de façon significative à l'allongement des plantules en hétérotrophie identifiés pour les lots de graines I (2013) et II (2014). Cette figure montre l'existence de 13 positions communes entre les deux lots dans les différentes conditions environnementales.

### ***III-2-Influence des caractéristiques géo-climatiques des sites d'origine des accessions***

#### ***III-2-1-Structuration des accessions de la CC192 selon les caractéristiques géo-climatiques des sites d'origine***

Afin d'étudier les caractéristiques des sites d'origine des accessions de la core collection 192 et en déduire des groupes phénotypiques représentatifs de ces sites, une analyse en composante principale a été réalisée avec les données géo-climatiques (Figure IV-4). Ces données géo-climatiques concernent des caractères liés aux géo-localisations, à la température, aux précipitations, aux vents et aux radiations solaires provenant de la base de données WorldClim 2 (Fick & Hijmans, 2017). Les cinq premiers axes de cette ACP, permettant d'expliquer 92 % de la variance, ont été considérés. L'ACP mettant en avant la représentation graphique des caractères géo-climatiques des accessions selon les composantes principales 1- 2, 1-3, 1-4 et 1-5 est présentée dans la figure IV-4. L'axe 1, qui explique 45 % de la variance, permet de séparer les caractères relatifs à la latitude et aux précipitations (à gauche du point d'intersection des axes), des températures moyennes mensuelles, minimales et maximales ainsi que des radiations solaires (à droite du point d'intersection des axes). L'axe 2, qui explique 25 % de la variance, permet de séparer les caractères qui expriment la vitesse moyenne des vents (en haut du point d'intersection des axes), des caractères liés à l'altitude et la température saisonnière et annuelle (en bas du point d'intersection des axes). L'axe 3, qui explique 10 % de la variance, rassemble les précipitations des mois les plus humides (hiver et automne). Les axes 4 et 5 qui expliquent respectivement 7 % et 4 % de la variance, permettent de séparer la longitude ouest des autres caractères.



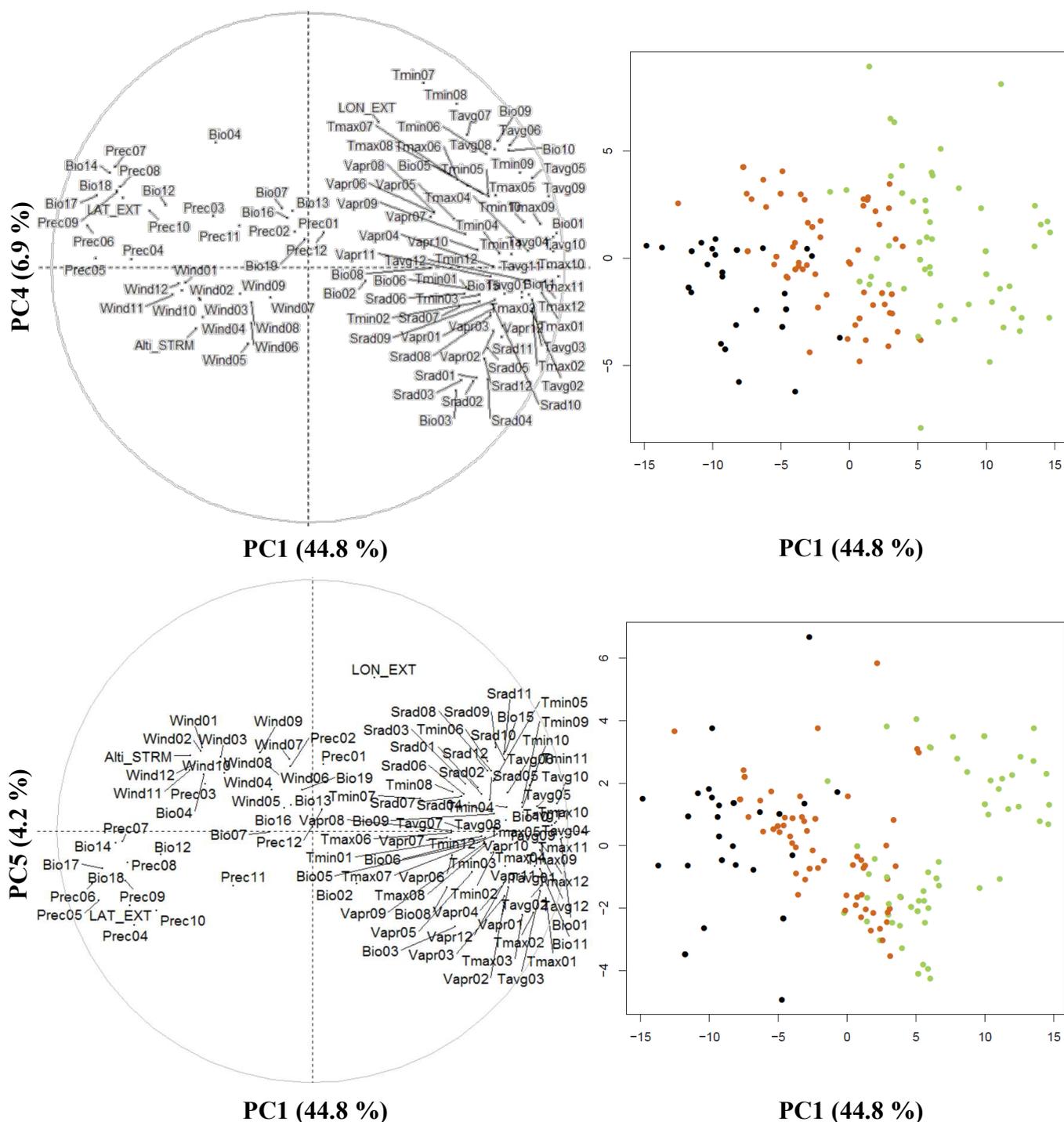
**Figure IV-4-A.** Graphique des composantes principales 1 (PC1) - 2 (PC2), 1 (PC1) - 3 (PC3), 1 (PC1) - 4 (PC4), 1 (PC1) - 5 (PC5), avec projections des caractères (à gauche) provenant de la Base de données - WorldClim 2.0 - Juin 2016, moyenne sur les années 1970-2000, et avec projection de 174 accessions représentant la diversité naturelle de *M. truncatula* (à droite). Lon\_ext, Longitude en degrés décimaux (négatif, est) ; Lat\_ext, Latitude en degrés décimaux (négatif, sud) ; Altitude, Altitude à partir des fiches de sites ou autres sources ; Alt\_i\_srtm, Altitude estimée dans un rayon de 250 mètres; Lon\_ext, Longitude en degrés décimaux (négatif, est) ; Prec01-Prec12, Précipitations mensuelles en mm; Srad01-Srad12 = Radiation solaire - moyenne mensuelle en kJ/m<sup>2</sup>/jour; Tavg01-Tavg12, Température moyenne du mois en degrés celsius; Vapr01-Vapr12 : pression de vapeur d'eau en kPa Tmax01-Tmax12, Températures maximales mensuelles en degrés celsius; Tmin01-Tmin12, Température minimale du mois en degrés celsius ;; Wind01-Wind12, Vitesse moyenne mensuelle du vent (m/s) ; (1 = Janvier à 12 = Décembre).

Cette ACP a permis de mettre en avant des groupes d'accessions en fonction des caractéristiques géographiques. En effet, la représentation dans l'espace de la distribution des accessions montre qu'elles se positionnent de part et d'autre des trois premiers axes et qu'elles se répartissent en trois groupes (G1, G2 et G3, Figure VI-4). Le premier groupe (G1, orange) rassemble les accessions originaires de régions aux altitudes élevées et aux températures saisonnières et moyennes mensuelles élevées (e.g. BIO2 : température moyenne mensuelle). Le deuxième groupe (G2, noir) rassemble les accessions originaires de régions de basse altitude (i.e. Alti\_srtm : altitude estimée dans un rayon de 250 mètres) assujetties à des forts épisodes de vent et de précipitations. Le troisième groupe (G3, vert) se distingue par les accessions originaires de régions à fortes températures moyennes mensuelles, minimales et maximales, accompagnées de radiations solaires élevées (e.g. Srad11 : radiation solaire moyenne mensuelle du mois de novembre).

### ***III-2-2-Lien avec la performance des plantules et la plasticité de réponse aux stress environnementaux***

Nous avons projeté les caractères décrivant la croissance hétérotrophe des plantules en absence et en présence de nitrate sur l'ACP construite à partir des données géo-climatiques, respectivement à température optimale et au froid (Figure IV-5). Cette ACP montre premièrement que la masse de la graine est corrélée aux composantes principales (PCs) 1 et 2 de l'ACP (Annexe IV-2). Deuxièmement, quelle que soit la condition environnementale, la longueur de l'hypocotyle est expliquée par l'axe 1 de l'ACP (PC1). Les accessions provenant de régions chaudes et sèches ont donc une masse de graine et une longueur de l'hypocotyle élevées.

Afin de confirmer le lien entre l'influence du climat de la région d'origine sur la masse de la graine, d'une part, et la longueur de l'hypocotyle, d'autre part, une analyse de variance a été réalisée pour différencier les trois groupes climatiques. La figure IV-6, représente le résultat du test post-hoc de SNK réalisé après l'ANOVA pour différencier les groupes. La masse de la graine et la longueur de l'hypocotyle du groupe G2 (noir) dans lesquelles les accessions originaires de régions basse altitude, avec de forts épisodes de vent et de précipitations, étaient significativement plus faibles que pour les deux autres groupes. Ce résultat confirme bien le lien entre l'environnement natif des accessions et la masse des graines ainsi que le potentiel d'allongement de l'hypocotyle. Les caractères associés à l'utilisation de la biomasse sont indépendants des caractéristiques géo-climatiques des sites d'origine. Etant donné que la longueur de l'hypocotyle évolue dans le même sens quelles que soient les conditions nutritives et la température (Figure IV-5), cela suggère que les conditions climatiques d'origine des accessions ont peu d'effet sur la réponse à l'absence de nitrate et au froid des plantules.



**Figure IV-4-B :** BIO3, Isothermalité (P2/P7) (\* 100) (Amplitude quotidienne moyenne (paramètre 2) divisée par l'amplitude annuelle de la température (paramètre 7)) BIO1, Température moyenne annuelle ; BIO2, Température moyenne mensuelle (temp max - temp min) ; BIO4, Saisonnalité de la température (écart type \* 100) ; BIO5, Température maximale du mois le plus chaud ; BIO6, Température minimale du mois le plus froid ; BIO7, Plage de température annuelle; BIO8-11, Températures moyennes du trimestre le plus humide (8), le plus sec (9), le plus chaud (10), le plus froid (11) respectivement ; BIO12 = Précipitation annuel BIO13-19, Précipitations annuelles du mois le plus humide (13), du mois le plus sec (14), saisonnalité (coefficient de variation (15), du quartier le plus humide 16), du quartier le plus sec (17), du trimestre le plus chaud (18), du trimestre le plus froid (19) respectivement. Les cinq premiers PC expliquent environ 92 % de l'inertie totale. Les points colorés correspondent aux accessions regroupées en trois groupes distincts pour les variables étudiées (G1, orange ; G2, noir, G3, vert)

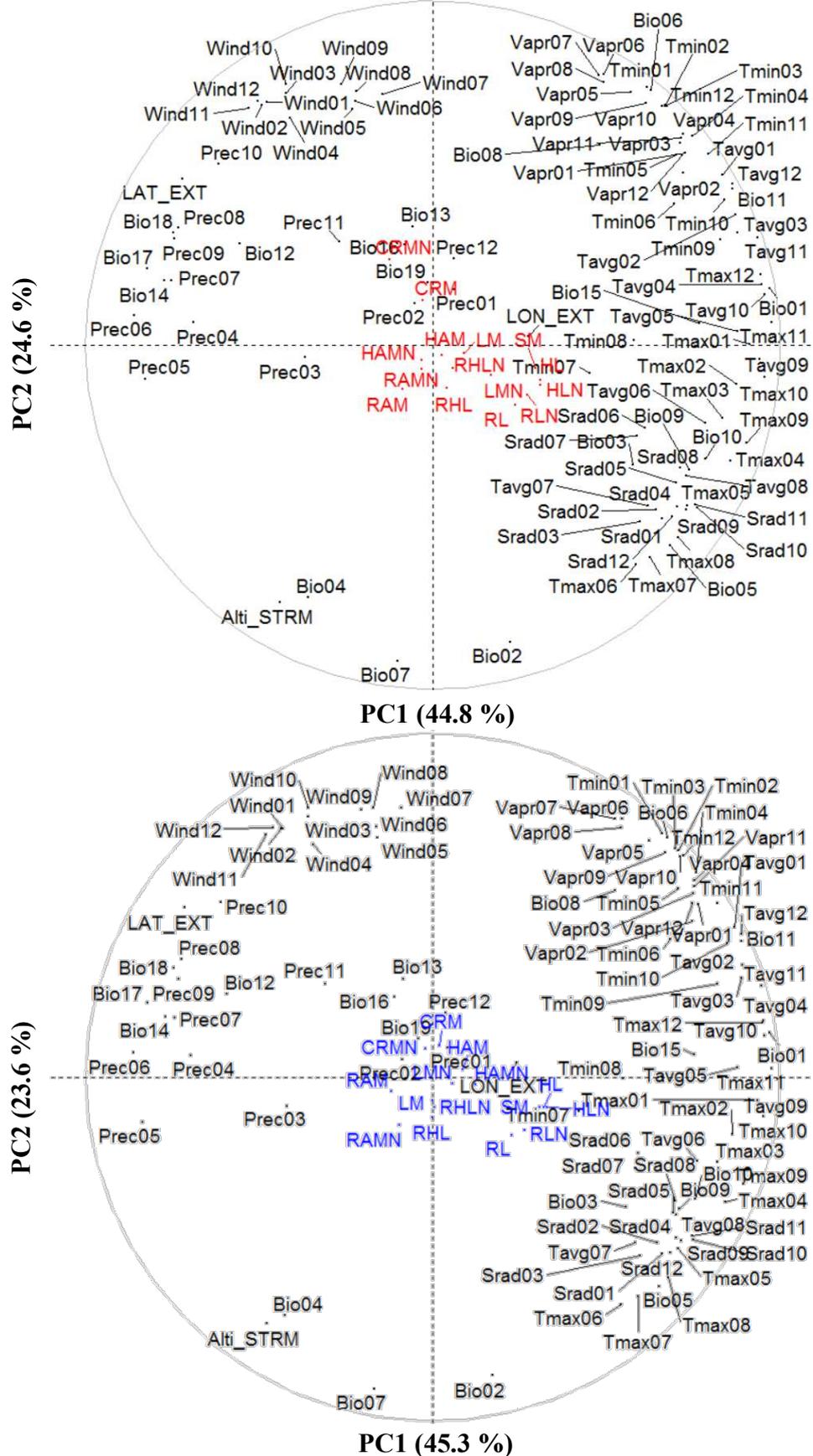
Afin de vérifier cette indépendance, nous avons projeté les caractères d'indices de plasticité à l'absence de nitrate "rTraits" (Figure IV-7) et au froid "rtTraits" (Figure IV-8) sur l'ACP construite sur la base des données géo-climatiques. Les résultats montrent qu'il n'existe aucune corrélation entre ces indices de réponse des plantules à l'absence de nitrate ainsi qu'au froid et les données climatiques des régions d'origine des accessions.

## ***IV-Discussion***

### ***IV-1-La variation de la biomasse de la graine est à l'origine de l'effet du lot***

La réussite de la croissance en conditions hétérotrophe des plantules dépend non seulement du génotype et des conditions environnementales d'avant la levée, mais aussi des caractéristiques des lots de graines utilisées. Ces caractéristiques regroupent entre autre l'historique des graines (*e.g.* conditions de production et de stockage des graines), la composition en réserves et l'aptitude à la germination. Les conditions environnementales lors de la production de semences se désignent également sous le terme d'environnement maternel (Roach & Wulff 1987). Il existe plusieurs sources possibles de variabilité de l'environnement maternel qui explique la variabilité des propriétés des graines produites selon les individus d'une même population ou encore par un même individu (Penfield & MacGregor 2017). Par exemple, les températures élevées peuvent inhiber la remobilisation de l'azote des tissus maternels vers la graine en développement (Tahir & Nakata 2005) et réduire sa teneur en ABA (Brunel-Muguet et al. 2015). De même, un déficit hydrique pendant la floraison peut causer une réduction du nombre de gousses par inflorescence. Dans le cas de la luzerne cultivée par exemple, le déficit hydrique entraîne une diminution de la production de gousses et de graines (Chebouti et al. 2001), modifiant ainsi la taille des graines car la remobilisation des assimilats est différente.

Pour éviter l'hétérogénéité inter-annuelle des propriétés des graines, nous avons exploité des graines issues de deux lots (*i.e.* lot I vs lot II) du même environnement maternel. Par la suite, nous avons évalué l'influence du lot de graines sur la performance des plantules. Les résultats indiquent

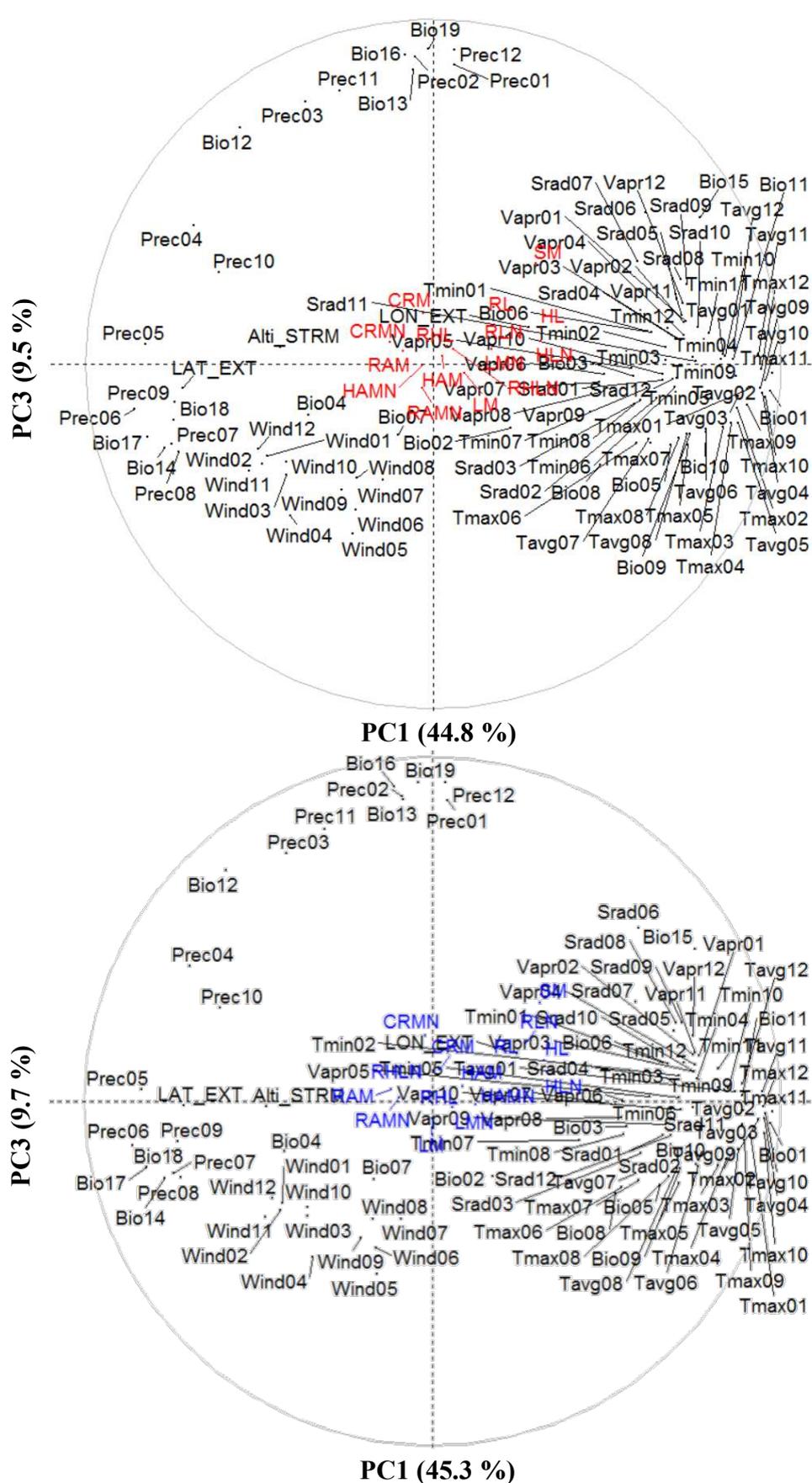


**Figure IV-5-A :** Projection des caractères supplémentaires liés à la performance des plantules en présence et en absence de nitrate à la température contrôle (haut, couleur rouge) et au froid (bas; couleur bleu) sur l'analyse en composantes principales (ACP) des caractères exprimant les données géo-climatiques des centres d'origine des accessions pour les PC1-PC2. Le détail sur les ACPs et sur les caractères associés est décrit dans la légende de la figure IV-4. Caractères supplémentaires projetés : pourcentage de biomasse résiduelle dans les cotylédons (CRM), de biomasse allouée à l'hypocotyle (HAM), de biomasse allouée à la racicule (RAM) et de biomasse perdue (LM), longueur de l'hypocotyle (HL), longueur de la racicule (RL) et masse de la graine (SM). N, présence de nitrate, et absence du symbole, absence de nitrate.

qu'il existe un effet lot sur la masse de la graine et sur l'ensemble des variables de la performance des plantules, quelle que soit la condition nutritive (Tableau IV-1; IV-2). Cet effet lot est particulièrement important pour les caractères liés à la redistribution de la biomasse de la graine dans la plantule. En effet, même avec un environnement maternel contrôlé, certaines variations peuvent être observées pour la vigueur des graines d'un lot à un autre (Renzi et al. 2019). La biomasse de la graine ainsi que les caractères d'allongement des organes sont également affectés par le lot de graines utilisé. Mais, contrairement aux caractères liés la mobilisation de la graine, l'amplitude de l'allongement des plantules et la masse de la graine des accessions de la CC192 changent d'un lot à l'autre mais le comportement des accessions les unes par rapport aux autres est comparable dans les deux lots. Les accessions ayant une masse de la graine élevée et des capacités d'allongement élevées se comportent de la même façon quelle que soit le lot et inversement. Cela est en accord avec l'étude réalisée sur 8 accessions de *M. truncatula* par Brunel et al. (2009) montrant que la masse de la graine sèche était dépendante, à la fois de l'effet de l'accession et de son interaction avec l'effet du lot de graines. De plus, l'analyse GWAS montre l'existence de 13 loci communs aux deux lots de graines pour les caractères d'allongement des organes (Figure IV-3). Les SNPs identifiés dans notre étude présentent également des co-localisations avec des loci associés à la performance des plantules à partir de différents lots de graines de *M. truncatula* (Vandecasteele et al. 2011). A titre d'exemple, le locus lié à la longueur de la radicule à la lumière (RLL) de l'étude de Vandecasteele et al. (2011) co-localise avec les SNPs associés au ratio de longueur radicule/hypocotyle (RHL) en absence de nitrate pour les deux lots de graines étudiés. Par conséquent, l'ensemble des résultats suggère que la longueur des organes et la masse de la graine sont des caractères sous fort contrôle génétique.

