ETUDE DU PROCESSUS DE RUPTURE DE L'INTERACTION SYMBIOTIQUE *MEDICAGO TRUNCATULA* / *SINORHIZOBIUM MELILOTI* : ROLE DE CYSTEINE PROTEASES

Présentée et soutenue par

Olivier PIERRE

Thèse entrant dans le cadre de l'obtention du

Doctorat des Sciences de la Vie et de la Santé – ED85

UNIVERSITE DE NICE-SOPHIA ANTIPOLIS

Institut Sophia-Agrobiotech (ISA), Equipe Symbiose

2013

Président du jury : Dr. P. Normand

Rapporteur : Dr. S. Goormachtig

Rapporteur : Dr. A. Niebel

Examinateur : Pr. V. Gruber

Directeur de Thèse : Pr. D. Hérouart

Co-directeur de Thèse : Dr. E. Boncompagni

RESUME

Medicago truncatula est une Légumineuse établissant une interaction symbiotique avec une bactérie tellurique de la famille des Rhizobiacées, *Sinorhizobium meliloti*. Cette interaction induit l'organogénèse racinaire d'un nouvel organe, la nodosité dans laquelle s'établit un microenvironnement propice à la différenciation de *S. meliloti* en bactéroïde fixateur du diazote atmosphérique. Ce dernier réduit ainsi le N_2 atmosphérique en ammonium, assimilé ensuite par la plante hôte. Cette réduction étant très endergonique *M. truncatula* fournit aux bactéroïdes des substrats carbonés issus de la photosynthèse. Cependant, cette interaction n'est pas pérenne, du fait de la mise en place d'un processus de sénescence ; processus conduisant à la lyse des bactéroïdes et des cellules hôtes végétales. Cependant, à l'heure actuelle, ce processus de rupture symbiotique reste largement méconnu.

Afin de mieux caractériser ce processus de sénescence, nous avons développé de nouveaux outils cytologiques permettant par microscopie confocale de suivre *in vivo* la viabilité, mais également le fonctionnement des bactéroïdes au sein de la cellule hôte végétale. Ces nouvelles approches cytologiques pourraient ainsi offrir de nouvelles perspectives pour une caractérisation plus précise du déroulement du processus de sénescence nodositaire.

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous avons également cherché à déterminer l'implication de deux cystéine protéases dans la mise en place du processus de sénescence nodositaire. Une des caractéristiques de ce processus de sénescence est une hausse de l'activité protéolytique, notamment des activités cystéine protéases. L'analyse transcriptomique par cDNA-AFLP du processus de sénescence nodositaire (Van de Velde et al., 2006) a pu mettre en évidence 508 gènes différentiellement exprimés dont deux cystéine protéases, *MtCP6* et *MtVPE*. L'analyse spatio-temporelle de *MtCP6* et *MtVPE*, par fusion transcriptionnelle avec le gène rapporteur GUS, a permis de mettre en évidence l'induction de ces deux gènes lors du processus de sénescence nodositaire aussi bien développementale qu'induit par un traitement abiotique ou lors d'une interaction symbiotique non efficace. De plus, nous avons pu démontrer, par génétique inverse, que la diminution de l'expression de ces deux protéases retarde la mise en place du processus de sénescence, alors que leur expression précoce conduit à la promouvoir. Enfin, l'étude par microscopie confocale de la localisation subcellulaire de ces protéases par fusion traductionnelle avec la GFP, démontre leur adressage aux bactéroïdes. Nos données tendent donc à démontrer le rôle clef de *Mt*CP6 et de *Mt*VPE dans le processus de sénescence nodositaire, où ces protéases pourraient participer directement au déclenchement d'une dégradation des bactéroïdes.

Table des matières

Table des matières 1

Liste des illustrations (hors publications) 7

Liste des abbréviations 9

CHAPITRE I INTRODUCTION 10

I. DIVERSITE DES SYMBIOSES FIXATRICES D'AZOTE CHEZ LES PLANTES 11

I.1. Une multitude de plantes hôtes et de symbiontes 11

I.1.A Les symbioses fixatrices d'azotes non rhizobiennes 11

I.1.A.1 LES « PLANTS GROWTH PROMOTING BACTERIA » ou PGPB 11

I.1.A.2 Les Cyanobactéries 12

I.1.A.3 Les actinomycètes 13

I.1.B Les symbioses Légumineuses – Rhizobiacées 14

I.1.B.1 Nodosités racinaires ou caulinaires 16

I.1.B.2 Nodosités de type déterminées et indéterminées 16

II. LES SYMBIOSES LEGUMINEUSES - RHIZOBIACEES 18

II.1 Les Légumineuses 18

II.1.A Importance agronomique, écologique et enjeux agraires des Légumineuses 18

II.1.A.1 Importance agronomique 18

II.1.A.2 Importance écologique et enjeux agraires 19

II.1.B Phylogénie des Légumineuses 20

II.2 LES RHIZIOBIACEES 21

II.2.A Phylogénie des Rhizobiacées 22

III. LA SYMBIOSE *MEDICAGO TRUNCATULA- SINORHIZOBIUM MELILOTI* 22
III.1 Outils génomiques et transcriptomiques 23
III.1.A S. meliloti 23
III.1.B M. truncatula 24
III.1.B.1 Séquençage et annotation génomique 25
III.1.B.2 Génération de banque de mutants 26
III.1.B.3 Les outils de transcriptomiques 27

IV. MISE EN PLACE DE LA SYMBIOSE *M. TRUNCATULA / S. MELILOTI* 28
IV.1 Dialogue moléculaire et reconnaissance des partenaires 29
IV.2 Perception des facteurs nod et transduction du signal 30
IV.3 Processus d'infection rhizobienne 31
IV.3.A L'adhésion aux poils absorbants 31
IV.3.B Déformation des poils absorbants en réponse aux rhizobia 32
IV.3.C L'infection rhizobienne 33
IV.3.C.1 Importance de la plante hôte dans la mise en place du cordon d'infection 34
IV.3.C.2 Importance du rhizobium dans la mise en place du cordon d'infection 34
IV.3.D EXTENSION DU CORDON D'INFECTION 35
IV.3.D.1. Rôle des bactéries et de la plante dans l'extension du cordon 35
IV.3.D.2 Cordons pré-infectieux : un guidage au travers du cortex 37
IV.3.D.3 Gouttes d'infection : l'internalisation des rhizobia dans les cellules hôtes 37
IV.4 Organogenèse de la nodosité indéterminée 38
IV.4.A Formation du primordium nodositaire 38
IV.4.B Différenciation de la nodosité 39
IV.4.B.1 Mise en place du méristème nodositaire 39
IV.4.B.2 Structure de la nodosité indéterminée 40
IV.4.C Zone d'infection et différenciation des deux partenaires 42

IV.4.C.1 Différenciation de la cellule hôte végétale 42

IV.4.C.2 Différenciation et persistance des rhizobia 43

V. Fonctionnement de la symbiose, une niche écologique au sein de la nodosité 47

V.1 Respiration et fixation d'azote : le paradoxe de la nitrogénase 47

V.2 Métabolisme symbiotique 50

VI. La sénescence 51

VI.1 La Sénescence nodositaire 52

VI.2 Changements structuraux lors de la sénescence nodositaire 53

VI.3 Analyses transcriptomiques du processus de sénescence nodositaire 56

VI.4 Signalisation hormonale lors de la sénescence 57

VI.5 Facteurs de transcription 59

VI.6 Altération de la leghémoglobine et de la balance redox 61

VI.7 Sénescence nodositaire et protéases 63

VI.8 La sénescence nodositaire dite induite 64

VI.8.A La sénescence nodositaire développementale et induite, des caractéristiques propres et communes 65

VI.8.B Altération de l'équilibre redox nodositaire lors de la sénescence induite 68

VI.9 Sénescence précoce et bactéroïdes non fonctionnels 70

VII. Objectifs de ce travail de thèse 71

CHAPITRE II MATERIELS ET METHODES 73

I. Matériels biologique et conditions de culture 74

I.1 M. truncatula 74

I.2 Souches bactériennes 74

I.2.A Escherichia coli 74

I.2.B Agrobacterium rhizogenes 75

I.2.C Sinorhizobium meliloti 75

II. Méthodes 76

II. 1 Obtention de plantes M. truncatula composites 76

II.1.A En conditions non axéniques, dérivant de (Vieweg et al., 2004). 77

II.1.B En conditions axéniques (Boisson-Dernier et al., 2001) 78

II.2 Culture racinaire in vitro 79

II.3 Génétique bactérienne 79

II.3.A Transformation d'E.coli 79

II.3.B Transformation A. rhizogenes 80

II.3.C Souches utilisées 81

II.4. Mesure de la capacité fixatrice d'azote 82

II.5 Histologie et cytologie 82

II.5.A Détection histochimique de l'activité GUS 82

II.5.B Réalisation de coupes fines (5 µm) 83

II.5.C Réalisation de coupes semi-fines (70 µm) 84

II.5.D Microscopie confocale et sondes acidophiles 84

II.5.E Microscopie confocale et viabilité in planta des bactéroïdes (Live/Dead) 85

II.5.F Parmacologie et mesure du pH in planta 86

II.6 Biologie moléculaire 87

II.6.A Extraction des ARN *87*
II.6.B Transcription inverse et réaction de polymérase en chaine (PCR) *88*
II.6.C PCR quantitative en temps réel *88*
II.6.D Conception d'amorces *89*
II.6.E Amorces utilisées *90*
II.6.F Clonage d'ADN et technologie Gateway *91*
II.6.G Construction de fusion transcriptionnelle promoteur:GUS *92*
II.6.H Expression ectopique et ARN interférence *92*
II.6.I Fusions traductionnelle avec la GFP *94*
II.6.J Plasmides utilisés *94*
II.6.K Séquençage *96*
II.7 Biochimie *96*
II.7.A Extraction protéique et activité protéolytique *96*
II.7.B Analyse en Western-blot *97*
II.8 Phylogénie *98*

CHAPITRE II : RESULTATS *99*

I. Developpement de nouveaux outils pour l'étude *in vivo* de la sénescence nodositaire **100**
I. 1 Etudes in vivo de la viabilité des bactéroïdes *101*
I.1.A Caractérisation du rôle de la protéine bactérienne BacA dans la persistance des bactéroïdes de S. meliloti face aux peptides antimicrobiens NCR. *103*
I.1.A.1 Introduction *103*
I.1.A.2 Discussion *106*
I.1.B Rôle du monoxyde d'azote dans les étapes tardives de la symbiose, un inducteur de la sénescence ? *109*
I.1.B.1 Introduction *109*

I.1.B.2 Discussion *112*

I.2 L'acidification de l'espace péribactéroïdien : un marqueur du fonctionnement des bactéroïdes chez M. truncatula *115*

I.2.A Introduction *115*

I.2.B Discussion *119*

II. Implication des cystéine protéases *Mt*CP6 et *Mt*VPE dans le processus de sénescence nodositaire **124**

II. 1 Introduction *124*

II. 2 Discussion *127*

CHAPITRE III DISCUSSION GENERALE & PERSPECTIVES *132*

I. Vers une meilleure caractérisation du processus de sénescence nodositaire **133**

II. Vers une agriculture écologique plus rentable ? **138**

Bibliographie *141*

Annexes *162*

Liste des illustrations *(hors publications)*

Figure 1: Symbiose fixatrice d'azote avec des bactéries fixatrices d'azote

Figure 2 : Symbiose fixatrice d'azote avec les cyanobactéries

Figure 3 : Nodosités actinorhiziennes

Figure 4 : Symbiose rhizobienne

Figure 5 : Nodosités caulinaires et racinaires

Figure 6 : Nodosités indéterminées et déterminées

Figure 7 : Légumineuses d'intérêts agronomiques

Figure 8 : Importance écologique des Légumineuses

Figure 9 : Phylogénie des Fabacées selon le polymorphisme de gène *matK*

Figure 10 : Phylogénie des Rhizobiacées basée sur le polymorphisme de l'ARN16S

Figure 11 : « The TILLING machine »

Figure 12 : Banque de mutants insertionnels *Tnt1* chez *M. truncatula*

Figure 13 : Dialogue moléculaire entre les deux partenaires symbiotiques

Figure 14 : Schéma simplifié de la voie de transduction du signal suite à la perception des facteurs Nod

Figure 15 : Adhésion des rhizobia aux poils absorbants

Figure 16 : Croissance et déformation des poils absorbants en réponse aux facteurs Nod

Figure 17 : Peroxyde d'hydrogène et croissance du poil absorbant

Figure 18 : Progression du cordon d'infection et exopolysaccharides bactériens

Figure 19 : Importance de la plante et du rhizobium dans l'extension du cordon d'infection

Figure 20 : L'internalisation des rhizobia, un processus similaire à l'endocytose

Figure 21 : Organogénèse de la nodosité de type indéterminée

Figure 22 : Structure de la nodosité indéterminée

Figure 23 : Endoréduplication et différenciation des cellules hôtes de la nodosité

Figure 24 : Rôles des peptides NCR et de DNF1 dans la différenciation des bactéroïdes

Figure 25 : Différenciation des rhizobia en bactéroïdes au sein des cellules végétales

Figure 26 : Nitrogénase et microoxie de la nodosité

Figure 27 : Schéma simplifié du métabolisme du bactéroïde au sein de la nodosité fixatrice

Figure 28 : La sénescence nodositaire

Figure 29 : Acquisition d'une identité vacuolaire des symbiosomes lors de la sénescence nodositaire

Figure 30 : Analyse transcriptionnelle par cDNA-AFLP de la sénescence nodositaire

Figure 31 : Sénescence nodositaire et phytohormones

Figure 32 : Induction de *MtATB2* lors de la sénescence nodositaire

Figure 33 : Sénescence nodositaire et perturbation de l'équilibre redox

Figure 34 : Cystéine protéases lors de la sénescence nodositaire développementale ou induite

Figure 35 : Altération de la structure des nodosités de *M. truncatula* après traitement de 3 ou 5 jours à l'obscurité

Figure 36 : Altération du métabolisme carboné et de la respiration lors de la sénescence induite

Figure 37 : Sénescence nodositaire développementale et induite, similarités et divergences

Figure 38 : Altération de la balance redox lors de la sénescence induite

Figure 39 : Sénescence précoce et bactéroides non fonctionnels

Figure 40 : Etude *in vivo* de l'activité protéolytique, les sondes protéasiques ratiométriques

Figure 41 : Stratégie de capture *in vivo* et d'identification des interactants d'*Mt*CP6 et *Mt*VPE

Table 1 : Efficacité de fixation d'azote, organismes libres ou symbiotiques.

Liste des abbréviations

PGPB : « Plant Growth Promoting Bacteria »

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messager

ADNc : ADN complémentaire

Taq : *Thermophylus aquaticus* ADN polymérase

RT : « Reverse Transcriptase »

PCR : « Polymerase Chain Reaction »

D.O. : Densité optique

pb : Paire de base

kb : Kilobase

Mb : Mégabase

GUS : β-glucuronidase

GFP : « Green Fluorescent Protein »

DsRED : « *Discosoma* Red Fluorescent Protein »

RFP : « Red Fluorescent Protein »

DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole

TAMRA : Tetramethylrhodamine

MET : Microscopie électronique à transmission

MEB : Microscopie électronique à balayage

CHAPITRE I
INTRODUCTION

I. DIVERSITE DES SYMBIOSES FIXATRICES D'AZOTE CHEZ LES PLANTES

I.1. UNE MULTITUDE DE PLANTES HOTES ET DE SYMBIONTES

Si cette étude traite de la symbiose fixatrice d'azote entre la Légumineuse *Medicago truncatula* et la bactérie tellurique *Sinorhizobium meliloti*, d'autres symbioses fixatrices d'azotes, non rhizobiennes, ont été caractérisées chez les plantes. Ces symbioses contrairement aux symbioses Légumineuse-Rhizobiacées, ces interactions ne conduisent pas nécessairement à l'organogénèse d'organe spécifique à symbiose.

Ces autres symbiontes fixateurs d'azote sont divers : bactéries telluriques, épiphytes ou endophytes, Cyanobactéries ou encore Actinomycètes.

I.1.A Les symbioses fixatrices d'azotes non rhizobiennes

I.1.A.1 LES « PLANTS GROWTH PROMOTING BACTERIA » ou PGPB

Au niveau tellurique, parmi une vaste diversité d'organismes, certains Procaryotes ont la capacité de fixer le diazote atmosphérique à l'état libre, sans interactions avec une plante hôte. En interaction, ces bactéries peuvent promouvoir la croissance de plantes notamment d'intérêt agronomique comme le blé, le riz ou la canne à sucre (Beatty & Good, 2011). Ces bactéries sont ainsi nommées « Plant Growth Promoting Bacteria » (PGPB). La plante par le biais d'exsudats racinaires assure leur colonisation rapide de la rhizosphère puis de la rhizoplane par la mise en place d'un chimiotactisme positif (Compant et al., 2010) (Figure 1A). Ces exsudats racinaires

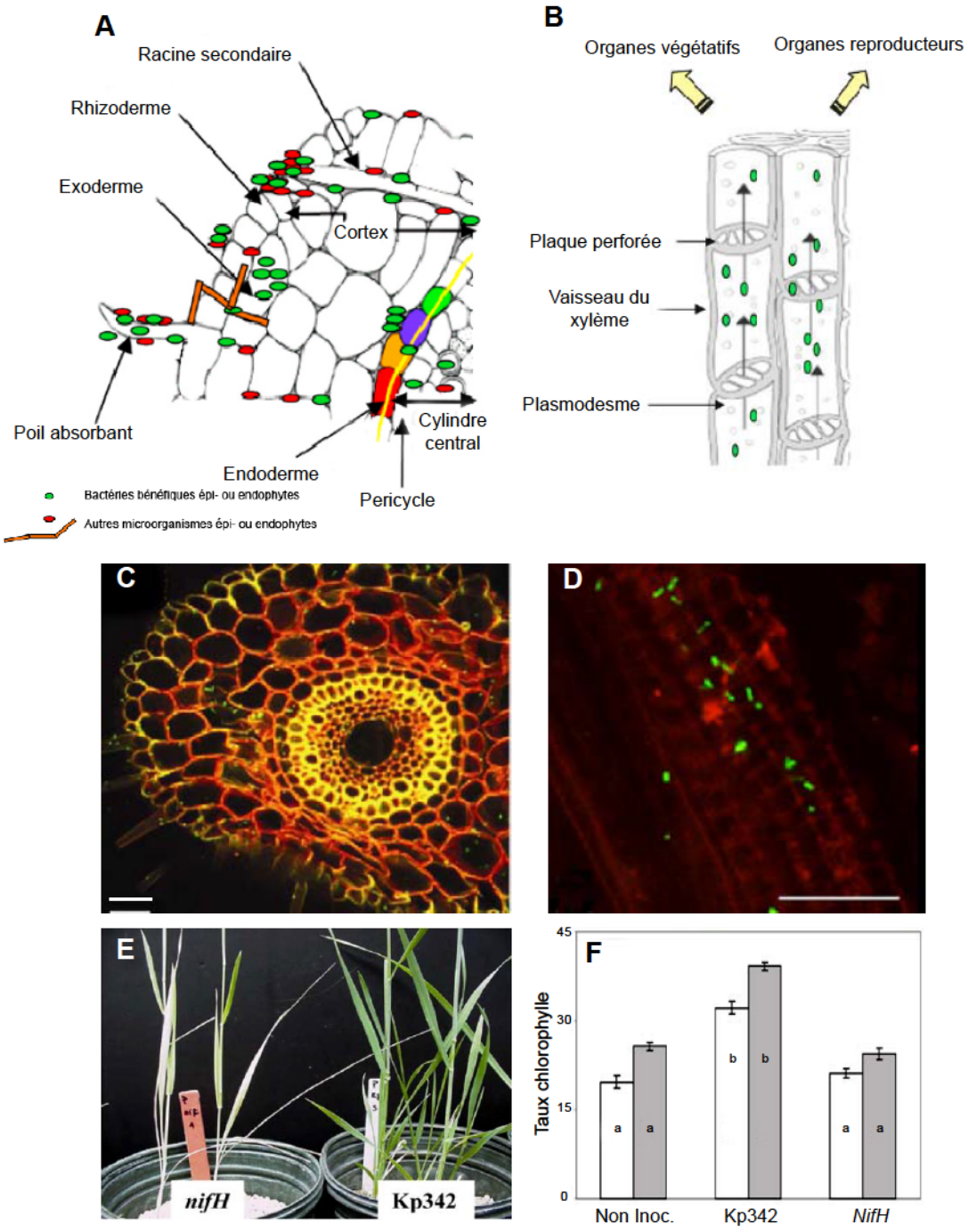


Figure 1: Symbiose fixatrice d'azote avec des bactéries fixatrices

A. Schéma de colonisation de la racine par les bactéries épiphytes et endophytes. B. Schéma de dispersion des bactéries endophytes vers les parties aériennes de la plante via les faisceaux du xylème. C. Coupe transversale de racine de blé (*Triticum aestivum* cv Trenton) colonisée par les bactéries endophytes *Klepsiella pneumoniae* 342 (*Kp*342) étiquetée GFP. Bar d'échelle : 50µm. D. Colonisation des faisceaux du xylème par la bactérie endophyte *Burkholderia phytofirmans* étiquetée GFP. Bar d'échelle : 10µm. E&F. Effet promoteur de l'inoculation de *Klepsiella pneumoniae* 342 sur le blé *T. aestivum*. Comme contrôle négatif, inoculation avec la souche mutée *nifH*, invalidée pour la nitrogénase. F. Taux de chlorophylle du blé inoculée ou pas avec *Kp*342 ou *Kp*342 *nifH* sur un milieu perlite (colonne blanche) ou sable-vermiculite (colonne grisée). Les plantes inoculées avec *Kp*342 présentent une augmentation significative du taux de chlorophylle d'un facteur deux.

Figures modifiées d'après : Compant et al., 2000 ; Iniguez et al., 2004

assurent une source de nutriments (glucides, acides aminés…) pour les PGPB (Walker et al., 2003), mais également assurent via la sécrétion de métabolites secondaires un rôle de biocontrôle de la rhizosphère, tendant à la sélection de PGPB au niveau de la rhizoplane (Compant et al., 2010; Compant et al., 2005). Cependant, certaines PGPB ne colonisent pas uniquement la rhizosphère et/ou la rhizoplane, mais peuvent pénétrer dans les tissus végétaux, et assurent des effets bénéfiques pour la plante hôte (Figure 1A, C, D). Ces bactéries endophytes pénètrent passivement dans les tissus de la plante hôte, en profitant de points de faiblesse des racines, produits par l'émergence une racine latérale, ou par une blessure mécanique ou induite par un pathogène (Compant et al., 2010). Cette colonisation intercellulaire peut s'établir de l'endoderme jusqu'au péricycle ou via les faisceaux vasculaires jusque dans les parties aériennes (Figure 1B), incluant les feuilles, mais aussi les fleurs et les graines (Compant et al., 2010); offrant ainsi un inoculum bénéfique pour la génération suivante.

I.1.A.2 Les Cyanobacteries

Les Cyanobactéries sont un vaste groupe de Procaryotes photosynthétiques. Certaines espèces de cyanobactéries forment des filaments pluricellulaires et initient la différentiation de cellules spécialisées, appelées les hétérocystes, capable de fixer le diazote atmosphérique (Meeks & Elhai, 2002) (Figure 2F, G, H). Les hétérocystes ne sont pas photosynthétiques et sont caractérisés par une épaisse paroi limitant la diffusion de l'O_2, créant ainsi un environnent microoxique propice à la réduction du diazote atmosphérique par une activité nitrogénase. Elles peuvent ainsi avoir un mode de vie libre, mais aussi symbiotique, avec un très large spectre de plantes hôte, des Eumycètes formant une symbiose avec des lichens, des Bryophytes, des Ptéridophytes, mais aussi des Cycadophytes, Gymnospermes, et des Angiospermes (Figure 2A, D, E). Une fois en interaction, la majorité de ces symbioses restent extracellulaires, et s'établissent dans les tissus foliaires ou racinaires au niveau de structures spécialisées (Meeks & Elhai, 2002). Ce sont des cavités symbiotiques chez les Bryophytes et les

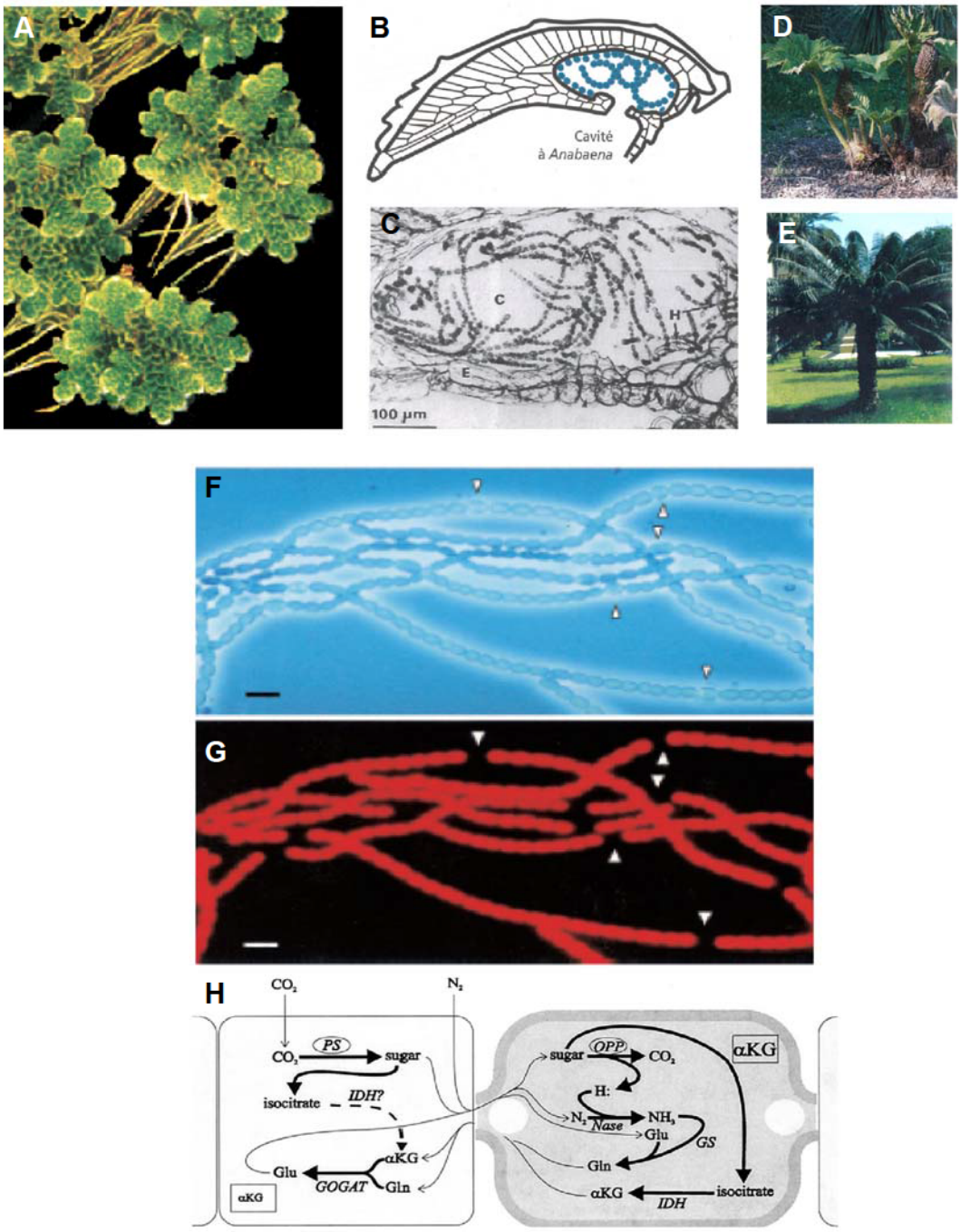


Figure 2 : Symbiose fixatrice d'azote en association avec des cyanobactéries

A-C. La symbiose *Azolla* (Ptéridophyte) - *Anabaena* (Cyanobactérie) est écologiquement la plus importante. Les cyanobactéries du genre *Anabaena* sont localisées dans une cavité symbiotique située dans le lobe dorsal des frondes (C) schématisée en (B). (D). La symbiose *Gunnera* (Angiosperme) - *Nostoc* (Cyanobactérie) est la seule symbiose fixatrice d'azote référencée entre un Angiosperme et une Cyanobactérie. Ici un jeune plant de *Gunnera*. E. La symbiose Cycadophytes - *Nostoc* (Cyanobactérie). Les Cyanobactéries du genre *Nostoc* peuvent mettre en place, au niveau racinaire, une interaction symbiotique fixatrice d'azote avec les Cycadophytes ; plantes des régions tropicales et subtropicales. F-G Micrographies de la Cyanobactérie *Nostoc* punctiforme présentant des cellules végétatives et des hétérocystes fixateurs d'azotes. F. Images en contraste de phase de filaments de *Nostoc punctiforme*, les hétérocystes, cellules légèrement renflées, sont indiquées par une flèche. G. Observation en epifluorescence de l'image précédente. Autofluorescence des phycobiliprotéines et chlorophylles, qui fluorescent dès 600nm (fluorescence rouge) après excitation à 510nm. Les hétérocystes, cellules fixatrices d'azotes mais non chlorophylliennes, ne présentent pas de fluorescence significative. Echelle : 10µm. H. Schéma illustrant les échanges métaboliques de l'hétérocyste fixateur d'azote et les cellules végétatives photosynthétiques. L'hétérocyste présente un épaississement de sa paroi favorisant la mise en place d'une microaérobie. Le CO_2 est fixé dans les cellules végétatives au cours des phases dites sombres de la photosynthèse (PS). Les trioses résultant sont exportés à l'hétérocyste qui via les voies oxydatives des pentoses phosphates (OPP) vont générer du pouvoir réducteur nécessaire à l'activité nitrogénase (Nase). La Nase réduit ainsi le N_2 en NH_3 qui via l'activité glutamine synthétase (GS) puis glutamate synthase (GOGAT) alimente les cellules végétative en glucides. IDH : Isocitrate dehydrogénase.