#### ***IV-2 La masse de la graine et l'allongement de l'hypocotyle dépendent des conditions géo-climatiques d'origine des accessions***

L'adaptation des plantes à l'environnement local est la force motrice primaire de l'évolution (Levine 2000). Cette adaptation à l'environnement changeant et la plasticité phénotypique des plantes contribuent à leur distribution géographique. Grâce à sa large distribution le long du pourtour Méditerranéen, *M. truncatula* est un excellent modèle pour étudier les liens entre les milieux natifs des accessions et la performance des plantules en condition hétérotrophe. Cette espèce est distribuée dans des zones géographiques caractérisées par des étés chauds et secs avec de grandes oscillations

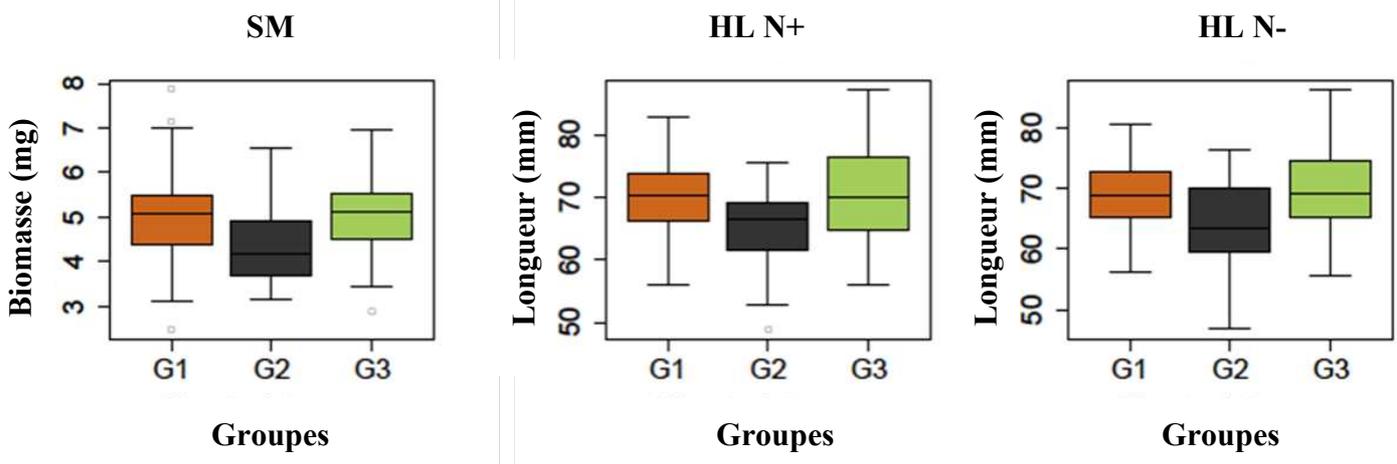


**Figure IV-5-B :** Projection des caractères supplémentaires liés à la performance des plantules en présence et en absence de nitrate à la température contrôle (haut, couleur rouge) et au froid (bas; couleur bleu) sur l'analyse en composantes principales (ACP) des caractères exprimant les données géo-climatiques des centres d'origine des accessions pour les PC1-PC3. Le détail sur les ACPs et sur les caractères associés est décrit dans la légende de la figure IV-4. Caractères supplémentaires projetés : pourcentage de biomasse résiduelle dans les cotylédons (CRM), de biomasse allouée à l'hypocotyle (HAM), de biomasse allouée à la racicule (RAM) et de biomasse perdue (LM), longueur de l'hypocotyle (HL), longueur de la racicule (RL) et masse de la graine (SM). N, présence de nitrate, et absence du symbole, absence de nitrate.

diurnes de température, suivis par des automnes pluvieux, avec cependant certaines zones très arides (Thompson et al. 2005). Ainsi, dans ce chapitre nous avons cherché les liens entre l'origine géographique des accessions de *M. truncatula* le long du bassin méditerranéen et la croissance hétérotrophe des plantules dans diverses conditions environnementales. Ensuite, comme l'origine géographique explique seulement 5 % de la variation et que le climat est la source majeure de variation (41,5 %) (Gentzbittel et al. 2019), nous avons exploré les liens entre le climat aux sites d'origine des accessions et la performance des plantules dans les diverses conditions étudiées. Pour cela, nous avons exploité des variables bioclimatiques de l'origine géographique des accessions issues de la base de données "WorldClim version 2" couvrant la période de 1970 à 2000. Ces variables représentent les données climatiques (e.g. température, précipitations...) mensuelles, saisonnières, annuelles ainsi que les facteurs environnementaux extrêmes ou limitants (Fick & Hijmans, 2017).

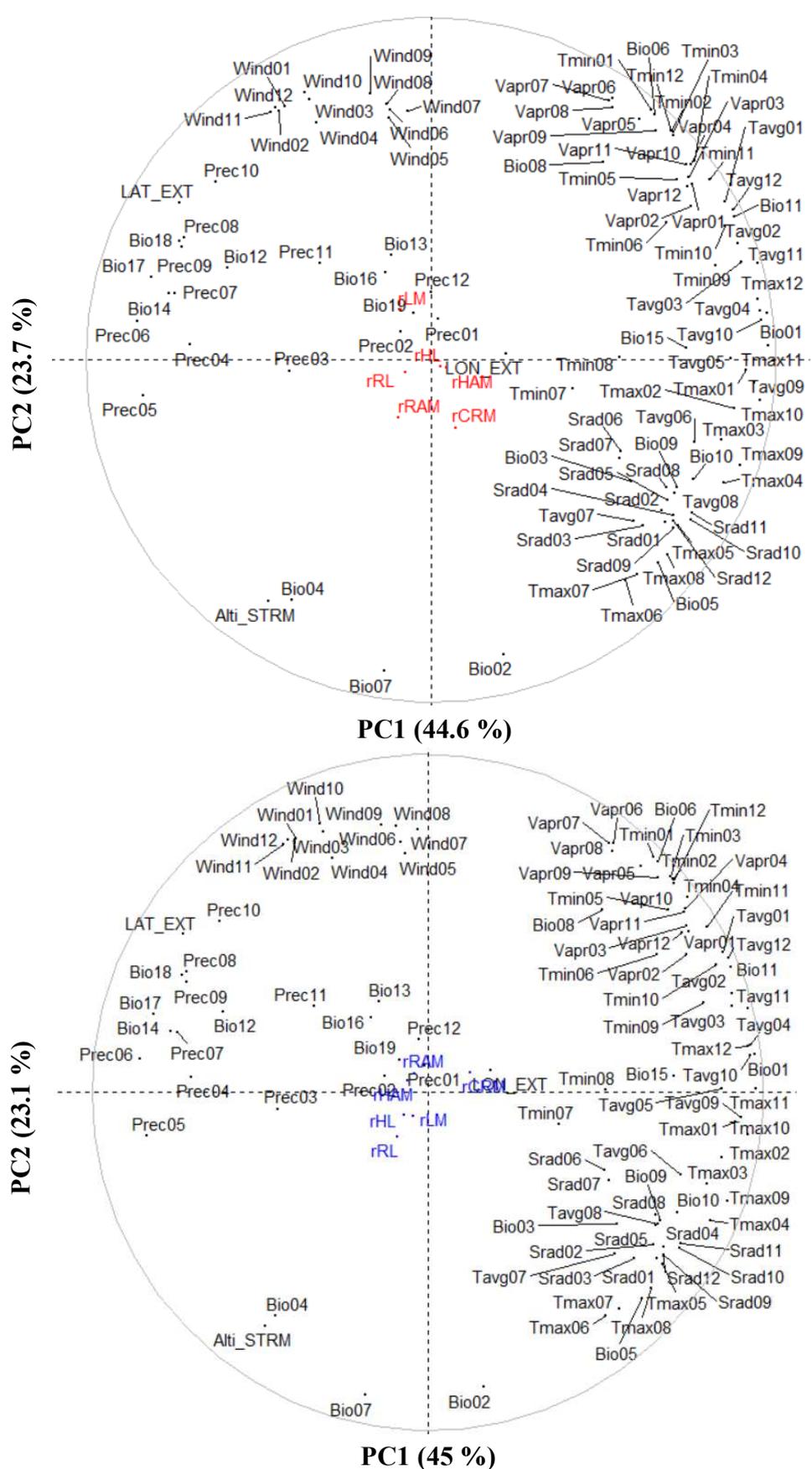
Nous avons montré que la variation de la masse de la graine et de l'allongement de l'hypocotyle étaient liées aux variables géo-climatiques d'origine des accessions (Figures IV-5; IV-6). Les positions géographiques de basses altitudes ainsi que les climats froids et humides sont corrélés à une faible vigueur des plantules (SM et HL faibles). Inversement, les positions géographiques de hautes altitudes ainsi que les climats chauds et secs sont corrélés à une forte vigueur des plantules (SM et HL élevés). Ces résultats suggèrent un lien entre les caractéristiques géo-climatiques d'origine des accessions et la performance de leurs plantules (e.g. l'allongement de l'hypocotyle). Les conditions environnementales varient souvent le long des gradients en latitude et en altitude (De Frenne et al. 2013; Sundqvist et al. 2013). Sur cette base, les comportements des graines et des plantules (germination, levée, croissance) peuvent varier selon la répartition géographique de la population dont ils sont issus et ils s'adaptent aux conditions climatiques locales ou aux habitats (Chamorro et al. 2018). Wu et al. (2019), ont montré que des graines collectées sous des latitudes élevées présentaient des pourcentages de germinations plus élevés et des temps de germination plus courts que des graines collectées sous de basses latitudes. Notre étude a également montré que les variables de mobilisation de la biomasse depuis les graines n'étaient pas corrélées aux conditions géo-climatiques des sites d'origine des accessions. Ainsi, contrairement à la mobilisation de la biomasse de la graine dans la plantule, la masse de la graine et la levée de l'hypocotyle semblent être des caractéristiques avec un fort contrôle génétique, nécessaires à la survie de la plantule dans le milieu d'origine.

Par ailleurs, l'adaptation des plantules à leurs milieux naturels ne semble pas leur conférer directement la plasticité de réponse au nitrate et à la température. En effet, les indices de réponse à l'absence de nitrate et au froid calculés dans notre étude, ne présentent pas de lien avec les conditions



**Figure IV-6 :** Diagramme en boîtes de chacun des trois groupes climatiques en fonction de la masse de la graine (SM) et de la longueur de l'hypocotyle en présence (HL N+) et en absence de nitrate (HL N-). G1, G2 et G3 indiquent les groupes formés (Figure IV-5).

géo-climatiques évaluées. Or, un lien peut exister entre la réponse des graines et des plantules à la variation des caractéristiques environnementales expérimentales (*e.g.* thermiques) et les conditions environnementales de leur habitat naturel. Renzi et al. (2019) ont exploré les mêmes données géo-climatiques dans le cadre de la plasticité de réponse de la CC192 de *M. truncatula* à la levée de la dormance des graines. Contrairement à notre étude, ils ont suggéré un lien entre les conditions d'origine des accessions et la réponse de leurs graines aux variations de températures. Cependant pour des études réalisées sur le maïs, aucune relation n'a été trouvée entre la tolérance au froid et la latitude d'origine (Revill et al. 2014; Enders et al. 2019). Dans notre étude, l'indépendance entre les caractéristiques géo-climatiques et certains des déterminants de la performance des plantules, ainsi que leurs réponses au froid et à l'absence de nitrate, peut être expliquée par la nature même de ces caractéristiques géo-climatiques collectées. En effet, les variables géo-climatiques utilisées représentent une moyenne dans le temps et dans l'espace (*i.e.* mensuelle, annuelle, trimestrielle), ce qui peut masquer les données sur des micro-environnements à petites échelles spatiales ou des régions géographiques aux caractéristiques plus complexes. Ces régions caractérisées par des micro-environnements peuvent abriter des accessions aux comportements contrastés par rapport au stress (*e.g.* froid) et qui ont été assujetties à différentes pressions de sélection (Kerdaffrec & Nordborg 2017).

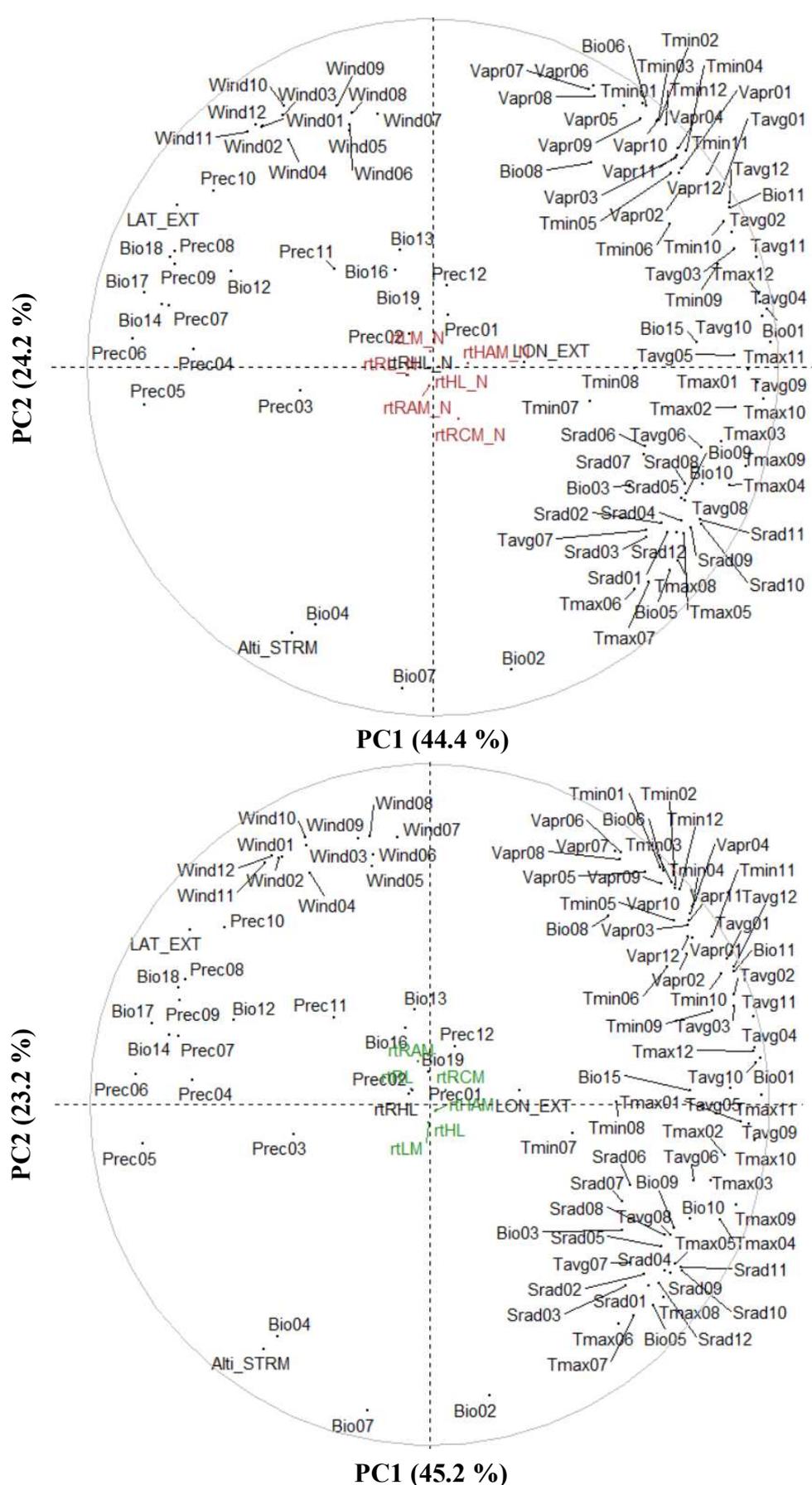


**Figure IV-7 :** Projection des caractères supplémentaires liés aux indices de réponse des plantules à l'absence de nitrate à la température contrôle (haut; couleur rouge) et au froid (bas; couleur bleu) sur l'analyse en composantes principales (ACP) des caractères exprimant les données géo-climatiques des centres d'origine des accessions pour les PC1-PC2. Le détail sur les ACPs et sur les caractères associés est décrit dans la légende de la figure IV-4. Caractères supplémentaires projetés : indices de plasticité de réponse (rTraits) à l'absence de nitrate concernant la longueur de l'hypocotyle (rHL), la longueur de la radicule (rRL), la biomasse résiduelle dans les cotylédons (rCRM), la biomasse allouée à l'hypocotyle (rHAM), la biomasse allouée à la radicule (rRAM) et la biomasse perdue (rLM).

#### *V- Idées principales du chapitre IV*

L'étude des conditions géo-climatiques natives des accessions de *M. truncatula* et la variation interannuelle de comportement de ces accessions mettent en avant :

- Un effet significatif du « lot de graines » vis-à-vis de la mobilisation de la biomasse de la graine et une variation d'un lot à un autre du comportement moyen des accessions en réponse à l'absence de nitrate aux diverses températures.
- Un effet significatif du « lot de graines » pour la masse de la graine et l'allongement des plantules, avec un comportement reproductible des accessions entre les deux lots.
- Un comportement des accessions vis-à-vis de la réponse moyenne de la plantule à l'absence de nitrate, aux deux températures, également reproductible entre les deux lots.
- Une corrélation pour les caractères associés à l'allongement des plantules entre les deux lots de graines et une détection de 13 loci communs à ces deux lots lors de l'analyse GWAS.
- Une relation entre les données géo-climatiques des régions d'origine des accessions et l'un des caractères clé de la performance des plantules (*i.e.* allongement de l'hypocotyle).



**Figure IV-8 :** Projection des caractères supplémentaires liés aux indices de réponse des plantules au froid en présence (haut ; couleur marron) et absence (bas ; couleur vert) de nitrate sur l'analyse en composantes principales (ACP) des caractères exprimant les données géo-climatiques des centres d'origine des accessions pour les PC1-PC2. Le détail sur les ACPs et sur les caractères associés est décrit dans la légende de la figure IV-4. Caractères supplémentaires projetés : indices de plasticité de réponse (rtTraits) au froid concernent la longueur de l'hypocotyle (rtHL), la longueur de la racicule (rtRL), la biomasse résiduelle dans les cotylédons (rtCRM), la biomasse allouée à l'hypocotyle (rtHAM), la biomasse allouée à la racicule (rtRAM) et la biomasse perdue (rtLM)

## **Conclusion Générale Et Perspectives**

---



Les études menées chez *M. truncatula* ont permis de montrer que l'allongement de l'hypocotyle repose exclusivement sur l'élongation des cellules préétablies dans les graines lors de la formation de l'embryon (Pierre et al. 2014). Sous stress abiotiques (*e.g.* stress hydrique, froid), la longueur des cellules est le principal déterminant de l'allongement de l'hypocotyle. En revanche, en conditions optimales, le nombre de cellules est définie comme le principal contributeur à l'allongement de l'hypocotyle en hétérotrophie (Youssef et al. 2016). D'autres études permettent de définir le déterminisme physiologique et génétique de l'allongement des divers compartiments de la plantule de *M. truncatula* (Dias et al. 2011; Vandecasteele et al. 2011; Youssef et al. 2016), en lien avec la variation de disponibilité de l'azote endogène et exogènes (Brunel-Muguet et al. 2015). Seulement, ces travaux ont été souvent menés sur la croissance de plantule d'un nombre réduit d'accessions et ont été menés quelquefois en autotrophie. Ainsi, notre étude a pour objectif d'approfondir ces connaissances sur la croissance des plantules en hétérotrophie. Cela est effectué *via* la caractérisation d'une core collection de 192 accessions représentative de la diversité génétique naturelle de *M. truncatula* en condition d'absence de nitrate, de froid et en conditions multistress. Certaines caractérisations plus fines ont été menées sur un panel réduit de 4 accessions.

Sur la base de cette core collection, nous avons caractérisé la croissance hétérotrophe à travers l'évaluation de ses déterminants (*i.e.* caractères liés à l'allongement des organes en croissance et à l'utilisation de la biomasse de la graine). Nous avons révélé l'existence d'un effet génotypique significatif et d'une large gamme de variation pour les différents caractères liés à la croissance hétérotrophe aux diverses conditions environnementales (Tableaux : I-1, II-4, III-1, IV-2). Cette diversité naturelle nous a permis de constater un ensemble de comportements "moyen" représentatifs du comportement de la majorité des accessions de la CC192 ou du petit panel d'accessions (Figure I-1 ; Annexe III-1). La diversité naturelle nous a permis également de confirmer la position de certain loci et d'identifier de nouveaux loci associés à la croissance hétérotrophe et à ses déterminants aux différentes conditions environnementales (Tableau: I-6; Figures: I-3, I-9, II-9, III-3).

Pour commencer, nous avons montré qu'en moyenne au niveau de la population, l'allongement de la racicule se mettait en place avant celui de l'hypocotyle (Figure II-1). Cependant, la valeur de l'allongement maximal de ce dernier a été estimée comme plus élevée que celle de la racicule (Tableau I-1). De plus, contrairement à la racicule, l'hypocotyle a bénéficié en moyenne d'une allocation plus importante de la biomasse de la graine (Tableau I-1, Figure II-2). Nous avons également montré qu'en moyenne pour assurer l'allongement de l'hypocotyle, une capacité



respiratoire et une mobilisation des réserves de la graine (SM, C, N) sont maintenues jusqu'à 193 HAT (Figure II-2, II-3 ; Tableau II-3). Dans ce cadre et grâce à l'étude GWAS, une co-localisation de SNPs contrôlant la quantité de réserves carbonée et azotée dans la graine et l'allocation de la biomasse de la graine vers l'hypocotyle, a été identifiée (Figure II-9). Ensuite, l'étude nous a permis de montrer que le comportement moyen des accessions vis-à-vis de l'allongement des organes, a été reproductible pour les différents lots de graines utilisés (Lot I vs II) (Tableau IV-1). En revanche, alors que la biomasse de la graine est corrélée entre les lots de graines I et II, nous avons constaté que, la redistribution de cette biomasse vers les compartiments de la plantule est très différente entre ces deux lots. Ensuite, pour assurer la levée des plantules, quel que soit le niveau de mobilisation des réserves de la graine, l'allongement de l'hypocotyle de la majorité des accessions, est homogène d'une année à une autre. La stabilité de ce caractère provenant de différentes productions (années) suggère qu'il est sous fort contrôle génétique. Cela est confirmé grâce à l'identification de 13 co-localisations entre les SNPs associés au trait d'allongement aux deux lots de graines. Parmi eux, le SNP (chr1\_7216961) est associé à la longueur de l'hypocotyle à la fin de la croissance hétérotrophe pour la condition contrôle quel que soit le lot de graines (Figure IV-4). Ce SNP a coïncidé également avec un locus lié à la longueur maximale de l'hypocotyle identifié pour *M. truncatula*, identifié par cartographie de QTL à partir de populations de lignées recombinantes, pour différents lots de graines (années) (Vandecasteele et al. 2011). Ensuite, nous avons montré que l'allongement de l'hypocotyle est influencé par les conditions environnementales lors de la croissance hétérotrophe. L'absence de nitrate et le froid ainsi que leur combinaison a provoqué une réduction de l'allongement de l'hypocotyle (Tableau III-1; Figure III-2). Dans les deux conditions nutritives, le froid a eu également pour effet d'augmenter non seulement la mobilisation de la biomasse de la graine mais aussi sa perte (Tableau III-1; Figure III-2). De plus, la variabilité génotypique a montré que les accessions ayant un potentiel d'élongation faible puisent davantage dans leurs réserves azotées en absence de nitrate (Tableaux II-2, II-3). Cependant, en réponse à la variation des conditions environnementales, l'allongement de l'hypocotyle de la majorité des accessions, a montré une réponse faible en comparaison avec l'allongement de la racine.

En effet, la principale variation dans la performance des plantules en fonction des conditions environnementales a été constatée pour la racine (Tableau I-1, III-1 ; Figure I-1, II-1, III-2). Nous avons constaté que la majorité des accessions (CC192 et petit panel), ont réduit l'allongement de leur racine en réponse à la présence de nitrate et en réponse au froid au cours et à la fin de la croissance



hétérotrophe. Ce résultat est en cohérence avec l'effet inhibiteur du nitrate sur l'élongation des racines de *M. truncatula* en tant que molécule de signalisation *via* le transporteur de nitrate MtNPF6.8 (Morère-Le Paven et al. 2011; Pellizzaro et al. 2014; Zang et al. 2020). L'analyse GWAS a permis de mettre en avant un SNP (chr5\_42057552) associé à l'allongement de la racine en présence de nitrate, qui co-localise avec le transporteur de nitrate MtNPF6.8 (Figure I-3) comme observé préalablement dans l'étude de Morère-Le-Paven et al. (2011) menée sur une population de lignées recombinantes. De plus, le SNP « chr5\_42057552 » était identifié à proximité du SNP «

chr5\_41341940», lui-même associé à la concentration en nitrate dans l'hypocotyle à la fin de la croissance (Figure II-9). Nous avons également noté que la présence de nitrate en condition de stress froid induit la même réponse à savoir une réduction de l'allongement de la racine (Tableau III-3; Figure III-2). Mais, cette réponse au signal nitrate sur l'allongement de la racine en hétérotrophie est moins intense au froid. Malgré cela, nous avons identifié, le SNP « chr5\_42057552 » comme étant associé à l'allongement de la racine (RL) aux deux températures (Figure III-3). Ce qui suggère que, quelle que soit la température, les mêmes voies de signalisation par le nitrate sur la réduction de l'allongement de la racine sont sollicitées.

Afin de comprendre les mécanismes à la base de la réponse adaptative de la core collection à l'absence du signal nitrate (azote exogène) en condition de croissance hétérotrophe, nous avons calculé des indices de plasticité de réponse à l'absence de nitrate. L'utilisation de ces indices séparés (rTraits) ou combinés (données issues d'analyses en composantes principales) a fourni de nouvelles opportunités pour mieux comprendre les bases physiologiques de la plasticité des plantules en réponse à l'absence du signal nitrate pendant la croissance hétérotrophe et pour identifier les gènes impliqués dans cette réponse. Pour commencer l'indice de plasticité de réponse de la longueur de la racine à l'absence de nitrate (rRL) est associé à un cluster de gènes codant pour neuf transporteurs de sucres (*e.g.* glucose) (Figure I-5). Cette région enrichie en gènes de transporteurs de sucres autour du locus associé au rRL coïncidait avec la région liée à la composition du sucres de graine précédemment mis en évidence par Vandecasteele et al. (2011) (Figure I-3). De même, nous avons également montré pour la majorité des accessions, la réponse de RL à l'absence de nitrate est appuyé par une activité respiratoire élevée (biomasse perdue élevée) et une forte mobilisation des réserves (biomasse et carbone). En perspective à cette étude, il serait intéressant d'effectuer un dosage des sucres solubles dans la plantule en cours d'allongement au niveau de toute la core collection. L'étude de Youssef et al. (2016) avait montré qu'une corrélation négative entre le niveau de sucres solubles dans



l'hypocotyle en cours d'allongement tel que le saccharose et les hexoses (glucose et fructose) et entre capacité d'allongement cellulaire dans l'hypocotyle. Il conviendra également de déterminer si cette relation existe pour la capacité d'allongement cellulaire dans la radicule en absence de signal nitrate. À terme, il serait aussi intéressant d'étudier l'effet de l'absence du signal nitrate sur l'architecture racinaire lors de la transition vers l'autotrophie grâce à des méthodes d'exploration non destructives (e.g. systèmes des Mini-Rhizotrons; McMichael et al. 2010).

Ensuite, en condition de température optimale (*i.e.* 17 °C) la combinaison entre les indices de réponse de la longueur de toute la plantule à l'absence de nitrate, capturant la part de la variation génétique liée à la fois à rRL et rHL sont associés à deux loci au niveau du chromosome 7 (Figure I-2, I-3). Parmi ces loci, un locus est localisé dans une région enrichie en gènes codant pour des glutathion transférases (16 GSTs) (Figure I-5). En fonction de leur localisation, les gènes révélés dans la présente étude codent pour des GSTs de classe tau (Figure I-6, I-7), dont l'expression a été souvent corrélée à la tolérance à un large éventail de stress abiotiques (Dixon et al. 2002; Dixon & Edwards, 2010; Han et al. 2018). Quelle que soit leur classe, les GSTs sont définis en tant qu'enzymes antioxydants capables d'éliminer les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et ainsi limiter les dommages oxydatifs des cellules (Sappl et al. 2009; Foyer & Noctor 2011; Río 2015). L'implication des ROSs comme régulateur de la croissance *via* le contrôle la division cellulaire et l'allongement cellulaire pendant le développement des racines, a été suggérée dans différentes études (Liszkay et al. 2004; Dunand et al. 2007; Tsukagoshi et al. 2010). Zang et al. (2020) suggèrent que les ROSs contribuent à la voie de signalisation des nitrates qui contrôlent la croissance autotrophe des racines primaires chez *M. truncatula*. Ces auteurs ont constaté une corrélation étroite entre l'inhibition de la croissance des racines primaires et l'inhibition de ROS (*i.e.*  $O_2^{\cdot-}$ ) d'une part et une réduction du contenu en ROS (*i.e.*  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$  et  $HO^{\cdot}$ ) dans la pointe de la racine principale qui est provoqué par le nitrate *via* le transporteur MtNPF6.8 d'autre part. Ainsi, en perspective à nos travaux, il serait intéressant de mesurer l'activité des GSTs et le contenu en ROSs dans les compartiments de la plantule de *M. truncatula* en hétérotrophie dans des conditions d'apport en nitrate contrastées. De même, il serait intéressant d'approfondir les connaissances sur le lien entre les niveaux de sucres et de ROS, ainsi que sur leur implication dans le contrôle de l'allongement des cellules pendant la croissance hétérotrophe à diverses conditions d'apport de nitrate.



L'ensemble des constats ci-dessus reflètent des comportements moyens de la majorité des accessions, or, la large diversité naturelle de la core collection a révélé d'autres comportements contrastés. Cette variabilité est notamment évaluée grâce à des analyses multivariées (*i.e.* données issues d'analyses en composantes principales et de classifications) intégrant un ensemble de caractères pour identifier des phénotypes de comportements adaptatifs aux diverses conditions environnementales. Pour commencer, le calcul des indices de plasticité a permis non seulement de quantifier la réponse moyenne à l'absence de nitrate au sein de la core collection, mais également à mieux discriminer la réponse individuelle des accessions à cette absence de signal nitrate. Ces indices de plasticité ont permis l'identification de quatre phénotypes (Figure I-2; Tableau I-3) ayant des caractères intégratifs pertinents pour l'installation des plantules en réponse à l'absence de signal nitrate au sein de la diversité génétique. Ces quatre phénotypes de réponse à l'absence de nitrate identifiés à la température de contrôle, sont réduits en trois phénotypes au froid (Figure III-4). Cette baisse de la température, a modifié la répartition des accessions contenues dans les trois groupes phénotypiques (*i.e.* L1, L2 et L3) par rapport à ceux contenues dans les quatre groupes phénotypiques (*i.e.* C1, C2, C3 et C4) (Tableau III-5). Malgré cela, nous avons pu identifier un groupe d'accessions (intersection  $C2 \cap L2$ ) ayant un caractère intégratif pertinent, où l'élongation des organes (hypocotyle et racine) n'est pas affectée par l'absence du signal nitrate et ce, quelle que soit la température étudiée. Ensuite, à travers l'exploitation de la plasticité de réponse des accessions, nous avons identifié des phénotypes en considérant des caractéristiques métaboliques pouvant expliquer la croissance hétérotrophe (Figure II-7). Cela a fourni des connaissances précieuses sur l'existence de biomarqueurs de la croissance hétérotrophe. Ces liens putatifs ont été également confirmés, par des co-localisations entre les régions du génome contrôlant certains caractères liés à la croissance hétérotrophe et ceux contrôlant ses biomarqueurs (Figure II-7, II-9). Par exemple, la composition en réserves de la graine et le pourcentage d'anions inorganiques (phosphate et nitrate) dans l'hypocotyle à la fin de la croissance ont été proposés comme biomarqueurs de la croissance de la plantule. De même, le  $\delta^{15}\text{N}$  dans les graines et le pourcentage d'azote dans les cotylédons, ont été proposés comme biomarqueurs de l'allongement de la racine en hétérotrophie (Tableau II-3; Figure II-8, II-9). Enfin, un ensemble de phénotypes ont été défini en considérant les données géoclimatiques des sites d'origine des accessions (Figure IV-5). À partir de cette classification des accessions, nous avons pu mettre en avant des liens entre l'environnement natif des accessions et la



masse des graines ainsi que le potentiel d'allongement de l'hypocotyle. A noter par exemple, que contrairement à la moyenne de la CC192, les accessions du phénotype G2 (Figure IV-6, IV-7) originaires de régions avec de forts épisodes de vent et de précipitations, se distinguaient par de faibles masses de la graine et de la longueur de l'hypocotyle.

En perspective à cette exploration de la plasticité de comportements des accessions de la core collection, il serait intéressant de sélectionner un éventail d'accessions représentatives de l'ensemble des phénotypes identifiés. Cet éventail d'accessions pourrait contribuer à l'identification de set de caractères intégratifs minimum indispensables à la réussite de l'installation des plantules, lesquels permettront la conception d'idéotypes par la suite. Ensuite, les investigations GWAS ont montré un certain nombre de loci différents en fonction des modèles utilisés et de la stratégie de sélection de ces loci (Figure I-9, IV-3, IV-4 ; Tableaux I-4, I-5, II-7, III-2). Dans ce cadre, la sélection d'un nouvel éventail d'accessions peut être une base intéressante pour la création de populations multiparentales MAGIC ou encore AMPRIL (Kover et al. 2009; Huang et al. 2011), contrastées par rapport aux caractères étudiés. La création de telles populations permettrait la confirmation des différents loci identifiés, à travers la réalisation d'une cartographie de liaison en complément à l'analyse GWAS. Ce qui permettrait également la réalisation d'analyses comparatives pour la détection de Méta-QTLs, gouvernant simultanément les caractères les plus importants en lien avec la performance des plantules de *M. truncatula* en conditions abiotiques pénalisantes.



# Références Bibliographiques

---

- Abdul Kayum Md, Nath U, Park J-I, Biswas M, Choi E, Song J-Y, Kim H-T, Nou I-S. 2018. Genome-Wide Identification, Characterization, and Expression Profiling of Glutathione S-Transferase (GST) Family in Pumpkin Reveals Likely Role in Cold-Stress Tolerance. *Genes*. 9(2):84.
- Alboresi A, Gestin C, Leydecker M-T, Bedu M, Meyer C, Truong H-N. 2005. Nitrate, a signal relieving seed dormancy in Arabidopsis. *Plant Cell Environ*. 28(4):500–512.
- Améziane R, Richard-Molard C, Deléens E, Morot-Gaudry J, Limami A. 1997. Nitrate (15NO<sub>3</sub>) limitation affects nitrogen partitioning between metabolic and storage sinks and nitrogen reserve accumulation in chicory (*Cichorium intybus* L.). *Planta*. 202:303–312.
- ANDREWS M, McKENZIE BA, JONES AV. 1991. Nitrate Effects on Growth of the First Four Main Stem Leaves of a Range of Temperate Cereals and Pasture Grasses. *Annals of Botany*. 67(5):451–457.
- Asimit J, Zeggini E. 2010. Rare Variant Association Analysis Methods for Complex Traits. *Annu Rev Genet*. 44(1):293–308.
- Atwell S, Huang YS, Vilhjálmsson BJ, Willems G, Horton M, Li Y, Meng D, Platt A, Tarone AM, Hu TT, et al. 2010. Genome-wide association study of 107 phenotypes in Arabidopsis thaliana inbred lines. *Nature*. 465(7298):627–631.
- Bagchi R, Salehin M, Adeyemo OS, Salazar C, Shulaev V, Sherrier DJ, Dickstein R. 2012. Functional Assessment of the *Medicago truncatula* NIP/LATD Protein Demonstrates That It Is a High-Affinity Nitrate Transporter. *Plant Physiol*. 160(2):906.
- Bernardes JS, Vieira FRJ, Zaverucha G, Carbone A. 2016. A multi-objective optimization approach accurately resolves protein domain architectures. *Bioinformatics*. 32(3):345–353.
- Betty M, Finch-Savage WE, King GJ, Lynn JR. 2000. Quantitative genetic analysis of seed vigour and pre-emergence seedling growth traits in Brassica oleracea: RESEARCH QTL analysis of seed vigour in Brassica. *New Phytologist*. 148(2):277–286.
- Bewley JD, Black M. 1982. Dormancy. In: Bewley JD, Black M, editors. *Physiology and Biochemistry of Seeds in Relation to Germination: Volume 2: Viability, Dormancy, and Environmental Control* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; p. 60–125. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-68643-6\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-642-68643-6_2)
- Bolormaa S, Pryce JE, Reverter A, Zhang Y, Barendse W, Kemper K, Tier B, Savin K, Hayes BJ, Goddard ME. 2014. A Multi-Trait, Meta-analysis for Detecting Pleiotropic Polymorphisms for Stature, Fatness and Reproduction in Beef Cattle. Flint J, editor. *PLoS Genet*. 10(3):e1004198.
- Bonhomme M, André O, Badis Y, Ronfort J, Burgarella C, Chantret N, Prosperi J-M, Briskine R, Mudge J, Debéllé F, et al. 2014. High-density genome-wide association mapping implicates an F-box encoding gene in *Medicago truncatula* resistance to *Aphanomyces euteiches*. *New Phytologist*. 201(4):1328–1342.
- Bouchet S, Bertin P, Presterl T, Jamin P, Coubriche D, Gouesnard B, Laborde J, Charcosset A. 2017. Association mapping for phenology and plant architecture in maize shows higher power for developmental traits compared with growth influenced traits. *Heredity*. 118(3):249–259.



- Bradbury PJ, Zhang Z, Kroon DE, Casstevens TM, Ramdoss Y, Buckler ES. 2007. TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics*. 23(19):2633–2635.
- Branca A, Paape TD, Zhou P, Briskine R, Farmer AD, Mudge J, Bharti AK, Woodward JE, May GD, Gentzbittel L, et al. 2011. Whole-genome nucleotide diversity, recombination, and linkage disequilibrium in the model legume *Medicago truncatula*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 108(42):E864–E870.
- Brodie A, Azaria J, Ofran Y. 2016. How far from the SNP may the causative genes be? *Nucleic acids research*. 44.
- Brunel S, Teulat-Merah B, Wagner M-H, Huguet T, Prosperi JM, Dürr C. 2009. Using a model-based framework for analysing genetic diversity during germination and heterotrophic growth of *Medicago truncatula*. *Annals of Botany*. 103(7):1103–1117.
- Brunel-Muguet S, Mary B, Dürr C. 2015. Modelling the relative contribution of seed nitrogen reserves and external nitrogen uptake during heterotrophic growth in *Medicago truncatula*. *Plant and Soil*. 386(1–2):331–340.
- Buckeridge M, Pessoa dos Santos H, Tiné M. 2000. Mobilisation of storage cell wall polysaccharides in seeds. *Plant Physiology and Biochemistry*. 38:141–156.
- Canfield DE, Glazer AN, Falkowski PG. 2010. The Evolution and Future of Earth's Nitrogen Cycle. *Science*. 330(6001):192–196.
- Carpita NC. 1996. STRUCTURE AND BIOGENESIS OF THE CELL WALLS OF GRASSES. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 47(1):445–476.
- Casadebaig P, Pouban B, Trepos R, Picheny V, Debaeke P. 2015. Using Plant Phenotypic Plasticity to Improve Crop Performance and Stability Regarding Climatic Uncertainty: A Computational Study on Sunflower. *Procedia Environmental Sciences*. 29:142–143.
- Castaigns L, Marchive C, Meyer C, Krapp A. 2011. Nitrogen signalling in *Arabidopsis*: how to obtain insights into a complex signalling network. *Journal of Experimental Botany*. 62(4):1391–1397.
- Celis-Arámburo T de J, Carrillo-Pech M, Castro-Concha LA, Miranda-Ham M de L, Martínez-Estévez M, Echevarría-Machado I. 2011. Exogenous nitrate induces root branching and inhibits primary root growth in *Capsicum chinense* Jacq. *Plant Physiology and Biochemistry*. 49(12):1456–1464.
- Cendreau E, Traas J, Demos T, Crandjean O, Caboche M, Hofte H. 1997. Cellular Basis of Hypocotyl Growth in *Arabidopsis thaliana*. 114:11.
- Chalker-Scott L. 1999. Environmental Significance of Anthocyanins in Plant Stress Responses. *Photochem Photobiol*. 70(1):1–9.



- Chamorro D, Luna B, Moreno JM. 2018. Local climate controls among-population variation in germination patterns in two *Erica* species across western Iberia. *Seed Science Research*. 28(2):112–122.
- Chardon F, Barthélémy J, Daniel-Vedele F, Masclaux-Daubresse C. 2010. Natural variation of nitrate uptake and nitrogen use efficiency in *Arabidopsis thaliana* cultivated with limiting and ample nitrogen supply. *Journal of Experimental Botany*. 61(9):2293–2302.
- Chebouti A., Abdelguerfi A., Mefti M. 2001. Effet du stress hydrique sur le rendement en gousses et en graines chez trois espèces de luzernes annuelles : *Medicago aculeata*, *Medicago orbicularis* et *Medicago truncatula*. In: Delgado I., Lloveras J., editors. Quality in lucerne and medics for animal production [Internet]. Vol. 45. [place unknown]: Zaragoza : CIHEAM; p. 163–166. <http://om.ciheam.org/om/pdf/a45/01600077.pdf>
- Chen J, Chen Z. 2008. Extended Bayesian information criteria for model selection with large model spaces. *Biometrika*. 95(3):759–771.
- Choi H-K, Mun J-H, Kim D-J, Zhu H, Baek J-M, Mudge J, Roe B, Ellis N, Doyle J, Kiss GB, et al. 2004. Estimating genome conservation between crop and model legume species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 101(43):15289–15294.
- Cosgrove DJ. 2005. Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 6(11):850–861.
- Cosgrove DJ. 2014. Re-constructing our models of cellulose and primary cell wall assembly. *Current Opinion in Plant Biology*. 22:122–131.
- Cramer GR, Urano K, Delrot S, Pezzotti M, Shinozaki K. 2011. Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. *BMC Plant Biology*. 11(1):163.
- Crawford NM. 1995. Nitrate: nutrient and signal for plant growth. *Plant Cell*. 7(7):859.
- Crawford NM, Forde BG. 2002. Molecular and Developmental Biology of Inorganic Nitrogen Nutrition. *The Arabidopsis Book*. 1:e0011.
- Crawford NM, Glass ADM. 1998. Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trends in Plant Science*. 3(10):389–395.
- Dalal A, Attia Z, Moshelion M. 2017. To Produce or to Survive: How Plastic Is Your Crop Stress Physiology? *Frontiers in Plant Science* [Internet]. [accessed 2019 Oct 6] 8. <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2017.02067/full>
- Dayoub E, Naudin C, Piva G, Shirliff SJ, Fustec J, Corre-Hellou G. 2017. Traits affecting early season nitrogen uptake in nine legume species. *Heliyon*. 3(2):e00244.
- De Frenne P, Rodríguez-Sánchez F, Coomes DA, Baeten L, Verstraeten G, Vellend M, Bernhardt-Römermann M, Brown CD, Brunet J, Cornelis J, et al. 2013. Microclimate moderates plant responses to macroclimate warming. *Proc Natl Acad Sci USA*. 110(46):18561.
- De Pessemier J, Chardon F, Juraniec M, Delaplace P, Hermans C. 2013. Natural variation of the root morphological response to nitrate supply in *Arabidopsis thaliana*. *Mechanisms of Development*. 130(1):45–53.



- De Ron AM, Rodiño AP, Santalla M, González AM, Lema MJ, Martín I, Kigel J. 2016. Seedling Emergence and Phenotypic Response of Common Bean Germplasm to Different Temperatures under Controlled Conditions and in Open Field. *Front Plant Sci.* 7:1087–1087.
- Deleens E, Gregory N, Bourdu R. 1984. Transition between seed reserve use and photosynthetic supply during development of maize seedlings. *Plant Science Letters.* 37(1–2):35–39.
- Derieux M, Bourdu R, Duburcq J-B, Boizard H. 1989. La crise de croissance de la plantule de maïs à basse température. *Agronomie.* 9:207–212.
- Dias PMB, Brunel-Muguet S, Dürr C, Huguet T, Demilly D, Wagner M-H, Teulat-Merah B. 2011. QTL analysis of seed germination and pre-emergence growth at extreme temperatures in *Medicago truncatula*. *Theoretical and Applied Genetics.* 122(2):429–444.
- Diaz C, Lemaître T, Christ A, Azzopardi M, Kato Y, Sato F, Morot-Gaudry J-F, Le Dily F, Masclaux-Daubresse C. 2008. Nitrogen recycling and remobilization are differentially controlled by leaf senescence and development stage in *Arabidopsis* under low nitrogen nutrition. *Plant Physiol.* 147(3):1437–1449.
- Dickson SP, Wang K, Krantz I, Hakonarson H, Goldstein DB. 2010. Rare Variants Create Synthetic Genome-Wide Associations. Hastie N, editor. *PLoS Biology.* 8(1):e1000294.
- Ding L, Wang KJ, Jiang GM, Biswas DK, Xu H, Li LF, Li YH. 2005. Effects of nitrogen deficiency on photosynthetic traits of maize hybrids released in different years. *Ann Bot.* 96(5):925–930.
- Diwan N, Bauchan GR, McIntosh MS. 1994. A Core Collection for the United States Annual *Medicago* Germplasm Collection. *Crop Science.* 34(1):279.
- Dixon DP, Edwards R. 2010. Glutathione Transferases. *The Arabidopsis Book.* 8:e0131.
- Dixon DP, Hawkins T, Hussey PJ, Edwards R. 2009. Enzyme activities and subcellular localization of members of the *Arabidopsis* glutathione transferase superfamily. *Journal of Experimental Botany.* 60(4):1207–1218.
- Dixon DP, Laphorn, Adrian, Edwards R. 2002. Plant Glutathione Transferases. In: *Methods in Enzymology* [Internet]. Vol. 401. [place unknown]: Elsevier; [accessed 2019 Oct 6]; p. 169–186. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687905010116>
- Dixon DP, Skipsey M, Edwards R. 2010. Roles for glutathione transferases in plant secondary metabolism. *Phytochemistry.* 71(4):338–350.
- Djemel N, Guedon D, Lechevalier A, Salon C, Miquel M, Prosperi J-M, Rochat C, Boutin J-P. 2005. Development and composition of the seeds of nine genotypes of the *Medicago truncatula* species complex. *Plant physiology and biochemistry : PPB / Société française de physiologie végétale.* 43:557–66.
- Doyle J, Luckow M. 2003. The Rest of the Iceberg. *Legume Diversity and Evolution in a Phylogenetic Context.* *Plant physiology.* 131:900–10.
- Dunand C, Crèvecoeur M, Penel C. 2007. Distribution of superoxide and hydrogen peroxide in *Arabidopsis* root and their influence on root development: possible interaction with peroxidases. *New Phytologist.* 174(2):332–341.



- Dürr C. 1998. Effects of Nutrient Supply on Pre-emergence Growth and Nutrient Absorption in Wheat (*Triticum aestivum*L.) and Sugarbeet (*Beta vulgaris*L.). *Annals of Botany*. 81(5):665–672.
- Durrant MJ, Mash SJ. 1989. Stimulation of sugar-beet hypocotyl extension with potassium nitrate. *Annals of Applied Biology*. 115(2):367–374.
- Eastmond PJ, Astley HM, Parsley K, Aubry S, Williams BP, Menard GN, Craddock CP, Nunes-Nesi A, Fernie AR, Hibberd JM. 2015. Arabidopsis uses two gluconeogenic gateways for organic acids to fuel seedling establishment. *Nature Communications*. 6(1):6659.
- Eastmond PJ, Graham IA. 2001. Re-examining the role of the glyoxylate cycle in oilseeds. *Trends in Plant Science*. 6(2):72–78.
- Eickhout B, van Meijl H, Tabeau A, van Rheenen T. 2007. Economic and ecological consequences of four European land use scenarios. *Land Use Policy*. 24(3):562–575.
- Ejigui, J., Savoie, L., Marin, J., and Desrosiers, T. (2007). Improvement of the nutritional quality of a traditional complementary porridge made of fermented yellow maize (*Zea mays*): Effect of maize–legume combinations and traditional processing methods. *Food Nutr. Bull.* 28: 23–34.
- Enders TA, St. Dennis S, Oakland J, Callen ST, Gehan MA, Miller ND, Spalding EP, Springer NM, Hirsch CD. 2019. Classifying cold-stress responses of inbred maize seedlings using RGB imaging. *Plant Direct*. 3(1):e00104.
- Fick SE, Hijmans RJ. 2017. WorldClim 2: new 1-km spatial resolution climate surfaces for global land areas. *Int J Climatol*. 37(12):4302–4315.
- Finch-Savage WE, Bassel GW. 2016. Seed vigour and crop establishment: extending performance beyond adaptation. *EXBOTJ*. 67(3):567–591.
- Finch-Savage WE, Clay HA, Lynn JR, Morris K. 2010. Towards a genetic understanding of seed vigour in small-seeded crops using natural variation in *Brassica oleracea*. *Plant Science*. 179(6):582–589.
- Finch-Savage WE, Phelps K, Steckel JRA, Whalley WR, Rowse HR. 2001. Seed reserve-dependent growth responses to temperature and water potential in carrot (*Daucus carota* L.). *Journal of Experimental Botany*. 52(364):2187–2197.
- Flint J, Eskin E. 2012. Genome-wide association studies in mice. *Nat Rev Genet*. 13(11):807–817.
- Foolad MR, Subbiah P, Zhang L. 2007. Common QTL affect the rate of tomato seed germination under different stress and nonstress conditions. *Int J Plant Genomics*. 2007:97386–97386.
- Forde B, Clarkson D. 1999. Nitrate and Ammonium Nutrition of Plants: Physiological and Molecular Perspectives. *Advances in Botanical Research*. 30:1–90.
- Forde BG. 2000. Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 1465(1–2):219–235.
- Foyer CH, Noctor G. 2011. Ascorbate and Glutathione: The Heart of the Redox Hub. *Plant Physiol*. 155(1):2–18.
- Fustec J, Lesuffleur F, Mahieu S, Cliquet J-B. 2010. Nitrogen rhizodeposition of legumes. A review. <http://dx.doi.org/101051/agro/2009003>. 30.