Figures modifiées d'après : Meeks & Elhai, 2002; Duhoux et al., 2004

Ptéridophytes, ou des racines spécifiques chez les Gymnospermes (Duhoux et al., 2004). L'interaction *Azolla–Anabaena* se met en place de manière extracellulaire au sein d'un compartiment symbiotique spécialisé mis en place dans les lobes des frondes de la Ptéridophytes *Anabaena* (Figure 2B, C). Cependant, les Cyanobactéries du genre *Nostoc* mettent en place une interaction symbiotique intracellulaire avec les Angiospermes du genre *Gunnera* où elles s'établissent dans les cellules d'une glande spécialisée. Une fois en interaction avec la plante, la fréquence de différentiation des hétérocystes augmente, de 30 à 60% pour respectivement l'interaction *Azolla-Anabaena* et *Nostoc-Gunnera*, assurant ainsi une fixation d'azote optimale pour l'interaction symbiotique (Meeks & Elhai, 2002).

I.1.A.3 LES ACTINOMYCETES

Les Actinomycètes, maintenant appelés Actinobactéries, sont des Procaryotes telluriques Gram-positifs. Les Actinobactéries du genre *Frankia*, sont des organismes filamenteux et diazotrophes, capable de réduire le diazote atmosphérique en condition libre ou symbiotique (Figure 3). En interaction avec une plante compatible, *Frankia* est capable d'induire *de novo* la différenciation d'un organe racinaire propice à la symbiose, la nodosité. Les *Frankia* sont ainsi capables de noduler plus de 200 espèces, pour la plupart des plantes ligneuses, reparties en 8 familles regroupées sous le terme de plantes actinorhiziennes: les Betulaceae les Casuarinaceae, les Coriaroaceae, les Datiscaceae, Elaegaceae, Myricaceae, Rhamnaceae et Rosaceae (Pawlowski & Demchenko, 2012). A l'instar des Cyanobactéries, chez *Frankia* la fixation d'azote est assurée par des cellules spécialisées de 2 à 6 µm appelées diazovésicules. Ces diazovésicules pédonculées sont localisées sur les hyphes en position latérale ou terminale. En termes de structure, les nodosités actinorhiziennes ont une croissance indéterminée. Initiées au niveau du péricycle, elles présentent une vascularisation centrale ainsi qu'une zonation (Figure 3E). Une zone méristématique assurant la croissance indéterminée de la nodosité. Une zone d'infection où les cellules végétales sont progressivement infectées par

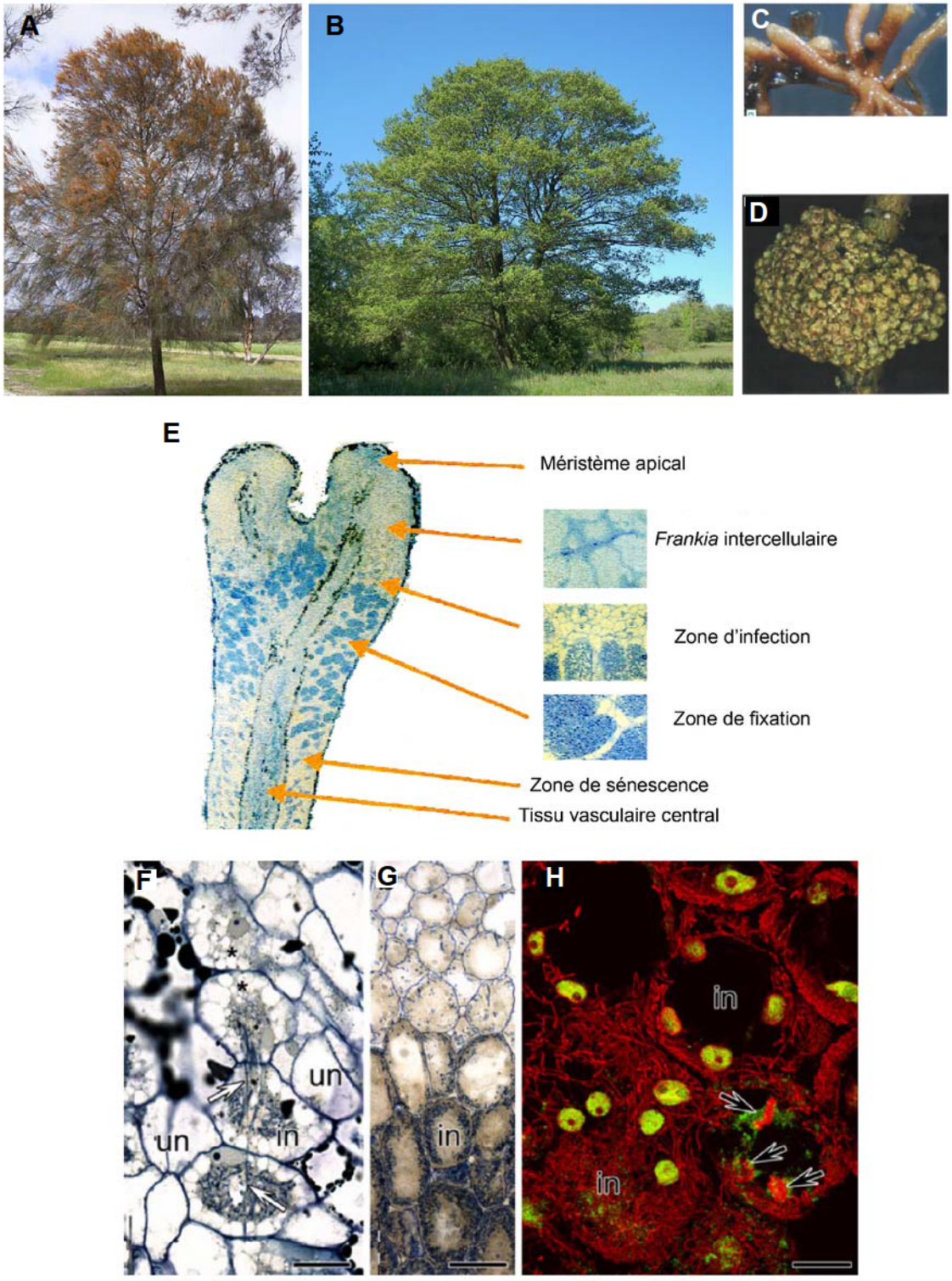


Figure 3 : Nodosités actinorhiziennes

A-D : Symbiose actinorhizienne chez *Allocasuarina huegeliana* (soupirant sheoak) (A) et *Alnus glutinosa* (Aulne) (B). Jeune nodosité d'*Allocasuarina verticillata* (C). Nodosité mature d'*Alnus glutinosa* (D). Structure d'une nodosité actinorhizienne mature lors de l'interaction *Discaria trinervis* et *Frankia* sp. (E). Progression d'hyphe invasive de *Frankia* dans les nodosités de *Casuarina glauca*. (F). Section longitudinale de la zone d'infection d'une nodosité de *Datisca glomerata* ; les cellules hôtes végétales sont emplies d'hyphes non invasives dites végétatives. (G). Agrandissement de cellules infectées de nodosité de *D. glomerata* en cours d'endoréduplication. Les hyphes et noyaux végétaux sont marqués avec l'iodure de propidium (agent intercalant de l'ADN ; fluorescence rouge). La néosynthèse d'ADN des cellules végétales en cours d'endoréduplication est visualisée à l'aide d'un marquage de 24h avec 5-ethynyl-2'-deoxyuridine suivie d'un marquage Alexa Fluor 488-azide (fluorescence verte) (H). Echelle : 20µm (E & G) et 50µm (F).

Figures modifiées d'après : Duhoux et al., 2004 ; Wall, 2000 ; Pawlowski & Demchenko, 2012

les hyphes de *Frankia* (Figure 3F, G). Une fois le processus d'infection terminé les diazovésicules se différentient et la fixation d'azote est en place dans une zone de fixation (Figure 3H). Cependant cette interaction symbiotique n'est pas pérenne et une zone de sénescence se met en place conduisant à la dégradation des cellules végétales hôtes et des hyphes (Figure 3E) (Pawlowski & Demchenko, 2012).

I.1.B Les symbioses Légumineuses – Rhizobiacées

Les symbioses légumineuses-rhizobiacées sont actuellement les mieux caractérisées et conduisent à la mise en place une fixation d'azote très efficace, jusqu'à 200 kg (N)/an/hectare chez le soja, contre 150 et 80 Kg (N)/an/hectare chez l'aulne et la fougère aquatique *Azolla*, respectivement en association avec l'Actinobactérie *Frankia* et la Cyanobactérie *Anabaena* (Läuchli & Bieleski, 1983) (Table 1). A l'instar des symbioses actinorhiziennes, les symbioses rhizobiennes conduisent systématiquement à la formation d'un organe symbiotique, la nodosité, qui assure la mise en place d'un environnement propice à la fixation d'azote (notamment microoxique). La mise en place d'une nodosité fonctionnelle est conditionnée par l'accomplissement de trois processus : l'infection bactérienne de la plante hôte, l'organogénèse de la nodosité et enfin la réduction de l'azote atmosphérique.

L'infection de la plante hôte, appelée également nodulation, s'effectue principalement au niveau racinaire, plus précisément au niveau des poils absorbants. Toutefois, la nodulation peut également se mettre en place au niveau des parties aériennes, au niveau de points de faiblesse de la tige, c'est l'infection dite par « crack entry » (Goormachtig et al., 2004). Au niveau racinaire, les rhizobia envahissent progressivement le cortex racinaire via une structure tubulaire appelée cordon d'infection. Ces cordons d'infection libéreront, par un processus similaire à l'endocytose, les rhizobia dans les cellules hôtes végétales néoformées. Ces bactéries se différencient ensuite en bactéroïdes fixateurs d'azote. Parallèlement, les cellules du cortex et

Hôte végétal	Symbionte	Taux de fixation (kg N/ha/an)
Symbioses rhizobiennes		
Glycine max	*B. japonicum*	40-200
Arachis hypogaea	*C.rhizobium*	70-240
Vicia faba	*R. leguminosarum*	45-300
Trifolium sp.	*R. trifolii*	45-350
Medicago sativa	*R. meliloti*	50-460
Symbioses actinorhiziennes		
Alnus sp.	*Frankia*	50-150
Casuarina equisetifolia		58
Myrica gale		27
Hippophae rhamnoides		180
Symbioses Cyanobactéries		
Azolla	*Anabaena azollae*	50-80
Marozamia riedlei	*Nostoc*	18
Gunnera	*Nostoc*	581
Symbioses occasionnelles		
Paspalum notatum	*Azotobacter paspali*	10
Zea mays	*Klebsiella, Bacillus,*	<3
Saccharum officinarum	*Azospirillum, Beijerinckia*	
Organismes libres		
Cyanobactéries	*Azotobacter, Clostridium, Klebsiella ...*	80-120
Autres fixateurs d'azote libres		<1

Table 1 : Efficacité de fixation d'azote, organismes libres ou symbiotiques.

Figures modifiées d'après : Läuchli et al, 1983

du péricycle se dédifférencient et entrent en division conduisant à la formation d'un primordium nodositaire. L'activité méristématique du primordium nodositaire conduit à la différenciation de nouvelles cellules qui, conjointement au relargage de bactéries par les cordons d'infection vont assurer la mise en place d'une nodosité fonctionnelle (Figure 4).

Au cours de cette organogénèse nodositaire, les cellules hôtes végétales et bactéroïdes vont subir des endoréduplications successives de leur génome conduisant à la différentiation des bactéroïdes en bactéroïdes fixateurs d'azote. La fixation d'azote s'effectue grâce à une enzyme bactérienne exprimée en conditions microoxiques, la nitrogénase. La réduction du diazote atmosphérique par la nitrogénase est un processus hautement endergonique (16 moles d'ATP et 8 moles d'électrons pour réduire une mole de diazote atmosphérique). L'énergétique est assurée par la respiration du bactéroïde soutenue par l'apport par la plante hôte de substrats carbonés issus de la photosynthèse. Cependant, l'activité nitrogénase est très sensible la pression partielle en O_2 (pO_2) qui est de 1µM au sein des cellules fixatrices (Minchin, 1997). Au niveau de la nodosité, ce problème est pallié par la mise en place d'un environnement microoxique optimal pour l'activité nitrogénase tout en restant propice à la respiration microaérophile des bactéroïdes.

Le diazote atmosphérique est ainsi réduit sous forme d'ammoniaque puis exporté sous forme d'ammonium dans la cellule hôte végétale où il est assimilé et exporté sous forme de glutamine, asparagine ou uréides dans l'ensemble de la plante via les vaisseaux vasculaires (Crespi & Frugier, 2008; Prell & Poole, 2006).

Au cours de l'interaction Légumineuses-*Rhizobium*, deux types de nodosités ont été caractérisés, les nodosités à croissance déterminée ou à croissance indéterminée. De plus, bien que généralement différentiées au niveau racinaire (nodosités racinaires), les nodosités peuvent être également localisées, chez certaines légumineuses tropicales au niveau des tiges (nodosités caulinaires) (Tsien et al., 1983).

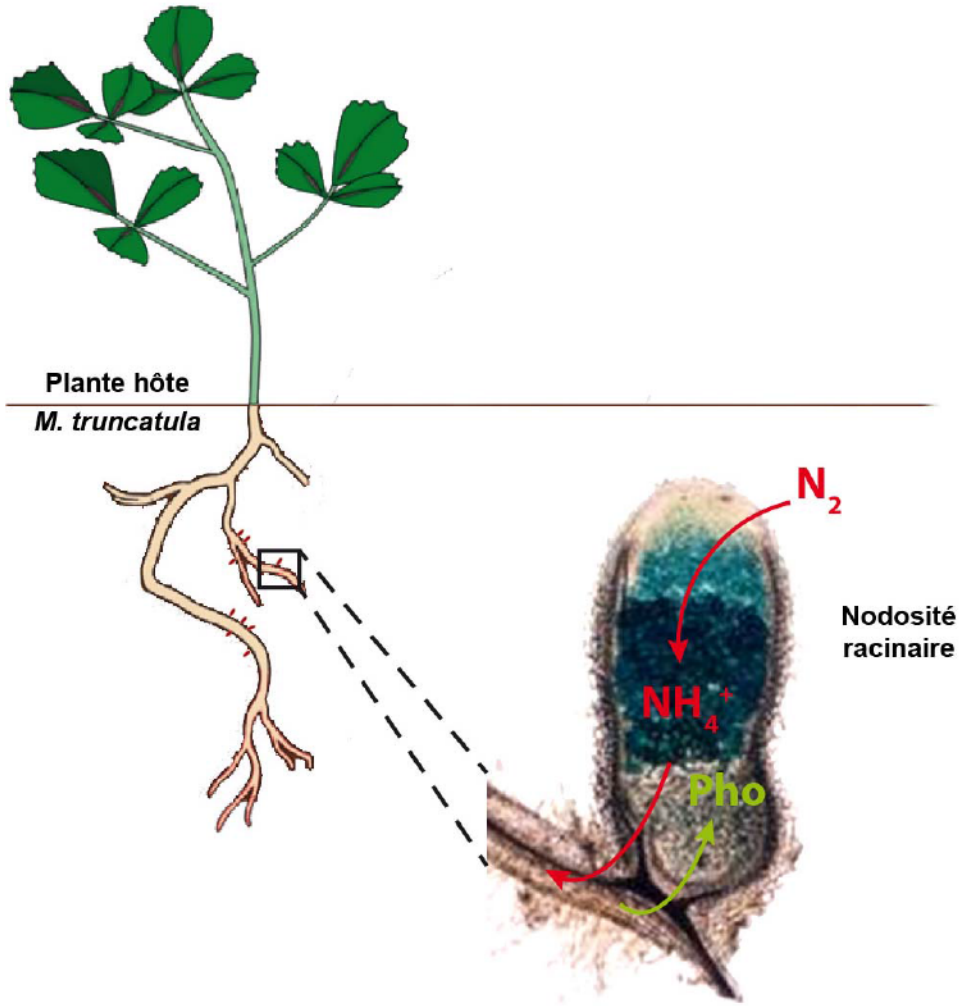


Figure 4: Symbiose rhizobienne
Schéma simplifié de la symbiose rhizobienne avec l'interaction *M. truncatula-S. meliloti* comme exemple.

I.1.B.1 NODOSITES RACINAIRES OU CAULINAIRES

La légumineuse tropicale *Sesbania rostrata* est l'exemple le mieux caractérisé d'une légumineuse formant des nodosités caulinaires et racinaires. Cette plante annuelle localisée en Afrique de l'Ouest vit sur des sols inondables. Les nodosités aériennes se différencient à partir de sites préformés, disposés en lignes verticales le long de la tige (Figure 5D). Ces sites d'infections sont en fait des ébauches de méristèmes racinaires composés d'un méristème racinaire, un cortex et de faisceaux vasculaires. Une fois inoculées par un rhizobium spécifique (*Azorhizobium caulinodans*), apporté par l'eau, le vent ou des insectes, ces ébauches racinaires se différencient en nodosités aériennes. Cependant, bien que localisée à différents niveaux, la mise en place des nodosités aériennes et racinaires est fondamentalement identique (Goormachtig et al., 1997).

I.1.B.2 NODOSITES DE TYPE DETERMINEES ET INDETERMINEES

La croissance nodositaire, déterminée ou indéterminée, dépend de la plante hôte et du symbionte bactérien. Ainsi les légumineuses tropicales comme le soja (*Glycine max*) ou le haricot (*Vicia faba*) forment des nodosités déterminées alors que les légumineuses tempérées comme la luzerne (*Medicago sativa*) ou le pois (*Pisum sativum*) forment des nodosités à croissance indéterminée (Hirsch, 1992) (Figure 6A). Notons cependant que la légumineuse tropicale *Sesbania rostrata* peut induire la formation de nodosités déterminées et indéterminées en fonction des conditions environnementales. Cette transition de type de croissance serait médiée par l'action d'une phytohormone, l'éthylène (Fernandez-Lopez et al., 1998). Selon Hirsch, 1992, le type de nodosité peut être déterminé en fonction du site d'initiation du primordium nodositaire. En effet, des divisions successives au niveau du cortex interne de la racine induisent la formation d'une nodosité indéterminée alors que l'initiation de divisions successives dans le cortex externe conduisent à la formation de nodosités de type indéterminée.



Figure 5 : Nodosités caulinaires et racinaires
(A-C) Tige de *Aeschynomene afraspera* et ces nodosités caullinaires. (B) Tige et ébauches racinaires adventives d'*Aeschynomene afraspera*. (C) Développements de jeunes racines adventives à partir de leurs ébauches après 10j d'immersion dans l'eau. (D) Sites d'ébauches de racines adventives, sites de nodulation par « crack entry ». (E) Tige nodulée de *Sesbania rostrata*. (F) Nodosités racinaires de *M. truncatula*.

Figures modifiées d'après : Duhoux et al., 2004

Les nodosités indéterminées sont caractérisées par la présence d'un méristème persistant au niveau distal de la nodosité (Figure 6B). Ainsi, par le biais de divisions cellulaires successives et continues, ce méristème assure une croissance indéterminée de la nodosité, générant une nodosité de forme allongée. Ainsi, le développement continu d'une nodosité indéterminée forme au sein du même organe un gradient d'âge entre la partie distale méristématique et la partie proximale fonctionnelle, voir sénescente de la nodosité (Hirsch, 1992). Ainsi toutes les étapes de développement de la nodosité sont représentées au sein d'un même nodule mature (Figure 6B). La nodosité est ainsi composée en cinq zones : la zone I, méristématique assurant une croissance indéterminée de la nodosité. Une zone II, dite d'infection où les cellules néoformées par la zone I sont infectées de manière chronique par les rhizobia libérés par le cordon d'infection puis internalisés par endocytose par la cellule hôte végétale. Une zone III, dite fixatrice où les bactéries sont différentiées en bactéroïdes fixateurs d'azote et une zone IV, dite de sénescence où les bactéroïdes et les cellules végétales sont dégradées (Crespi & Galvez, 2000; Hirsch, 1992). Puis, plus tardivement, se met en place une zone V, dite saprophytique où les rhizobia sont libérés par le cordon d'infection et envahissent les tissus dégradés issus de la zone de sénescence, qui deviennent une niche écologique pour des rhizobia non différentiés (Timmers et al., 2000; Vasse et al., 1990). Au niveau expérimental, cette zonation au sein d'une même nodosité offre la capacité de comparer sur un même organe des tissus à différents stades de développement : division cellulaire (zone I), d'infection (zone II), fixation (zone III) et de sénescence (zone IV).

Les nodosités de type déterminées ne possèdent pas de méristème persistant (Figure 6B). Suite à l'arrêt précoce du fonctionnement du méristème, la croissance de la nodosité se fait uniquement par expansion cellulaire et conduit ainsi à une croissance sphérique de la nodosité (Crespi & Galvez, 2000). De ce fait, l'absence de croissance indéterminée conduit à l'absence de zonation de la nodosité. L'ensemble des tissus infectés d'une nodosité déterminée se trouvent tous à un même stade de développement. Ainsi, cette différenciation successive des tissus nodositaires est visible non pas spatialement, mais temporellement.

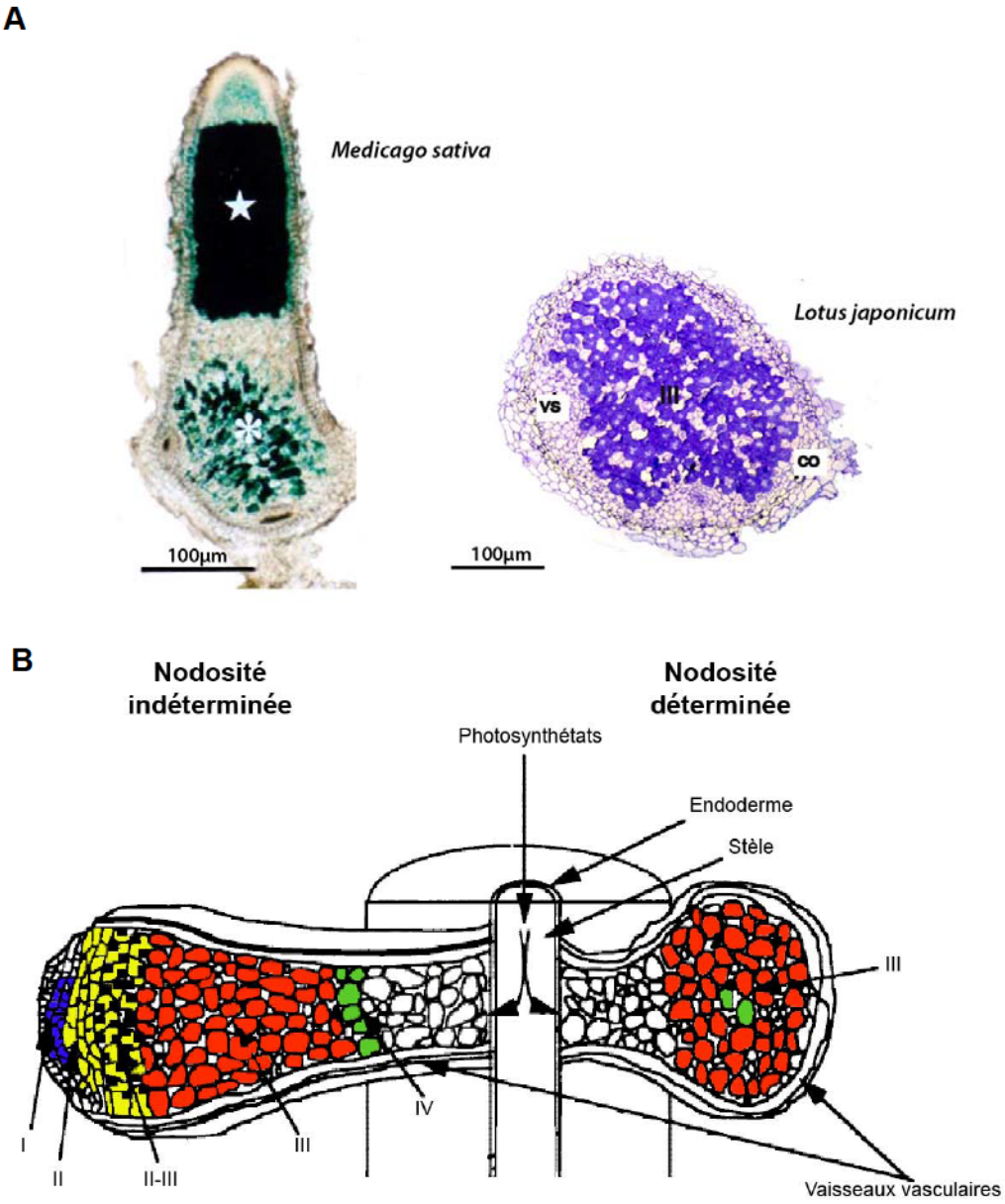


Figure 6 : Nodosités indéterminées et déterminées

(A) Coupes longitudinales de nodosité mature indéterminée (*M. sativa*) et déterminée (*L. japonicum*). Coupes colorées au bleu de toluidine. Etoile : zone III. Astérisque : zone V. vs : vaisseaux vasculaires ; co : cortex. (B) Structure schématisée de nodosité indéterminée et déterminée. Les nodosités à croissance indéterminées présentent un méristème persistant (zone I, colorée en bleu). Puis de manière chronique de nouvelles cellules sont infectées par le microsymbionte et se différencient progressivement en bactéroïdes (zone II et interzone II-III) ; ces bactéroïdes une fois fonctionnels réduisent le diazote atmosphérique en ammoniaque (zone III, rouge). Cependant, cette interaction n'est pas pérenne et elle conduit une rupture symbiotique induisant la sénescence de la nodosité au niveau proximal (zone IV, vert). Les nodosités à croissance déterminées ne présentent pas de méristème persistant, induisant ainsi une nodosité de forme globulaire dépourvue de zonation. Cependant, cette interaction reste toujours temporellement limitée et un processus de sénescence est initié à partir de la partie centrale de la nodosité (en vert).