- Gallardo K, Le Signor C, Vandekerckhove J, Thompson RD, Burstin J. 2003. Proteomics of *Medicago truncatula* Seed Development Establishes the Time Frame of Diverse Metabolic Processes Related to Reserve Accumulation. *Plant Physiol.* 133(2):664–682.
- Genitoni J, 2013. Les glutathion S-transférases de *Medicago truncatula*, rôle dans l’implantation au froid. Stage Institut de Recherche en Horticulture et Semences, Angers.
- Gentzbittel L, Andersen SU, Ben C, Rickauer M, Stougaard J, Young ND. 2015. Naturally occurring diversity helps to reveal genes of adaptive importance in legumes. *Frontiers in Plant Science* [Internet]. [accessed 2019 Oct 6] 6. <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2015.00269/abstract>
- Gentzbittel L, Ben C, Mazurier M, Shin M-G, Lorenz T, Rickauer M, Marjoram P, Nuzhdin SV, Tatarinova TV. 2019. WhoGEM: an admixture-based prediction machine accurately predicts quantitative functional traits in plants. *Genome Biol.* 20(1):106.
- Gepts P, Beavis WD, Brummer EC, Shoemaker RC, Stalker HT, Weeden NF, Young ND. 2005. Legumes as a Model Plant Family. *Genomics for Food and Feed Report of the Cross-Legume Advances through Genomics Conference.* *Plant Physiol.* 137(4):1228–1235.
- Gibson G. 2011. Gibson, G. Rare and common variants: twenty arguments. *Nat. Rev. Genet.* 13, 135–145. *Nature reviews Genetics.* 13:135–45.
- Giller KE. 2001. Nitrogen fixation in tropical cropping systems. 2nd ed. Wallingford, Oxon, UK ; New York, NY, USA: CABI Pub.
- Gimeno-Gilles C, Lelièvre E, Viau L, Malik-Ghulam M, Ricoult C, Niebel A, Leduc N, Limami AM. 2009. ABA-Mediated Inhibition of Germination Is Related to the Inhibition of Genes Encoding Cell-Wall Biosynthetic and Architecture: Modifying Enzymes and Structural Proteins in *Medicago truncatula* Embryo Axis. *Molecular Plant.* 2(1):108–119.
- Godfray HCJ, Beddington JR, Crute IR, Haddad L, Lawrence D, Muir JF, Pretty J, Robinson S, Thomas SM, Toulmin C. 2010. Food Security: The Challenge of Feeding 9 Billion People. *Science.* 327(5967):812.
- Gojon A, Krouk G, Perrine-Walker F, Laugier E. 2011. Nitrate transceptor(s) in plants. *Journal of Experimental Botany.* 62(7):2299–2308.
- Graham I. 2008. Seed Storage Oil Mobilization. *Annual review of plant biology.* 59:115–42.
- Gross BL, Olsen KM. 2010. Genetic perspectives on crop domestication. *Trends in Plant Science.* 15(9):529–537.
- Guo Y, Huang Y, Hou L, Ma J, Chen C, Ai H, Huang L, Ren J. 2017. Genome-wide detection of genetic markers associated with growth and fatness in four pig populations using four approaches. *Genetics Selection Evolution* [Internet]. [accessed 2019 Oct 6] 49(1). <http://gsejournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12711-017-0295-4>
- Han X-M, Yang Z-L, Liu Y-J, Yang H-L, Zeng Q-Y. 2018. Genome-wide profiling of expression and biochemical functions of the *Medicago* glutathione S-transferase gene family. *Plant Physiology and Biochemistry.* 126:126–133.



- Harris, J. 2015. Abscisic acid: Hidden architect of root system structure. *Plants* 4: 548–572.
- Hayashi E, Aoyama N, Still DW. 2008. Quantitative trait loci associated with lettuce seed germination under different temperature and light environments. *Genome*. 51(11):928–947.
- Heupel T, Kutschera U. 1997. Cell number and organ size in developing sunflower hypocotyls. *Journal of Plant Physiology*. 151(3):379–381.
- Hijmans RJ, Cameron SE, Parra JL, Jones PG, Jarvis A. 2005. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *Int J Climatol*. 25(15):1965–1978.
- Hirel B, Le Gouis J, Ney B, Gallais A. 2007. The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches. *Journal of Experimental Botany*. 58(9):2369–2387.
- Hopkins W, Hüner N. 2008. *Introduction to Plant Physiology*, John Wiley and Sons Inc.
- Huang X, Paulo M-J, Boer M, Effgen S, Keizer P, Koornneef M, van Eeuwijk FA. 2011. Analysis of natural allelic variation in *Arabidopsis* using a multiparent recombinant inbred line population. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 108(11):4488–4493.
- ICHIE T, NINOMIYA I, OGINO K. 2001. Utilization of seed reserves during germination and early seedling growth by *Dryobalanops lanceolata* (Dipterocarpaceae). *Journal of Tropical Ecology*. 17(3):371–378.
- Ingvarsson PK, Street NR. 2011. Association genetics of complex traits in plants: Tansley review. *New Phytologist*. 189(4):909–922.
- Islam S, Rahman IA, Islam T, Ghosh A. 2017. Genome-wide identification and expression analysis of glutathione S-transferase gene family in tomato: Gaining an insight to their physiological and stress-specific roles. Chakrabarty D, editor. *PLOS ONE*. 12(11):e0187504.
- Jernigan KL, Godoy JV, Huang M, Zhou Y, Morris CF, Garland-Campbell KA, Zhang Z, Carter AH. 2018. Genetic Dissection of End-Use Quality Traits in Adapted Soft White Winter Wheat. *Frontiers in Plant Science* [Internet]. [accessed 2018 Jun 14] 9. <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2018.00271/full>
- Kaló P, Seres A, Taylor SA, Jakab J, Kevei Z, Kereszt A, Endre G, Ellis THN, Kiss GB. 2004. Comparative mapping between *Medicago sativa* and *Pisum sativum*. *Molecular Genetics and Genomics*. 272(3):235–246.
- Kang HM, Zaitlen NA, Wade CM, Kirby A, Heckerman D, Daly MJ, Eskin E. 2008. Efficient Control of Population Structure in Model Organism Association Mapping. *Genetics*. 178(3):1709–1723.
- Kang Y, Sakiroglu M, Krom N, Stanton-Geddes J, Wang M, Lee Y-C, Young ND, Udvardi M. 2015. Genome-wide association of drought-related and biomass traits with HapMap SNPs in *Medicago truncatula*: GWAS of drought-related traits in *Medicago truncatula*. *Plant, Cell & Environment*. 38(10):1997–2011.
- Kerdaffrec E, Nordborg M. 2017. The maternal environment interacts with genetic variation in regulating seed dormancy in Swedish *Arabidopsis thaliana*. *PLOS ONE*. 12(12):e0190242.



- Kiba T, Krapp A. 2016. Plant Nitrogen Acquisition Under Low Availability: Regulation of Uptake and Root Architecture. *Plant and Cell Physiology*. 57(4):707–714.
- Korkmaz A, Dufault RJ. 2001. Developmental Consequences of Cold Temperature Stress at Transplanting on Seedling and Field Growth and Yield. I. Watermelon. *Jashs*. 126(4):404–409.
- Korte A, Farlow A. 2013. The Advantages and Limitations of Trait Analysis With Gwas: A Review. *Plant methods*. 9:29.
- Kover PX, Valdar W, Trakalo J, Scarcelli N, Ehrenreich IM, Purugganan MD, Durrant C, Mott R. 2009. A Multiparent Advanced Generation Inter-Cross to Fine-Map Quantitative Traits in *Arabidopsis thaliana*. Mauricio R, editor. *PLoS Genetics*. 5(7):e1000551.
- Krigel I. 1967. The early requirement for plant nutrients by subterranean clover seedlings (*Trifolium subterraneum*). *Aust J Agric Res*. 18(6):879–886.
- Krouk G, Lacombe B, Bielach A, Perrine-Walker F, Malinska K, Mounier E, Hoyerova K, Tillard P, Leon S, Ljung K, et al. 2010. Nitrate-Regulated Auxin Transport by NRT1.1 Defines a Mechanism for Nutrient Sensing in Plants. *Developmental Cell*. 18(6):927–937.
- Lahti M, Aphalo PJ, Finer L, Ryyppo A, Lehto T, Mannerkoski H. 2005. Effects of soil temperature on shoot and root growth and nutrient uptake of 5-year-old Norway spruce seedlings. *Tree Physiology*. 25(1):115–122.
- Lawrence DM, Halmer P, Bowles DJ. 1990. Mobilisation of storage reserves during germination and early seedling growth of sugar beet. *Physiologia Plantarum*. 78(3):421–429.
- Lawrie AC, Wheeler CT. 1974. THE EFFECTS OF FLOWERING AND FRUIT FORMATION ON THE SUPPLY OF PHOTOSYNTHETIC ASSIMILATES TO THE NODULES OF *PISUM SATIVUM* L. IN RELATION TO THE FIXATION OF NITROGEN. *New Phytologist*. 73(6):1119–1127.
- Le Signor C, Aimé D, Bordat A, Belghazi M, Labas V, Gouzy J, Young ND, Prosperi J-M, Leprince O, Thompson RD, et al. 2017. Genome-wide association studies with proteomics data reveal genes important for synthesis, transport and packaging of globulins in legume seeds. *New Phytologist*. 214(4):1597–1613.
- Lee SH, Park KY, Lee HS, Park EH, Boerma HR. 2001. Genetic mapping of QTLs conditioning soybean sprout yield and quality: *Theor Appl Genet*. 103(5):702–709.
- Léran S, Varala K, Boyer J-C, Chiurazzi M, Crawford N, Daniel-Vedele F, David L, Dickstein R, Fernandez E, Forde B, et al. 2014. A unified nomenclature of NITRATE TRANSPORTER 1/PEPTIDE TRANSPORTER family members in plants. *Trends in Plant Science*. 19(1):5–9.
- Levine JM. 2000. Species diversity and biological invasions: relating local process to community pattern. *Science*. 288(5467):852–854.
- Li G, Xu X, Bai G, Carver BF, Hunger R, Bonman JM, Kolmer J, Dong H. 2016. Genome-Wide Association Mapping Reveals Novel QTL for Seedling Leaf Rust Resistance in a Worldwide Collection of Winter Wheat. *The Plant Genome*. 9(3):0.



- Liang Y, Mitchell DM, Harris JM. 2007. Abscisic acid rescues the root meristem defects of the *Medicago truncatula* latd mutant. *Developmental Biology*. 304(1):297–307.
- Licciardello C, D'Agostino N, Traini A, Recupero GR, Frusciante L, Chiusano ML. 2014. Characterization of the glutathione S-transferase gene family through ESTs and expression analyses within common and pigmented cultivars of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. *BMC Plant Biol*. 14:39–39.
- Lieffering M, Andrews M, McKenzie B. 1996. Nitrate stimulation of mobilization of seed reserves in temperate cereals: importance of water uptake. *Annals of Botany*. 78(6):695–701.
- Limami AM, Rouillon C, Glevarec G, Gallais A, Hirel B. 2002. Genetic and Physiological Analysis of Germination Efficiency in Maize in Relation to Nitrogen Metabolism Reveals the Importance of Cytosolic Glutamine Synthetase. *Plant Physiology*. 130(4):1860–1870.
- Linkohr B, Williamson L, Fitter A, Leyser H. 2002. Nitrate and Phosphate Availability and Distribution Have Different Effects on Root System Architecture of *Arabidopsis*. *The Plant journal : for cell and molecular biology*. 29:751–60.
- Liszak A, van der Zalm E, Schopfer P. 2004. Production of Reactive Oxygen Intermediates ( $O_2^{\cdot -}$ ,  $H_2O_2$ , and  $\cdot OH$ ) by Maize Roots and Their Role in Wall Loosening and Elongation Growth. *Plant Physiology*. 136(2):3114–3123.
- Lithourgidis AS, Dordas CA, Damalas CA, Vlachostergios DN. Annual intercrops: an alternative pathway for sustainable agriculture. :16.
- Little DY, Rao H, Oliva S, Daniel-Vedele F, Krapp A, Malamy JE. 2005. The putative high-affinity nitrate transporter NRT2.1 represses lateral root initiation in response to nutritional cues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102(38):13693.
- Liu X, Huang M, Fan B, Buckler ES, Zhang Z. 2016. Iterative Usage of Fixed and Random Effect Models for Powerful and Efficient Genome-Wide Association Studies. Listgarten J, editor. *PLOS Genetics*. 12(2):e1005767.
- Loridon K, Burgarella C, Chantret N, Martins F, Gouzy J, Prospéri J-M, Ronfort J. 2013. Single-nucleotide polymorphism discovery and diversity in the model legume *Medicago truncatula*. *Molecular Ecology Resources*. 13(1):84–95.
- Louarn G, Chenu K, Fournier C, Andrieu B, Giauffret C. 2008. Relative contributions of light interception and radiation use efficiency to the reduction of maize productivity under cold temperatures. *Functional Plant Biology*. 35:885–899.
- LoveLess MD, Hamrick JL. Ecological Determinants of Genetic Structure in Plant Populations. :33.
- Luo Y, Field CB, Mooney HA. 1994. Predicting responses of photosynthesis and root fraction to elevated  $[CO_2]$ : interactions among carbon, nitrogen, and growth\*. *Plant, Cell and Environment*. 17(11):1195–1204.
- Lv Y, Guo Z, Xiaokai L, Ye H, Li X, Xiong L. 2015. New insights into the genetic basis of natural chilling and cold shock tolerance in rice by genome-wide association analysis. *Plant, Cell & Environment*. 39.



- Maillard P, Garriou D, Delens E, Gross P, Guehl J-M. 2004. The effects of lifting on mobilisation and new assimilation of C and N during regrowth of transplanted Corsican pine seedlings. A dual <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N labelling approach. *Annals of Forest Science*. 61(8):795–805.
- Marschner H. 1995. *The Mineral Nutrition of Higher Plants*. :60.
- Martinez SA, Godoy J, Huang M, Zhang Z, Carter AH, Garland Campbell KA, Steber CM. 2018. Genome-Wide Association Mapping for Tolerance to Preharvest Sprouting and Low Falling Numbers in Wheat. *Frontiers in Plant Science* [Internet]. [accessed 2018 Jun 14] 9. <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2018.00141/full>
- Martre P, Quilot-Turion B, Luquet D, Memmah M-MO-S, Chenu K, Debaeke P. 2015. Model-assisted phenotyping and ideotype design. In: *Crop Physiology* [Internet]. [place unknown]: Elsevier; [accessed 2019 Oct 6]; p. 349–373. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124171046000145>
- Mašková T, Herben T. 2018. Root:shoot ratio in developing seedlings: How seedlings change their allocation in response to seed mass and ambient nutrient supply. *Ecology and Evolution*. 8(14):7143–7150.
- McKenzie FC, Williams J. 2015. Sustainable food production: constraints, challenges and choices by 2050. *Food Security*. 7(2):221–233.
- Miller BD, Hawkins BJ. 2007. Ammonium and nitrate uptake, nitrogen productivity and biomass allocation in interior spruce families with contrasting growth rates and mineral nutrient preconditioning. *Tree Physiology*. 27(6):901–909.
- Mohammadi H, Soltani A, Sadeghipour HR, Zeinali E. Effects of seed aging on subsequent seed reserve utilization and seedling growth in soybean. *International Journal of Plant Production*.:6.
- Mohan A, Schillinger WF, Gill KS. 2013. Wheat Seedling Emergence from Deep Planting Depths and Its Relationship with Coleoptile Length. Niedz RP, editor. *PLoS ONE*. 8(9):e73314.
- Monti LM, Grillo S. 1983. Legume seed improvement for protein content and quality. *Plant Foods for Human Nutrition*. 32(3):253–266.
- Moreau D, Voisin A-S, Salon C, Munier-Jolain N. 2008. The model symbiotic association between *Medicago truncatula* cv. Jemalong and *Rhizobium meliloti* strain 2011 leads to N-stressed plants when symbiotic N<sub>2</sub> fixation is the main N source for plant growth. *Journal of Experimental Botany*. 59(13):3509–3522.
- Morere-Le Paven M-C, Viau L, Hamon A, Vandecasteele C, Pellizzaro A, Bourdin C, Laffont C, Lapiéd B, Lepetit M, Frugier F, et al. 2011. Characterization of a dual-affinity nitrate transporter MtNRT1.3 in the model legume *Medicago truncatula*. *Journal of Experimental Botany*. 62(15):5595–5605.
- Morrison GD, Linder CR. 2014. Association Mapping of Germination Traits in *Arabidopsis thaliana* Under Light and Nutrient Treatments: Searching for G×E Effects. *G3&#58; Genes|Genomes|Genetics*. 4(8):1465–1478.



- Muños S, Cazettes C, Fizames C, Gaymard F, Tillard P, Lepetit M, Lejay L, Gojon A. 2004. Transcript Profiling in the chl1-5 Mutant of Arabidopsis Reveals a Role of the Nitrate Transporter NRT1.1 in the Regulation of Another Nitrate Transporter, NRT2.1. *Plant Cell*. 16(9):2433–2447.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*. 15(3):473–497.
- Myles S, Peiffer J, Brown PJ, Ersoz ES, Zhang Z, Costich DE, Buckler ES. 2009. Association Mapping: Critical Considerations Shift from Genotyping to Experimental Design. *Plant Cell*. 21(8):2194–2202.
- Nacry P, Bouguyon E, Gojon A. 2013. Nitrogen acquisition by roots: physiological and developmental mechanisms ensuring plant adaptation to a fluctuating resource. *Plant and Soil*. 370(1–2):1–29.
- Nicotra AB, Davidson A. 2010. Adaptive phenotypic plasticity and plant water use. *Functional Plant Biol*. 37(2):117.
- Nordborg M, Borevitz JO, Bergelson J, Berry CC, Chory J, Hagenblad J, Kreitman M, Maloof JN, Noyes T, Oefner PJ, et al. 2002. The extent of linkage disequilibrium in Arabidopsis thaliana. *Nature Genetics*. 30(2):190–193.
- Nykiforuk CL, Johnson-Flanagan AM. 1997. Low Temperature Emergence in Crop Plants: Biochemical and Molecular Aspects of Germination and Early Seedling Growth. *Journal of Crop Production*. 1(1):249–289.
- O'Brien JA, Vega A, Bouguyon E, Krouk G, Gojon A, Coruzzi G, Gutiérrez RA. 2016. Nitrate Transport, Sensing, and Responses in Plants. *Molecular Plant*. 9(6):837–856.
- Olesen J, Gustavsson A, Svensson M, Wittchen H-U, Jönsson B, on behalf of the CDBE2010 study group, the European Brain Council. 2012. The economic cost of brain disorders in Europe: Economic cost of brain disorders in Europe. *European Journal of Neurology*. 19(1):155–162.
- Olesen JE, Trnka M, Kersebaum KC, Skjelvåg AO, Seguin B, Peltonen-Sainio P, Rossi F, Kozyra J, Micale F. 2011. Impacts and adaptation of European crop production systems to climate change. *European Journal of Agronomy*. 34(2):96–112.
- Ono K, Terashima I, Watanabe A. 1996. Interaction between Nitrogen Deficit of a Plant and Nitrogen Content in the Old Leaves. *Plant and Cell Physiology*. 37(8):1083–1089.
- Orvar B, Sangwan V, Omann F, Dhindsa R. 2000. Early steps in cold sensing by plant cells: The role of actin cytoskeleton and membrane fluidity. *The Plant journal : for cell and molecular biology*. 23:785–94.
- Palaisa K, Morgante M, Tingey S, Rafalski A. 2004. Long-range patterns of diversity and linkage disequilibrium surrounding the maize Y1 gene are indicative of an asymmetric selective sweep. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 101(26):9885–9890.



- Pan Y, Zhang H, Zhang D, Li Jinjie, Xiong H, Yu J, Li Jilong, Rashid MAR, Li G, Ma X, et al. 2015. Genetic analysis of cold tolerance at the germination and booting stages in rice by association mapping. *PLoS One*. 10(3):e0120590–e0120590.
- Park YB, Cosgrove D. 2012. A Revised Architecture of Primary Cell Walls Based on Biomechanical Changes Induced by Substrate-Specific Endoglucanases. *Plant physiology*. 158:1933–43.
- Pate JS. 1958. *Austral J Biol Sci* [Internet]. 11. <https://doi.org/10.1071/BI9580366>
- Paul, K.H., Dickin, K.L., Ali, N.S., Monterrosa, E.C., and Stoltzfus, R.J. (2008). Soy- and rice-based processed complementary food increases nutrient intakes in infants and is equally acceptable with or without added milk powder. *J. Nutr.* 138: 1963–1968.
- Pecrix Y, Staton SE, Sallet E, Lelandais-Brière C, Moreau S, Carrère S, Blein T, Jardinaud M-F, Latrasse D, Zouine M, et al. 2018. Whole-genome landscape of *Medicago truncatula* symbiotic genes. *Nature Plants*. 4(12):1017–1025.
- Pellizzaro A, Alibert B, Planchet E, Limami AM, Morère-Le Paven M-C. 2017. Nitrate transporters: an overview in legumes. *Planta*. 246(4):585–595.
- Pellizzaro A, Clochard T, Cukier C, Bourdin C, Juchaux M, Montrichard F, Thany S, Raymond V, Planchet E, Limami AM, Morère-Le Paven M-C. 2014. The Nitrate Transporter MtNPF6.8 (MtNRT1.3) Transports Abscisic Acid and Mediates Nitrate Regulation of Primary Root Growth in *Medicago truncatula*. *Plant Physiology*. 166(4):2152–2165.
- Penfield S, MacGregor DR. 2017. Effects of environmental variation during seed production on seed dormancy and germination. *Journal of Experimental Botany*.:erw436.
- Pereira WA, Pereira SMA, Dias DCF dos S. 2015. Dynamics of reserves of soybean seeds during the development of seedlings of different commercial cultivars. *Journal of Seed Science*. 37(1):63–69.
- Peterbauer T, Richter A. Biochemistry and physiology of raffinose family oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seeds. :14.
- Petricka JJ, Winter CM, Benfey PN. 2012. Control of *Arabidopsis* Root Development. *Annu Rev Plant Biol*. 63(1):563–590.
- Phan HTT, Ellwood SR, Hane JK, Ford R, Materne M, Oliver RP. 2007. Extensive macrosynteny between *Medicago truncatula* and *Lens culinaris* ssp. *culinaris*. *Theoretical and Applied Genetics*. 114(3):549–558.
- Pierre J, Teulat B, Juchaux M, Mabileau G, Demilly D, Dürr C. 2014. Cellular changes during *Medicago truncatula* hypocotyl growth depend on temperature and genotype. *Plant Science*. 217–218:18–26.
- Pierre Y, 2012. Combinaison d’approche transcriptomique et écophysiological pour l’analyse de la croissance hétérotrophe de *Medicago truncatula* à basse température. Thèse Agrocampus ouest, Angers, Pgs 95.
- Platt A, Vilhjálmsson BJ, Nordborg M. 2010. Conditions Under Which Genome-Wide Association Studies Will be Positively Misleading. *Genetics*. 186(3):1045.
- Rafalski JA. 2010. Association genetics in crop improvement. *Current Opinion in Plant Biology*. 13(2):174–180.



- Rahman A. 2012. Auxin: A regulator of cold stress response. *Physiologia plantarum*. 147.
- Raun WR, Johnson GV. 1999. Improving Nitrogen Use Efficiency for Cereal Production. *Agron.j*. 91(3):357–363.
- Rebetzke GJ, Verbyla AP, Verbyla KL, Morell MK, Cavanagh CR. 2014. Use of a large multiparent wheat mapping population in genomic dissection of coleoptile and seedling growth. *Plant Biotechnology Journal*. 12(2):219–230.
- Redinbaugh MG, Campbell WH. 1991. Higher plant responses to environmental nitrate. *Physiol Plant*. 82(4):640–650.
- Remans T, Nacry P, Pervent M, Filleur S, Diatloff E, Mounier E, Tillard P, Forde BG, Gojon A. 2006. The Arabidopsis NRT1.1 transporter participates in the signaling pathway triggering root colonization of nitrate-rich patches. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103(50):19206–19211.
- Remington DL, Thornsberry JM, Matsuoka Y, Wilson LM, Whitt SR, Doebley J, Kresovich S, Goodman MM, Buckler ES. 2001. Structure of linkage disequilibrium and phenotypic associations in the maize genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 98(20):11479–11484.
- Renzi JP, Duchoslav M, Brus J, Hradilová I, Pechanec V, Václavěk T, Machalová J, Hron K, Verdier J, Smýkal P. 2019. Plasticity of *Medicago truncatula* seed dormancy relates to large-scale environment variation [Internet]. [place unknown]: *Plant Biology*; [accessed 2020 Sep 23]. <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2019.12.22.886218>
- Repo T, Leinonen I, Ryyppö A, Finér L. 2004. The effect of soil temperature on the bud phenology, chlorophyll fluorescence, carbohydrate content and cold hardiness of Norway spruce seedlings. *Physiologia Plantarum*. 121(1):93–100.
- Revilla P, Rodríguez V, Ordás A, Rincón R, Charcosset A, Giauffret C, Melchinger A, Schön C-C, Bauere E, Altmann T, et al. 2014. Cold Tolerance in Two Large Maize Inbred Panels Adapted to European Climates. *Crop Science*. 54.
- Rice TK, Schork NJ, Rao DC. 2008. Methods for Handling Multiple Testing. In: *Advances in Genetics* [Internet]. Vol. 60. [place unknown]: Academic Press; p. 293–308. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065266007004129>
- Río LA. 2015. ROS and RNS in plant physiology: an overview. *Journal of Experimental Botany*. 66(10):2827–2837.
- Roach DA, Wulff RD. 1987. MATERNAL EFFECTS IN PLANTS. *Annu Rev Ecol Syst*. 18(1):209–235.
- Rolland F, Baena-Gonzalez E, Sheen J. 2006. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annu Rev Plant Biol*. 57:675–709.
- Ronfort J, Bataillon T, Santoni S, Delalande M, David JL, Prospero J-M. 2006. 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 Biology*.:13.
- Roorkiwal M, von Wettberg EJ, Upadhyaya HD, Warschefsky E, Rathore A, Varshney RK. 2014. Exploring Germplasm Diversity to Understand the Domestication Process in *Cicer* spp. Using SNP and DArT Markers. Zhang T, editor. *PLoS ONE*. 9(7):e102016.



- Rose RJ. 2008. *Medicago truncatula* as a model for understanding plant interactions with other organisms, plant development and stress biology: past, present and future. *Funct Plant Biol.* 35(4):253–264.
- Rothstein SJ. 2007. Returning to Our Roots: Making Plant Biology Research Relevant to Future Challenges in Agriculture. *The Plant Cell.* 19(9):2695–2699.
- Ruffel S, Gojon A, Lejay L. 2014. Signal interactions in the regulation of root nitrate uptake. *Journal of Experimental Botany.* 65(19):5509–5517.
- Ruffel S, Krouk G, Ristova D, Shasha D, Birnbaum KD, Coruzzi GM. 2011. Nitrogen economics of root foraging: Transitive closure of the nitrate-cytokinin relay and distinct systemic signaling for N supply vs. demand. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 108(45):18524–18529.
- Sakakibara H. 2006. Cytokinins: Activity, biosynthesis, and translocation. *Annu Rev Plant Biol. Annual review of plant biology.* 57:431–49.
- Sánchez-Linares L, Gavilanes-Ruiz M, Diaz-Pontones D, Guzman Chavez F, Calzada-Alejo V, Zurita-Villegas V, Luna Loaiza V, Moreno-Sanchez R, Bernal I, Sánchez-Nieto S. 2012. Early carbon mobilization and radicle protrusion in maize germination. *Journal of experimental botany.* 63:4513–26.
- Sappl PG, Carroll AJ, Clifton R, Lister R, Whelan J, Harvey Millar A, Singh KB. 2009. The *Arabidopsis* glutathione transferase gene family displays complex stress regulation and co-silencing multiple genes results in altered metabolic sensitivity to oxidative stress: Genomic and reverse genetic analysis of plant GSTs. *The Plant Journal.* 58(1):53–68.
- Schaberg PG, DeHayes DH, Hawley GJ, Murakami PF, Strimbeck GR, McNulty SG. 2002. Effects of chronic N fertilization on foliar membranes, cold tolerance, and carbon storage in montane red spruce. *Canadian Journal of Forest Research.* 32(8):1351–1359.
- Scheepens JF, Deng Y, Bossdorf O. 2018. Phenotypic plasticity in response to temperature fluctuations is genetically variable, and relates to climatic variability of origin, in *Arabidopsis thaliana*. *AoB PLANTS* [Internet]. [accessed 2019 Oct 6] 10(4). <https://academic.oup.com/aobpla/article/doi/10.1093/aobpla/ply043/5054186>
- Scheible W-R, Lauerer M, Schulze E-D, Caboche M, Stitt M. 1997. Accumulation of nitrate in the shoot acts as a signal to regulate shoot-root allocation in tobacco†. *The Plant Journal.* 11(4):671–691.
- Schillinger WF, Donaldson E, Allan RE, Jones SS. 1998. Winter Wheat Seedling Emergence from Deep Sowing Depths. *Agronomy Journal.* 90(5):582.
- Segura V, Vilhjálmsson BJ, Platt A, Korte A, Seren Ü, Long Q, Nordborg M. 2012. An efficient multi-locus mixed-model approach for genome-wide association studies in structured populations. *Nature Genetics.* 44(7):825–830.



- Sharma P, Sharma N, Deswal R. 2005. The molecular biology of the low-temperature response in plants. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 27(10):1048–1059.
- Sharma R, Draicchio F, Bull H, Herzig P, Maurer A, Pillen K, Thomas WTB, Flavell AJ. 2018. Genome-wide association of yield traits in a nested association mapping population of barley reveals new gene diversity for future breeding. *Journal of Experimental Botany*. 69(16):3811–3822.
- Sharma R, Sahoo A, Devendran R, Jain M. 2014. Over-Expression of a Rice Tau Class Glutathione S-Transferase Gene Improves Tolerance to Salinity and Oxidative Stresses in Arabidopsis. Wu K, editor. *PLoS ONE*. 9(3):e92900.
- Shewry PR, Napier JA, Tatham AS. Seed Storage Proteins: Structures and Biosynthesis. :12.
- Singh B, Singh A, Ngasepam T, Mukherjee A, Mandal N. 2016. QTL Mapping for Cold Tolerance at the Seedling Stage in Rice. *International Journal of Bio-resource and Stress Management*. 7:1214–1224.
- Smýkal P, Coyne CJ, Ambrose MJ, Maxted N, Schaefer H, Blair MW, Berger J, Greene SL, Nelson MN, Besharat N, et al. 2015. Legume Crops Phylogeny and Genetic Diversity for Science and Breeding. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 34(1–3):43–104.
- Soltani A, Gholipour M, Zeinali E. 2006. Seed reserve utilization and seedling growth of wheat as affected by drought and salinity. *Environmental and Experimental Botany*. 55(1–2):195–200.
- Spiertz JHJ. Nitrogen, sustainable agriculture and food security. A review. :14.
- Stanton-Geddes J, Paape T, Epstein B, Briskine R, Yoder J, Mudge J, Bharti AK, Farmer AD, Zhou P, Denny R, et al. 2013. Candidate Genes and Genetic Architecture of Symbiotic and Agronomic Traits Revealed by Whole-Genome, Sequence-Based Association Genetics in *Medicago truncatula*. Lukens L, editor. *PLoS ONE*. 8(5):e65688.
- Stranger BE, Stahl EA, Raj T. 2011. Progress and promise of genome-wide association studies for human complex trait genetics. *Genetics*. 187(2):367–383.
- Sundqvist MK, Sanders NJ, Wardle DA. 2013. Community and Ecosystem Responses to Elevational Gradients: Processes, Mechanisms, and Insights for Global Change. *Annu Rev Ecol Evol Syst*. 44(1):261–280.
- Sutton M, Howard C, Erisman JW. 2011. The European Nitrogen Assessment: Sources, Effects and Policy Perspectives. In: [place unknown].
- Tahir ISA, Nakata N. 2005. Remobilization of Nitrogen and Carbohydrate from Stems of Bread Wheat in Response to Heat Stress during Grain Filling. *J Agron Crop Sci*. 191(2):106–115.
- Tang H, Krishnakumar V, Bidwell S, Rosen B, Chan A, Zhou S, Gentzbittel L, Childs KL, Yandell M, Gundlach H, et al. 2014. An improved genome release (version Mt4.0) for the model legume *Medicago truncatula*. *BMC Genomics*. 15(1):312.
- Tekrony DM, Bustamam T, Egli DB, Pfeiffer TW. 1987. Effects of Soybean Seed Size, Vigor, and Maturity on Crop Performance in Row and Hill Plots1. *Crop Science*. 27(5):1040.



- Thompson JD, Lavergne S, Affre L, Gaudeul M, Debussche M. 2005. Ecological differentiation of Mediterranean endemic plants. *Taxon*. 54(4):967–976.
- Thompson R, Burstin J, Gallardo K. 2009. Post-Genomics Studies of Developmental Processes in Legume Seeds. *Plant Physiol*. 151(3):1023.
- Thuillet A-C, Bataillon T, Poirier S, Santoni S, David JL. 2005. Estimation of Long-Term Effective Population Sizes Through the History of Durum Wheat Using Microsatellite Data. *Genetics*. 169(3):1589–1599.
- Tian Q, Chen F, Liu J, Zhang F, Mi G. 2008. Inhibition of maize root growth by high nitrate supply is correlated with reduced IAA levels in roots. *Journal of plant physiology*. 165(9):942–951.
- Tommasini L, Svensson JT, Rodriguez EM, Wahid A, Malatrasi M, Kato K, Wanamaker S, Resnik J, Close TJ. 2008. Dehydrin gene expression provides an indicator of low temperature and drought stress: transcriptome-based analysis of Barley (*Hordeum vulgare* L.). *Funct Integr Genomics*. 8(4):387–405.
- Trieu AT, Burleigh SH, Kardailsky IV, Maldonado-Mendoza IE, Versaw WK, Blaylock LA, Shin H, Chiou T-J, Katagi H, Dewbre GR, et al. 2000. Transformation of *Medicago truncatula* via infiltration of seedlings or flowering plants with *Agrobacterium*. *Plant J*. 22(6):531–541.
- Trieu AT, Harrison MJ. 1996. Rapid transformation of *Medicago truncatula*: regeneration via shoot organogenesis. *Plant Cell Reports*. 16(1–2):6–11.
- Trinh TH, Ratet P, Kondorosi E, Durand P, Kamaté K, Bauer P, Kondorosi A. 1998. Rapid and efficient transformation of diploid *Medicago truncatula* and *Medicago sativa* ssp. *falcata* lines improved in somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports*. 17(5):345–355.
- Tsukagoshi H, Busch W, Benfey PN. 2010. Transcriptional Regulation of ROS Controls Transition from Proliferation to Differentiation in the Root. *Cell*. 143(4):606–616.
- Tuck G, Glendinning MJ, Smith P, House JI, Wattenbach M. 2006. The potential distribution of bioenergy crops in Europe under present and future climate. *Biomass and Bioenergy*. 30(3):183–197.
- Vandecasteele C, Teulat-Merah B, Morère-Le Paven M-C, Leprince O, Ly Vu B, Viau L, Ledroit L, Pelletier S, Payet N, Sator P, et al. 2011. Quantitative trait loci analysis reveals a correlation between the ratio of sucrose/raffinose family oligosaccharides and seed vigour in *Medicago truncatula*: Sugar composition links with seed vigour of *M. truncatula*. *Plant, Cell & Environment*. 34(9):1473–1487.
- Verdier J, Lalanne D, Pelletier S, Torres-Jerez I, Righetti K, Bandyopadhyay K, Leprince O, Chatelain E, Vu BL, Gouzy J, et al. 2013. A Regulatory Network-Based Approach Dissects Late Maturation Processes Related to the Acquisition of Desiccation Tolerance and Longevity of *Medicago truncatula* Seeds. *Plant Physiol*. 163(2):757.
- Via S, Conner J. 1995. Evolution in heterogeneous environments: genetic variability within and across different grains in *Tribolium castaneum*. *Heredity*. 74(1):80–90.



- Vidal EA, Araus V, Lu C, Parry G, Green PJ, Coruzzi GM, Gutiérrez RA. 2010. Nitrate-responsive miR393/*AFB3* regulatory module controls root system architecture in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 107(9):4477.
- Vocanson A, Jeuffroy M-H. 2008. Agronomic Performance of Different Pea Cultivars Under Various Sowing Periods and Contrasting Soil Structures. *Agronomy Journal*. 100(3):748.
- Voisin A-S, Guéguen J, Huyghe C, Jeuffroy M-H, Magrini M-B, Meynard J-M, Mougel C, Pellerin S, Pelzer E. 2014. Legumes for feed, food, biomaterials and bioenergy in Europe: a review. *Agron Sustain Dev*. 34(2):361–380.
- 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(1):399–412.
- Voorrips RE. 2002. MapChart: Software for the Graphical Presentation of Linkage Maps and QTLs. *Journal of Heredity*. 93(1):77–78.
- Wallace JG, Bradbury PJ, Zhang N, Gibon Y, Stitt M, Buckler ES. 2014. Association Mapping across Numerous Traits Reveals Patterns of Functional Variation in Maize. Borevitz JO, editor. *PLoS Genetics*. 10(12):e1004845.
- Wang L, Liao S, Ruan Y-L. 2013. Cell wall invertase as a regulator in determining sequential development of endosperm and embryo through glucose signaling early in seed development. *null*. 8(1):e22722.
- Wang R, Xing X, Wang Y, Tran A, Crawford NM. 2009. A Genetic Screen for Nitrate Regulatory Mutants Captures the Nitrate Transporter Gene *NRT1.1*. *Plant Physiol*. 151(1):472–478.
- Wang T-Z, Tian Q-Y, Wang B-L, Zhao M-G, Zhang W-H. 2014. Genome variations account for different response to three mineral elements between *Medicago truncatula* ecotypes Jemalong A17 and R108. *BMC Plant Biology*. 14(1):122.
- Wang X, Li W, Li M, Welte R. 2006. Profiling lipid changes in plant response to low temperatures. *Physiologia Plantarum*. 126(1):90–96.
- Wang Z, Wang J, Bao Y, Wang F, Zhang H. 2010. Quantitative trait loci analysis for rice seed vigor during the germination stage. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*. 11(12):958–964.
- Weber H, Borisjuk L, Wobus U. 2005. Molecular physiology of legume seed development. *Annu Rev Plant Biol*. 56:253–279.
- Weigel D. 2012. Natural Variation in *Arabidopsis*: From Molecular Genetics to Ecological Genomics. *Plant Physiol*. 158(1):2–22.
- Weller JI, Wiggans GR, VanRaden PM, Ron M. Application of a canonical transformation to detection of quantitative trait loci with the aid of genetic markers in a multi-trait experiment. :5.



- Wu H, Wang S, Wei X, Mingxi J. 2019. Sensitivity of seed germination to temperature of a relict tree species from different origins along latitudinal and altitudinal gradients: implications for response to climate change. *Trees*.
- Wu Q, Chen F, Chen Y, Yuan L, Zhang F, Mi G. 2011. Root growth in response to nitrogen supply in Chinese maize hybrids released between 1973 and 2009. *Sci China Life Sci.* 54(7):642–650.
- Yadav SK. 2010. Cold stress tolerance mechanisms in plants. A review. *Agronomy for Sustainable Development.* 30(3):515–527.
- Yendrek CR, Lee Y-C, Morris V, Liang Y, Pislariu CI, Burkart G, Meckfessel MH, Salehin M, Kessler H, Wessler H, et al. 2010. A putative transporter is essential for integrating nutrient and hormone signaling with lateral root growth and nodule development in *Medicago truncatula*: Molecular characterization of the LATD/NIP gene. *The Plant Journal.* 62(1):100–112.
- Yoder JB, Stanton-Geddes J, Zhou P, Briskine R, Young ND, Tiffin P. 2014. Genomic Signature of Adaptation to Climate in *Medicago truncatula*. *Genetics.* 196(4):1263–1275.
- Young ND, Debelle F, Oldroyd GED, Geurts R, Cannon SB, Udvardi MK, Benedito VA, Mayer KFX, Gouzy J, Schoof H, et al. 2011. The *Medicago* genome provides insight into the evolution of rhizobial symbioses. *Nature.* 480(7378):520–524.
- Young ND, Udvardi M. 2009. Translating *Medicago truncatula* genomics to crop legumes. *Current Opinion in Plant Biology.* 12(2):193–201.
- Youssef C. Bases génétiques de la croissance hétérotrophe de l'hypocotyle en conditions optimales et sous stress abiotiques chez *Medicago truncatula*: contribution du nombre et de la longueur des cellules. :335.
- Youssef C, Aubry C, Montrichard F, Beucher D, Juchaux M, Ben C, Prospero J-M, Teulat B. 2016. Cell length instead of cell number becomes the predominant factor contributing to hypocotyl length genotypic differences under abiotic stress in *Medicago truncatula*. *Physiologia Plantarum.* 156(1):108–124.
- Yu J, Buckler ES. 2006. Genetic association mapping and genome organization of maize. *Current Opinion in Biotechnology.* 17(2):155–160.
- Yu P, White PJ, Hochholdinger F, Li C. 2014. Phenotypic plasticity of the maize root system in response to heterogeneous nitrogen availability. *Planta.* 240(4):667–678.
- Zang L, Morère-Le Paven M-C, Clochard T, Porcher A, Satour P, Mojović M, Vidović M, Limami AM, Montrichard F. 2020. Nitrate inhibits primary root growth by reducing accumulation of reactive oxygen species in the root tip in *Medicago truncatula*. *Plant Physiology and Biochemistry.* 146:363–373.
- Zhang C, Bousquet A, Harris JM. 2014. Abscisic Acid and LATERAL ROOT ORGAN DEFECTIVE/NUMEROUS INFECTIONS AND POLYPHENOLICS Modulate Root Elongation via Reactive Oxygen Species in *Medicago truncatula*. *PLANT PHYSIOLOGY.* 166(2):644–658.



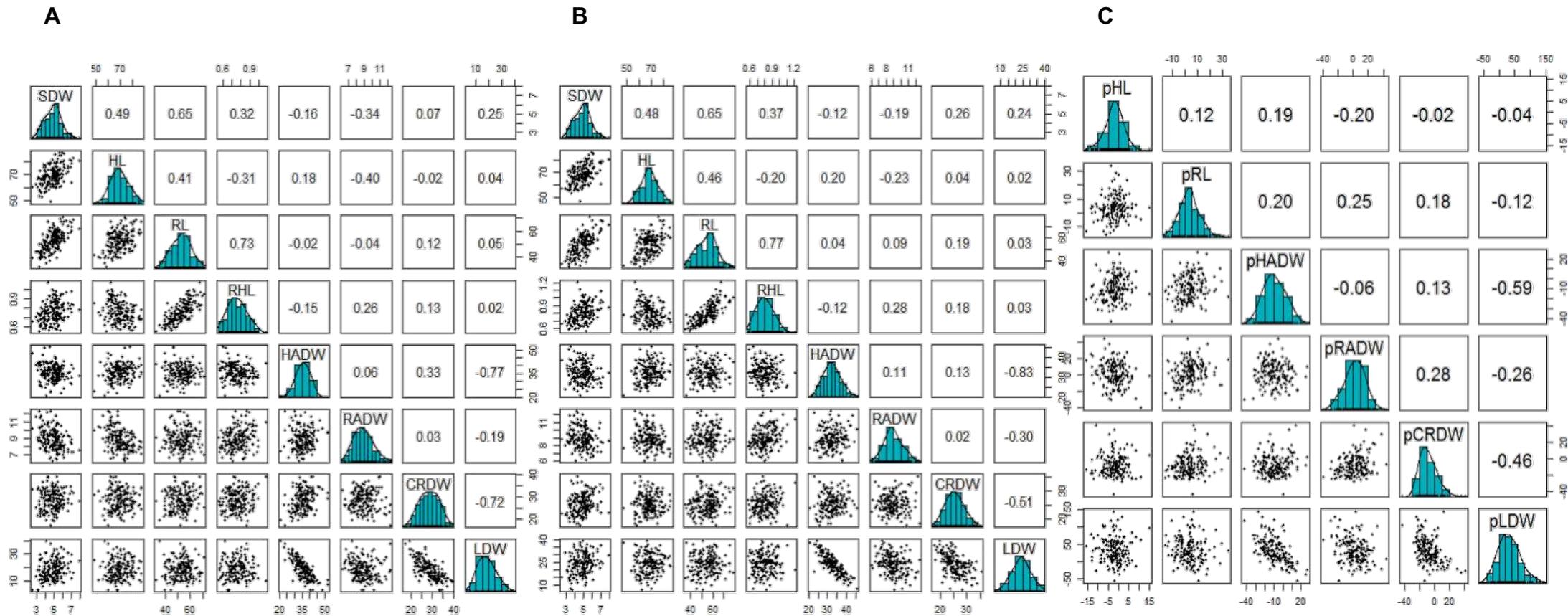
- Zhang H. 2000. Regulation of Arabidopsis root development by nitrate availability. *Journal of Experimental Botany*. 51(342):51–59.
- Zhang H, Jennings A, Barlow PW, Forde BG. 1999. Dual pathways for regulation of root branching by nitrate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 96(11):6529–6534.
- Zhang W, Gao X, Shi X, Zhu B, Wang Z, Gao H, Xu L, Zhang L, Li J, Chen Y. 2018. PCA-Based Multiple-Trait GWAS Analysis: A Powerful Model for Exploring Pleiotropy. *Animals*. 8(12):239.
- Zhang Z, Ersoz E, Lai C-Q, Todhunter RJ, Tiwari HK, Gore MA, Bradbury PJ, Yu J, Arnett DK, Ordovas JM, Buckler ES. 2010. Mixed linear model approach adapted for genome-wide association studies. *Nat Genet*. 42(4):355–360.
- Zhou X, Stephens M. 2012. Genome-wide efficient mixed-model analysis for association studies. *Nat Genet*. 44(7):821–824.
- Zhou X, Stephens M. 2014. Efficient multivariate linear mixed model algorithms for genome-wide association studies. *Nature Methods*. 11(4):407–409.
- Zhu C, Gore M, Buckler ES, Yu J. 2008. Status and Prospects of Association Mapping in Plants. *The Plant Genome Journal*. 1(1):5.



# Annexes

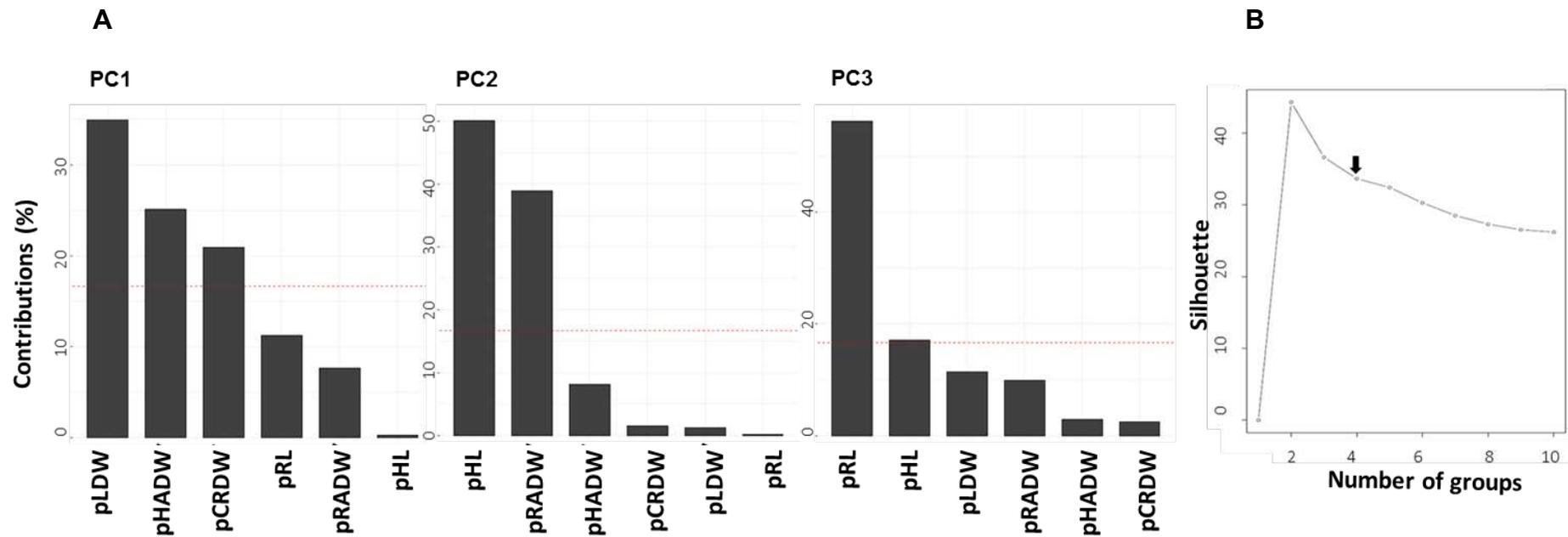
## Annexe I-1 : Tableaux et figures supplémentaires du chapitre I

**Fig. S1.** Trait distribution, scatterplots and Pearson correlation coefficients of pairs of traits determined in N+ (A) and N- (B) conditions, and pairs of plasticity indexes (pTraits) (C). The lower and upper diagonal panels of the pair plots show scatterplots and correlation coefficients, respectively. Histograms showing the frequency distribution of the traits are in the diagonal. SDW, seed dry weight; HL, hypocotyl length; RL, radicle length; RHL, ratio between radicle and hypocotyl lengths; HADW, dry weight allocated to hypocotyl; RADW, dry weight allocated to radicle; CRDW, cotyledon residual dry weight; LDW, lost dry weight. pHL, pRL, pCRDW, pHADW, pRADW, pLDW: plasticity indexes of hypocotyl length, radicle length, cotyledon residual dry weight, dry weight allocated to hypocotyl, dry weight allocated to radicle and lost dry weight, respectively.