Figures modifiées d'après : Balestrini et al, 2012 ; Crespi & Galvez, 2000

Enfin, les nodosités déterminées et indéterminées diffèrent au niveau de leur métabolisme azoté. En effet, dans les nodosités indéterminées, une fois réduit en ammonium et exporté dans la cellule hôte végétale, l'azote est exporté par la plante, via les faisceaux vasculaires, sous forme d'acides aminés, la glutamine et l'asparagine. Chez les nodosités déterminées, l'ammonium est exporté sous forme de dérivés de base purique, les uréides (Crespi & Galvez, 2000; Prell & Poole, 2006).

II. LES SYMBIOSES LEGUMINEUSES - RHIZOBIACEES

II.1 Les Legumineuses

Les Légumineuses représentent une des familles les plus importantes et variées des Angiospermes avec 727 genres et environ 20 000 espèces réparties sur une aire géographique diversifiée. Elles se composent de plantes arborescentes lignifiées dans les forêts pluviales d'Amérique latine et d'Afrique tropicales, mais aussi de plantes herbacées en régions plus tempérées, dont certaines ont une importance agronomique majeure comme le soja, le pois ou la luzerne (Cronk et al., 2006).

II.1.A Importance agronomique, écologique et enjeux agraires des Légumineuses

II.1.A.1 Importance agronomique

En termes d'importance agronomique, les cultures de Légumineuses sont, à travers le monde, en seconde position après les cultures céréalières (Figure 7F). En effet, en 2004, les cultures de Légumineuses étaient réparties sur 190 millions d'hectares, soit près de 13 % des



F

	Production (10^6 t)	Surface récoltée (10^6 ha)
Légumineuses protéagineuses	275	160
Légumineuses fouragères	605	20
Blé	583	214
Riz (*O. sativa*)	590	152
Maïs (*Zea mais*)	609	138
Orge (*Hordeum vulgare*)	141	54
Pomme de terre (*Solanum tuberosum*)	308	19
Manioc (*Manihot esculenta*)	179	20
Total	3 290	777

Figure 7 : Légumineuses d'intérêts agronomiques
(A) Cultures de soja (*Glycine max*) en Arkansas. (B) Gousses et graines du pois (*Pisum sativum*). (C) Diverses graines de Légumineuses d'intérêt agronomique dont soja, pois, haricot et lentille. (D) Fleurs et feuilles du trèfle (*Trifolium repens*). (E) Fleurs et feuilles de la luzerne (*Medicago sativa*). (F) Comparatif de la production et surface cultivée entre cultures dans les années 2000 (« Food and Agriculture Organisation of the United Nations », FAO).

Figures modifiées d'après : Graham & Vance, 2003

terres arables mondiales (Gepts et al., 2005). Elles sont cultivées comme plantes fourragères pour l'alimentation animale, mais aussi comme plantes protéagineuses pour l'alimentation animale et humaine. Les protéagineuses, également appelées légumineuses à graines, assurent à elle seules (soja et arachide principalement) 33% des besoins azotés de l'alimentation humaine. Riches en azote, les graines des protéagineuses contiennent jusqu'à 30 % de protéine. Cependant, bien que riche en lysine leur composition en acides aminés soufrés (méthionine et sérine) reste limitée (Graham & Vance, 2003) obligeant pour partie à une diversification des sources alimentaires.

Outre leur rôle crucial dans la sécurité alimentaire, les Légumineuses sont également utilisées à des fins industrielles pour la confection d'encre et de plastique biodégradable et plus récemment dans la production de biodiesel (Graham & Vance, 2003).

II.1.A.2 IMPORTANCE ECOLOGIQUE ET ENJEUX AGRAIRES

Outre une importance agronomique et industrielle, les Légumineuses jouent également un rôle écologique clef (Figure 8). En effet, leur capacité à mettre en place une symbiose fixatrice d'azote avec les Rhizobiacées en font le principal point d'entrée de l'azote atmosphérique, moléculaire, non bioassimilable, dans le cycle biogéochimique de l'azote (Figure 8A). Le diazote atmosphérique est ainsi réduit en ammoniaque bioassimilable. Cette fixation biologique de l'azote fournit 140×10^{12} g N/an soit 12% des besoins annuels en azote de la production primaire. Le complément étant fourni par la décomposition et le recyclage de l'azote (Figure 8A) (Rickmefs & Miller, 2005). Ainsi, cette capacité à établir une symbiose avec les Rhizobiacées leur permet via la fixation de l'azote atmosphérique et ainsi de s'émanciper de la richesse naturelle du sol en nitrate et en ammonium. Ainsi, les Légumineuses sont capables de coloniser des substrats relativement pauvres en azote organique, et d'assurer de génération en génération un enrichissement progressif des sols, permettant ainsi la colonisation par d'autres espèces végétales. Les Légumineuses jouent ainsi le rôle d'espèces pionnières ou plus exactement de début de succession (Figure 8B, D).

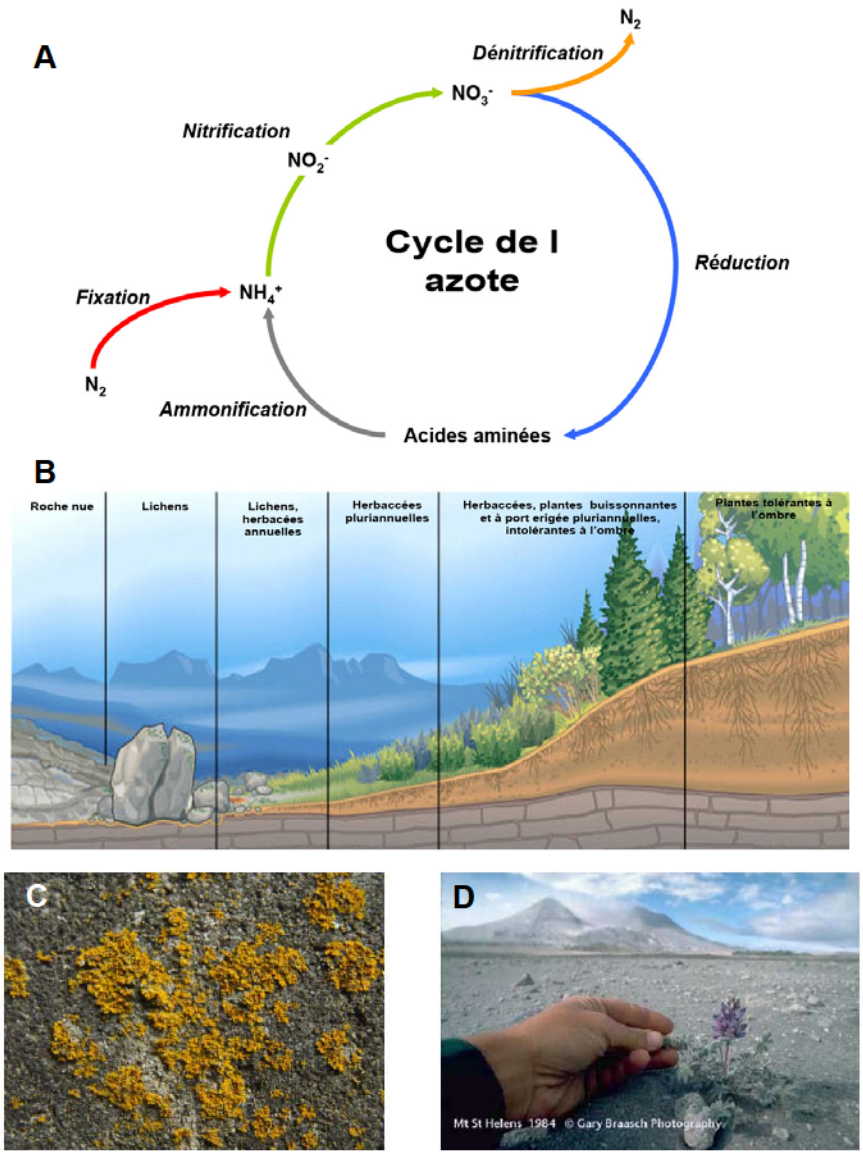


Figure 8 : Importance écologique des Légumineuses

(A) Cycle biologique de l'azote. L'azote est après l'eau le principal facteur limitant pour la croissance végétale. Les 78% de diazote atmosphérique ne sont bioassimilables qu'après leur réduction en ammonium. Cette réduction peut être biologique (diazotrophes libres ou symbiotique) ou abiotique (éclairs), cette dernière étant très minoritaire. Cet ammonium est successivement oxydé par différents organismes et processus biologiques en nitrite (NO_2^-) puis nitrate (NO_3^-), c'est la nitrification. Le nitrate est rapidement réduit lors de la synthèse d'acides aminées assurant la synthèse protéique et à l'anabolisme de composés azotés. La dégradation de ces acides aminées conduits à la réallocation de l'azote biologique sous forme d'ammonium, réinitiant ainsi le cycle de l'azote, c'est l'ammonification. Cependant cette réallocation de l'azote via l'ammonification n'est pas suffisante pour assurer l'autosuffisance du cycle, du fait d'un processus de dénitrification conduisant à oxyder le nitrate en diazote ; d'où la nécessité d'une fixation de l'azote via des organismes diazotrophes. (B) Illustration du processus de succession. La succession est le processus ordonné de remplacement ou succession d'espèces conduisant à la colonisation biologique d'un substrat – de l'argile et de la roche nue suite au retrait d'un glacié à l'établissement d'une forêt d'épicéa (Etude de Glacier Bay, Alaska ; Chapin et al, 1994). Les premières espèces colonisatrices dite pionnières sont principalement des microorganismes autotrophes et des lichens qui conduisent à enrichir le sol en matière organique tout en libérant progressivement les différents éléments minéraux du substrat. Cet enrichissement progressif en matière organique et minérale devient propice à des espèces végétales annuelles (dont les Légumineuses) dont les cycles de vie successifs poursuivent cet enrichissement du substrat. Cette succession d'espèces entre elles, bien que soumis aux aléas est en fait un processus ordonné par 3 principaux traits : la facilitation, l'inhibition et la tolérance entre espèces. Ces multiples réitérations et successions d'espèces conduisent ainsi à produire un habitat structuré comme une forêt avec sa diversité biologique qui l'accompagne. (C) Les Lichens, une symbiose pionnière. (D) Le lupin fut une des premières espèces à recoloniser les abords du Mt St Helens après son éruption en 1980 (Ricklefs & Miller, 2005). Photo prise en 1984.

Figures modifiées d'après : Heller et al, 1993 ; Ricklefs & Miller, 2005

Ainsi, par la symbiose rhizobienne, les Légumineuses enrichissent le sol en azote de 50 millions de tonnes par an (Pislariu et al., 2012). Cette capacité à enrichir le sol en azote pourrait ainsi permettre via la rotation culturale de diminuer l'utilisation d'intrants azotés. Les travaux de Peterson & Russelle, 1991 ont estimé que la rotation culturale de la luzerne (*Medicago sativa*) avec le maïs (*Zea mays*) épargnerait jusqu'à 300 millions de dollars par an à l'économie agraire américaine en achat et épandage d'engrais azotés.

En effet, à l'heure actuelle l'utilisation intensive d'engrais azotés pour assurer des rendements culturaux maximal à une double conséquence : un coût économique important, mais aussi un coût écologique dévastateur comme le montrent des études récentes mettant en évidence le rôle majeur des intrants azotés dans la production de N_2O, un puissant gaz à effet de serre (Good & Beatty, 2011). A l'heure actuelle, si des raisons évidentes de marchés économiques et de sécurité alimentaire empêchent toute diminution des rendements culturaux, rendant les engrais azotés incontournables ; diverses stratégies sont en cours d'élaboration pour pallier à leurs utilisations et donc à leurs conséquences. Ainsi, l'optimisation des PGPB comme bioengrais, ou le développement de Rhizobiacées ou d'Actinobactéries à spectres d'hôte élargie permettant de noduler les céréales sont à l'étude (Beatty & Good, 2011).

II.1.B Phylogénie des Légumineuses

Les Légumineuses sont des plantes Eudicotylédones appartenant à l'ordre des Fabales, ordre appartenant à la famille des Fabacées (Zhu et al., 2005). Les Fabacées sont divisées en trois sous-familles : Caesalpinoideae, les Mimosoideae et les Papilionoideae ou Faboideae. Les Faboideae regroupent la plus grande diversité avec plus de 12 000 espèces de Légumineuses tropicales ou tempérées, dont celles présentant un d'intérêt agronomique majeur comme *Glycine max* (Soja), *Phaseolus vulgaris* (Haricot), *Arachis hypogaea* (Arachide) ou encore *Medicago sativa* (luzerne) (Zhu et al., 2005) (Figure 9). Le caractère monophylétique des

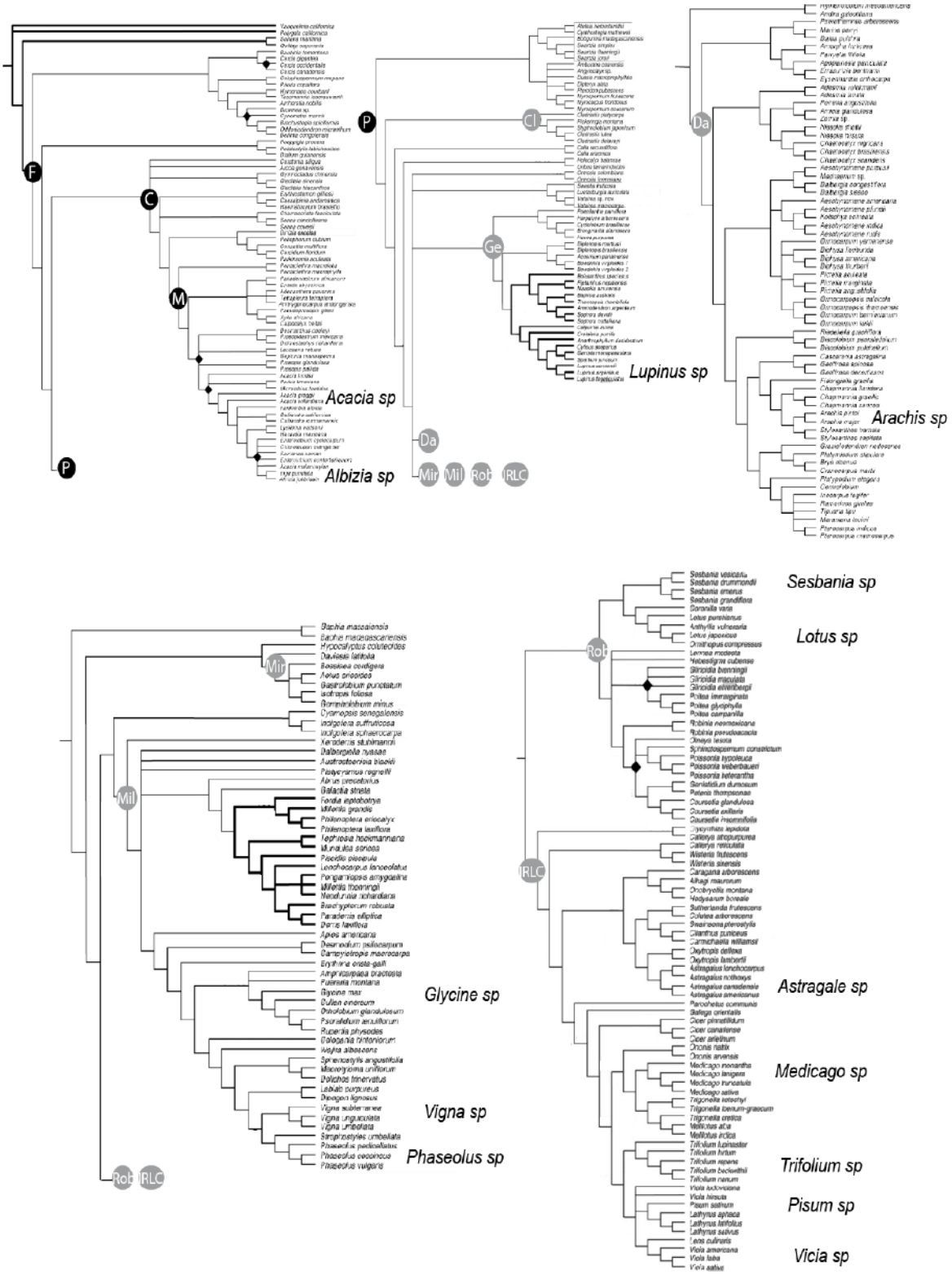


Figure 9 : Phylogénie des Fabacées selon le polymorphisme de gène *matK*

Les Fabacées (F) sont divisées en trois sous-familles : Caesalpinoideae (C), les Mimosoideae (M) et les Papilionoideae (P). Les Papilionoideae sont divisées en 7 clades, les Cladrastis, les Genistoides (Ge), les Dalbergooides (Da), les Mirbelioides (Mir), les Milletioides (Mil), les Robinoides (Rob) et les « Inverted Repeat Lost Clades » (IRLC) qui regroupent la majorité des Légumineuses d'intérêt agronomique.

Figures modifiées d'après : Wojciechowshi et al., 2004

Papilionoideae a clairement été démontré, et les analyses phylogénétiques basées sur les variations de la séquence de la maturase chloroplastique K (*matK*) subdivisent les Papilionoideae en 7 clades (Wojciechowski et al., 2004) dont le clade des IRLC (Inverted Repeat Loss Clades) qui regroupe la majorité des Légumineuses d'intérêt agronomique comme *Pisum* (ex : Pois), *Lens* (ex : Lentilles), *Trifolium* (ex : Trèfle) et *Medicago* (ex : Luzerne) (Cronk et al., 2006).

Les Mimosoideae incluent 77 genres et environ 3 000 espèces principalement en région tropicale et subtropicale comme les genres *Albizia* et *Acacia*, utilisées comme bois de coupe (Young et al., 2011).

Les Caesalpinoideae composés de 162 genres et près de 3 000 espèces sont principalement composés de Légumineuses tropicales comme le caroubier (*Ceratonia siliqua*) ou le tamarinier (*Tamarindus indica*) et sont principalement utilisés comme plantes alimentaires, ornementales ou comme bois de coupe (Young, 2003). Notons que toutes les Légumineuses n'établissent pas une symbiose rhizobienne. En effet, 90% des Papilionoideae et des Mimosoideae établissent une symbiose rhizobienne contre seulement 25% des Caesalpinoideae (Hirsch, 1992).

II.2 LES RHIZIOBIACEES

Le terme *Rhizobium* représente un genre bactérien, appartenant à la famille des Rhizobiaceae. Cependant, le terme rhizobium, dont le pluriel est rhizobia, est également utilisé pour représenter l'ensemble des bactéries symbiotiques capables d'initier une symbiose fixatrice d'azote avec une légumineuse. Contrairement, aux Actinobactéries, les rhizobia sont des bactéries Gram-négatives.

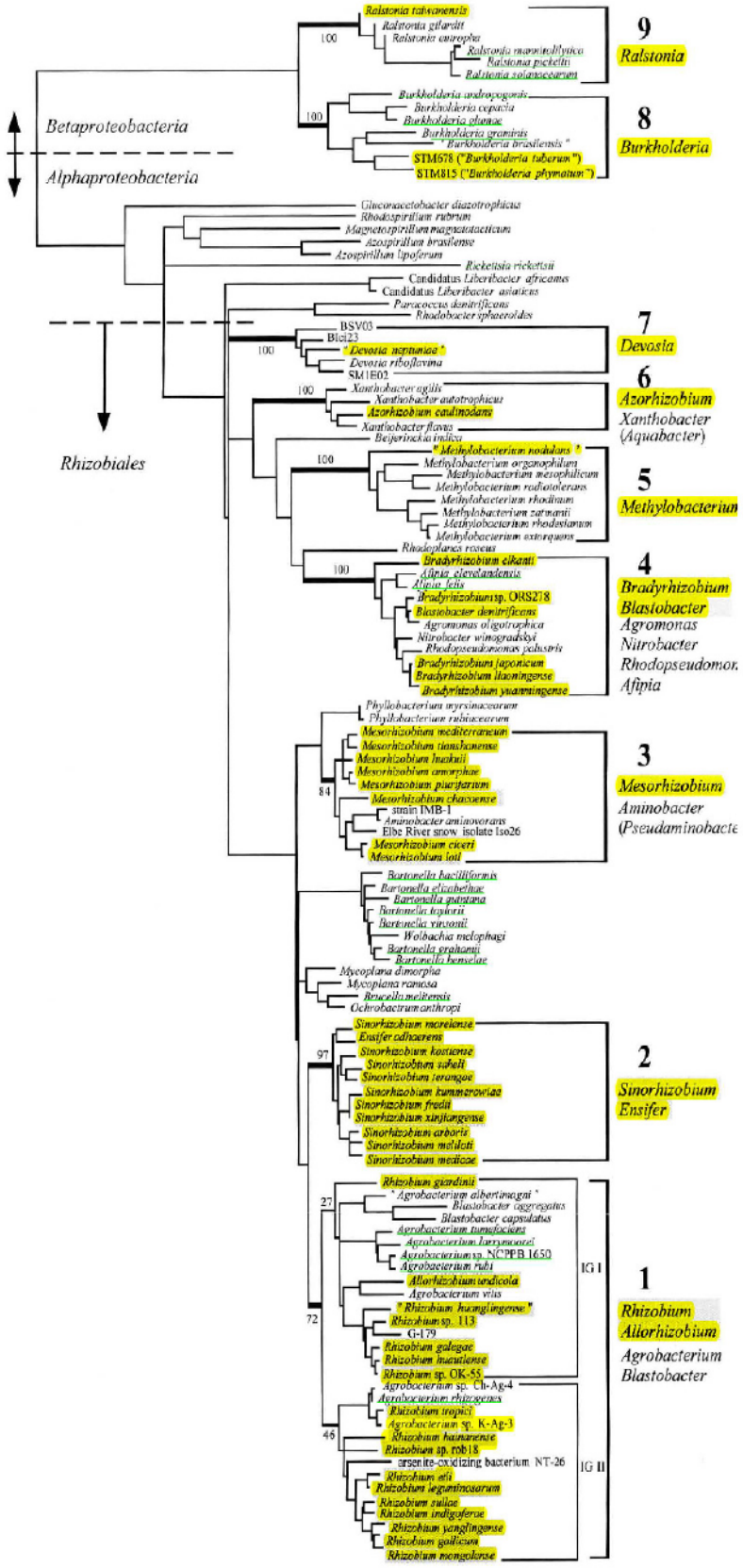


Figure 10 : Phylogénie des Rhizobiacées basée sur le polymorphisme de l'ARN16S
Les Rhizobiacées sont réparties sur deux clades, les α-Protéobactéries et les β-Protéobactéries suivant 9 groupes monophylétiques. Cependant la majorité des rhizobia sont regroupée en 7 groupes monophylétiques : *Rhizobium* et *Allorhizobium*, *Sinorhizobium* et *Ensifer*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Methylorhizobium*, *Azorhizobium* et *Devosia*. Les espèces surlignées en jaunes sont les espèces symbiotiques se différenciant en bactéroïdes en interaction avec les Légumineuses. Soulignées en vert sont les espèces pathogènes animales ou végétales.

Figures modifiées d'après : Sawada et al, 2003

II.2.A Phylogénie des Rhizobiacées

L'analyse phylogénique basée sur les variations de l'ARN ribosomal 16S ont mis en évidence que les 44 espèces et 12 genres ne forment pas en un même groupe, mais plutôt deux clades différents, les α- et β-protéobactéries, subdivisées en 9 groupes monophylétiques (Sawada et al., 2003) (Figure 10). La majorité des Rhizobiacées sont des α-protéobactéries qui regroupent 7 groupes monophylétiques : *Rhizobium* et *Allorhizobium*, *Sinorhizobium* et *Ensifer*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Methylorhizobium*, *Azorhizobium* et *Devosia*. Les β-protéobacteries regroupent les *Burkholderia* et les *Ralstonia*.

Notons que, bien que symbiotiques, certaines rhizobia sont très proches de bactérie phytopathogène comme *Agrobacterium tumefaciens* (α-Protéobactérie) ou *Ralstonia solanacearum* (β-Protéobactérie), mais aussi très proche de bactéries pathogènes pour des espèces animales comme *Brucella meltensis*, une α-Protéobacterie, capable de causer des avortements chez les troupeaux d'ovins et de fortes fièvres chez l'homme (DelVecchio et al., 2002) (Figure 10).

III. LA SYMBIOSE *MEDICAGO TRUNCATULA-SINORHIZOBIUM MELILOTI*

L'étude de *Sinorhizobium meliloti* et de ces hôtes végétaux est un sujet de recherche relativement bien développé. En effet, outre le fait que *S. meliloti* est le symbionte de la luzerne, *Medicago sativa,* et de la légumineuse modèle, *Medicago truncatula*, lors de la symbiose fixatrice d'azote, il est aussi en tant que α-protéobactérie très proche de bactérie pathogène comme *Agrobacterium*, *Ralstonia*, mais aussi *Brucella*. L'étude du processus

d'infection de *M. truncatula* par *S. meliloti* pourrait fournir des gènes candidats pour l'étude des mécanismes pathogènes de ces dernières. De plus, la compréhension du dialogue moléculaire et de la physiologie mise en place entre les deux partenaires symbiotiques au sein de la nodosité pourrait à terme, servir de socle à des programmes d'amélioration variétale pour la sélection et commercialisation de variétés de légumineuses présentant une fixation d'azote optimisée.

Pour développer ce socle de connaissances fondamentales, le modèle *M. truncatula – S. meliloti* présentent de multiples avantages.

III.1 OUTILS GENOMIQUES ET TRANSCRIPTOMIQUES

III.1.A *S. meliloti*

S. meliloti (souche 1021) présente un génome tripartite composé d'un chromosome de 3,65 Mb et de deux mégaplasmides *pSymA* et *pSymB* respectivement de 1,35 et 1,68 Mb. Le séquençage et l'annotation de ce génome composite a pu mettre en évidence que les 3 réplicons contribueraient à des degrés divers à la mise en place de la symbiose rhizobienne. Ainsi le mégaplasmide *pSymA* serait le support génétique principal de l'émergence de la nodulation chez *S. meliloti* (Galibert et al., 2001). 42 % des gènes de *S. meliloti* appartiennent à des familles multigéniques, permettant ainsi la mise en place de nouvelles fonctions adaptatives pour une vie libre dans la rhizosphère, mais aussi symbiotique au sein des tissus végétaux (Galibert et al., 2001). Les duplications géniques les plus récentes seraient en effet liées à la symbiose rhizobienne. Le génome de *S. meliloti* code potentiellement près de 6000 protéines dont les plus larges classes seraient des protéines de transport (12 %) et des protéines régulatrices (6 %). La majorité des gènes liés au métabolisme azoté et à la fixation

d'azote sont codés sur le mégaplasmide *pSymA*. Séquences génomiques disponibles sur le « *Sinorhizobium meliloti* genome browser » (https://iant.toulouse.inra.fr).

Dès 2003, en se basant sur l'annotation du génome de *S. meliloti* (Galibert et al., 2001) des microarrays ont été développées ciblant 6 046 gènes (Ruberg et al., 2003). Cependant, dès 2005, le développement et la mise sur le marché des puces Affymetrix pangénomique ciblant les transcrits spécifiques de *S. meliloti* et des transcrits de *M. truncatula*, a fait de cet outil, l'outil privilégié pour les analyses transcriptomiques. L'ensemble de ces données transcriptomiques sont disponibles sur le site du RhizoGate (Becker et al., 2009).

Le séquençage complet et l'annotation détaillée du génome de *S. meliloti* (Galibert et al., 2001) offre un outil indispensable pour étudier l'importance de *S. meliloti* dans la mise en place de la nodosité, mais aussi sa persistance en tant que symbionte au sein des cellules hôtes végétales.

III.1.B *M. truncatula*

L'espèce la plus communément connue du genre *Medicago* est la luzerne, *Medicago sativa*. Utilisée comme plante fourragère, *M. sativa* est une plante pérenne, allogame présentant un génome tétraploïde. Ces caractéristiques génomiques font que *M. sativa* n'est pas adapté pour l'utilisation d'outils génétiques. A l'inverse *M. truncatula*, est une espèce annuelle, autogame, diploïde, présentant un génome haploïde relativement réduit d'environ 500 Mpb. Ce caractère diploïde rend *M. truncatula* d'avantage compatible pour des analyses par génétique inverse (Cook, 1999). Les travaux présentés dans ce travail de thèse ont été exclusivement réalisés sur cette plante modèle.

III.1.B.1 SEQUENÇAGE ET ANNOTATION GENOMIQUE

Le séquençage et l'annotation de *M. truncatula* réunit à l'heure actuelle un consortium de laboratoires Américains et Européens (Université du Minnesota, le National Center for Genome Resources (NCGR), Boyce Thompson Institute (BTI), J. Craig Venter Institute (JCVI), l'Université de Caroline du Sud, l'INRA-Montpellier, l'ENSAT-Toulouse et la Noble Foundation. La stratégie mise en place pour le séquençage est une approche dite BAC par BAC (Bacterial Artificial Chromosome), épaulée par l'utilisation de cartes génétiques et physiques déjà disponibles (Cannon et al., 2005). En effet, bien que le séquençage de génome par 'shotgun' soit la stratégie la plus souvent privilégiée, l'approche BAC par BAC s'avère être plus pertinente en cas de régions trop fréquemment répétées (Todesco et al., 2008). Cette approche consiste à séquencer les BAC par 'shotgun' puis à les assembler en contigs. Pour lier les contigs, deux approches complémentaires peuvent être mises en place. La première consiste en la mise en place d'une cartographie physique par une approche dite de marche sur le chromosome, pour identifier les clones adjacents parmi la banque de BAC. La deuxième approche, consiste dans un premier temps à ne séquencer que les extrémités de tous les BAC sans *a priori*, créant ainsi une banque d'extrémité de BAC ou banque BES (BAC-Ends Sequences). Puis après, séquençage de chaque BAC, de déterminer par identité de séquence où chaque BAC-ends se positionne sur le BAC. Ce processus peut s'avérer délicat à cause de multiples séquences répétées (Retro-transposons, transposons, séquences virales…). Pour cela des algorithmes informatiques ont été développés pour identifier et masquer ces séquences et limiter ainsi leurs interférences dans l'assemblage (Todesco et al., 2008). A partir de ces séquences, l'annotation du génome est assurée par un autre consortium appelé IMGAG (International Medicago Genome Annotation Group). Ce consortium a développé des algorithmes de prédiction de gènes en utilisant des motifs canoniques et d'annotations automatiques (Cannon et al., 2005). La version actuellement publiée du génome de *M. truncatula* – v3.5- disponible en ligne depuis l'été 2010,

fourni près de 94 % des gènes de *M. truncatula* (Young et al., 2011). Récemment une préversion –v4.0- du génome est disponible exclusivement sur le site du Craig Venter Institute.

III.1.B.2 GENERATION DE BANQUE DE MUTANTS

Du fait d'un génome réduit et de la mise en place de protocole de transformation et de croisement, *M. truncatula* a vite émergé parmi les modèles de génétique fonctionnelle chez les Légumineuses (Cook, 1999). Ainsi, afin de caractériser génétiquement les divers processus biologiques mis en place lors du cycle de vie de *M. truncatula* : germination, floraison, organogénèse, interactions abiotiques et biotiques dont la symbiose, différentes banques de mutants ont été générées.

La mutagenèse chimique par traitements EMS (Ethyl Methane Sulfonate) conduit à générer une forte densité de mutation ponctuelle dans l'ensemble du génome, conduisant à la génération d'une population de lignées mutantes, dont les phénotypes viables sont répertoriés. Ensuite, le séquençage et l'annotation du génome ont permis la mise en œuvre de stratégie par TILLING (Targeting Induced Local Lesions in Genome), permettant d'établir la cartographie des mutations sur l'ensemble du génome et d'établir ainsi l'ensemble des gènes potentiellement mutés dans chaque lignée composant la banque (Le Signor et al., 2009) (Figure 11). De plus, l'utilisation du polymorphisme des différents écotypes de *M. truncatula* permet des analyses de génétiques fonctionnelles, et ce, sans mutagenèse (EcoTILLING). D'autres banques de mutants générées par rayonnement γ ou fast-neutron sont disponibles (Sagan et al., 1995; Starker et al., 2006).

En plus des banques de mutations ponctuelles sont présentes dans des banques de mutants insertionnels. En effet, la maitrise de la culture *in vitro* ainsi que de la transformation de *M. truncatula* par *Agrobacterium tumefaciens* permet la génération de banques insertionnelles de T-DNA (d'Erfurth et al., 2003), mais aussi d'élément génétique mobile que sont les rétrotransposons (Tadege et al., 2008). Cette dernière stratégie vise à transformer *M.*

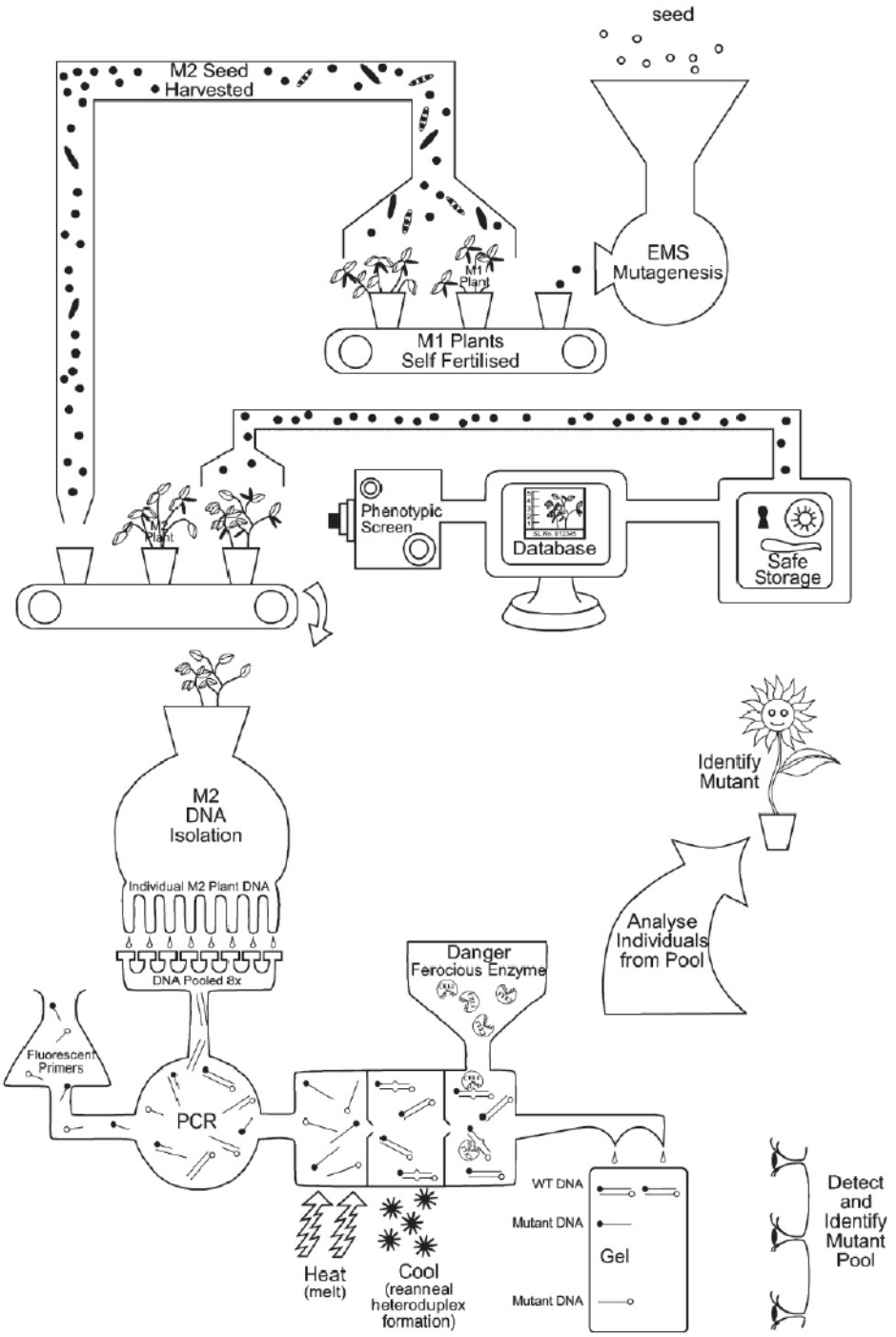


Figure 11 : Processus de « The TILLING machine »
Les graines sauvages subissent un traitement EMS appropriées puis elles sont mises à germer générant ainsi la génération M1. Les plantes sont ensuite autofécondées. La génération M2 ainsi produite est ensuite criblée pour le phénotype recherché et les graines stockés. Les lignées d'intérêt sont ensuite génotypées par lot pour de raison d'efficacité. Les ADN génomiques de différentes plantes sont mises en communs puis une réaction PCR est réalisée à l'aide d'amorces marquées spécifiques de la région génomique d'intérêt (~1kb). Les produits PCR dénaturés et réhybridés pour induire la formation d'éventuel hétéroduplex induit par une mutation ponctuelle. Ces hétéroduplex sont ensuite digérés avec l'enzyme CLE1 qui ne clive qu'en présence d'un mésappariement. Ce clivage visualisé par électrophorèse.

Figures modifiées d'après : Wang et al., 2012

truncatula avec le rétrotransposon de tabac *Tnt1* conduisant à la génération de 7 600 lignées indépendantes représentant plus 190 000 événements d'insertions sur l'ensemble du génome (Tadege et al., 2008) (Figure 12). 30% des lignées ainsi générées présentent un phénotype visible sur des caractères morphologiques (par ex. : nanisme), développementaux (comme l'absence de méristème apical aérien) ou symbiotiques (non nodulant, supernodulant, non fixateur) (Pislariu et al., 2012; Tadege et al., 2008).

L'utilisation de ces banques permet ainsi la mise en place rapide d'études génétiques directes (« forward genetics ») permettant ainsi de disséquer les voies géniques impliquées dans une multitude de processus développementaux ou symbiotiques.

III.1.B.3 LES OUTILS DE TRANSCRIPTOMIQUES

De multiples banques d'ADNc ont été générées afin d'identifier les gènes exprimés lors notamment de la symbiose rhizobienne (Gyorgyey et al., 2000; Journet et al., 2002). En parallèle, afin de capturer d'une part les transcrits spécifiques à une condition biologique test, mais aussi les transcrits faiblement exprimés, des banques d'ADNc soustractives ont été mises en place via la stratégie de SSH (Substitutive Substractive Hybridization) (Diatchenko et al., 1999). Bien que novatrice, cette technique a le désavantage de générer des ADNc plus courts que lors de la génération de banque ADNc classique, obligeant ainsi à des approches complémentaires de RACE PCR pour obtenir les séquences des extrémités 5' et 3' manquantes.

A l'heure actuelle, l'ensemble des EST disponibles sur *M. truncatula* sont regroupées dans deux bases de données : MENS, Medicago EST Navigation System, (Journet et al., 2002) et TIGR-GI database (The Institute of Genomic Research-Gene Index) (Childs et al., 2007) qui référence également les ESTs capturées chez divers organismes Eucaryotes uni- ou pluricellulaires, végétaux ou animaux.

Ces ESTs ont également servi de sondes pour la confection de macro- puis de microarrays dédiées (Kuster et al., 2007). Dès 2005, la société Affymetrix GeneChip a commencé à développer à moindre coût une puce pangénomique de 61 200 sondes incluant

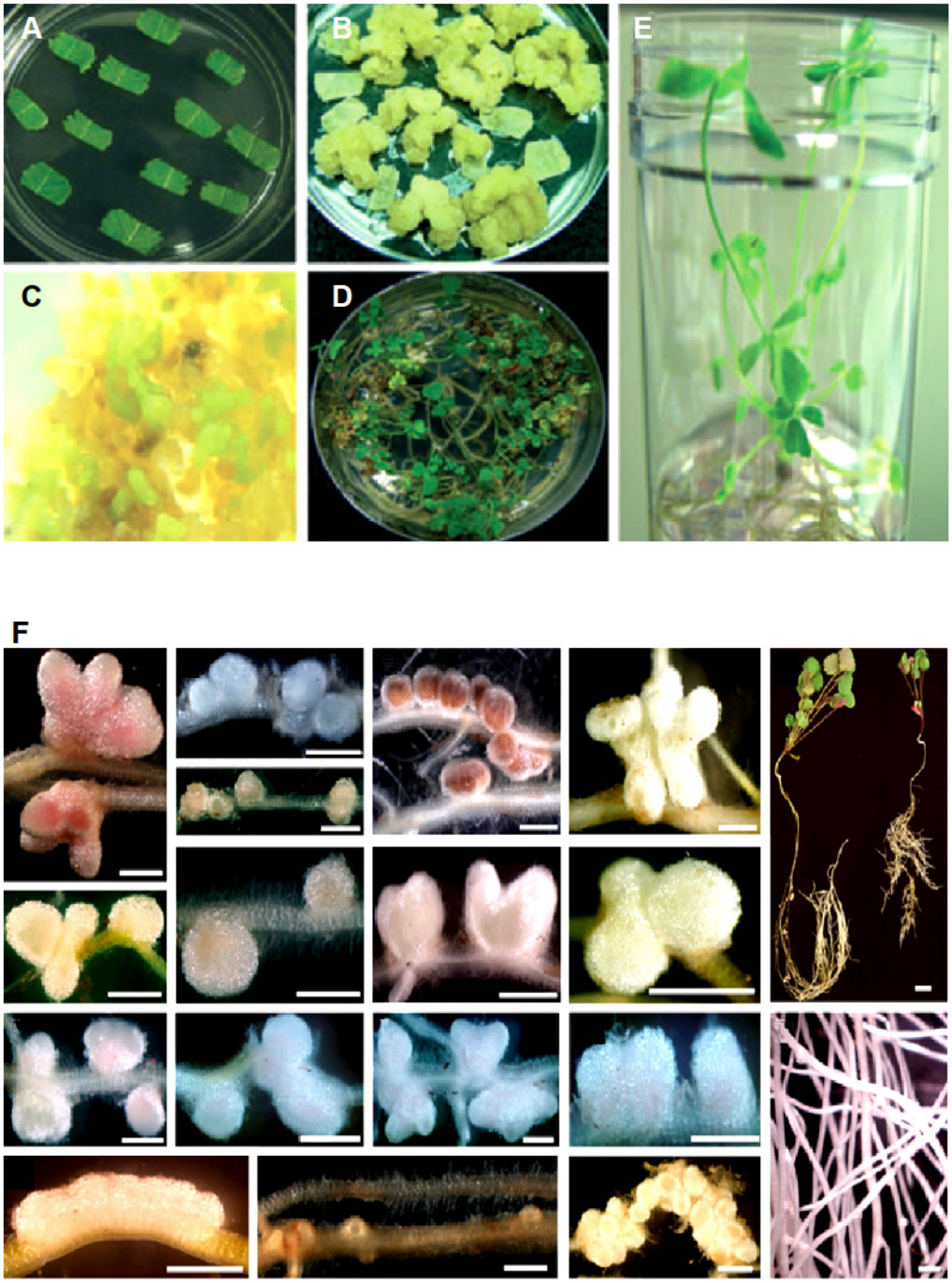


Figure 12 : Banque de mutants insertionnels *Tnt1* chez *M. truncatula*
(A-E) Génération de lignées insertionnelles *Tnt1* chez *M. truncatula*. (A) Des explants foliaires de *M. truncatula* sont mises en présence d'une solution d'*Agrobacterium tumefaciens* porteur d'un vecteur binaire contenant le rétrotransposon *Tnt1*. (B) Les explants sont ensuite mis en culture *in vitro* pour obtenir des cals (4-7 semaines). (C-E) Les cals différenciant des embryons somatiques qui sont prélevés et mis en culture *in vitro* pour régénérer une lignée transgénique stable. Chaque plante représentant une lignée unique est ensuite mise en culture en sol. Le ou les insertions de *Tnt1* se font entre les étapes A et B. (F) Exemple de lignées *Tnt1* mutantes présentant des phénotypes altérés de nodulation. Echelle : 1 mm ou 1cm.

Figures modifiées d'après : Tadege et al., 2008 ; Pislariu et al., 2012

l'ensemble des transcrits présents dans les banques d'EST de *M. truncatula*, mais aussi *S. meliloti*. Associé à cet outil d'analyse transcriptomique, la fondation Noble en collaboration avec l'ensemble de la communauté scientifique a développé une base de données référençant la majorité les données d'expression issues de ces microarrays accessibles publiquement au travers du Medicago Gene Atlas (Benedito et al., 2008).

A l'heure actuelle, le développement de séquençage à haut débit offre de nouvelles méthodes pour l'analyse des transcriptomes, et ce avec une plus grande sensibilité (Boscari et al., 2012). Ces approches permettent et permettront l'identification de nouveau transcrits offrant ainsi de nouvelles perspectives sur les études transcriptomiques assurant ainsi une caractérisation encore plus fine des réseaux de gènes soutenant la mise en place, le maintien puis la rupture de la symbiose, et ce aussi en réponse aux variations de l'environnement.

L'ensemble de ces données et outils génomiques ou transcriptomiques développés chez les deux partenaires symbiotiques *M. truncatula* et *S. meliloti* offrent de nombreuses perspectives pour la mise en place d'étude de génétiques fonctionnelles afin de caractériser les processus biologiques conduisant à l'organogénèse, le fonctionnement, l'homéostasie puis enfin à la sénescence de la nodosité.

IV. MISE EN PLACE DE LA SYMBIOSE *M. TRUNCATULA / S. MELILOTI*

La mise en place d'une symbiose rhizobienne fonctionnelle nécessite l'accomplissement de trois étapes séquentielles : la reconnaissance de chacun des partenaires par la mise en place d'un dialogue moléculaire ; l'infection des tissus végétaux par *S. meliloti* et la mise en place d'un primordium nodositaire ; puis l'organogénèse *de novo* de la nodosité, qui va créer l'environnement nécessaire pour la mise en place effective de la fixation d'azote.

IV.1 DIALOGUE MOLECULAIRE ET RECONNAISSANCE DES PARTENAIRES

Les plantes sécrètent dans la rhizosphère des exsudats racinaires de natures diverses : glucides, acides organiques, acides aminés, vitamines et dérivées phénoliques qui tendent à moduler leur environnement tellurique dont notamment la flore microbienne. Parmi ces exsudats racinaires, *M. truncatula* sécrète des flavonoïdes (Perret et al., 2000) (Figure 13). Ces flavonoïdes, une fois perçus par les rhizobia, vont induire l'expression de gènes cruciaux pour la nodulation que sont les gènes *nod*, *nol* et *noe*, mais aussi exercer un chimiotactisme positif, attirant les bactéries vers la rhizoplane (Perret et al., 2000).

Cette capacité d'induction dépend d'une part de la nature des flavonoïdes sécrétés, mais aussi du *Rhizobium*, conditionnant ainsi le spectre d'hôte. Chez le symbionte bactérien, ces flavonoïdes vont se complexer à un récepteur cytoplasmique de type LysR appelé NodD. L'interaction de NodD avec des flavonoïdes compatibles va induire un changement de conformation de NodD qui va alors ce lier à un élément cis-régulateur en amont des opérons *nod* appelée « nodbox ». La « nodbox » consiste en un motif palindromique conservé de 49 pb, fait de la répétition des séquences ATC-N9-GAT ou T-N11-A. Ainsi NodD va induire l'expression des opérons *nod* dont les enzymes vont assurer, avec les gènes *nol* et *noe* la synthèse et la maturation de composés lipo-chito-oligosaccharidiques (LCO) appelée facteurs Nod (Perret et al., 2000).

Ces facteurs Nod sont des LCO constitués d'une succession de 4 à 5 N-acétyl-D-glucosamines reliés par une liaison covalente en β(1-4) et d'une chaine d'acides gras aliphatiques (Oldroyd & Downie, 2004). Une fois produit ce squelette de LCO est, selon les espèces de rhizobium, décoré par l'ajout de divers groupements méthyle, acétyle, sulfuryle,

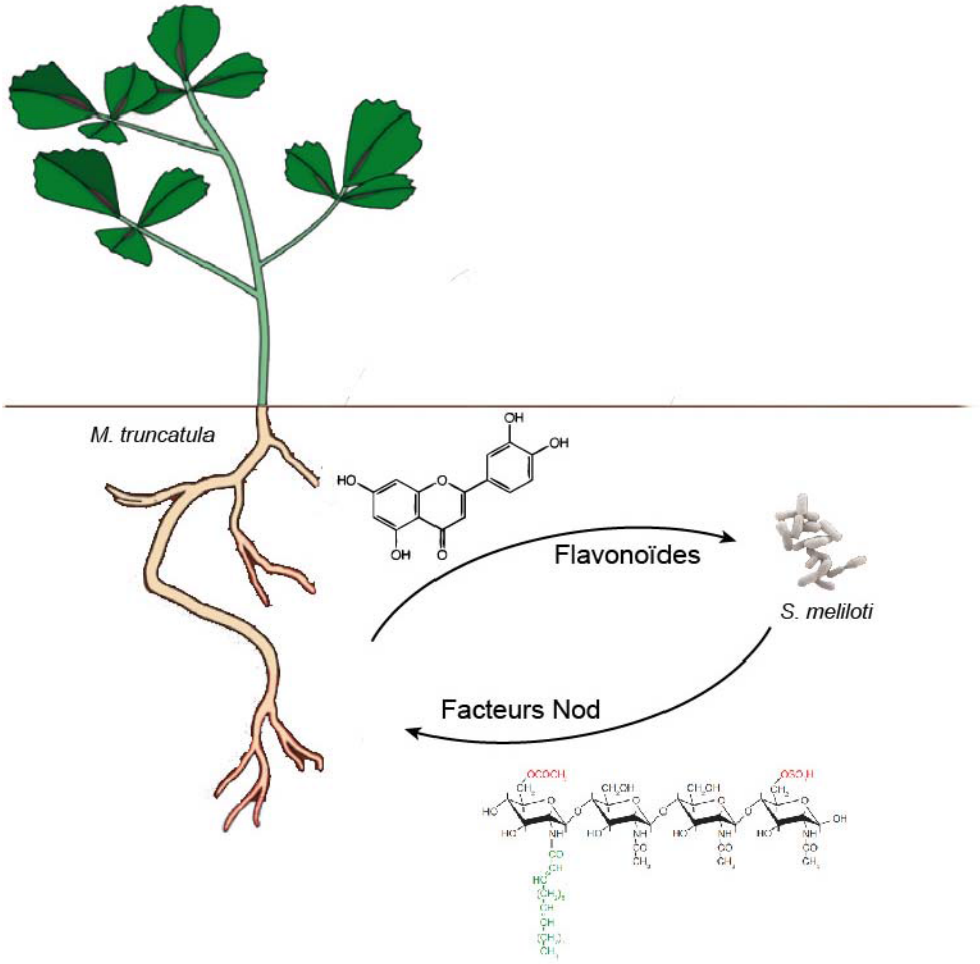


Figure 13 : Dialogue moléculaire entre les deux partenaires symbiotiques
La plante hôte, ici *M. truncatula*, sécrète parmi ses exsudats racinaires des flavonoïdes, qui vont être perçue par *S. meliloti* . Ces flavonoïdes exercent un chimiotactisme positif de la bactérie vers la plante et induisent la production et la sécrétion de facteurs Nod. Ces facteurs Nod vont être perçus par *M. truncatula* qui en retour augmente la production de flavonoïdes. C'est un exemple de rétrocontrôle positif.

carbonyle, fucosyle ou encore arabinosyle. Ces décorations participent d'une part à définir le spectre d'hôte du rhizobium, mais elles participeraient également à la stabilité des facteurs Nod dans la rhizosphère (Oldroyd & Downie, 2008; Perret et al., 2000). Ainsi en réponse aux flavonoïdes végétaux, les rhizobia vont produire et sécréter des facteurs Nod qui une fois reconnus par la plante conduiront à l'initiation de l'organogénèse de la nodosité.