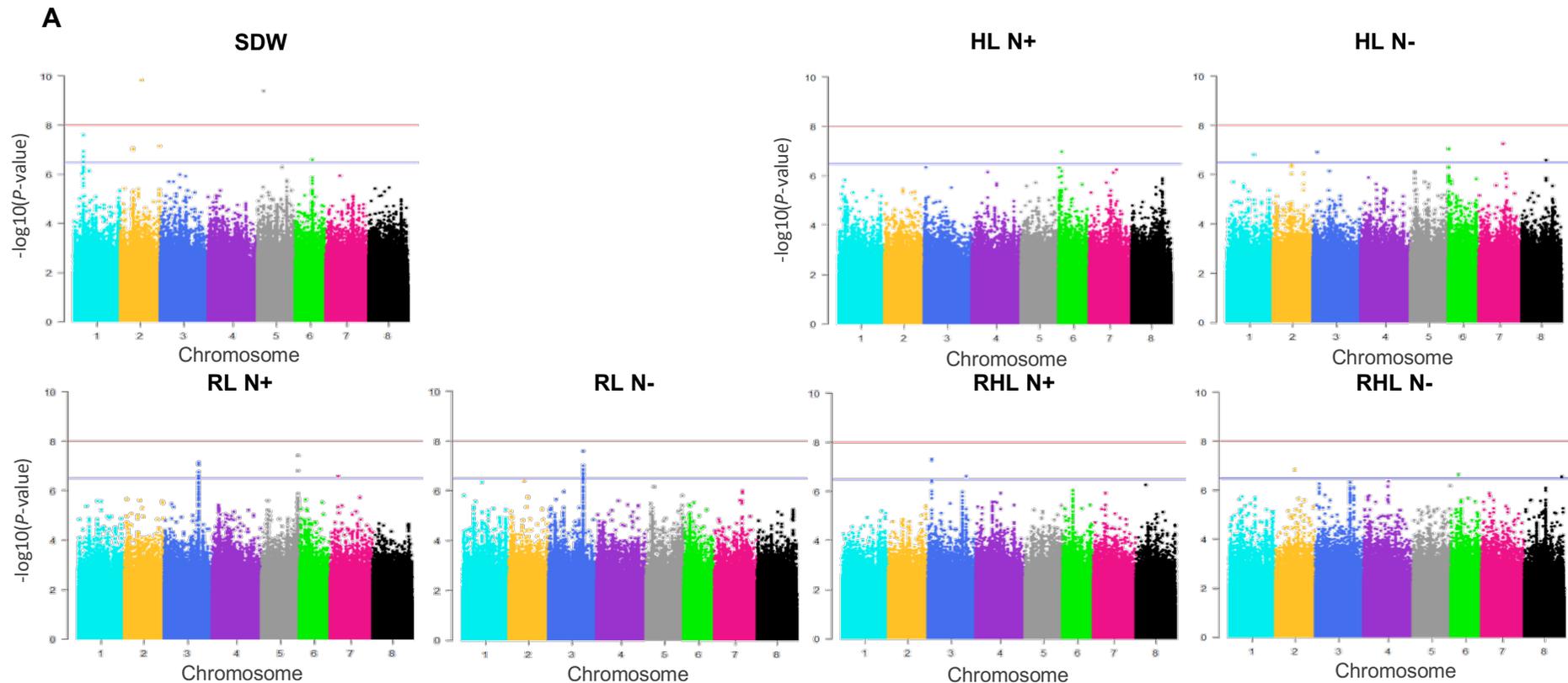


**Fig. S2.** Trait contribution to the three first dimensions of the PCA (A) and silhouette evolution plot of the Calinski-Harabasz criterion values according to the number of clusters used in k-mean accession classifications (B). For each principal component, the red dotted line on the graph shows the expected average contribution of all traits. Traits with a contribution larger than this cut-off are considered as important in contributing to the component. The black arrow shows the retained group number. The traits used for PCA are plasticity indexes (pTraits) representing the response of seedling elongation and seed biomass use related traits to the absence of nitrate during heterotrophic growth. pHL, pRL, pCRDW, pHADW, pRADW, pLDW: plasticity indexes of hypocotyl length, radicle length, cotyledon residual dry weight, dry weight allocated to hypocotyl, dry weight allocated to radicle and lost dry weight, respectively.

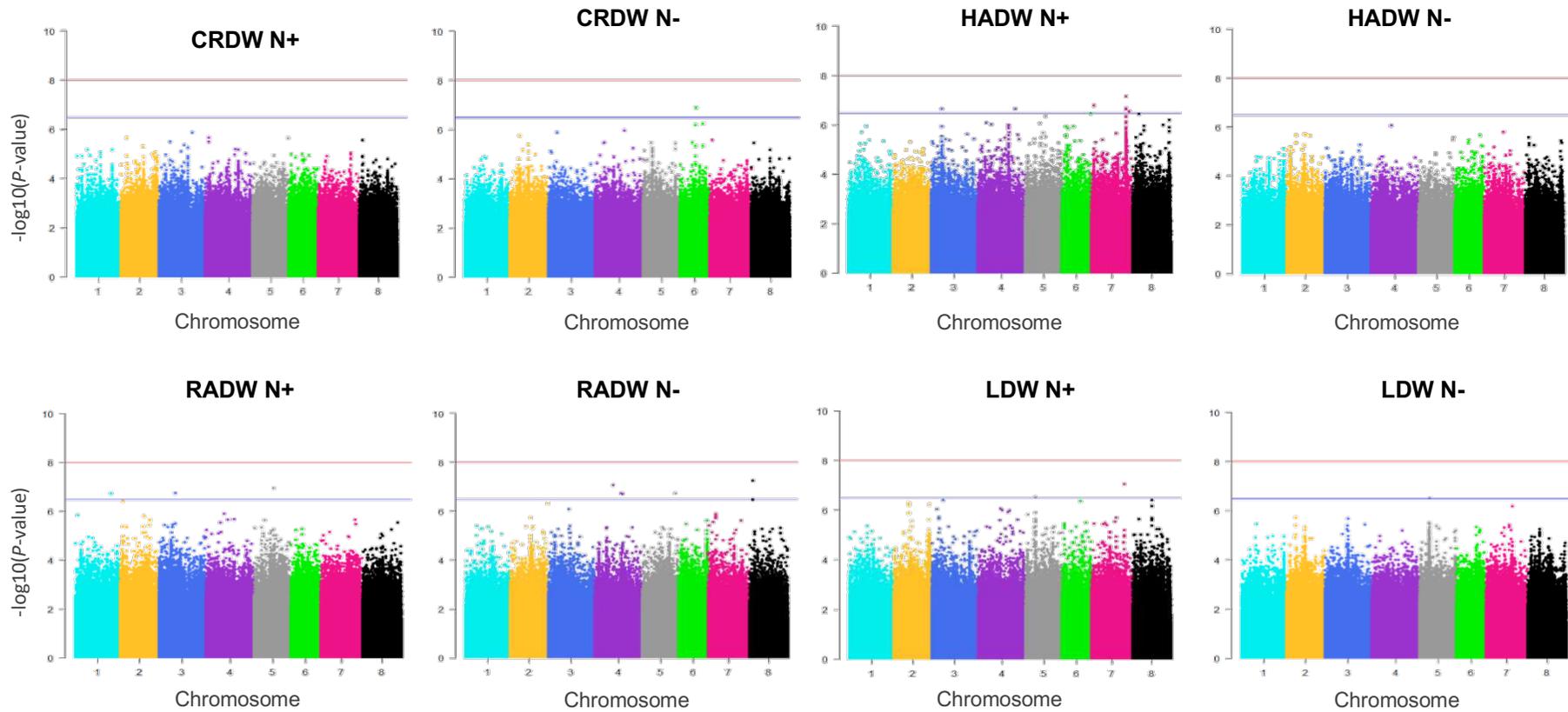




**Fig. S3.** Manhattan plots resulting from GWAS based on a single-locus mixed model for single traits determined in the presence (N+) and absence (N-) of nitrate (A), for plasticity indexes (pTraits) to the absence of nitrate (B), for combined-pTraits based on PCA (C), and graphs of partition of the variance explained (PVE) obtained for the QTNs revealed with the optimal model (D). On Manhattan plots, significant QTNs were upper to the red horizontal line at  $-\log_{10}(P\text{-value}) \geq 8.01$ , and additional SNPs at  $-\log_{10}(P\text{-value}) \geq 6.5$  were upper to the blue line. For each QTN, the model at the optimal model step (full black line on PVE graphs) estimated partition of the variance. Grey, part of the variance explained by the population structure; blue, by SNPs retained as cofactors (QTN) (SDW: 0.53; pRL: 0.28; pCRDW: 0.20; pRADW: 0.32); green: by relatedness; red: by residual variance. SDW, seed dry weight; HL, hypocotyl length; RL, radicle length; RHL, ratio between radicle and hypocotyl lengths; CRDW, cotyledon residual dry weight; HADW, dry weight allocated to hypocotyl; RADW, dry weight allocated to radicle; LDW, lost dry weight. pHL, pRL, pCRDW, pHADW, pRADW, pLDW: plasticity indexes of hypocotyl length, radicle length, cotyledon residual dry weight, dry weight allocated to hypocotyl, dry weight allocated to radicle and lost dry weight, respectively. Combined-pTraits PC1, PC2 and PC3, coordinates of accessions on principal components 1, 2 and 3 of the PCA (Fig. 2).

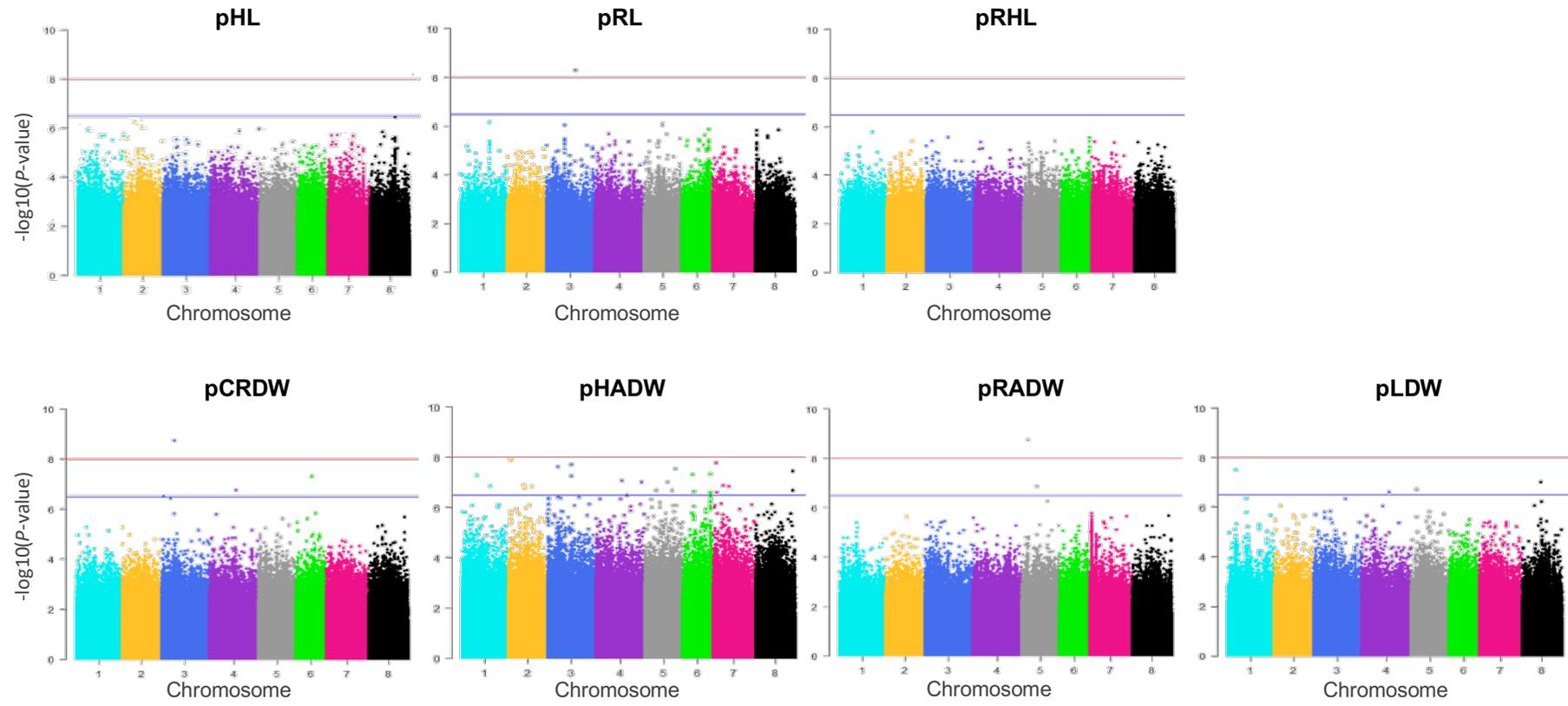




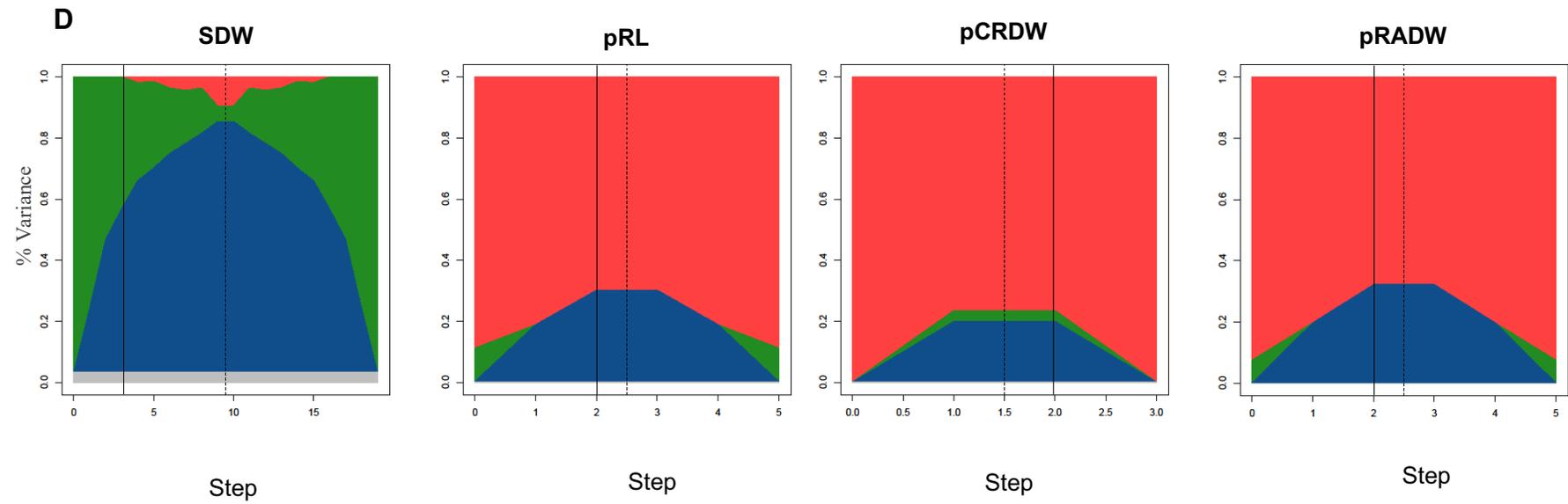
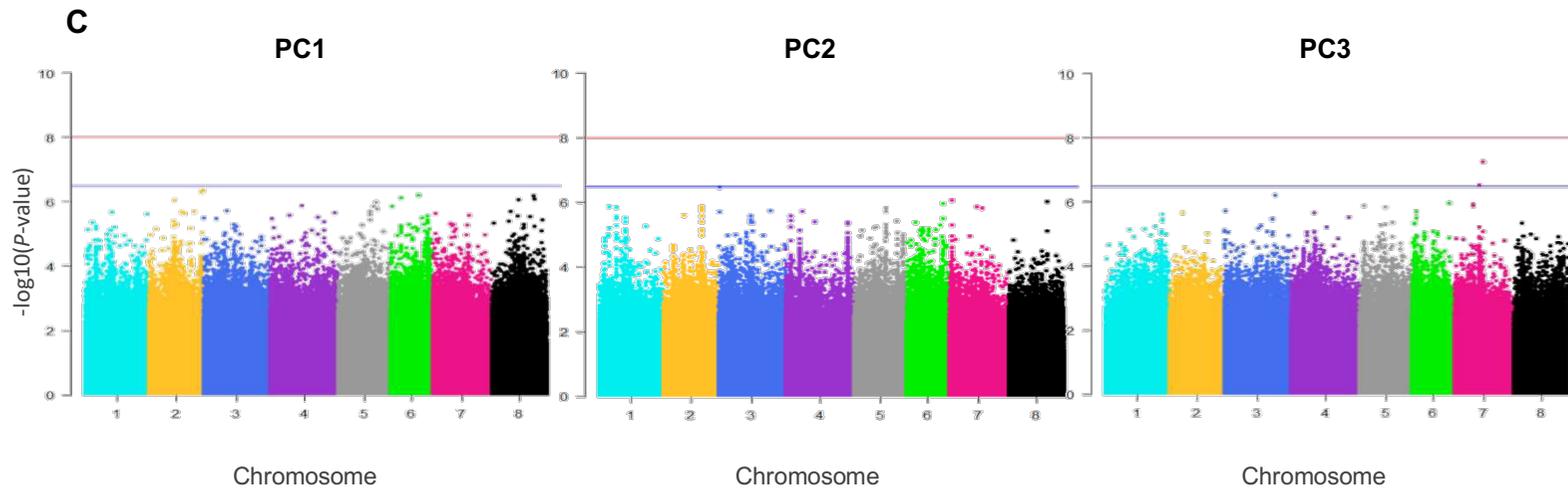




**B**

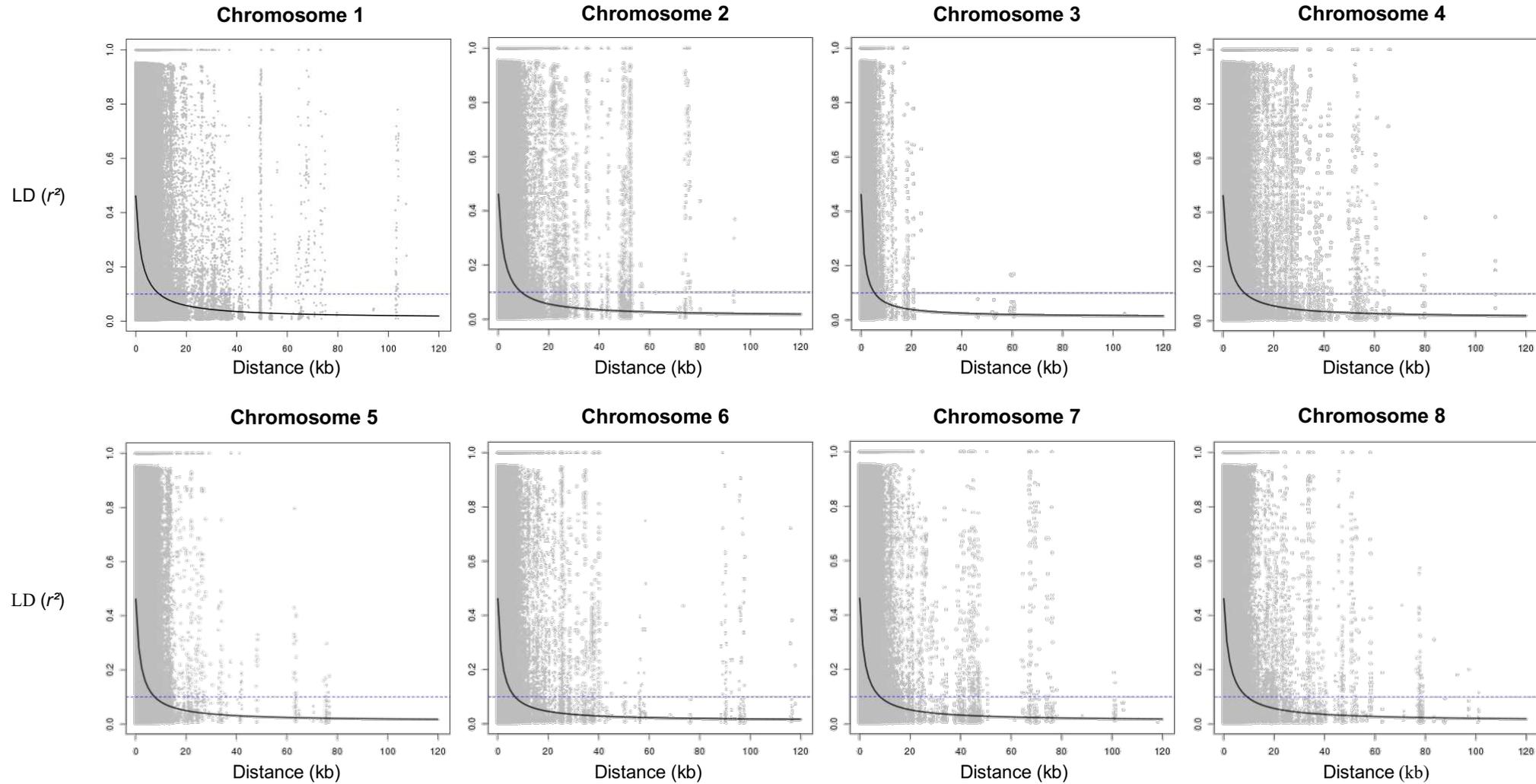








**Fig. S4.** Scatter plots showing the linkage disequilibrium (LD) decay over the chromosomes of *M. truncatula*. A pairwise LD between SNPs is assigned to 120 kb distance (grey) corresponding to sliding windows of 50 SNPs. Fitted trend line is a nonlinear regression curve of  $r^2$  on physical distance (black). LD decay is considered below  $r^2 = 0.1$  threshold (blue lines). LD decay of chromosome 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 was 9.3, 9.3, 5.3, 8.6, 7.49, 6.7, 7.9 and 9.3, respectively.





**Table S1.** *M. truncatula* accessions used in the study. The three first columns indicate the accessions used for ANOVA, PCA and GWAS analyses identified by their HapMap ID (<http://www.medicagohapmap.org>). The corresponding line number, accession label, core collection belonging, country of origin transmitted by Medicago Biological Resource Centre (INRAE Montpellier, France), as well as the assignation probability to 0 or 1 to genetic groups highlighted by Bonhomme et al. (2014) and Loridon et al. (2013), are shown in columns 4 to 8, respectively.