IV.2 PERCEPTION DES FACTEURS NOD ET TRANSDUCTION DU SIGNAL

La plante hôte est très sensible aux facteurs Nod, qu'elle perçoit jusqu'à de très faibles concentrations (10^{-4} nM) (Gough & Cullimore, 2011). De nombreuses études sur les plantes modèles *Lotus japonicus* et *M. truncatula,* ont permis de caractériser les mécanismes de perception et de transduction du signal en réponse aux facteurs Nod (Crespi & Frugier, 2008; Den Herder & Parniske, 2009; Oldroyd & Downie, 2008) (Figure 14). La perception par la plante hôte des facteurs Nod est assurée par un récepteur kinase de type LysM (Arrighi et al., 2006; Oldroyd & Downie, 2008), présentant au niveau extracellulaire un domaine LysM assurant la liaison aux facteurs Nod et un domaine kinase cytosolique. Caractérisé comme un hétérodimère chez *L. japonicum* NFR5-NFR1, le récepteur aux facteurs Nod serait double chez *M. truncatula*. En effet, *Mt*NFP, orthologue de *Lj*NFR5 chez *M. truncatula*, peut se dimériser avec *Mt*LYK3 et *Mt*LYK4 qui présentent une même affinité pour les facteurs Nod, mais présentent des domaines kinases différents suggérant l'activation en aval de différentes protéines cibles (Arrighi et al., 2006). En réponse aux facteurs Nod, le récepteur LysM et DMI2, un récepteur kinase de type LRR (Leucine Rich Repeat), active une cascade de signalisation impliquant une activité phospholipase C et D, qui conduit à l'activation des canaux potassiques DMI1 et POLLUX présents sur l'enveloppe nucléaire (Ane et al., 2004; Charpentier et al., 2008) ainsi que les nucléoporines NUP85, NUP1333 et NEMA (Groth et al., 2010; Kanamori et al., 2006; Saito et al., 2007), dont l'activation est nécessaire à la mise en place d'oscillation calcique

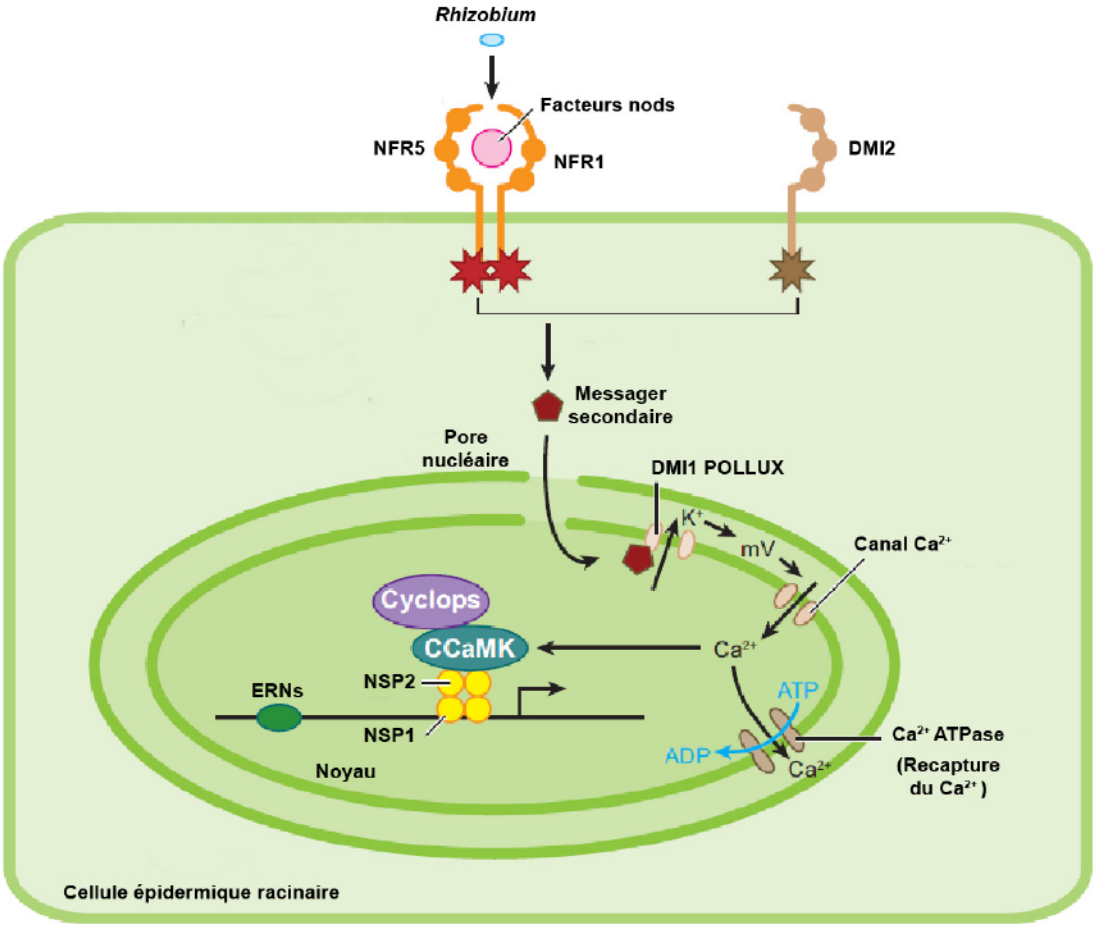


Figure 14 : Schéma simplifié de la voie de transduction du signal suite à la perception des facteurs Nod
La perception des facteurs Nod par des récepteurs membranaires conduisent à la mise en place d'oscillation calcique nucléaire assurant la transcription des gènes impliqués dans l'organogénèse de la nodosité.

Figures modifiées d'après : Oldroyd & Downie, 2008

(Capoen et al., 2011). Ces oscillations calciques vont conduire à l'activation d'une Ca^{2+} calmoduline kinase CCaMK nucléaire, DMI3 (Mitra et al., 2004). DMI3, est constituée d'un domaine kinase et d'un domaine de liaison au Ca^{2+}, présentant une forte homologie de séquence avec les CaMK-II animales, qui ont la capacité de s'autophosphoryler progressivement après chaque oscillation calcique (Oldroyd & Downie, 2008) (Figure 14). DMI3 en interaction avec la protéine CYCLOPS/IPD3 (Yano et al., 2008) va induire conjointement avec différents facteurs de transcription (NSP1, NSP2, NIN, ERN1, ERN2) (Cerri et al., 2012; Oldroyd & Downie, 2008) la transcription de nodulines précoces, la dédifférenciation des cellules corticales et par mitoses successives à la mise en place du primordium nodositaire initiant ainsi l'organogénèse de la nodosité (Crespi & Frugier, 2008).

IV.3 PROCESSUS D'INFECTION RHIZOBIENNE

IV.3.A L'adhésion aux poils absorbants

Pour mettre en place une symbiose avec la plante hôte, les rhizobia doivent traverser les tissus racinaires et être internalisés spécifiquement dans les cellules du primordium nodositaire. Pour cela, parallèlement au dialogue moléculaire initié entre les deux partenaires, et attiré par le chimiotactisme positif des flavonoïdes, les rhizobia vont adhérer sur les poils absorbants. Cette adhésion est assurée par la sécrétion de rhicadhésines (Rhizobial calcium dependent surface protein) bactériennes (Smit et al, 1992) et par la sécrétion par la plante de lectines, qui ont la capacité de lier les oligosaccharides présents notamment sur les parois du *Rhizobium* comme les EPS et LPS respectivement exo et lipopolysaccharide de surface (Laus et al., 2006) (Figure 15). Laus et coll, (2006) proposent que l'importance des rhicadhésines et des lectines végétales varieraient selon le pH de la rhizosphère qui conditionne la disponibilité du calcium sous forme soluble, notamment celui des parois du *Rhizobium*. En conditions alcalines douces (pH 5.6), le calcium se solubilise des parois du rhizobium libérant les rhicadhésines des

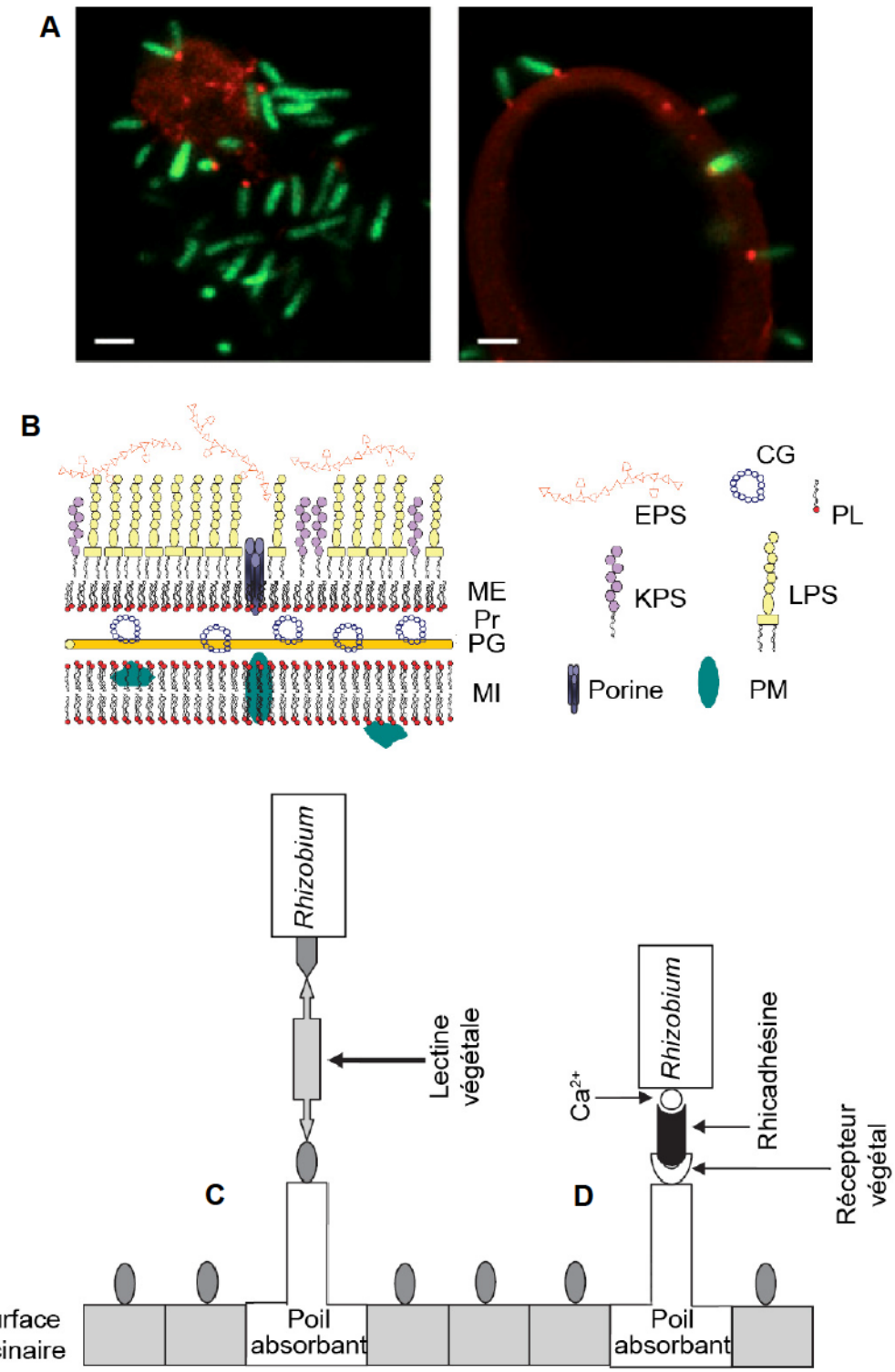


Figure 15 : Adhésion des *rhizobia* aux poils absorbants

(A) Attachement de *R. leguminosarum* sur des poils absorbants de *Vicia sativa* (Vesce). Cette souche de *Rhizobium* exprime la GFP. Les racines et *rhizobia* ont été incubés en présence de lectine de pois marqué avec une rhodamine (rouge). Le marquage rouge en pointillé montre bien l'accumulation de lectine au niveau du point d'adhésion. Echelle : 3µm (B) Représentation schématique de la surface des *rhizobia* et des polysaccharides de surface potentiellement impliqués dans l'attachement du *Rhizobium* aux poils absorbants. ME : membrane externe ; MI : membrane interne ; PG ; peptidoglycane ; Pr : périplasme ; EPS : exopolysaccharide de surface ; LPS ; lipopolysaccharide de surface ; KPS : antigène K (polysaccharide de la capsule) ; GC : glucane cyclique ; PL : phospholipide ; PM : protéine membranaire. (C) Modèle d'adhésion médié par les lectines végétales reconnaissant certains antigènes bactériens, comme des polysaccharides de surface liant le *rhizobium* au poil absorbant. (D) Modèle d'adhésion médié par les rhicadhésines bactériennes. Ces rhicadhésines présentent un site de liaison pour un récepteur protéique racinaire et un second assurant l'ancrage calcium-dépendent au *Rhizobium*.

Figures modifiées d'après : Rodriguez-Navarro et al., 2007; Laus et al., 2006

bactéries. Alors que dans ces conditions, les lectines végétales restent insolubles et donc liées à la paroi du poil absorbant assurant ainsi l'attachement des rhizobia. L'inverse se produit à un pH plus neutre avec la solubilisation des lectines et l'insolubilité des rhicadhésines qui assurent dans ces conditions l'adhésion de la bactérie aux poils absorbant (Figure 15A).

IV.3.B Déformation des poils absorbants en réponse aux rhizobia

Sous l'influence des facteurs Nod, l'ensemble des poils absorbants ne se comporte pas de manière similaire selon leur stade de croissance. Certaines régions pilifères ne présentent aucune déformation des poils absorbants, alors que d'autres présentent des renflements, ondulations et l'apparition d'une structure caractéristique de la symbiose, la crosse de berger (Gage, 2004) (Figure 16B).

Les poils absorbants se différencient suite à une croissance polarisée des cellules épidermiques racinaires. Cette croissance est assurée par un flux vésiculaire polarisé qui lors de sa fusion avec la membrane plasmique, apporte les phospholipides pour l'expansion de la membrane plasmique et les composés pecto-cellulosique de la paroi. Cet exocytose s'effectue à l'extrémité du poil absorbant dans une zone dite claires car dépourvue d'organites (Sieberer & Emons, 2000). Ainsi selon le stade de croissance, 3 types de poils absorbants se distinguent (Figure 16A) :

Les poils absorbants de type I, sont en croissance rapide (0,8-1,4 µm/min, *ex vivo*, à température ambiante). Le noyau n'est plus en position centrale, mais périphérique et migre comme la vacuole qui s'élargit lors la progression vers l'extrémité subapicale du poil absorbant. Les flux cytoplasmiques sont très rapides avec une vitesse de déplacement des organites de 8 à 14 µm/s.

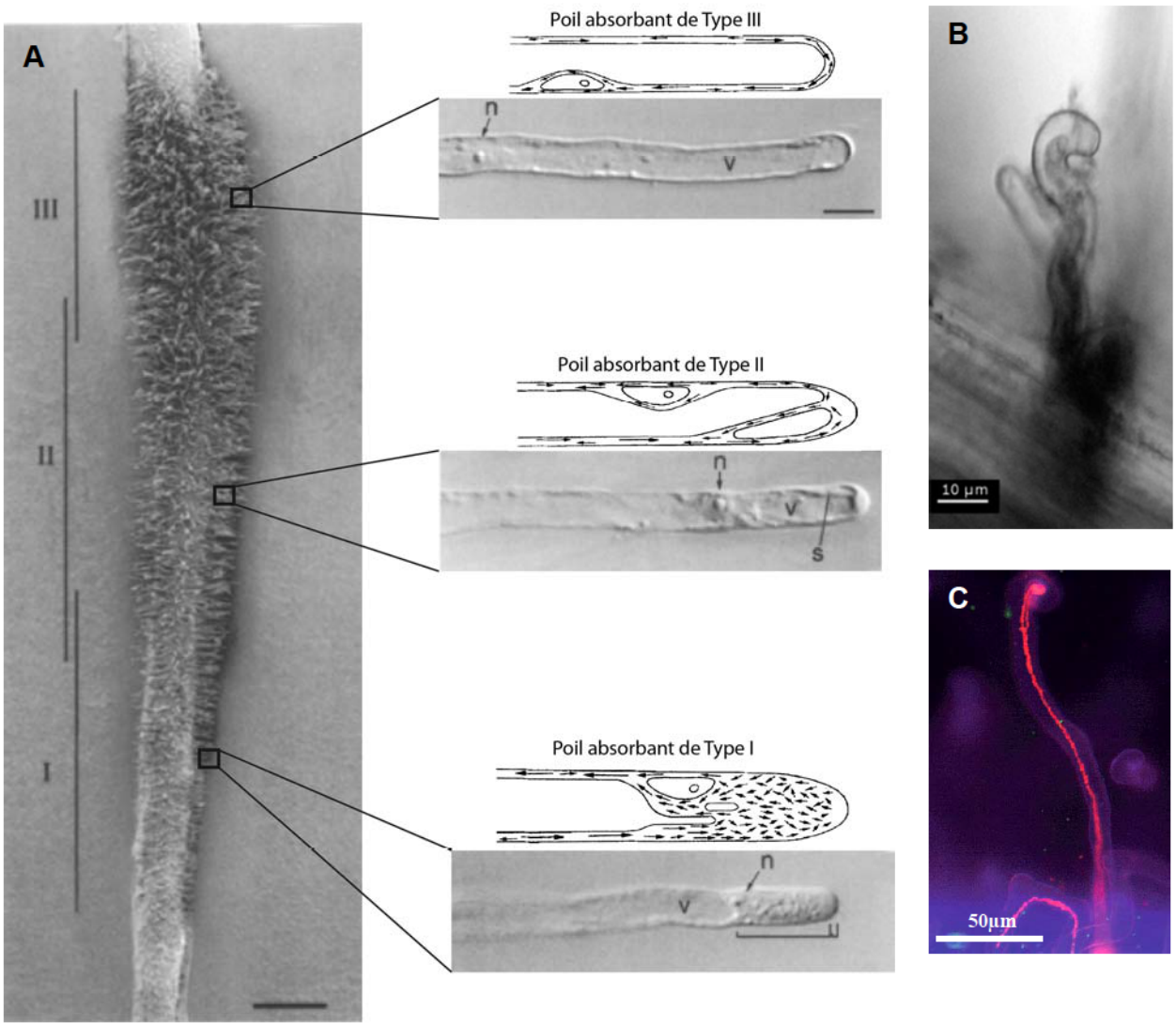


Figure 16 : Croissance et déformation des poils absorbants en réponse aux facteurs Nod
Trois stades de croissance des poils absorbants ont été caractérisés en fonction de leur vitesse de croissance *ex vivo*, de la position de la vacuole par rapport à l'apex, mais également sur la vitesse du flux cytoplasmique (A). Echelle : 1mm. Seuls les poils absorbants de type II sont sensibles aux facteurs Nod des *rhizobia* et induisent la formation de structures en crosse de berger, qui emprisonnant les bactéries au sein d'une poche d'infection, de laquelle s'initie la croissance du cordon d'infection (flèche) (B). Poils absorbants formant une struture en crosse de berger après inoculation avec *S. meliloti*. Le cordon d'infection est également visible. (C). Cordon d'infection au sein d'un poil absorbant contenant des bactéries exprimant constitutivement la DsRED.

Figures modifiées d'après : Sieber & Emons, 2000, Rakocevic et al., 2009 ; Gage, 2004

Les poils absorbants de type II, sont en phase terminale de croissance. Ce processus est progressif durant lequel le noyau cesse sa progression apicale et une vacuolarisation progressive de l'apex se met en place. Progressivement les flux cytoplasmiques ralentissent. C'est à ce stade que les poils absorbants sont sensibles aux facteurs Nod.

Les poils absorbants de type III, ont terminé leur croissance polarisée. Ils se composent d'une large vacuole centrale et d'une fine couche cytoplasmique avec un noyau de position variable avec un flux cytoplasmique circulaire.

Seuls les poils absorbants en stade II réagiront aux facteurs Nod. L'absence de déformation des poils absorbants de type III peut s'expliquer par la présence de la paroi cellulaire tout au long du poil absorbant et par l'arrêt de la machinerie de croissance. A l'inverse, la croissance rapide et polarisée des poils absorbants de type I, limiterait également les déformations en réponse aux facteurs Nod (Lhuissier et al., 2001).

Ainsi, après attachement des rhizobia aux poils absorbants, celui-ci en réponse aux facteurs Nod, se courbent en une structure de crosse de berger, emprisonnant les bactéries dans une poche dite d'infection, à partir de laquelle va s'initier la progression des rhizobia au sein de la plante par une structure tubulaire, le cordon d'infection (Figure 16C).

IV.3.C L'infection *rhizobienne*

Enfermées dans la poche d'infection, les divisions successives des rhizobia créent une force de pression capable de contrer la pression de turgescence du poil absorbant ce qui permet d'initier, après affaiblissement local de la paroi du poil absorbant, l'infection des tissus du végétal (Brewin, 2004).

IV.3.C.1 IMPORTANCE DE LA PLANTE HOTE DANS LA MISE EN PLACE DU CORDON D'INFECTION

La paroi du cordon d'infection est en continuité avec celle du poil absorbant, mais aussi de même composition: polymères de cellulose, xyloglycanes et pectines estérifiées et non estérifiées. De même, dans le lumen des cordons d'infection, la matrice pariétale contient des glycoprotéines extracellulaires présentent, au niveau apoplastique, sur la paroi de toutes cellules végétales (Rae et al., 1992; Rae & Perotto, 1991). Parmi ces glycoprotéines pariétales se trouvent des extensines. Les extensines sont des glycoprotéines riches en hydroxyproline (HRGPs) et participent à la synthèse et rigidité de la paroi. En effet, ces HRGP sont capables dans un environnement oxydant de se lier entre elles par peroxydation, assurant ainsi le pontage des polysaccharides au sein de la paroi provoquant ainsi sa rigidité (Cassab, 1998). Au sein du cordon d'infection, la présence d'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ont été observés chez *M. sativa* (Santos et al., 2001), et s'avèrent indispensables à la mise en place de la symbiose (Jamet et al., 2007) (Figure 17). Cette peroxydation de glycoprotéines en présence d'H_2O_2 assurerait une rigidification de la matrice du cordon d'infection créant une force mécanique de poussée qui conjointement à la poussé due à la croissance des rhizobia favorise l'expansion basipète du cordon d'infection vers la racine.

IV.3.C.2 IMPORTANCE DU RHIZOBIUM *DANS LA MISE EN PLACE DU CORDON D'INFECTION*

Les *rhizobia* présentent à leurs surfaces des exopolysaccharides (EPS). Cinq types d'EPS ont été caractérisés lors de la symbiose dont 3 sont impliqués dans l'extension du cordon d'infection, les EPS I, EPS II et l'antigène K (KPS) (Figure 18).

Le succinoglycane (EPSI) a été étudié au travers des mutants *exo* de *S. meliloti* déficients pour la production d'EPSI. Ces mutants *exo* ne peuvent pas former de cordons d'infection, conduisant à la formation de nodosité contenant peu ou pas de bactéroïdes (Gage, 2004) (Figure 18A-D). Cependant, ce phénotype *exo* peut être complémenté par l'ajout de faible quantité de

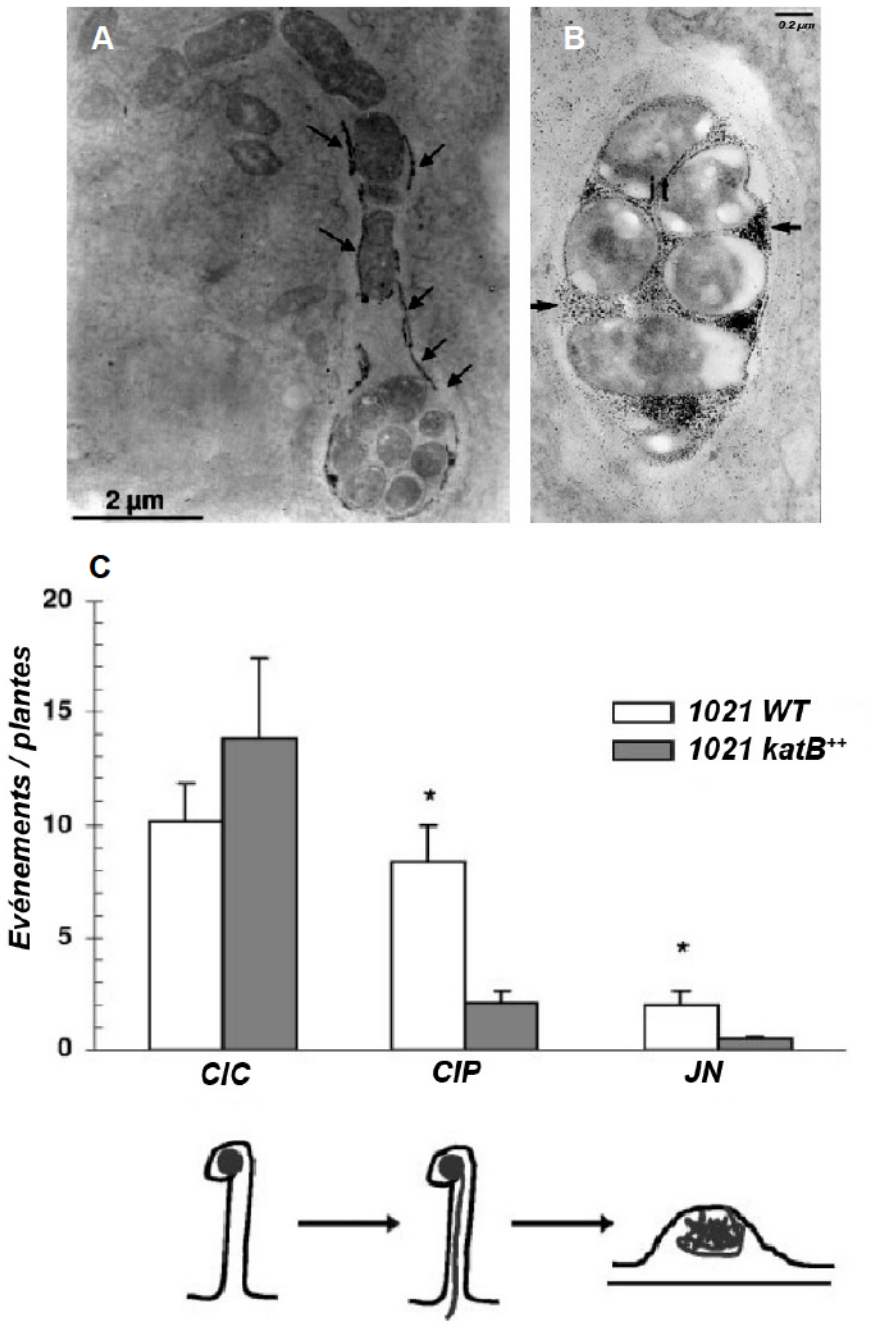


Figure 17 : Peroxyde d'hydrogène et croissance du poil absorbant
(A-B) Détection de l'H_2O_2 au niveau du cordon d'infection (coupe longitudinale (A) et transversale (B)) par coloration au chlorure de cérium qui en présence d'H_2O_2 forme un précipité dense aux électrons. (C) Nombre d'événements d'infection 5 jours après inoculation avec *S. meliloti* 1021 WT ou *katB*$^{++}$. CIC : cordon d'infection colonisé ; CIP : cordon d'infection prolongé ; JN : jeune nodosité « bumps ». Signifiance : test t de Student (* : $p<0.05$).

Figures modifiées d'après : Santos et al, 2000 ; Jamet et al, 2007

succinoglycane, ce qui suggère que le rôle des EPSI dans la formation du cordon d'infection n'est probablement pas structurel, mais d'avantage signalétique (Gage, 2004; Gonzalez et al., 1996b; Urzainqui & Walker, 1992).

Les EPSII participent également à l'infection de la plante hôte (Gonzalez et al., 1996a) consistent en de courts polymères (15-20 sous unités) de galactose-glucose décorés de groupement acétyl et pyruvyl (Gonzalez et al., 1996a; Pellock et al., 2000). La forte production d'EPSII est capable de palier à la déficience en succinoglycane des mutants *exo* (Gonzalez et al, 1996 ; Pellock et al, 2000) suggérant qu'à l'instar des EPSI, les EPSII assuraient également un rôle de signalisation dans la formation du cordon d'infection (Figure 18E).

Le rôle des KPS dans l'établissement de la symbiose reste encore mal caractérisé du fait de l'absence de gènes spécifiquement impliqués dans leurs biosynthèses. En effet, ils s'avèrent être également impliqués dans la voie de biosynthèse des EPSI et II (Fraysse et al., 2003). Cependant, l'utilisation de la souche *Rm41*, qui synthétise du succinoglycane et de l'antigène K, et plus particulièrement la comparaison de deux mutants invalidés ou non pour l'antigène K, met en évidence son rôle dans la formation et l'extension du cordon d'infection (Pellock et al., 2000) (Figure 18F).

Le rôle signal de ces EPS assurerait donc la formation et la progression du cordon, d'infection, mais aussi la modulation des défenses de la plante (Fraysse et al., 2003). Cependant, le mécanisme moléculaire sous-jacent n'a pas encore été caractérisé (Gage, 2004).