HapMap_id ANOVA	HapMap_id PCA	HapMap_id GWAS	Line number	Accession label	Core collection	Origin	Structure
HM141	HM141	HM141	L000044	SA09456	CC144	Tunisia	1
HM107	HM107	HM107	L000047	SA09670	CC96	Algeria	1
HM016	HM016	HM016	L000049	SA09707	CC16	Tunisia	1
HM073	HM073	HM073	L000052	SA09710	CC64	Tunisia	1
HM194	HM194	HM194	L000057	SA09700	CC192	Tunisia	1
HM106	HM106	HM106	L000060	SA09434	CC96	Tunisia	1
HM072	HM072	HM072	L000061	SA09357	CC64	Algeria	1
HM109	HM109	HM109	L000126	SA11959	CC96	Israel	1
HM075		HM075	L000130	SA12451	CC64	Italy	1
HM200	HM200	HM200	L000134	SA19998	CC192	Cyprus	1
HM045	HM045	HM045	L000144	SA14163	CC32	Jordan	1
HM145	HM145	HM145	L000146	SA19964	CC144	Turkey	1
HM199	HM199	HM199	L000147	SA19983	CC192	Cyprus	1
HM149	HM149	HM149	L000148	SA21819	CC144	Cyprus	1
HM010	HM010	HM010	L000154	SA24714	CC16	Italy	1
HM147	HM147	HM147	L000161	SA21362	CC144	Libya	1
HM148	HM148	HM148	L000162	SA21590	CC144	Libya	1
HM001	HM001	HM001	L000163	SA22322	CC8	Syria	1
HM151	HM151	HM151	L000165	SA25226	CC144	Italy	1
HM152	HM152	HM152	L000166	SA25654	CC144	Morocco	0
HM203	HM203	HM203	L000167	SA27176	CC192	Greece	1
HM153	HM153	HM153	L000168	SA25898	CC144	Italy	1
HM204	HM204		L000172	SA27185	CC192	Italy	
HM154	HM154	HM154	L000173	SA27778	CC144	Morocco	0
HM002	HM002	HM002	L000174	SA28064	CC8	Cyprus	1
HM112		HM112	L000178	SA28097	CC96	Cyprus	1
HM041	HM041	HM041	L000198	SA09048	CC32	Libya	1
HM099	HM099	HM099	L000202	SA02840	CC96	Cyprus	1
HM066	HM066	HM066	L000204	SA01489	CC64	Israel	1
HM196	HM196	HM196	L000207	SA09970	CC192	Tunisia	1
HM205	HM205	HM205	L000212	SA28375	CC192	Portugal	0
HM046	HM046	HM046	L000213	SA27882	CC32	Morocco	0
HM157	HM157	HM157	L000215	SA28099	CC144	Cyprus	1
HM155	HM155	HM155	L000216	SA27961	CC144	Morocco	0
HM156	HM156	HM156	L000217	SA28089	CC144	Cyprus	1
HM110	HM110		L000225	SA21560	CC96	Libya	
HM202	HM202	HM202	L000226	SA25941	CC192	Italy	1
HM078	HM078	HM078	L000228	SA27063	CC64	Greece	1
HM077	HM077	HM077	L000232	SA27062	CC64	Greece	1
HM201	HM201	HM201	L000233	SA24576	CC192	Morocco	0
HM076	HM076	HM076	L000234	SA23859	CC64	Tunisia	1
HM146	HM146	HM146	L000237	SA21302	CC144	Libya	1
HM150	HM150	HM150	L000238	SA22323	CC144	Syria	1
HM012	HM012	HM012	L000239	SA26063	CC16	Morocco	0
HM198	HM198	HM198	L000244	SA18543	CC192	Tunisia	1
HM044	HM044	HM044	L000245	SA14161	CC32	Jordan	1
HM197	HM197	HM197	L000246	SA12455	CC192	Italy	1
HM039	HM039	HM039	L000263	SA03116	CC32	Israel	1
HM067	HM067	HM067	L000265	SA01526	CC64	Algeria	0,99



HapMap_id ANOVA	HapMap_id PCA	HapMap_id GWAS	Line number	Accession label	Core collection	Origin	Structure
HM134	HM134	HM134	L000267	SA02084	CC144	Greece	1
HM136	HM136		L000270	SA02820	CC144	Turkey	
HM068	HM068	HM068	L000274	SA03648	CC64	Portugal	0
HM069	HM069	HM069	L000276	SA07749	CC64	Tunisia	1
HM191		HM191	L000277	SA03653	CC192	Portugal	1
HM192	HM192	HM192	L000280	SA07763	CC192	Tunisia	1
HM138	HM138	HM138	L000283	SA08454	CC144	Libya	1
HM140	HM140		L000286	SA09049	CC144	Libya	
HM042	HM042	HM042	L000290	SA09119	CC32	Turkey	1
HM105	HM105	HM105	L000293	SA09137	CC96	Algeria	1
HM071	HM071	HM071	L000297	SA08626	CC64	Morocco	0
HM103	HM103		L000302	SA04087	CC96	Tunisia	
HM104	HM104		L000303	SA08604	CC96	Algeria	
HM139	HM139	HM139	L000306	SA08623	CC144	Morocco	0
HM070	HM070	HM070	L000307	SA08625	CC64	Morocco	0
HM193	HM193	HM193	L000309	SA08638	CC192	Morocco	0
HM043	HM043	HM043	L000310	SA09944	CC32	Tunisia	1
HM195	HM195	HM195	L000313	SA09728	CC192	Tunisia	1
HM142	HM142		L000315	SA09820	CC144	Libya	
HM108	HM108	HM108	L000317	SA09715	CC96	Tunisia	1
HM040	HM040	HM040	L000321	SA03780	CC32	Italy	1
HM137	HM137		L000322	SA03749	CC144	Israel	
HM190	HM190	HM190	L000330	SA02806	CC192	Portugal	0
HM135	HM135	HM135	L000332	SA02748	CC144	Israel	1
HM036	HM036	HM036	L000337	GRC042-1	CC32	Greece	1
HM114	HM114	HM114	L000338	CRE009-A	CC144	Greece, Crete	1
HM160	HM160	HM160	L000340	CRE005-A	CC192	Greece, Crete	1
HM167	HM167	HM167	L000341	DZA242-A	CC192	Algeria	1
HM028	HM028	HM028	L000342	DZA241-2	RILParent/CC14 4	Algeria	1
HM166	HM166	HM166	L000343	DZA236-2	CC192	Algeria	1
HM165	HM165	HM165	L000344	DZA231-1	CC192	Algeria	1
HM164	HM164	HM164	L000350	DZA215-5	CC192	Algeria	0
HM083	HM083	HM083	L000354	DZA210-5	CC96	Algeria	0,5
HM082	HM082	HM082	L000355	DZA210-2	CC96	Algeria	0,5
HM081	HM081	HM081	L000356	DZA202-5	CC96	Algeria	0
HM051	HM051	HM051	L000357	DZA202-4	CC64	Algeria	0
HM163		HM163	L000358	DZA061-11	CC192	Algeria	1
HM049	HM049	HM049	L000360	DZA058-5	CC64	Algeria	1
HM079		HM079	L000362	DZA045-4c	CC96	Algeria	1
HM161		HM161	L000365	DZA033-2	CC192	Algeria	1
HM008	HM008	HM008	L000368	DZA012-J	CC8	Algeria	0,5
HM038	HM038	HM038	L000369	PRT180-A	CC32	Portugal	0
HM065	HM065	HM065	L000370	PRT179-J	CC64	Portugal	0
HM064	HM064	HM064	L000371	PRT178-D	CC64	Portugal	0
HM189	HM189	HM189	L000372	PRT177-C	CC192	Portugal	0
HM133		HM133	L000375	GRC098-A	CC144	Greece	1
HM132	HM132		L000376	GRC093-C	CC144	Greece	
HM062	HM062	HM062	L000379	GRC063-D	CC64	Greece	1
HM188	HM188	HM188	L000383	GRC040-1	CC192	Greece	1



HapMap_id ANOVA	HapMap_id PCA	HapMap_id GWAS	Line number	Accession label	Core collection	Origin	Structure
HM187	HM187	HM187	L000386	GRC033-C	CC192	Greece	1
HM186	HM186	HM186	L000387	GRC024-H	CC192	Greece	1
HM084	HM084	HM084	L000394	DZA243-6	CC96	Algeria	1
HM054	HM054	HM054	L000395	DZA309-A	CC64	Algeria	0
HM087	HM087	HM087	L000397	DZA323-1	CC96	Algeria	0
HM168	HM168	HM168	L000400	DZA323-3	CC192	Algeria	0
HM117	HM117	HM117	L000401	ESP031-A	CC144	Spain	0
HM169	HM169	HM169	L000404	ESP039-A	CC192	Spain	0
HM170	HM170	HM170	L000407	ESP042-B	CC192	Spain	0
HM171	HM171		L000409	ESP045-A	CC192	Spain	
HM118	HM118	HM118	L000410	ESP043-B	CC144	Spain	0
HM173	HM173	HM173	L000411	ESP048-F	CC192	Spain	0
HM172	HM172	HM172	L000412	ESP048-E	CC192	Spain	0
HM119	HM119	HM119	L000414	ESP050-B	CC144	Spain	0
HM056	HM056	HM056	L000416	ESP074-A	CC64	Spain	0
HM176	HM176	HM176	L000421	ESP098-C	CC192	Spain	0
HM177	HM177	HM177	L000425	ESP100-G	CC192	Spain	0
HM178	HM178	HM178	L000427	ESP103-B	CC192	Spain	0
HM121	HM121	HM121	L000430	ESP104-A	CC144	Spain	0
HM089	HM089	HM089	L000431	ESP155-A	CC96	Spain	0
HM090	HM090		L000437	ESP163-A	CC96	Spain	
HM179	HM179	HM179	L000438	ESP162-A	CC192	Spain	0
HM123	HM123		L000440	ESP163-B	CC144	Spain	
HM092	HM092	HM092	L000443	ESP174-A	CC96	Spain	0
HM093	HM093	HM093	L000444	ESP173-A	CC96	Spain	0
HM125	HM125	HM125	L000445	ESP175-A	CC144	Spain	0
HM181	HM181	HM181	L000448	ESP175-D	CC192	Spain	0
HM059	HM059	HM059	L000449	F11012-A	CC64	France	1
HM026	HM026	HM026	L000450	F11008-C	RILParent/CC96	France	1
HM182	HM182	HM182	L000451	F11013-A	CC192	France	1
HM127	HM127	HM127	L000455	F20025-F	CC144	France, Corsica	1
HM126	HM126	HM126	L000456	F20015-L	CC144	France, Corsica	1
HM095	HM095	HM095	L000458	F20025-4	CC96	France, Corsica	1
HM096	HM096	HM096	L000460	F20026-F	CC96	France, Corsica	1
HM184		HM184	L000463	F20058-B	CC192	France, Corsica	1
HM130	HM130	HM130	L000467	F20069-C	CC144	France, Corsica	1
HM129	HM129	HM129	L000468	F20069-A	CC144	France, Corsica	1
HM185	HM185	HM185	L000470	F20081-A	CC192	France, Corsica	1
HM048	HM048	HM048	L000475	DZA016-F	CC64	Algeria	1
HM050		HM050	L000477	DZA058-J	CC64	Algeria	1
HM120	HM120	HM120	L000482	ESP095-C	CC144	Spain	0
HM088	HM088	HM088	L000497	DZA323-D	CC96	Algeria	0
HM175	HM175	HM175	L000510	ESP098-B	CC192	Spain	0
HM057	HM057	HM057	L000512	ESP155-D	CC64	Spain	0
HM058	HM058	HM058	L000513	ESP163-E	CC64	Spain	0
HM180	HM180	HM180	L000514	ESP163-C	CC192	Spain	0
HM183	HM183	HM183	L000517	F20015-8	CC192	France, Corsica	1
HM060	HM060	HM060	L000520	F20015-10	CC64	France, Corsica	1
HM097	HM097	HM097	L000522	F83005-G	CC96	France	1



HapMap_id ANOVA	HapMap_id PCA	HapMap_id GWAS	Line number	Accession label	Core collection	Origin	Structure
HM098	HM098	HM098	L000523	PRT176-12	CC96	Portugal	1
HM063	HM063	HM063	L000525	PRT176-F	CC64	Portugal	0
HM115	HM115	HM115	L000529	Cyprus_C	CC144	Cyprus	1
HM006	HM006	HM006	L000530	F83005-5	RILParent/CC8	France	1
HM027	HM027	HM027	L000531	F83005-9	RILParent/CC144	France	1
HM113	HM113		L000537	CRE007-J	CC144	Greece, Crete	
HM162	HM162	HM162	L000538	DZA055-H	CC192	Algeria	1
HM014	HM014	HM014	L000542	DZA233-4	CC16	Algeria	1
HM011	HM011	HM011	L000543	DZA327-7	CC16	Algeria	0
HM003	HM003	HM003	L000544	ESP105-L	CC8	Spain	0
HM031	HM031	HM031	L000545	ESP158-A	CC32	Spain	0
HM122	HM122	HM122	L000546	Esp159-11	CC144	Spain	0
HM124	HM124	HM124	L000547	Esp165-D	CC144	Spain	0
HM091	HM091	HM091	L000548	ESP171-F	CC96	Spain	1
HM032	HM032	HM032	L000549	F11005-E	CC32	France	0
HM015	HM015	HM015	L000550	F11013-3	CC16	France	1
HM131	HM131	HM131	L000551	F34042-D	CC144	France	1
HM033	HM033	HM033	L000552	F20047-A	CC32	France, Corsica	1
HM034	HM034	HM034	L000554	F20089-B	CC32	France, Corsica	1
HM009		HM009	L000555	GRC020-B	CC16	Greece	1
HM037		HM037	L000557	GRC064-B	CC32	Greece	1
HM094	HM094		L000574	F13006-1	CC96	France	
HM053	HM053	HM053	L000601	DZA246-6	CC64	Algeria	1
HM174	HM174		L000610	ESP095-9	CC192	Spain	
HM080	HM080	HM080	L000637	DZA061-B3d	CC96	Algeria	1
HM052	HM052	HM052	L000639	DZA210-3	CC64	Algeria	0,5
HM061	HM061	HM061	L000645	GRC033-B2	CC64	Greece	1
HM013	HM013	HM013	L000648	Salses42B	CC16	France	0
HM158	HM158		L000649	Salse46B	CC144	France	
HM206	HM206	HM206	L000650	Salse57A	CC192	France	1
HM007	HM007	HM007	L000651	Salses71B	CC8	France	1
HM047	HM047	HM047	L000654	DZA014	CC64	Algeria	0,94
HM116	HM116		L000659	DZA211	CC144	Algeria	
HM085	HM085	HM085	L000673	DZA319	CC96	Algeria	0
HM086	HM086	HM086	L000674	DZA322--	CC96	Algeria	0
HM055	HM055	HM055	L000675	DZA326	CC64	Algeria	0
HM035	HM035	HM035	L000679	F66017	CC32	France	1
HM159	HM159	HM159	L000680	arboretu	CC192	France	1
HM004	HM004	HM004	L000736	DZA045-6	RILParent/CC8	Algeria	1



**Table S2.** Genes positioned in a covering distance of 20 kb surrounding the associations revealed. The traits concerned were single seedling elongation and biomass use related traits determined in the presence (N+) and the absence (N-) of nitrate, single plasticity indexes to the absence of nitrate (pTraits) and the combined-rTrait PC3 (Table 4). Genes were identified using the Mt4.0v2 annotation database ([www.medicagogenome.org](http://www.medicagogenome.org)). SDW, seed dry weight; HL, hypocotyl length; RL, radicle length; CRDW; cotyledon residual dry weight ;HADW, dry weight allocated to hypocotyl; RADW, dry weight allocated to radicle; LDW, lost dry weight; pRL, plasticity index of RL to the absence of nitrate; pCRDW, plasticity index cotyledon residual dry weight to the absence of nitrate; pRADW, plasticity index of RADW to the absence of nitrate; combined-pTrait PC3, accession coordinates on PC3 (Fig. I-2).

Traits	SNP	$-\log_{10}P$ -value	Genes	Function
SDW	chr1_10504462	7.61	Medtr1g030262	GDSL-like lipase/acylhydrolase
			Medtr1g030265	GDSL-like lipase/acylhydrolase
			Medtr1g030268	GDSL-like lipase/acylhydrolase
			Medtr1g030275	GDSL-like lipase/acylhydrolase
			Medtr1g030280	transmembrane protein, putative
			Medtr1g030290	long-chain fatty acyl CoA ligase, putative
	chr2_14661354	7.07	Medtr2g437370	CW-type zinc-finger protein
			Medtr2g437380	2OG-Fe(II) oxygenase family oxidoreductase
	chr2_24156155	9.85	Medtr2g058430	hypothetical protein
			Medtr2g058450	strictosidine synthase
			Medtr2g058460	hypothetical protein
			Medtr2g058470	chalcone and stilbene synthase family protein
	chr2_45074224	7.15	Medtr2g104620	hypothetical protein
			Medtr2g104610	3-isopropylmalate dehydrogenase
			Medtr2g104750	legume-specific protein, putative
			Medtr2g104600	zinc finger, C3HC4 type (RING finger) protein
			Medtr2g104590	helix loop helix DNA-binding domain protein
	chr5_7439421	9.41	Medtr5g019620	NAD(P)H:quinone oxidoreductase, type IV protein
			Medtr5g019630	dimerizations protein, putative
			Medtr5g019640	hypothetical protein
Medtr5g019650			homeobox leucine zipper protein	
chr6_19861282	6.6	Medtr6g055480	hypothetical protein	
		Medtr6g055485	hypothetical protein	
HL N+	chr6_3680493	6.98	Medtr6g012270	hypothetical protein
			Medtr6g012280	transcription factor HB29-like protein
	chr7_27874159	7.25	Medtr7g074570	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase
HL N-	chr7_27874159	7.25	Medtr7g074610	Serine/Threonine kinase family protein
			Medtr7g074570	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase
	chr6_778761	7.05	Medtr6g005470	NADP-dependent isocitrate dehydrogenase
			Medtr6g005480	plastid phosphate translocator
	chr3_5213763	6.91	Medtr3g018865	Nodule Cysteine-Rich (NCR) secreted peptide
	chr1_31059930	6.81	Medtr1g070325	hypothetical protein
			Medtr1g070330	inhibitor of trypsin and hageman factor-like protein
			Medtr1g070335	inhibitor of trypsin and hageman factor-like protein
	chr8_28383924	6.59	Medtr8g068110	rhamnogalacturonate lyase B-like protein
			Medtr8g068120	rhamnogalacturonate lyase B-like protein
RL N+	chr3_40147951	7.61	Medtr3g088440	NRAMP metal ion transporter 6
			Medtr3g088420	anthranilate N-hydroxycinnamoyl/benzoyltransferase, putative
			Medtr3g088410	ankyrin domain protein
			Medtr3g088250	hypothetical protein
			Medtr3g088400	hypothetical protein
			Medtr3g088390	hypothetical protein
			Medtr3g088380	replication factor C subunit 2
	chr5_42057552	7.42	Medtr5g096200	oligopeptide transporter OPT family protein
			Medtr5g096210	hypothetical protein
	chr7_9408292	6.59	Medtr7g028020	cytochrome P450 family flavone synthase
RL N-	chr3_40147951	7.61	Medtr3g088440	NRAMP metal ion transporter 6



Traits	SNP	$-\log_{10}P$ -value	Genes	Function
RHL N+	chr3_4207635	7.32	Medtr3g014660	LRP1 carboxy-terminal domain protein
			Medtr3g014680	transglutaminase family protein
	chr3_44571513	6.61	Medtr3g097220	magnesium transporter NIPA protein
			Medtr3g097240	DUF668 family protein
RHL N-	chr6_8869416	6.64	Medtr3g097250	GTP-binding elongation factor Tu family protein
			Medtr6g025490	hypothetical protein
			Medtr6g025480	late nodulin
			Medtr6g025470	ATP synthase subunit A
CRDW N-	chr6_18714149	6.89	Medtr6g025460	late nodulin
			Medtr6g453200	Nodule Cysteine-Rich (NCR) secreted peptide
			Medtr6g453210	hypothetical protein
HADW N+	chr6_18714149	6.89	Medtr6g453220	cytochrome P450 family protein
			Medtr3g437980	hypothetical protein
	chr3_12972406	6.64	Medtr3g437990	ABC transporter A family protein
			Medtr4g108080	ubiquitin-conjugating enzyme
			Medtr4g108100	hypothetical protein
	chr4_44804359	6.66	Medtr4g108110	hypothetical protein
			Medtr7g011120	ANAC079/ANAC080/ATNAC4 protein
			Medtr7g011130	ANAC079/ANAC080/ATNAC4 protein
chr7_2924502	6.79	Medtr7g011133	transmembrane protein, putative	
		chr7_41494823	7.16	Medtr7g102430
RADW N+	chr3_19634490	6.75	Medtr7g102430	HEAT repeat 7A-like protein
			Medtr3g049850	LCR related
	chr5_22957953	6.95	Medtr3g049870	hypothetical protein
			Medtr5g055770	hypothetical protein
RADW N-	chr4_21737506	7.07	Medtr5g055800	2OG-Fe(II) oxygenase family oxidoreductase
			Medtr4g058950	CASP-like protein
	chr4_31619754	6.72	Medtr4g058970	class III homeodomain leucine zipper protein
			Medtr4g081480	organic cation/carnitine transporter, putative
			Medtr4g081490	organic cation/carnitine transporter-like protein
			Medtr4g081500	hypothetical protein
			Medtr4g081510	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motif) family protein
	chr4_33187990	6.71	Medtr4g081520	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motif) family protein
			Medtr4g084970	transmembrane protein, putative
			Medtr4g084980	hypothetical protein
			Medtr4g084990	U1 small nuclear ribonucleoprotein
	chr5_39840103	6.73	Medtr4g085000	U1 small nuclear ribonucleoprotein
			Medtr5g091380	receptor-like kinase plant
			Medtr5g091390	WRKY family transcription factor
	chr8_3679902	7.27	Medtr5g091410	hypothetical protein
			Medtr8g012600	ER lumen protein retaining receptor-like protein
Medtr8g012605			ER lumen protein retaining receptor-like protein	
Medtr8g012610			ER lumen protein retaining receptor-like protein	
Medtr8g012615			ER lumen protein retaining receptor-like protein	
Medtr8g012620	ninja-family protein AFP1			



Traits	SNP	$-\log_{10}P\text{-value}$	Genes	Function
LDW N+	chr5_12110949	6.53	Medtr5g028960	GDP dissociation inhibitor
			Medtr5g028970	hypothetical protein
	chr7_38832028	7.05	Medtr7g096750	AP2 domain class transcription factor
			Medtr7g096760	hypothetical protein
			Medtr7g096770	hypothetical protein
			Medtr7g096780	ethylene-responsive transcription factor 1B
Medtr7g096810	ethylene response factor			
LDW N-	chr5_11955271	6.53	Medtr5g028560	transmembrane protein, putative
			Medtr5g028590	MFS transporter
pRL	chr3_33568974	8.31	Medtr3g074270	sugar porter (SP) family MFS transporter
			Medtr3g074280	hypothetical protein
			Medtr3g074290	hypothetical protein
pCRDW	chr3_15207285	8.74		
	chr4_30980383	6.77	Medtr4g080020	F-box protein MAX2
			Medtr4g080030	MAP kinase kinase kinase-like protein
chr6_18403820	7.32			
pHADW	chr2_3231800	7.93	Medtr2g012650	U3 small nucleolar RNA-associated-like protein
			Medtr2g012670	strubbelig receptor family 3 protein
	chr3_27292393	7.25	Medtr3g466410	endo/excinuclease amino terminal domain protein
			Medtr3g466430	hypothetical protein
			Medtr3g466440	GTP-binding protein EngB, putative
			Medtr3g466460	hypothetical protein
	chr5_32077987	6.69	Medtr5g075440	UDP-glucosyltransferase family protein
			Medtr5g075450	cytochrome P450 family cinnamate 4-hydroxylase
chr6_32285565	7.34	Medtr6g486155	hypothetical protein	
pLDW	chr1_8632060	7.51	Medtr1g026490	fanconi anemia group J-like protein
			Medtr1g026510	phloem protein 2-B5
PC3	chr7_20375462	6.53	Medtr7g056727	hypothetical protein
			Medtr7g056730	hypothetical protein
			Medtr7g056737	F-box protein interaction domain protein
	chr7_23831505	7.25	Medtr7g065590	glutathione S-transferase
			Medtr7g065600	glutathione S-transferase, amine-terminal domain protein
			Medtr7g065610	hypothetical protein
			Medtr7g065615	hypothetical protein
			Medtr7g065635	Nodule Cysteine-Rich (NCR) secreted peptide
			Medtr7g065630	glutathione S-transferase
			Medtr7g065640	glutathione S-transferase, amine-terminal domain protein

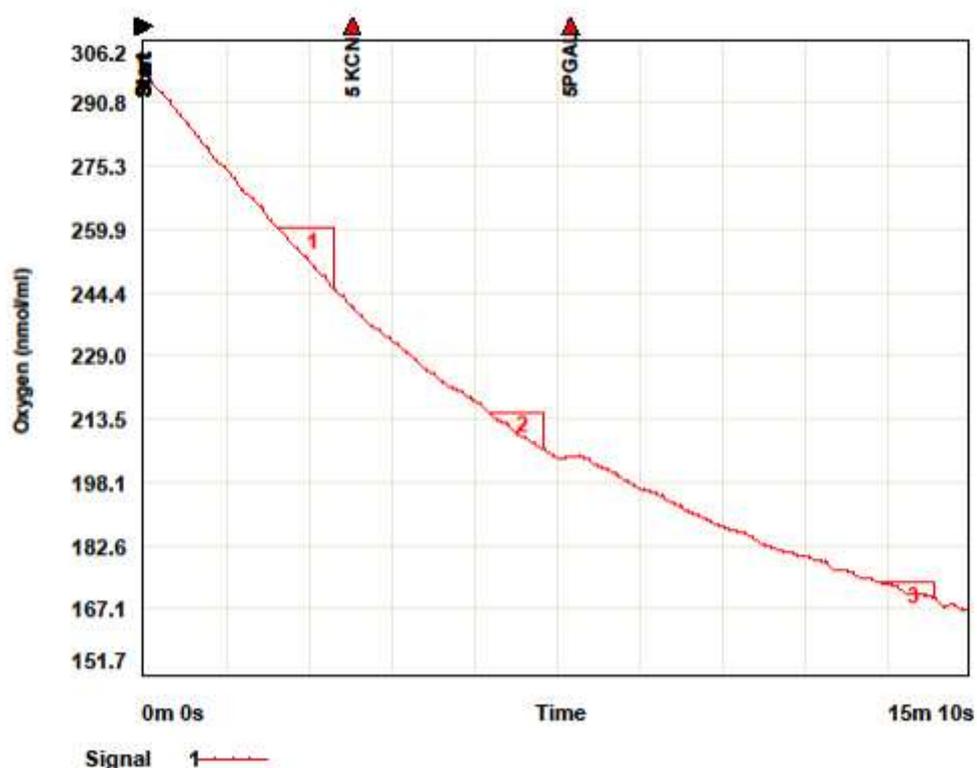


**Annexe I-2** : Liste des gènes orthologues chez *A. thaliana* du cluster de gène de transporteur de sucres identifiés pour *M. truncatula*. <sup>1</sup>Identifiant le cluster de gènes de transporteur de sucres (sauf : Medtr3g074350) de *M. truncatula* autour du SNP « chr3\_33568974 » identifié comme associés au caractère « rRL » à 17 °C. <sup>2</sup>Reference des deux Sequence chez NCBI pour l'espèce *A. thaliana* qui partagent le plus d'homologie avec les gènes de *M. truncatula*. La recherché d'homologie a été réalisé par l'outil BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) sur la base de données NCBI (National Center for Biotechnology Information). <sup>3</sup>E-value: la valeur-E attendue, plus cette valeur est faible, plus la correspondance est significative. <sup>4</sup>P.I: le pourcentage d'identité de similitude, plus ce pourcentage d'identité est élevé, plus la correspondance est importante.