IV.3.D EXTENSION DU CORDON D'INFECTION

IV.3.D.1. ROLE DES BACTERIES ET DE LA PLANTE DANS L'EXTENSION DU CORDON

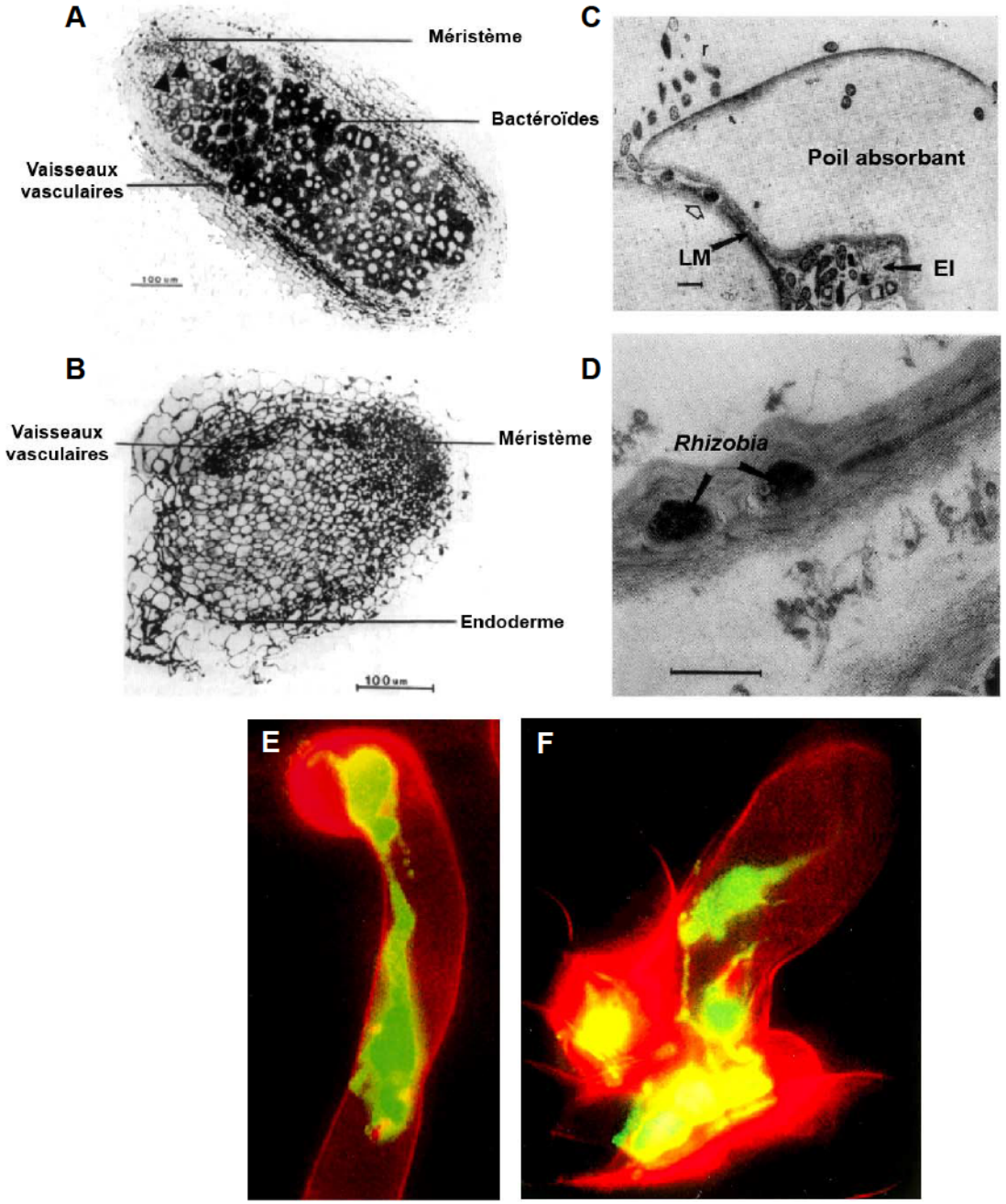


Figure 18 : Progression du cordon d'infection et exopolysaccharides bactériens
(A-B) Section longitudinale de nodosité de 3 semaines mises en place par une souche sauvage (A) ou déficiente en EPS (mutant *exo* EJ355) formant ainsi des nodosités non fixatrices dépourvues de cordon d'infection, de cellules infectées et de bactéroïdes (B). (C-D) Invasion intercellulaire de *M. truncatula* par le mutant *exoB* *R. meliloti exoB* (C) sont présent entre le poil absorbant et les cellules adjacentes (Grossissement ×5600). Quelques rhizobia ayant pénétrés la lamelle moyenne (LM) et colonisant l'espace intercellulaire (EI). (D) rhizobia enchâssés dans la lamelle moyenne (×18000). (E-F) Observation en microscopie à fluorescence de cordons d'infection abortifs mise en place par différentes souches *S. meliloti* défectueuses pour la production d'EPSII (E) et de KPS (F). La souche de *S. meliloti* exprime constitutivement la GFP et l'autofluorescence des poils absorbants est visualisée avec un filtre « longpass » à 580nm.

Figures modifiées d'après : Yang et al., 1992 ; Finan et al., 1985 ; Pellock et al., 2000

Comme discuté précédemment, la mise en place des cordons d'infections est conditionnée par la concomitance de facteurs végétaux et bactériens. La progression du cordon d'infection est elle aussi dépendante de ces deux composantes.

Afin de visualiser l'évolution des populations bactériennes au sein du cordon d'infection, des souches rhizobiennes exprimant de manière constitutive les gènes rapporteurs GFP ou la DsRED ont été co-inoculées (Gage, 2002). En effet, les gènes rapporteurs GFP et DsRED présentent respectivement sous illumination adéquate une fluorescence verte ou rouge, permettant ainsi de discriminer les populations bactériennes issues de chaque souche et de visualiser leur position et croissance au sein du cordon d'infection. Ainsi, D. Gage et coll. (2002) ont pu mettre en évidence que bien que la majorité des cordons sont composés de bactéries d'une même souche, GFP ou DsRED (Figure 19A), certains cordons infections présentent une population mixte. Cependant, malgré la présence de ces cordons mixtes, le nombre de nodosités présentant une population mixe est inférieur de moitié à l'effectif théorique attendu. Cette analyse cytologique a ainsi pu mettre en lumière que seuls les rhizobia placées à l'extrémité du cordon d'infection, les cellules ou bactéries fondatrices, se divisent et colonisent les cellules hôtes végétales. Les bactéries plus en amont du cordon seraient elles en phase stationnaire, ce qui est en accord avec le fait que seule l'extrémité de la matrice du cordon serait soluble, alors que l'ensemble du cordon serait rigidifié par les extensines végétales et l'environnement oxydant. Cette rigidification permet aux rhizobia en division situés à l'extrémité du cordon de créer une force de poussée permettant l'extension du cordon d'infection vers le primordium nodositaire en formation (Figure 19D).

Dans le poil absorbant, les microtubules sont recrutés pour la formation du cordon d'infection et forment un réseau dense de filaments parallèles entourant l'extrémité du cordon d'infection le reliant au noyau (Timmers et al., 1999). Ce réseau permet la mise en place d'un trafic vésiculaire apportant phospholipides membranaires et matériel pariétal, permettant ainsi la progression, mais aussi l'orientation du cordon d'infection vers le cortex racinaire (Gage, 2004) (Figure 19C, D).

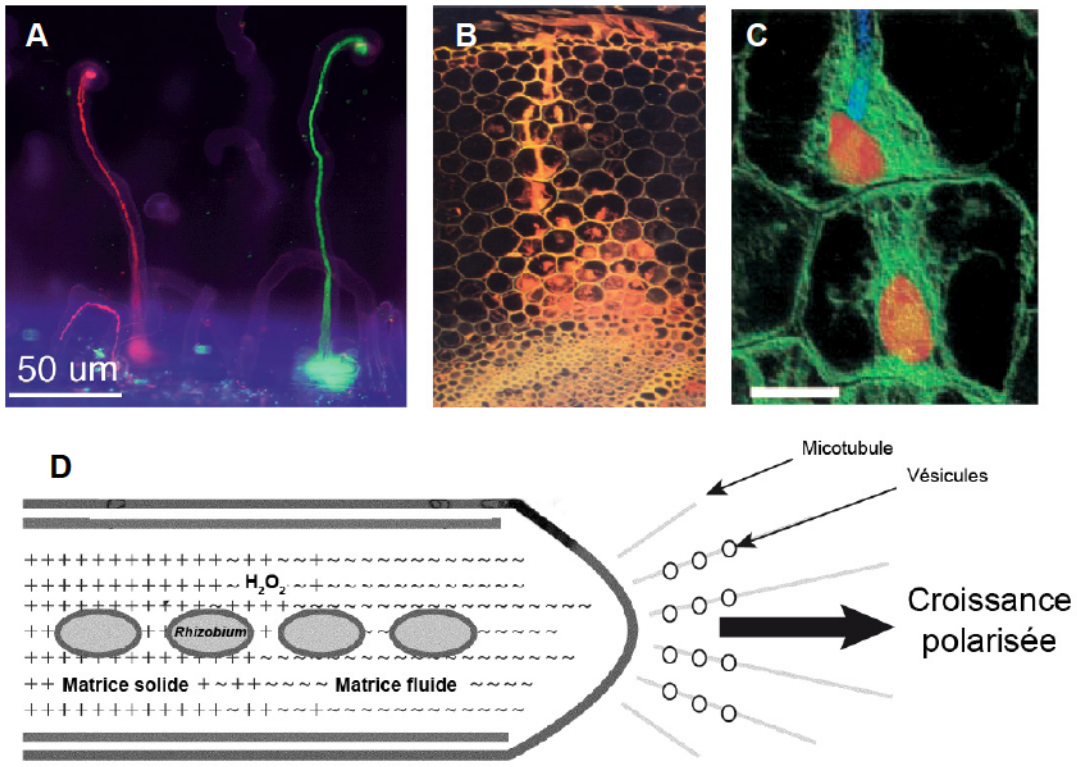


Figure 19 : Importance de la plante et du *rhizobium* dans l'extension du cordon d'infection
(A) Les cordons d'infection sont principalement composés de bactéries issues d'une même souche, comme le montre ici cette co-inoculation avec des rhizobia GFP ou DsRED sur *M. sativa*. La croissance de ces rhizobia au sein du cordon d'infection participe à son extension. (B) Progression du cordon d'infection au travers du cortex. A l'extrémité du cordon d'infection, l'alignement des cytoplasmes des cellules corticales forment le futur passage du cordon d'infection, c'est le cordon pre-infectieux ou « Pre-Infected threads ». Notons que les cellules du cortex interne ont initié leurs divisions cellulaires formant le primordium nodositaire. (C) Section transversale montrant le réseau dense de microtubules reliant le noyau et l'extrémité du cordon d'infection. C'est ce réseau de microtubules qui permet le trafic vésiculaire participant à l'extension du cordon d'infection. (D) Schéma simplifié illustrant le mécanisme d'extension du cordon d'infection qui est possible grâce à des composantes végétales et bactériennes : les divisions bactériennes successives à l'apex du cordon couplée à la rigidification de la partie proximale du cordon permettent la mise en place d'une force de poussée. Force de poussée agissant conjointement avec un trafic vésiculaire intense assurant l'apport en phospholipides membranaires et matériel pariétal permettent ainsi la progression du cordon d'infection au travers du cortex vers le primordium nodositaire.

Figures modifiées d'après : Oldroyd & Downie, 2008 ; Brewin, 2004 ; Gage, 2004 ; Timmers et al., 1999

IV.3.D.2 CORDONS PRE-INFECTIEUX : UN GUIDAGE AU TRAVERS DU CORTEX

Suite à la reconnaissance des facteurs Nod, les cellules corticales réactivent leur cycle cellulaire. Mais si les cellules du cortex interne se divisent conduisant à la formation du primordium nodositaire. Les cellules du cortex externe situées au-dessus du primordium nodositaire ne poursuivent pas le cycle cellulaire et vont préparer et faciliter la progression du cordon d'infection. Lors de l'entrée en mitose, le cytoplasme de ces cellules régresse, le noyau migre de la périphérie vers le centre de la cellule puis le cycle cellulaire est arrêté en phase G2. Après hydrolyse ménagée et localisée de la paroi, elles mettent en place avec les cellules des assises supérieures et inférieures des ponts cytoplasmiques, formant ainsi des colonnes cytoplasmiques dans l'ensemble du cortex externe, c'est le cordon pré-infectieux (Figure 19B). C'est ce continuum cytoplasmique qui facilitera la progression du cordon d'infection au travers du cortex externe jusqu'aux cellules néoformées du primordium nodositaire.

IV.3.D.3 GOUTTES D'INFECTION : L'INTERNALISATION DES RHIZOBIA *DANS LES CELLULES HOTES*

Les rhizobia quittent alors le cordon d'infection et sont internalisés au travers d'une structure appelée « infection droplet » (Figure 20). Ces gouttes d'infection sont des excroissances du cordon d'infection dépourvue de paroi, qui localisées à l'extrémité du cordon s'invaginent dans le cytoplasme de la cellule végétale hôte. C'est à partir de cette goutte d'infection que les bactéries sont internalisées dans le cytoplasme des cellules hôtes par un processus similaire à l'endocytose. Le rhizobium est donc ainsi entouré d'une membrane végétale issue de la membrane plasmique, la membrane péribactéroïdienne (PBM, « Peribacteroid membrane »). On parle alors de symbiosomes.

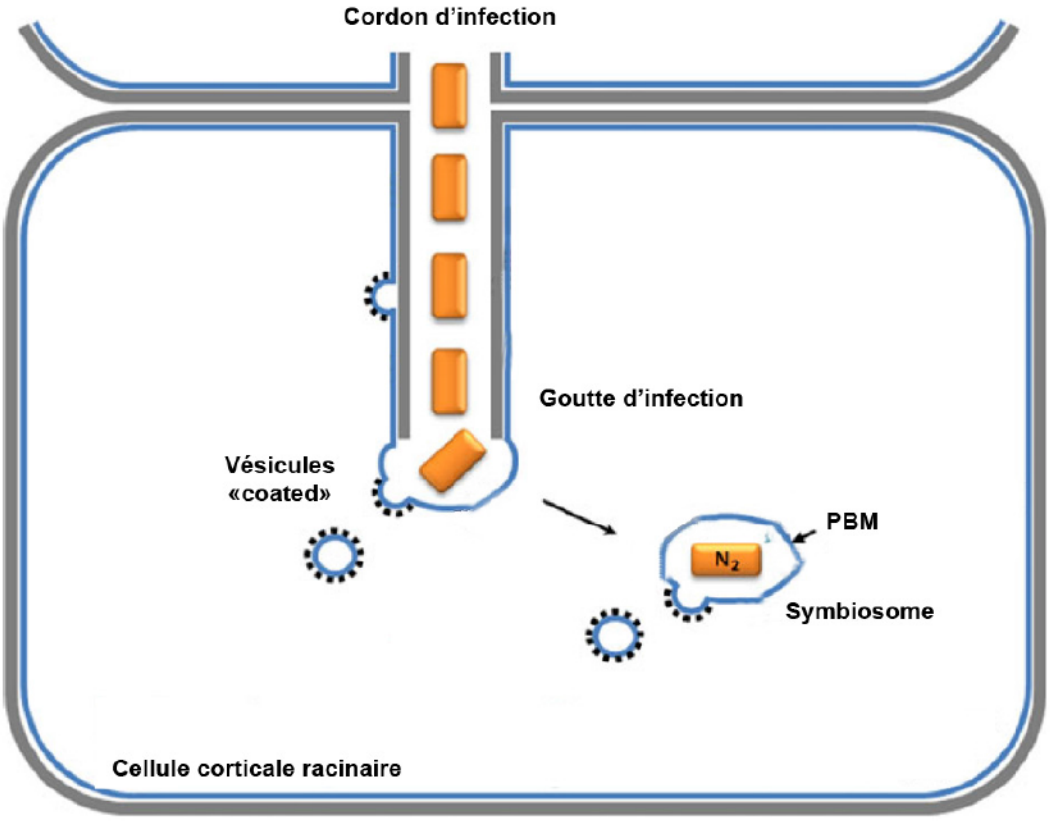


Figure 20 : L'internalisation des rhizobia, un processus similaire à l'endocytose
Les *rhizobia* quittent les cordons d'infection via une structure dite de goutte d'infection. Ces gouttes sont en fait des invaginations de la membrane plasmique du cordon d'infection qui enferme un *Rhizobium*. Par ce processus similaire à l'endocytose, les rhizobia sont internalisées dans la cellule végétale sans être libres dans le cytoplasme. C'est dans cet environnement modulé par un trafic vésiculaire issu de la plante hôte, que la bactérie se différencie en bactéroïde fixateur d'azote ; ce bactéroïde est entouré d'une membrane végétale, appelé symbiosome.

Figures modifiées d'après Leborgne-Castel et al, 2010

Bien que près de 95 % des cordons soient abortifs (Vasse et al., 1990), les cordons d'infections n'infectent pas toutes les cellules du primordium. Ces cellules primordiales non infectées formeront le méristème nodositaire, mais également des cellules dites compagnes. Présentes au sein du tissu infecté, ces cellules non infectées assurent spécifiquement la synthèse et le transport des uréides dans les nodosités déterminées, comme chez le soja (*G. max*). Bien qu'également présentent dans les nodosités indéterminées leurs rôles n'a pas encore été caractérisées (Vance, 2002). Mais leurs présences à la fois dans les nodosités déterminées et indéterminées suggèrent un rôle essentiel dans le fonctionnement de la nodosité (Sprent & James, 2007). Les cellules nouvellement infectées par *Rhizobium* formeront avec ces cellules compagnes, la zone d'infection, dont les cellules infectées évolueront au fur et à mesure du développement de la nodosité, en zone fixatrice d'azote puis de sénescence (Brewin, 2004; Monahan-Giovanelli et al., 2006).

IV.4 ORGANOGENESE DE LA NODOSITE INDETERMINEE

La nodulation est assurée par deux processus indépendants, un premier se dirigeant de l'extérieur vers l'intérieur de la racine et un second processus orienté de manière opposée, de l'intérieur vers l'extérieur de la racine. Il s'agit respectivement du processus d'infection et du processus de formation de la nodosité. C'est la collusion de ces deux phénomènes qui conduit à la mise en place de la nodosité.

IV.4.A FORMATION DU PRIMORDIUM NODOSITAIRE

En réponse à la perception des facteurs Nod, un signal calcique est émis conduisant à l'activation de facteur de transcription induisant l'expression de gènes assurant la différentiation du primordium nodositaire, gènes appelés nodulines (Geurts et al., 2005). Ces

nodulines précoces vont conduire à la réactivation du cycle cellulaire des cellules péricycliques proche des pôles du protoxylème et du protophloème 16-18 h post-inoculation) (Figure 21). Puis les cellules du cortex interne entrent à leur tour en division mitotique et forme le primordium nodositaire (18-24 h post-inoculation). Ce sont ces cellules qui seront infectées par les cordons d'infection (48 h post-inoculation) (Figure 21). Enfin, 24-48 h post-inoculation l'onde d'activation conduit à la réactivation du cycle cellulaire du cortex médian et externe de la racine. Ces cellules médianes et externes ne seront pas infectées par les rhizobia et conserveront leurs activités mitotiques formant la zone méristématique de la nodosité (Gage, 2004; Popp & Ott, 2011).

IV.4.B DIFFERENCIATION DE LA NODOSITE

Les nodosités indéterminées présentent une croissance continue du fait de la présence d'un méristème persistant. Chaque nouvelle cellule ainsi formée entre dans un processus de différenciation nodositaire. Cette croissance indéterminée conduit donc à la présence de chaque stade de développement ou zone au sein d'une même nodosité mature (Figure 21). Toutes les cellules qui composent la nodosité proviennent d'un même tissu en constante activité mitotique, situé à l'apex de la nodosité, le méristème nodositaire.

IV.4.B.1 MISE EN PLACE DU MERISTEME NODOSITAIRE

La différentiation du méristème nodositaire s'effectue 60 à 72 heures post-inoculation (Timmers et al., 1999). Le méristème nodositaire est issu des cellules primordiales du cortex racinaire (médian et externe) qui ne sont pas infectées par les cordons d'infections. Lors de la mise en place du méristème nodositaire, ces cellules se divisent à plusieurs reprises formant des ilots de cellules méristématiques. Puis, ces ilots fusionnent formant un unique centre de division cellulaire, le méristème (Timmers et al., 1999). La mise en place du méristème nodositaire ne requière pas l'infection effective des rhizobia et peut être induit par le seul ajout

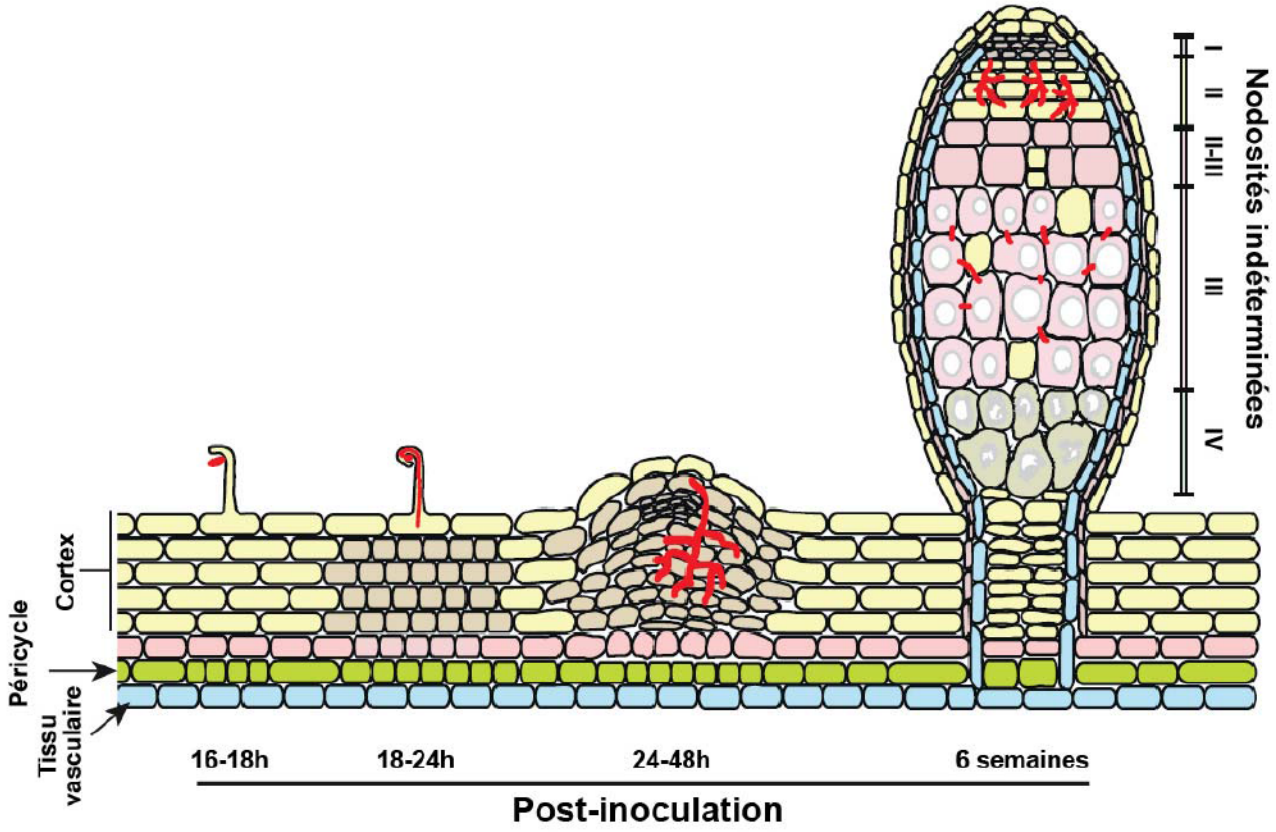


Figure 21 : Organogénèse de la nodosité de type indéterminée

Schéma simplifié du développement de la nodosité indéterminée. La perception des facteurs Nod induit la réactivation du cycle cellulaire des cellules péricycliques suivie par l'induction de la prolifération cellulaire du cortex interne durant le processus d'infection des *rhizobia*. Au cours du développement du primordium nodositaire, la différenciation d'un méristème nodositaire persistant conduit à la croissance indéterminée de la nodosité, conduisant à une zonation. Une zone I méristématique, assurant une croissance indéterminée de la nodosité ; une zone II dite d'infection où les cellules néoformées par la zone I sont infectées de manière chronique par les rhizobia ; une interzone II-III, où l'hôte et le microsymbionte se différencient progressivement pour former une zone III fixatrice d'azote. Cependant cette interaction symbiotique n'est pas pérenne du fait de la mise en place d'un processus de dégradation des bactéroïdes et des cellules hôtes formant une zone IV, dite de sénescence.

Figures modifiées d'après : Popp & Ott, 2011

de facteurs Nod (Timmers et al, 1999 ; Truchet et al, 1991). Une fois néoformé par le méristème nodositaire, les cellules commencent à ce différentier en différents types cellulaires qui conjointement au relargage des rhizobia par les cordons d'infection conduiront à la formation d'une nodosité fonctionnelle.

IV.4.B.2 Structure de la nodosite indeterminee

La nodosité mature est constituée par des tissus périphériques et centraux (Timmers et al., 2000; Vasse et al., 1990). Les tissus périphériques sont composés de trois types de tissus ; le cortex externe fait de vastes cellules vacuolarisées ; l'endoderme et un parenchyme comportant les faisceaux vasculaires assurant l'import de photosynthétats et l'export de produits azotés provenant de la nodosité.

La partie interne de la nodosité est constituée de 3 à 5 zones en fonction de l'âge de la nodosité (Figure 22).

La zone I, dite méristématique, est une zone de taille constante composée de petites cellules en division cellulaire et présentant un cytoplasme dense, avec un noyau central et des organites répartis sur l'ensemble du cytoplasme (Timmers et al., 1998).

La zone II, dite d'infection où le réseau de cordon d'infections se développe et libère les rhizobia dans des cellules ayant terminé leur division cellulaire. C'est dans cette zone que les bactéroïdes, mais aussi les cellules hôtes végétales se différencient assurant la mise en place effective de la fixation d'azote. Cette différenciation des cellules hôtes implique une série d'endoréduplications successives de leur génome allant jusqu'à 64 C (Kondorosi et al., 2005). Ces cycles d'endoréduplications conduisent à une augmentation du volume cellulaire (Timmers et al., 1999). Parallèlement, une fois relargués dans la cellule végétale, les bactéroïdes se divisent puis cessent toute activité mitotique et initient également leur différentiation en bactéroïdes fixateurs (Vasse et al, 1990) et migrent comme les proplastes et les mitochondries en périphérie de la cellule végétale (Timmers et al., 1998).

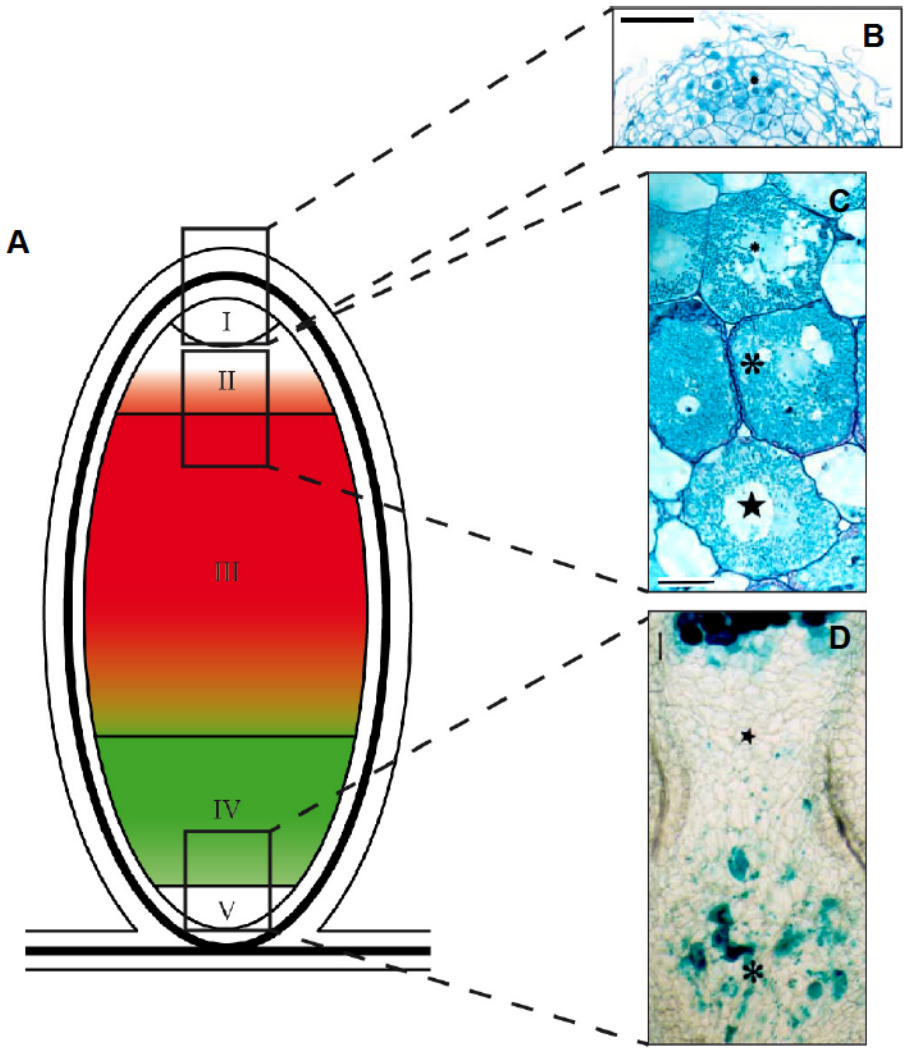


Figure 22 : Structure de la nodosité indéterminée
(A) Structure de la nodosité indéterminée. (B) Section longitudinale de la partie apicale, colorée au bleu de toluidine. La zone I méristématique est indiquée par un point. Echelle : 50µm. (C) Coupe longitudinale colorée au bleu de toluidine illustrant la zone II (point), II-III (astérisque) et la zone III (étoile). L'envahissement progressif des cellules hôtes par les *rhizobia* est bien visible. Echelle : 25µm. (D) Coupe longitudinale semi-fine de nodosité de 10 semaines post-inoculation misent en place par une souche de *S. meliloti* portant une fusion *nifH:lacZ*. Micrographie illustrant la transition zone IV de sénescence (étoile) et zone V saprophytique (astérisque). Zone V où les bactéries délivrées par les cordons d'infection envahissent, sans se différencier en bactéroïdes, les cellules végétales dégradées lors de la sénescence nodositaire. Echelle : 200µm.

Modifiées à partir de Timmers et al, 2000 ; Timmers et al, 1998

L'interzone II-III, est la partie basale de la zone II où mitochondries et plastes sont allongées et présentent de larges grains d'amidon dans leur stroma. Les bactéroïdes se placent progressivement perpendiculairement à la membrane plasmique.

La zone III, dite fixatrice, qui s'étend progressivement, est composée de cellules végétales et de bactéroïdes complètement différentiés. C'est dans cette zone que la nodosité crée un environnement microoxique permettant le fonctionnement, dans les bactéroïdes, de la nitrogénase. Les bactéroïdes conservent une disposition perpendiculaire au plasmalemme mise en place dans l'interzone II-III, puis progressivement perdue dans la partie basale de la zone III où les plastes et mitochondries reprennent leur forme ronde initiale. Cette période de fixation effective de l'azote atmosphérique s'avère être temporellement limitée et au-delà de 5 semaines post-inoculation un processus de sénescence est initié conduisant à une diminution progressive des capacités fixatrices d'azote de la nodosité (Puppo et al., 2005; Van de Velde et al., 2006).

La zone IV, dite de sénescence se met en place après 5 semaines post-inoculation. Ce processus conduit à la dégradation progressive des bactéroïdes puis de la cellule hôte végétale (Van de Velde et al., 2006). A l'heure actuelle, le mécanisme moléculaire soutenant cette rupture de l'interaction symbiotique reste globalement méconnu ; d'où la nécessité de mon travail de thèse sur ce processus.

La zone V, dite saprophytique apparaît sur des tissus de plus de 6 semaines post-inoculation (Timmers et al, 2000). Dans cette zone, les cordons d'infections restants libèrent les rhizobia au sein de cellules dégradées ou en cours dégradation. Ces rhizobia restent sous forme de bactéries et ne se différencient pas en bactéroïdes fixateurs. Cette zone V constitue une nouvelle niche écologique pour les rhizobia tirant profit du matériel pariétal et cellulaire restant après le processus de sénescence de la nodosité. Si ce mode de vie saprophytique semble porter avantage uniquement aux rhizobia, cette niche permet également la prolifération des rhizobia qui une fois le tissu entièrement dégradé seront libérés dans la rhizosphère facilitant

ainsi une nouvelle inoculation de la plante par cette même souche (Timmers et al., 2000). A terme, la mise en place de cette zone V, enrichirait donc la rhizosphère de la plante avec une souche de *Rhizobium* compatible et fonctionnelle (nod^+fix^+), primée et donc sélectionnée par la plante lors d'une précédente interaction (Timmers et al., 2000).

IV.4.C ZONE D'INFECTION ET DIFFERENCIATION DES DEUX PARTENAIRES

Si la zone d'infection conduit via les cordons d'infections à la rencontre des deux partenaires symbiotiques au niveau intracellulaire, elle est aussi le lieu d'une différenciation de l'hôte végétal et du symbionte vers un état symbiotique. Cette différenciation des deux partenaires conduit à l'endoréduplication de leurs génomes respectifs (facteurs Nod bactériens pour la plante et les peptides végétaux NCR pour les rhizobia).

IV.4.C.1 DIFFERENCIATION DE LA CELLULE HOTE VEGETALE

Les cellules néoformées en zone I ont suspendu leurs activités mitotiques (Kondorosi et al., 2005). Cependant, en zone II, probablement sous l'influence des facteurs Nod que les rhizobia continuent de sécréter, même internalisés dans les tissus végétaux (Timmers et al., 1998), la cellule hôte va initier une succession de cycle cellulaire sans cytokinèse, conduisant ainsi à dupliquer leur génome au sein du cytoplasme. Ces endoréduplications successives conduisent à augmenter la ploïdie de 2 C à 64 C, C étant le contenu en génome haploïde (Figure 23A). Ces endoréduplications conduisent à augmenter le volume cellulaire, et l'activité métabolique des cellules hôtes (Kondorosi et al., 2005). Ainsi de la zone II distale à la zone II proximale, les cellules hôtes augmentent progressivement de taille jusqu'en zone III. En zone III, les bactéroïdes ayant terminés leur propre différenciation en bactéroïdes fixateurs d'azote

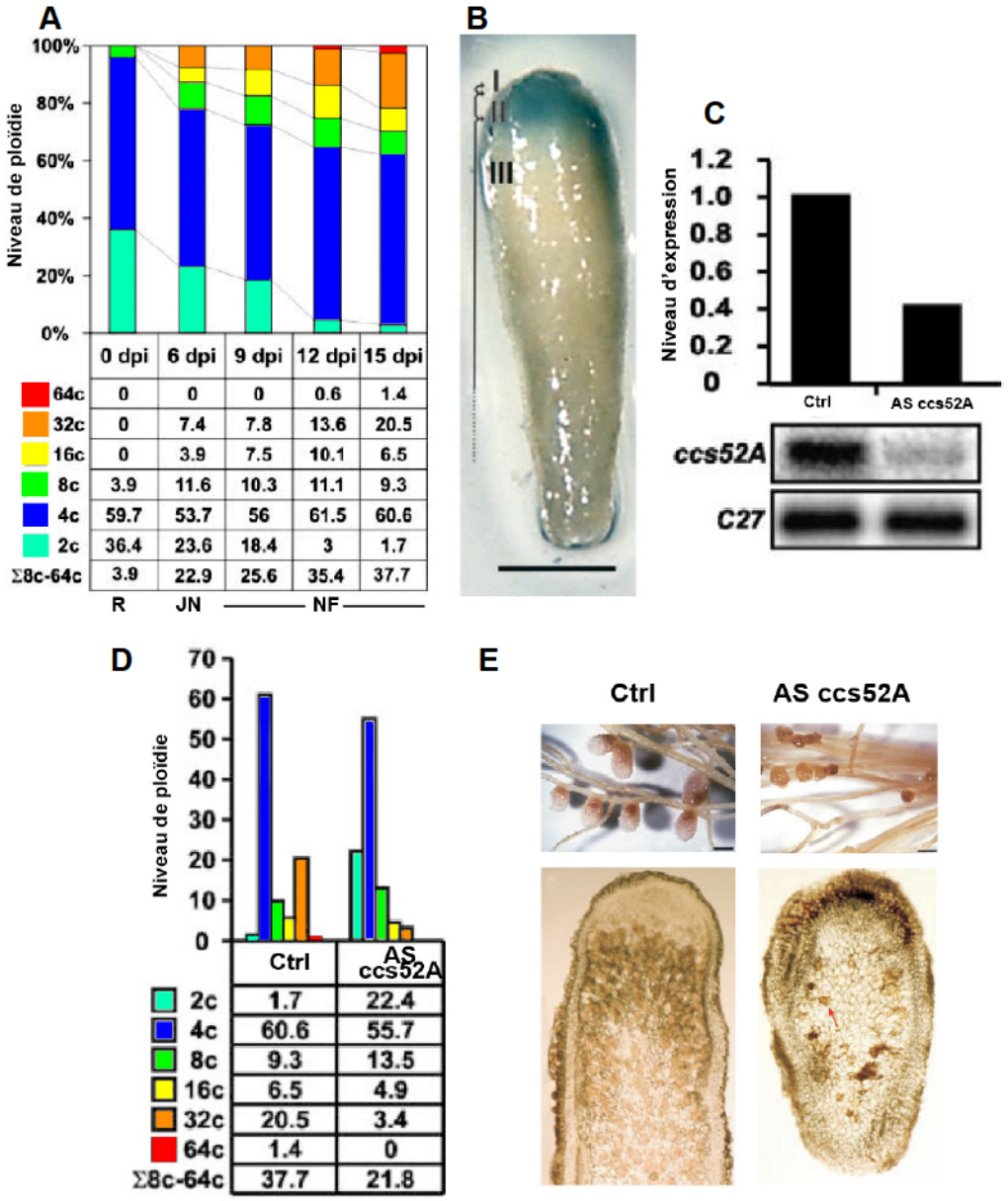


Figure 23: Endoréduplication et différenciation des cellules hôtes de la nodosité
(A) Etude du niveau de ploïdie via la mesure par cytométrie en flux du taux d'ADN nucléaire au cours de la nodulation. Du stade racinaire au niveau de la zone de compétence pour la nodulation (R), aux stades de jeunes nodosités (JN) et nodosités fixatrices (NF). (Dpi) jours post inoculation. (B-D) Rôle de ccds52A (sous-unité de l' « anaphase promoting complex ») dans l'endoréduplication des cellules hôtes. AS : diminution des transcrits c*cs52A* par ARN antisens. (B) Coloration GUS de nodosité transgénique portant la fusion *PMtccs52A:GUS*, gène exprimé en zone I et II. Echelle : 200µm. (C) Diminution par ARN antisens de la quantité de transcrits *ccs52A*. Diminution de transcrit induisant une réduction du niveau de ploïdie des cellules végétales de la nodosité (D) et la mise en place de nodosités abortives non infectées (E). Echelle : 1mm.

Figures d'après : Vinardell et al, 2003

cessent leurs sécrétions de facteurs Nod induisant ainsi l'arrêt de la différenciation des cellules hôtes végétales (Kondorosi et al., 2005).

Un des acteurs clefs de ces endoréduplications successives est la protéine CCS52A (Kondorosi et al., 2005) dont les transcrits et les protéines ont été détectés en zone II, mais pas en zone III (Cebolla et al., 1999; Vinardell et al., 2003). L'expression réduite par ARN antisens des transcrits *Ccs52A* (Figure 23B-E), conduit à la formation de nodosités abortives dépourvues de zone III, présentant une réduction de la ploïdie des cellules végétales ainsi qu'une zone II réduite composée de cellules de petit volume (Vinardell et al., 2003). Localisé au niveau nucléaire, CCS52A cible et lie certaines cyclines du cycle cellulaire induisant leurs polyubiquitination et donc leurs dégradations. L'absence de ces cyclines, conduit à l'inactivation progressive de kinase cycline dépendante (CDK) empêchant l'entrée en phase M ; si le cycle cellulaire est toujours actif, les cellules entrent directement en phase G1 puis S, dupliquant ainsi le matériel génétique de la cellule hôte (Kondorosi et al., 2005).

***IV.4.C.2 DIFFERENCIATION ET PERSISTANCE DES* RHIZOBIA**

Parallèlement à la différenciation des cellules hôtes végétales, les bactéroïdes, une fois relargués dans les cellules végétales, amorcent également leurs différenciations en bactéroïdes fixateurs. Ce processus est processus contrôlé en partie par de petits peptides nodule spécifiques composés d'une centaine d'acides aminés et riches en cystéine, adressés par la plante aux bactéroïdes, les peptides NCR (Nodule Cysteine Rich). Ces peptides NCR sont très similaires aux défensines (Mergaert et al., 2003) (Figure 23), qui en tant que petits peptides microbiens participent largement à l'immunité innée des Mammifères aux plantes (Cederlund et al., 2011; Wilmes et al., 2011). Présents uniquement dans certaines nodosités de type indéterminées, les peptides NCR appartiennent à une famille multigénique de plus de 300 membres (Mergaert et al., 2003), exprimés uniquement dans les cellules infectées de la nodosité et adressés aux bactéroïdes (Mergaert et al., 2006; Oldroyd et al., 2011; Van de Velde

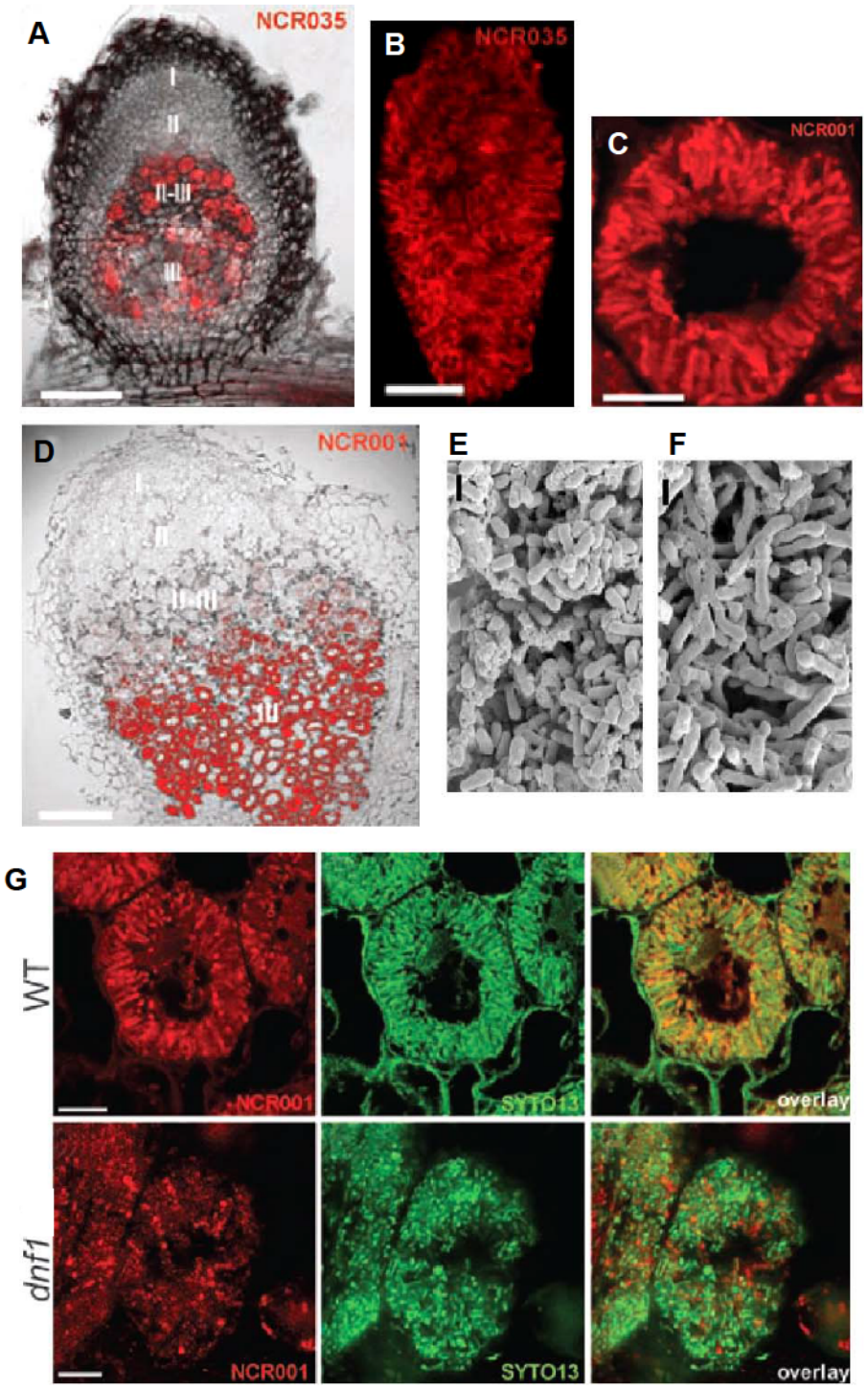


Figure 24 : Rôles des peptides NCRs et de DNF1 dans la différenciation des bactéroïdes
(A-B) Nodosités et cellules infectées transgéniques exprimant la fusion NCR035-mCHERRY qui est adressée aux symbiosomes en zone II-III et en zone III. (C-D) Immunolocalisation du peptide NCR001 avec un anticorps couplé à une Alexa633, illustrant l'adressage de NCR001 aux symbiosomes de zone III. (A, D) Echelle : 10µm. (B, C) Echelle : 1µm. (E-F) Micrographies en Microscopie électronique à balayage de symbiosome issus de microsection de nodosité control (E) et surexprimant NCR035 (F). Echelle : 1µm. La surexpression chez *L. japonicus*, nodosité déterminée dont les bactéroïdes ne présentent pas d'élongation, de *Mt*NCR035 induit l'élongation des symbiosomes. (G) Immunolocalisation de NCR001 dans une lignée sauvage (WT) ou invalidée pour *dnf1* ; invalidation empêchant l'adressage de NCR001 aux symbiosomes induisant sa séquestration dans le réticulum endoplasmique. Echelle : 10µm.

Figures modifiées d'après : Van de Velde et al., 2010

et al., 2010). Le rôle fondamental de ces peptides dans la différenciation du bactéroïde a pu être mis en évidence par l'équipe de P. Mergaert (Van de Velde et al., 2010). En effet, l'expression du peptide NCR035 de *M. truncatula* chez le lotier (*Lotus japonicum*) induit une forte augmentation de la taille de ces bactéroïdes, suggérant l'initiation de leur différenciation (Figure 24E, F). Ces peptides NCR sont adressés aux bactéroïdes et l'adressage à la membrane péribactéroïdienne est en partie contrôlé par une « signal peptidase », dont DNF1 est une sous-unité(Wang et al., 2010). L'invalidation de *dnf1* bloque l'adressage des peptides NCR aux symbiosomes qui restent bloqués dans le réticulum endoplasmique et les bactéroïdes restent indifférenciés (Wang et al., 2010) (Figure 24G). Localisée au niveau du réticulum endoplasmique, cette « signal peptidase » assurerait le clivage du peptide signal des NCR quelle adresserait via trafic vésiculaire à la membrane péribactéroïdienne et donc aux symbiosomes (Wang et al., 2010). DNF1 est donc nécessaire pour l'adressage des peptides NCRs aux bactéroïdes.

Un autre élément clef dans le développement des bactéroïdes est la protéine bactérienne BacA. Chez *S. meliloti* BacA est essentielle au développement des bactéroïdes au sein de la nodosité (Glazebrook et al, 1993). Différents pathogènes de Mammifères comme *Brucella abortus* ou *Mycobacterium tuberculosis* présentent également des gènes homologues à BacA qui s'avèrent cruciaux pour la persistance et donc le succès de leurs infections (Ferguson et al., 2004). BacA pourrait donc assurer la persistance des bactéroïdes au sein des cellules hôtes végétales, notamment dans un environnement riche en peptides antimicrobiens. En effet, des mutants de *S. meliloti*, *B. abortus* et *E. coli* invalidés pour leur homologue respectif de *bacA* présentent en culture pure une sensibilité accrue aux peptides antibiotiques comme la bléomycine ou bac7 (Marlow et al., 2009). Cependant à l'heure actuelle, le rôle *in vivo* de BacA au niveau des bactéroïdes reste incertain et différentes hypothèses coexistent :

BacA est prédit comme étant une protéine transmembranaire localisée au niveau de la membrane externe (bactéries Gram négatif). Chez *S. meliloti* et *B. abortus*, BacA est nécessaire pour la synthèse de lipide A, un composant essentiel des lipopolysaccharides composant la

membrane externe (Ferguson et al., 2004; Ferguson et al., 2002). Des analyses en similarité de séquences suggèrent que BacA serait un transporteur d'acides gras à longue chaine qui une fois dans le périplasme assurerait la maturation des lipides A, maturation qui permettrait de masquer cet épitope – en effet, le lipide A est un puissant antigène chez les Mammifères – ce qui faciliterait la persistance de la bactérie prolongeant ainsi l'infection (Ferguson et al., 2004).

Cependant, Fergusson et coll., 2006 ont pu mettre en évidence que cette forte sensibilité aux peptides antimicrobiens des mutants *bacA* était indépendante de la modification des lipides A (Ferguson et al., 2006). Chez *E. coli*, le gène homologue de *BacA*, *SbmA*, assure l'import de peptides antimicrobiens (Mattiuzzo et al., 2007). Ce rôle de BacA a été également mis en évidence chez *S. meliloti* suggérant son rôle central dans l'import de peptides pour le succès de l'infection par *S. meliloti* (Marlow et al., 2009). Cependant, cette étude montre également que la mutagenèse dirigée Q193G et R389G de *bacA* permet toujours l'import de peptides tout en altérant la synthèse des lipides A, suggérant ainsi que les modifications des lipopolysaccharides membranaires et l'import de peptides microbiens médiés par BacA seraient deux éléments clefs pour le succès et la persistance de *S. meliloti* dans les cellules hôtes.

Dès leur internalisation dans la cellule hôte par endocytose, les rhizobia sont appelés bactéroïdes. Du fait de cette endocytose, les bactéroïdes sont entourés par une membrane végétale d'origine plasmique formant un nouveau compartiment intracellulaire appelé symbiosome. Cette différenciation implique, à l'instar du partenaire végétal, des endoréduplications successives de leur génome jusqu'à 24 C (Mergaert et al., 2006), conduisant à un allongement de leur taille et changement de morphologie (symbiosomes bifides) (Oke & Long, 1999; Van de Velde et al., 2010) (Figure 25F). L'analyse *in situ* de l'ultrastructure des cellules infectées menée par Vasse et coll. (1990) a permis de différentier 5 stades de différenciation des bactéroïdes, répartis entre la zone II distale et la zone III proximale (Vasse et al., 1990) (Figure 25A-E).

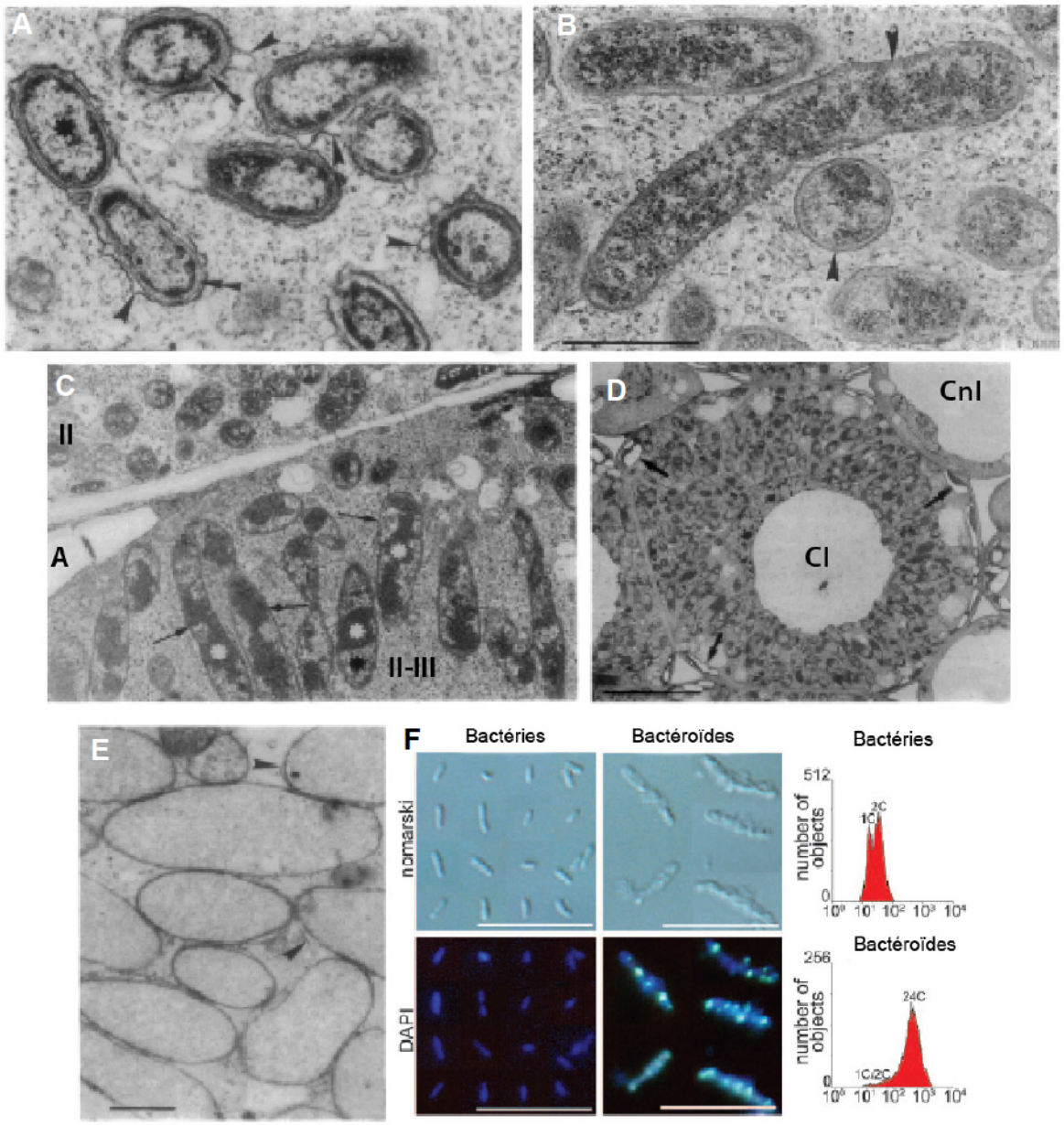


Figure 25 : Différenciation des rhizobia en bactéroïdes au sein des cellules végétales
(A-E) Ultrastructure de bactéroïdes de nodosités de 4 semaines (*M. sativa*) faite au microscope électronique à transmission (MET). (A) Bactéroïdes de type I localisés en zone II distale. (B) Bactéroïde de type II. (C) Jonction zone II (II) et interzone II-III (II-III) infectée respectivement avec des bactéroïdes de type II et III ; A : amyloplaste. (D) Partie distale de la zone III. IC : cellule infectée remplie de bactéroïde de type IV. Les flèches indiquent des amyloplastes. (E) Bactéroïde de type V localisé dans la partie proximale de la zone III, mitoyenne à la zone IV. (F) Evolution de la ploïdie des r*hizobia* au cours de leur différenciation. Mesures effectuées par cytométrie en flux avec un marquage DAPI des bactéroïdes. Images confocales, échelle : 10µm. Annotations micrographies en MET (A, B, C, E) : Astérisque noir : nucléoïde ; Astérisque blanc : région cytoplasmique riche en ribosomes. Les têtes de flèches indiquent la membrane péribactéroidienne (PBM) et en (A) la double tête de flèche pointe le périplasme. Echelle : 1 µm.