ID <sup>1</sup>	Reference <sup>2</sup>	Fonction	E-value <sup>3</sup>	Ident. <sup>4</sup>
<i>Medtr3g074270</i>	NP_001320789.1	Protein De La Superfamille Majeure Des Facilitateurs (MSF)	0,00E+00	58%
	NP_198006.1	Protein De La Superfamille Majeure Des Facilitateurs (MSF)	4,00E-176	49%
<i>Medtr3g074310</i>	NP_174718.1	Protein De La Superfamille Majeure Des Facilitateurs (MSF)	3,00E-60	65%
	AAM67326.1	Transporteur De Glucose	3,00E-47	53%
<i>Medtr3g074320</i>	NP_001320789.1	Protein De La Superfamille Majeure Des Facilitateurs (MSF)	2,00E-133	60%
	NP_001323384.1	Transporteur De Sucre	2,00E-107	49%
<i>Medtr3g074330</i>	NP_174718.1	Protein De La Superfamille Majeure Des Facilitateurs (MSF)	7,00E-61	65%
	CAA39037.1	Transporteur De Glucose	6,00E-48	54%
<i>Medtr3g074340</i>	NP_001320789.1	Protein De La Superfamille Majeure Des Facilitateurs (MSF)	2,00E-133	60%
	6H7D_A	Transporteur De Sucre	4,00E-110	48%
<i>Medtr3g074360</i>	NP_174718.1	Protein De La Superfamille Majeure Des Facilitateurs (MSF)	7,00E-61	65%
	CAA39037.1	Transporteur De Glucose	6,00E-48	54%
<i>Medtr3g074370</i>	NP_001320789.1	Protein De La Superfamille Majeure Des Facilitateurs (MSF)	1,00E-133	60%
	6H7D_A	Transporteur De Sucre	2,00E-109	48%
<i>Medtr3g074380</i>	NP_174718.1	Protein De La Superfamille Majeure Des Facilitateurs (MSF)	4,00E-152	60%
	AAM67326.1	Transporteur De Glucose	4,00E-131	54
<i>Medtr3g074390</i>	NP_174718.1	Protein De La Superfamille Majeure Des Facilitateurs (MSF)	0,00E+00	60%
	CAA39037.1	Transporteur De Glucose	0,00E+00	54%
<i>Medtr3g074400</i>	NP_001320789.1	Protein De La Superfamille Majeure Des Facilitateurs (MSF)	2,00E-122	45%
	NP_172592.1	Transporteur De Sucre	1,00E-91	40%
<i>Medtr3g074410</i>	NP_174718.1	Protein De La Superfamille Majeure Des Facilitateurs (MSF)	0,00E+00	59%
	AAM67326.1	Transporteur De Glucose	0,00E+00	53%



**Annexe II-1** : Exemple de traçage oxygraphique pour un échantillon de cotylédons 145 heures après le transfert des plantules en milieu nutritif avec apport de nitrate. La valeur de la pente 1 est utilisée pour le calcul de la respiration, et les pentes 2 et 3, pour le calcul de la respiration en présence de KCN (cyanure de Potassium) et KCN + PGAL (Propigalat). La valeur de la pente 1 correspondant à la respiration des cotylédons, cumulée à la valeur de celles de l'hypocotyle et de la radicule, a permis d'estimer la capacité respiratoire de la plantule (n= 3 répétitions biologiques x 5 plantules).



#### Event Markers

Label	Trace	Type	Comment
Start	All	Restart	Started at:17:00:03
5 KCN	1	Up Arrow	
5PGAL	1	Up Arrow	
Stop	All	Pause	Stopped at:17:18:06



**Annexe II-2 :** Corrélations phénotypiques entre les caractéristiques potentiellement explicatives de la croissance hétérotrophe et les caractères liés à l'allongement des plantules et à l'utilisation de la biomasse de la graine (A) en présence (N+), (B) en absence de nitrate (N-) et (C) aux indices de réponse à l'absence de nitrate (rTraits). Les demi-matrices supérieures et inférieures correspondent respectivement aux valeurs de corrélation à température optimale (17 °C) et au froid (10 °C). Seules des corrélations significatives modérées à fortes sont indiquées avec  $p < 0,001$  (\*\*\*) et  $r \leq -0,3$  et  $r \geq 0,30$ ,  $n = 185$  accessions. Les caractères sont : longueur de l'hypocotyle (HL) et de la radicule (RL) ; pourcentage de biomasse résiduelle dans les cotylédons (CRM), allouée à l'hypocotyle (HAM), allouée à la radicule (RAM) et perdue (LM) en % ; indice de réponse à l'absence de nitrate de la longueur de l'hypocotyle (HL) et de la longueur de la radicule (RL), de la biomasse résiduelle dans les cotylédons (rCRM), de la biomasse allouée à l'hypocotyle (rHAM), de la biomasse allouée à la radicule (rRAM), de la biomasse perdue (rLM) ; pourcentage en azote (%N) et carbone (%C) dans la graine en %, masse de la graine en mg (SM), quantité d'azote ( $N_{mg}$ ) et de carbone ( $C_{mg}$ ) en mg; delta  $^{15}N$  dans les graines ( $\delta^{15}N$ ); composition en anions inorganiques de l'axe embryonnaire à la fin de la croissance hétérotrophe en présence de nitrate 5 mM (N+) : pourcentage en anions nitrate  $NO_3^-$  ( $N_h$ ), chlorure  $Cl^-$  ( $C_h$ ), phosphate  $PO_4^{3-}$  ( $P_h$ ) dans l'hypocotyle et pourcentage en anions nitrate  $NO_3^-$  ( $N_r$ ), chlorure  $Cl^-$  ( $C_r$ ), phosphate  $PO_4^{3-}$  ( $P_r$ ) dans la radicule.

A		Indice de corrélation de Pearson (r) des caractères à 17 °C N+																
		SM	$\delta^{15}N$	%N	%C	Cr	Nr	Pr	$C_h$	$N_h$	$P_h$	HAM	RAM	CRM	LM	HL	RL	RHL
Indice de corrélation de Pearson (r) des caractères à 10 °C	SM												-0,34***			0,49***	0,65***	0,32***
	$\delta^{15}N$																	
	%N																	
	%C																	
	Cr												0,37***					
	Nr																	
	Pr																	
	$C_h$																	
	$N_h$																	
	$P_h$																	
	HAM																	
	RAM																	
	CRM																	
	LM																	
	HL																	
	RL																	
RHL																		

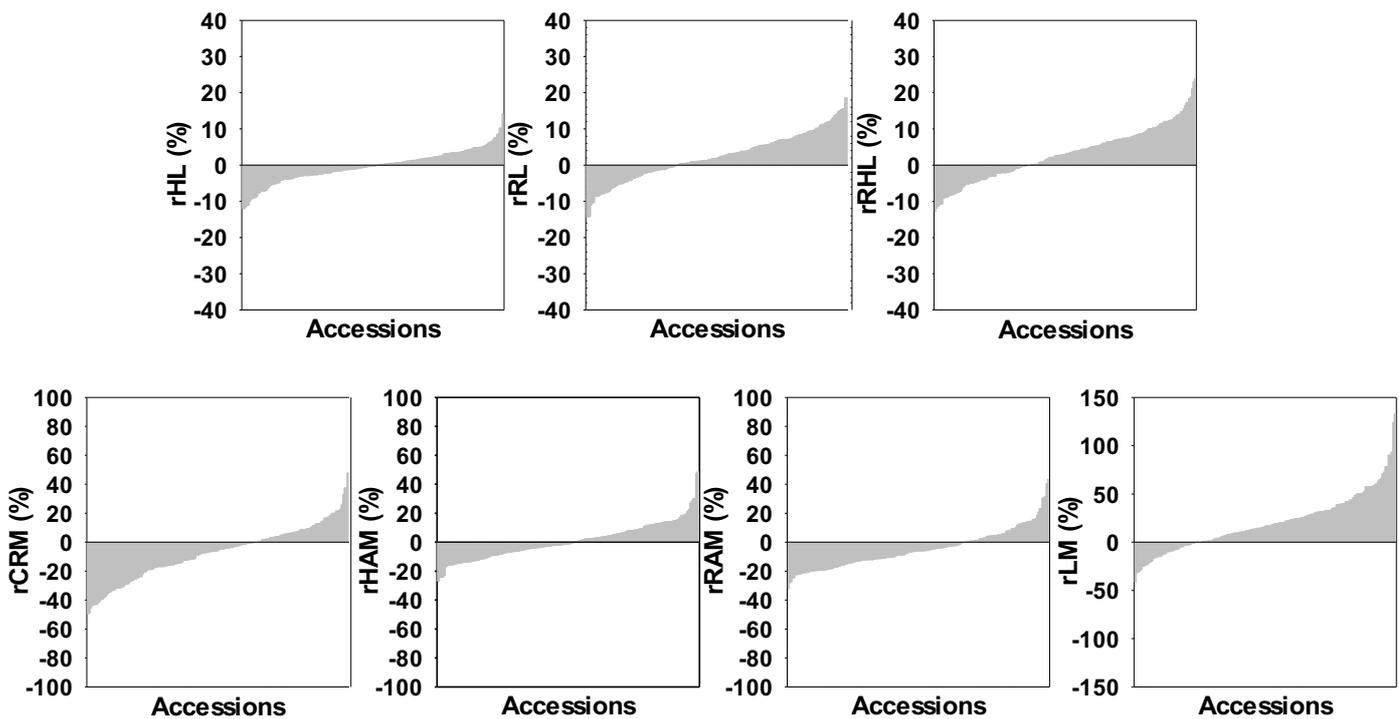


B		Indice de corrélation de Pearson (r) des caractères à 17 °C N-										
		SM	$\delta^{15}\text{N}$	%N	%C	HAM	RAM	CRM	LM	HL	RL	RHL
Indice de corrélation de Pearson (r) des caractères à 10 °C N-	SM									0,48***	0,65***	0,37***
	$\delta^{15}\text{N}$											
	%N											
	%C											
	HAM								-0,83***			
	RAM								-0,33***			
	CRM								-0,51***			
	LM					-0,63***	-0,32***	-0,67***				
	HL	0,48***					-0,32***				0,46***	
	RL	0,66***								0,34***		0,77***
	RHL	0,31***					0,47***			-0,35***	0,75***	

C		Indice de corrélation de Pearson (r) des rTraits 17 °C										
		SM	$\delta^{15}\text{N}$	%N	%C	rHAM	rRAM	rCRM	rLM	rHL	rRL	rRHL
Indice de corrélation de Pearson (r) des rTraits 10 °C	SM											
	$\delta^{15}\text{N}$											
	%N											
	%C											
	rHAM								-0,58***			
	rRAM											0,34***
	rCRM								-0,48***			
	rLM					-0,44***			-0,49***			
	rHL											-0,41***
	rRL											0,79***
	rRHL									-0,38***	0,75***	



**Annexe III-1** : Variation naturelle de l'allongement des plantules et des caractères liés à l'utilisation de la biomasse de la graine en réponse à l'apport de nitrate à la fin de la croissance hétérotrophe au froid (10 °C). Les indices de plasticité de réponse (rTraits) à l'absence de nitrate concernent la longueur de l'hypocotyle (rHL), la longueur de la radicule (rRL), le ratio des longueurs radicule/hypocotyle (rRHL), la biomasse résiduelle dans les cotylédons (rCRM), la biomasse allouée à l'hypocotyle (rHAM), la biomasse allouée à la radicule (rRAM) et la biomasse perdue (rLM). Les barres verticales dans les histogrammes désignent le comportement de chaque accession de la CC192. Pour les caractères d'allongement, n = 15 à 20 organes, pour les caractères liés à l'utilisation de la biomasse de la graine (n = 2 x 7 à 10 organes regroupés).





**Annexe IV-1** : Comparaison de la liste des SNPs identifiés pour les caractères déterminant la longueur des plantules en hétérotrophie entre le lot de graines I (2013) et le lot de graines II (2014). Les SNPs ont été révélés par l'analyse MLMM à l'aide de 175 accessions en tenant compte de la structuration et de l'apparentement comme co-variables. <sup>1</sup>Identifiant des SNPs dans la version Mt4.0 du génome (basé sur le numéro du chromosome et leurs positions chromosomiques en paires de bases). <sup>2</sup>-log<sub>10</sub> (valeur-P) au seuil supérieur à 5,5. Les caractères représentant des signaux d'associations significatifs sont la longueur de l'hypocotyle (HL), la longueur de la radicule (RL), le ratio des longueurs radicule/hypocotyle (RHL).

Caractères (Lot I)	ID <sup>1</sup>	-log <sub>10</sub> (P) <sup>2</sup>	Caractères (Lot II)	ID <sup>1</sup>	-log <sub>10</sub> (P) <sup>2</sup>
HL N+ 17 °C	chr1_7216961	5,99	HL N+ 17 °C	chr1_7216961	5,83
HL N- 10 °C	chr1_49726604	7,22	HL N- 10 °C	chr1_49726604	5,89
HL N- 10 °C	chr2_21487165	6,84	HL N- 17 °C	chr2_21487165	6,02
HL N+ 10 °C	chr2_21487165	6,48	RL N- 17 °C	chr2_22580394	5,75
HL N+ 17 °C	chr2_21487165	6,37			
RL N- 17 °C	chr2_22580394	5,66			
HL N+ 10 °C	chr2_41977869	5,50	HL N- 10 °C	chr2_41977869	7,01
HL N+ 17 °C	chr2_41977869	6,26	HL N+ 10 °C	chr2_41977869	5,53
RHL N- 10 °C	chr3_4525534	5,96	RHL N- 10 °C	chr3_4207723	5,99
			RHL N+ 17 °C	chr3_4207635	7,32
			RHL N- 17 °C	chr3_4207723	6,28
			RHL N+ 10 °C	chr3_4207723	6,87
HL N+ 17 °C	chr3_5213763	5,81	HL N- 17 °C	chr3_5213763	6,91
RHL N- 10 °C	chr3_36002776	5,66	RHL N- 10 °C	chr3_35761117	5,86
HL N+ 10 °C	chr3_36813384	5,81			
HL N- 10 °C	chr4_48479893	7,36	HL N- 10 °C	chr4_48483715	5,53
HL N+ 17 °C	chr4_48479893	5,60			
HL N- 17 °C	chr4_48483715	6,03			
HL N+ 10 °C	chr4_48486859	6,04			
RHL N- 17 °C	chr5_20523272	5,71	RHL N+ 10 °C	chr5_20523272	5,75
			RHL N- 10 °C	chr5_20523272	6,01
			RL N- 10 °C	chr5_20523272	5,65
			RL N+ 10 °C	chr5_20523272	5,93
RL N- 17 °C	chr6_7470057	6,23	RL N- 10 °C	chr6_6820933	5,77
RL N+ 10 °C	chr6_7470057	6,45	RL N+ 10 °C	chr6_7469885	5,51
RHL N+ 17 °C	chr6_7470057	6,53	RL N+ 17 °C	chr6_7060490	5,64
RHL N- 17 °C	chr6_7470057	7,69			
RHL N+ 10 °C	chr6_7470057	5,81			
HL N+ 17 °C	chr6_11577029	5,69	RHL N+ 17 °C	chr6_11782442	6,04
RHL N- 10 °C	chr6_11777214	6,57	RL N- 17 °C	chr6_11931082	5,51
RHL N+ 17 °C	chr6_11779747	6,07	RHL N- 17 °C	chr6_11782724	5,58
RHL N+ 10 °C	chr6_29368458	5,68	RHL N+ 10 °C	chr6_29368458	7,49
RHL N- 17 °C	chr6_29368927	6,29	RHL N- 10 °C	chr6_29368458	6,33
HL N+ 10 °C	chr6_29410521	5,73			
HL N- 17 °C	chr6_32825447	5,60	HL N- 17 °C	chr6_32575234	5,84
HL N+ 17 °C	chr6_32825447	5,63			
RL N- 10 °C	chr6_32934944	5,94			
HL N- 10 °C	chr7_10707532	6,98	HL N- 10 °C	chr7_10705593	5,83
HL N+ 10 °C	chr7_11762818	5,89	HL N+ 10 °C	chr7_10704543	5,84
HL N+ 17 °C	chr7_11762818	5,56			



**Annexe IV-2** : analyse de corrélation entre les composantes principales PC1 et PC3 et les caractères (SM : masse de la graine; HL : longueur de l'hypocotyle) projetés sur l'ACP Figure IV-2. <sup>a</sup>Temp: températures utilisées pour la croissance hétérotrophe; 17 °C (température de contrôle) et 10 °C (froid), <sup>b</sup>NC : conditions d'apport en nitrate : N- (absence); N+ (5 mM de nitrate), <sup>c</sup>r : coefficient de corrélation de Pearson. Seuil de significativité.

Caractères	<sup>a</sup> Temp.	<sup>b</sup> NC.	<b>r</b>	
			<b>PC1</b>	<b>PC3</b>
SM			0,30	0,29
HL	17 °C	N+	0,31	0,07
		N-	0,31	0,10
	10 °C	N+	0,33	0,08
		N-	0,32	0,12



**Titre : Exploration de la diversité naturelle de *Medicago truncatula* pour la croissance hétérotrophe des plantules en fonction de l'apport en nitrate et de la température**

**Mots clés :** performance des plantules, plasticité phénotypique, allongement des organes, mobilisation de la biomasse de la graine, physiotypes, GWAS, biomarqueurs

**Résumé :** La levée des plantules est une phase critique du développement pour la réussite de l'établissement des cultures en raison de sa sensibilité aux conditions environnementales. Pour s'adapter à un contexte climatique et environnemental changeant, les plantules se retrouvent de plus en plus dans des conditions de basses températures avec de faibles disponibilités en éléments nutritifs, en particulier le nitrate. Dans ce contexte, la croissance hétérotrophe des plantules a été caractérisée dans des conditions contrastées d'apport en nitrate (présence, absence) et de température (17 °C, 10 °C) pour une core-collection de 192 accessions de *M. truncatula* représentative de la diversité naturelle de cette espèce. Les caractères liés à l'allongement des organes et à la mobilisation de la biomasse de la graine ont été déterminés dans les différentes conditions environnementales et pour deux lots de graines différents. Des indices de plasticité de réponse des plantules à l'absence de nitrate et au froid ont également été déterminés. Le déterminisme génétique des caractères a été abordé par GWAS (Genome-Wide Association Study).

Quels que soient la température et le lot de graines, l'absence de nitrate affecte la mobilisation de la biomasse des graines et le ratio des longueurs racine/hypocotyle.

**Title : Exploring natural diversity of *Medicago truncatula* for seedlings heterotrophic growth depending on nitrate supply and temperature**

**Keywords :** seedling performance, phenotypic plasticity, organ elongation, seed's biomass mobilization, physiotypes, GWAS, biomarkers

**Abstract:** Seedling emergence is a critical phase of development for successful crop establishment due to its sensitivity to environmental conditions. In order to adapt to climatic and environmental context changing, seedlings are increasingly found in low temperature conditions with low availability of nutrients, especially nitrate. In this context, the heterotrophic growth of the seedlings was characterized under various conditions of nitrate supply (presence, absence) and temperature (17 °C, 10 °C) for a core collection of 192 accessions of *M. truncatula* representative of the natural diversity of this species. The traits related to organs elongation and to seed's biomass mobilization were determined under different environmental conditions deriving from different seeds batches. Plasticity indices of the seedling response to the absence of nitrate and to the cold were also determined. The genetic determinism of the traits was dissected by genome-wide association study (GWAS).

The absence of nitrate affected the mobilization of the seed's biomass and the Radicle: Hypocotyl length's ratio, whatever the temperature and the seed batch.

Cependant, la large gamme de variabilité génétique de l'ensemble des caractères en réponse à l'absence de nitrate a révélé différentes performances des plantules au sein de la diversité naturelle. Grâce à des analyses en composantes principales (ACP) réalisées avec les indices de plasticité, nous avons identifié des physiotypes de comportements adaptatifs à l'absence de nitrate aux deux températures. Par ailleurs, d'autres physiotypes ont été identifiés en lien avec les caractéristiques explicatives de la croissance hétérotrophe et les conditions géoclimatiques d'origine des accessions. Enfin, l'analyse GWAS a permis d'identifier 221 loci associés à la majorité des caractères dans les diverses conditions environnementales étudiées. De même, 160 gènes candidats ont été identifiés à proximité de loci contrôlant 16 caractères par data mining. Parmi eux se trouvent deux clusters de gènes, l'un codant pour des transporteurs de sucres et l'autre pour des glutathion S-transférases, aux environs des loci associés à l'élongation des plantules en réponse à l'absence de nitrate. Cet ensemble de résultats ouvre différentes pistes pour élucider les bases génétiques de l'adaptation de la croissance hétérotrophe à l'absence de nitrate et au froid.

However, the large range of genetic variability across all traits in response to the absence of nitrate, revealed different seedling performances within natural diversity. A principal component analysis (PCA) carried out with plasticity indexes highlighted physiotypes of adaptive behavior to the absence of nitrate at the both studied temperatures. In addition, other physiotypes were identified in connection with the explanatory characteristics of heterotrophic growth and the native geoclimatic conditions of the accessions. Finally, GWAS revealed 221 loci associated with the most traits in the various environmental conditions studied. Likewise, 160 candidate genes were identified near loci controlling 16 traits by data mining, including two clusters of genes encoding sugar transporters and glutathione S-transferases surrounding loci associated with seedling elongation in response to the absence of nitrate. These results open up various perspectives for better analyzing the genetic bases of the growth adaptation of to the absence of nitrate and to the cold in heterotrophy.