Figures modifiées d'après : Vasse et al., 1990 ; Mergaert et al., 2006

Les bactéroïdes de type I, localisés dans la partie distale de la zone II correspondent aux rhizobia venant d'être relargués dans la cellule végétale. De forme arrondie, ils présentent une activité mitotique et un large espace périsymbiotique.

Les bactéroïdes de type II sont localisés principalement dans la partie proximale de la zone II. De forme allongée, ils ne présentent pas d'activité mitotique. Bactéroïdes de type I et II peuvent être présent dans une même cellule végétale au milieu de la zone II.

Les bactéroïdes de type III, sont présent exclusivement dans la partie proximale de la zone II ou interzone II-III. A cette étape de la différenciation, les bactéroïdes de type III arrêtent leur élongation et remplissent l'ensemble du cytoplasme de la cellule hôte végétale.

Les bactéroïdes de type IV, sont localisés dans la partie distale de la zone III. Les bactéroïdes de type IV sont de taille similaire à ceux de type III, mais présentent une hétérogénéité cytoplasmique très marquée avec des zones denses en électrons (riche en ribosomes et/ou polysomes) et des zones plus claires faites de fibrilles d'ADN difficile à visualiser. Ce sont ces bactéroïdes de type IV qui, dans les tissus de la zone III, ont la capacité à réduire le diazote atmosphérique.

Les bactéroïdes de type V, sont localisés dans la partie proximale de la zone III. Ces bactéroïdes sont de morphologies variables et perdent l'hétérogénéité cytoplasmique caractéristique du stade précédant, supposant une dispersion des ribosomes. De plus, à mesure que l'on s'approche de la zone IV, dite de sénescence, leur nombre diminue progressivement, probablement dû au processus de dégradation initié lors de la sénescence. Ces observations suggèrent que le processus de sénescence se déroule au moins pour partie à la jonction entre la zone III fixatrice et la zone IV de sénescence.

V. FONCTIONNEMENT DE LA SYMBIOSE, UNE NICHE ECOLOGIQUE AU SEIN DE LA NODOSITE

V.1 RESPIRATION ET FIXATION D'AZOTE : LE PARADOXE DE LA NITROGENASE

Un des changements clefs au cours de la différenciation des rhizobia en bactéroïdes est l'induction des gènes impliqués dans la fixation d'azote et encodant les différentes sous unités de l'enzyme assurant la fixation d'azote, la nitrogénase (Figure 26).

Le complexe enzymatique de la nitrogénase est, à quelques exceptions prêtes, très conservé chez les diazotrophes. Il est présent dans des nodosités de type déterminé et indéterminé. Le complexe nitrogénase le plus fréquemment rencontré et le mieux caractérisé est la nitrogénase à molybdène ou Mo nitrogénase. Cependant, 3 autres types de complexe nitrogénase ont été caractérisés et divergents par leurs combinaisons de cofacteur métallique (Seefeldt et al., 2009); comme *Azotobacter vinelandii*, qui utilise une nitrogénase à vanadium (Jacobitz & Bishop, 1992). Le complexe nitrogénase est composé de 2 métalloprotéines : la protéine Fe, également appelée « dinitrogene réductase » ou composante II et la protéine MoFe également nommée composante I qui est la nitrogénase au sens strict (Seefeldt et al., 2009).

La protéine Fe est un homodimère (Figure 26A), encodé par les gènes *NifH*, *NifF* et *NifJ*. Elle assure via un cluster Fe-S le transfert ATP dépendant d'électron vers la protéine MoFe. La protéine MoFe est un α2β2 hétérodimère (*NifK*, *NifD*) dont chaque sous-unité αβ contient un cluster Fe-S nommé cluster P. Le cluster P reçoit les électrons de la protéine Fe, électrons

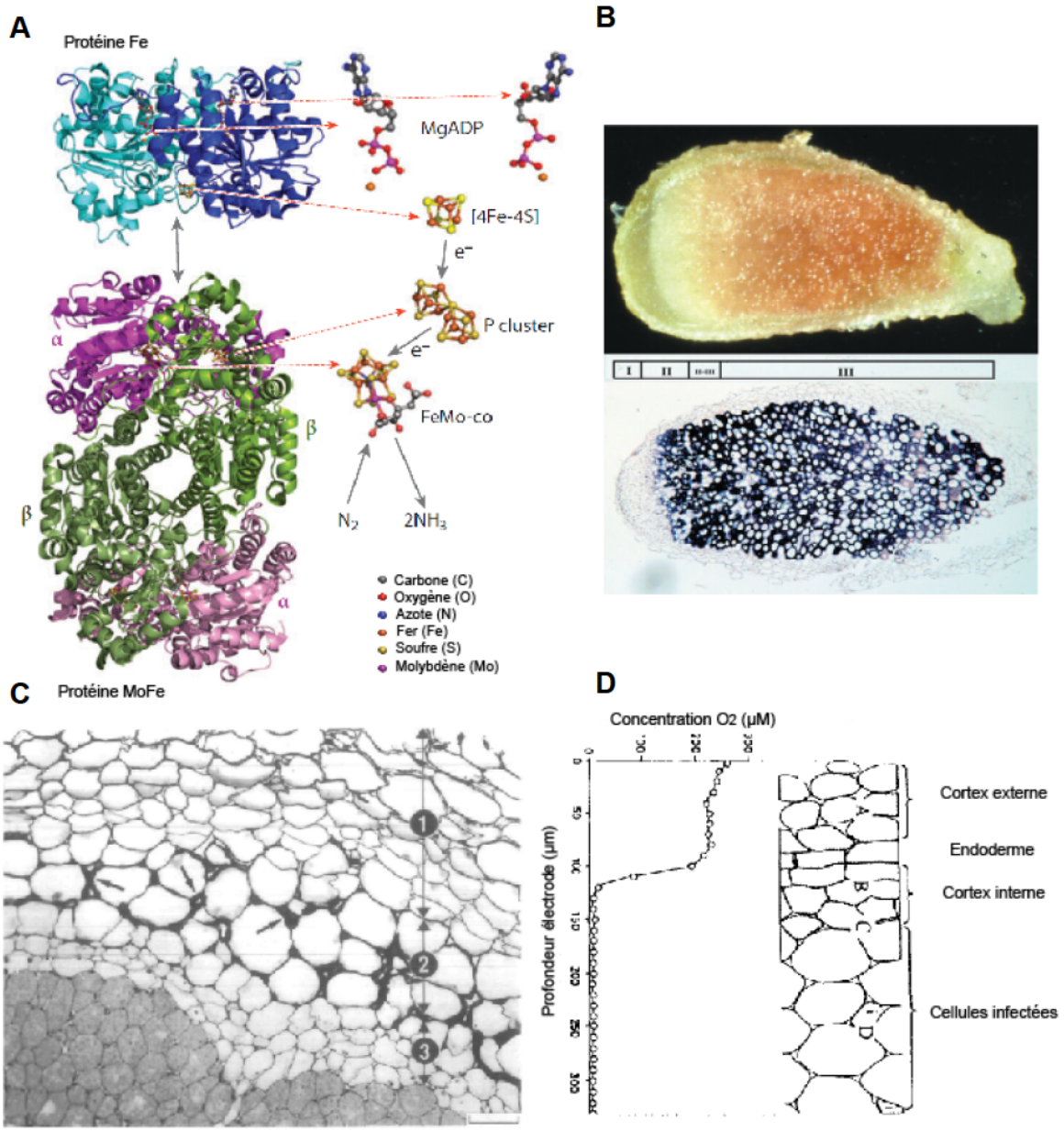


Figure 26 : Nitrogénase et microoxie de la nodosité

(A) Structures de la nitrogénase à MoFe et de la dinitrogène réductase Fe. De manière ATP dépendante la protéine Fe transfère des électrons au cluster P de la nitrogénase qui les transfère au cofacteur MoFe ; cofacteur MoFe assurant la liaison puis la réduction du N_2 atmosphérique. (B) Haut : Coupe transversale de nodosité indéterminée (*Pisum satium*) illustrant la couleur rouge due à la leghémoglobine. Bas : Hybridation *in situ* d'un même nodule avec une sonde antisens, marquée à la digoxygénine, ciblant l'ARNm de la leghémoglobine *PsLb5-10* présentant une forte affinité pour l'oxygène. La barre indique les différentes zones de la nodosité : I, le méristème, II, la zone d'infection, II-III, la zone de différenciation des bactéroïdes et la zone III dite de fixation. (C) Micrographie photonique d'une coupe transversale de nodosité de lupin (*Lupinus albus*) colorée avec le bleu de toluidine. Trois zones corticales sont indexées : en 1, le cortex externe composé de petites cellules ne présentant pas d'épaississement pariétal ou d'occlusion. En 2, l'endoderme composé de cellule large cellule présentant un épaississement pariétal (flèche) formant une barrière de diffusion à l'O_2. En 3, cortex interne. (D) Mesure de la variation de concentration d'O_2 au travers du cortex et de la zone III d'une nodosité de pois (*Pisum sativum*).

Figures modifiées d'après : Seefeldt et al., 2009 ; Downie, 2005 ; Ianetta et al., 1993 ; Batut & Boistard, 1994

transférés au cofacteur MoFe, qui assure la liaison puis la réduction du diazote (Kneip et al., 2007; Seefeldt et al., 2009).

L'activité nitrogénase est très endergonique. En effet, la réduction d'une mole de dinitrogène nécessite 16 moles d'ATP et 8 moles de protons et électrons, ainsi que du pouvoir réducteur sous forme de ferrédoxine (Jones et al., 2007).

$$N_2 + 16\ Mg\text{-}ATP + 8\ H^+ + 8\ e^- \rightarrow 2\ NH_3 + H_2 + 16\ Mg\text{-}ADP + 16\ P_i$$

Pour assurer l'activité nitrogénase, la plante fournie aux bactéroïdes des composés carbonés issus de la photosynthèse sous forme de malate, succinate et fumarate ; dont le malate semble être la principale composante (Oldroyd et al., 2011). La malate alimentant directement le cycle de Krebs et *de facto* la chaine respiratoire du bactéroïde (Prell & Poole, 2006). Cependant, l'activité nitrogénase est très sensible à l'oxygène, inhibition est irréversible (Batut & Boistard, 1994). Cette sensibilité à l'oxygène exerce une pression de sélection conduisant à mettre en place au sein de la nodosité un environnement microoxique assurant la respiration des bactéroïdes et des mitochondries de l'hôte tout en étant propice à l'activité nitrogénase.

Différents éléments participent à la mise en place par la plante de cet environnement microoxique au niveau de la zone de fixation d'azote, réduisant la pO_2 de 225µM dans le sol à moins d'1µM au sein des cellules fixatrices (Minchin, 1997). Au niveau cortical de la nodosité, une barrière de diffusion à l'O_2 faite d'un épithélium avec une forte densité cellulaire dont les méats sont obstrués par des sécrétions de glycoprotéine comme MAC236 (Batut & Boistard, 1994; Iannetta et al., 1993) limite la diffusion des gaz extérieurs, dont l'oxygène, dans la nodosité (Figure 26C, D). Pour s'adapter à cette microoxie, bactéroïdes et mitochondries adaptent leur chaine respiratoire, avec notamment une terminal-oxydase plus affine pour l'oxygène, conduisant donc à réduire progressivement la pO_2 intracellulaire tout en assurant une activité respiratoire optimale (Ott et al., 2009).

Un autre élément crucial pour la mise en place et le fonctionnement de cette niche microoxique est une protéine végétale exprimée notamment dans les cellules infectées de la zone III, la leghémoglobine (Figure 26B). Cette protéine est présente en grande quantité dans la nodosité et représente jusqu'à 40% de la fraction protéique soluble totale d'une nodosité mature (Nash & Schulman, 1976). La diminution par ARN antisens de cette noduline tardive a permis de mettre en évidence son rôle crucial dans l'interaction symbiotique et plus précisément dans le maintien de la microoxie de la nodosité (Ott et al., 2005). Si chez les animaux, l'hémoglobine circulant dans le système cardio-vasculaire assure l'apport d'oxygène entre les différents organes, le rôle de la leghémoglobine est plus analogue à celui de la myoglobine, qui localisée au niveau musculaire chélate l'oxygène et le libère lors de la diminution soudaine de la pO_2 produite par les contractions des sarcomères (Downie, 2005). La leghémoglobine est 20 fois plus affine pour l'oxygène que la myoglobine et présente une constante d'association pour l'oxygène extrêmement rapide alors que sa constante de dissociation est relativement lente (Appleby, 1984). La leghémoglobine a ainsi une capacité de chélation de l'oxygène autour de 7-11nM (Downie, 2005). Ainsi, présente en grande quantité au sein des cellules infectées (Downie, 2005), la leghémoglobine joue le rôle de chélateur ou tampon à oxygène tout en assurant la présence et la distribution d'oxygène aux mitochondries et aux bactéroïdes au sein des cellules infectées de la zone III ; participant ainsi au maintien de la microoxie tout en assurant l'apport en O_2.

L'action conjointe de ces différents éléments structuraux et protéiques permet donc le maintien d'un métabolisme de type aérobique - métabolisme plus exergonique, qu'un métabolisme anaérobie - tout en assurant ainsi une activité nitrogénase optimale très consommatrice en ATP et en pouvoir réducteur et nécessitant un environnement pauvre en oxygène.

V.2 METABOLISME SYMBIOTIQUE

Au sein de la cellule hôte végétale, les symbiosomes peuvent être assimilés à des structures similaires aux organelles du fait de l'arrêt de la croissance et de la division cellulaire ainsi que la réduction de la synthèse de ribosomes, d'acides nucléiques et de peptidoglycanes (Oldroyd et al., 2011). Cependant, les gènes assurant l'homéostasie du bactéroïde et la fixation d'azote sont eux fortement induits (Figure 27). L'induction de ces gènes impliqués dans la synthèse d'ammonium, via la nitrogénase, est accompagnée d'une répression des gènes impliqués dans l'assimilation par le bactéroïde de l'ammonium en acide aminés (Patriarca et al., 2002). Les bactéroïdes matures assurent donc la réduction du diazote atmosphérique en ammoniaque qu'ils exportent vers la cellule végétale sous forme d'ammonium. A l'heure actuelle, le mécanisme d'export de l'azote vers la cellule végétale n'a pas été caractérisé. Cependant, il est probable que l'ammoniaque soit réduit en ammonium lors de son transit dans l'espace péribactéroïdien ou PBS (Oldroyd et al., 2011). Des études *in vitro* ont mis en évidence l'acidité du PBS (Day et al., 2001), environnement acide qui pourrait assurer la réduction de l'ammoniaque en ammonium ensuite exporté vers la plante. Une fois dans le cytoplasme de la plante hôte, l'ammonium est assimilé sous forme de glutamine via la glutamine synthase puis exporté sous forme d'asparagine ou de glutamine dans l'ensemble de la plante via les vaisseaux vasculaires. Dans les nodosités de type déterminées, l'azote est exporté via un dérivé purique, les uréides (Prell & Poole, 2006).

La plante soutient le métabolisme bactérien par l'apport en glucides issus de la photosynthèse. Ces substrats carbonés sont importés sous forme d'acide dicarboxylique – malate et succinate principalement (Corzo et al., 1997; Prell & Poole, 2006). Différentes études *in vitro* ont pu mettre en évidence que cet import de malate au travers de la membrane

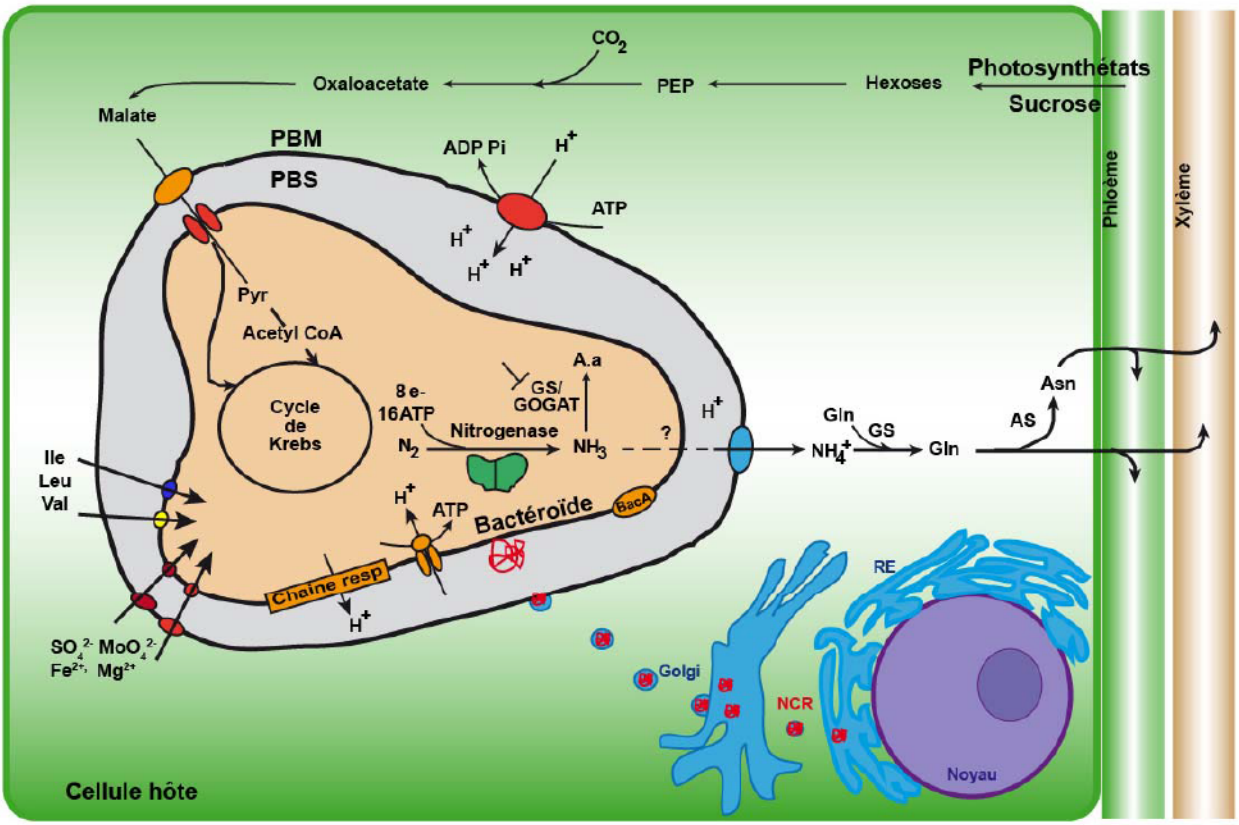


Figure 27 : Schéma simplifié du métabolisme du bactéroïde au sein de la nodosité fixatrice
L'activité nitrogénase étant très endergonique la plante hôte fournit aux bactéroïdes des glucides issus de la photosynthèse. Glucides assimilés sous forme d'acides dicarboxyliques, principalement sous forme de malate. Malate qui alimente directement ou indirectement le cycle de Krebs permettant avec la chaine respiratoire la synthèse d'ATP nécessaire à l'activité nitrogénase. La nitrogénase réduit ainsi le diazote atmosphérique en ammoniaque qui sous forme d'ammonium sera assimilé par la plante sous forme d'asparagine (Asn) et de glutamine (Gln).

Figures d'après : Oldroyd et al., 2011

péribactéroïdienne serait dépendant de l'acidité de l'espace péribactéroïdien, mettant ainsi en place une force protomotrice cruciale pour le transport de malate, mais aussi d'osmoprotectants comme la glycine bétaïne (Corzo et al., 1997; Day et al., 2001; Fougere & Le Rudulier, 1990). Une fois importé, le malate alimente directement et indirectement le cycle de Krebs dont les gènes s'avèrent être fortement induit, et ainsi alimente *de facto* la chaine respiratoire permettant ainsi la phosphorylation oxydative et donc la synthèse d'ATP du bactéroïde (Prell & Poole, 2006) (Figure 27).

Bien que l'interaction Légumineuses – *Rhizobium* procure des bénéfices à chaque partenaire, cette interaction symbiotique n'est pas pérenne et conduit au terme de son développement à l'initiation d'un processus de dégradation dit de sénescence (Puppo et al., 2005).

VI. LA SENESCENCE

Le terme sénescence est issu de deux mots latins, *senex* et *senescere*. Senex signifiant « agé » est la racine latine de mots comme « seniors », « sénile » ou même sénat. Le sénat dans la Rome antique était ainsi le « conseil des sages ». *Senescere* signifie « prendre de l'âge », « vieillir ». Ainsi la sénescence définit le processus de vieillissement. La sénescence est un processus universel dans le monde du vivant et le terme de sénescence est utilisé dans de multiples modèles, de la levure jusqu'à l'homme en passant par les plantes.

VI.1 La Senescence nodositaire

A l'heure actuelle, la sénescence nodositaire reste un processus encore peu caractérisé ; et ce bien que cette rupture de l'interaction symbiotique soit présente aussi bien dans des nodosités matures de type déterminées (*Glycine max*, *Lotus japonicum*) que indéterminées (*M. truncatula*, *Pisum sativum*) dont certaines sont d'un enjeu agronomique majeur (Figure 28A).

Chez les nodosités déterminées, le processus de sénescence se propage de manière radiale, du centre vers la périphérie. La dégradation des cellules infectées conduit à libérer les bactéroïdes, qui issus de ces nodosités déterminées ont pour la plupart la capacité à retourner à un mode de vie libre au sein de la rhizosphère. Au sein de ces nodosités indéterminées matures, le processus de sénescence est initié à partir de la partie proximale de la nodosité – tissus les plus âgés, et se propage progressivement, en parallèle à la croissance de la nodosité vers la partie apicale et tend ainsi à devenir le tissu majoritaire au sein de la nodosité (zone IV) (Figure 28).

Contrairement aux bactéroïdes issus de nodosités déterminées, les bactéroïdes des nodosités indéterminées ne peuvent retourner à un mode de vie libre au sein de la rhizosphère, et ce probablement du fait d'une différenciation irréversible médiée au moins en partie par le cocktail de peptides NCR (Nodule Cystein Rich peptides), conduisant certes à des bactéroïdes

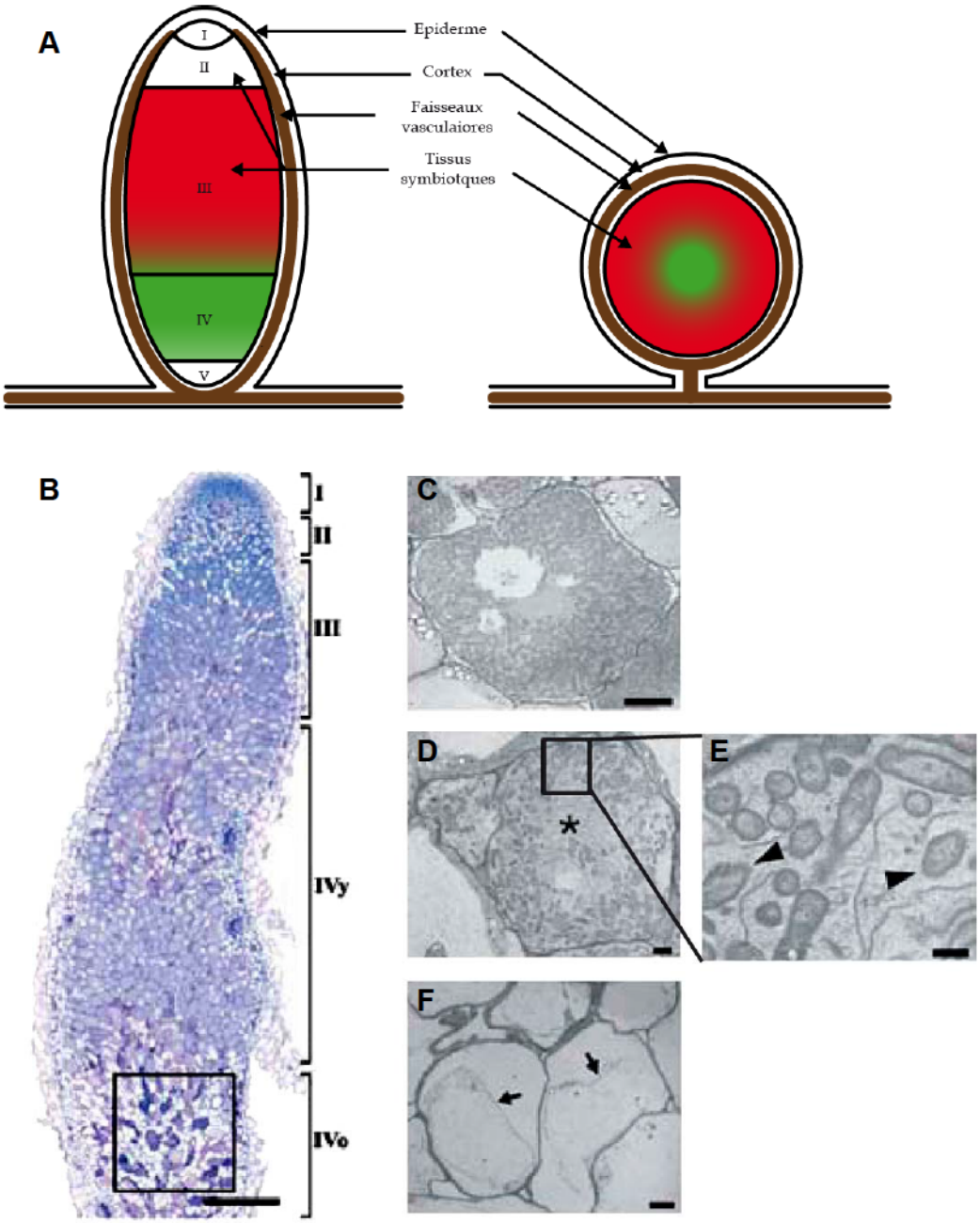


Figure 28 : La sénescence nodositaire

(A) Représentation schématique de la nodosité mature de type indéterminée (Gauche) et déterminée (Droite) I, zone méristématique ; II, zone d'infection ; III, zone de fixation d'azote ; IV, zone de sénescence ; V, zone saprophytique. (B) Coloration au bleu de toluidine d'une coupe longitudinale de nodosité mature de 9 semaines. (C) Image en MET (Microscopie électronique à transmission) d'une cellule infectée de zone III, présentant des symbiosomes fixateurs d'azote. (D) Image en MET de cellules infectées lors des premières étapes de la sénescence, présentant un nombre réduit de symbiosomes et une abondance de réticulum endoplasmique et de vésicules. (E) Agrandissement du rectangle en (D) montrant une altération de la membrane péribactéroïdienne (tête de flèches). (F) Image en MET, montrant une cellule infectée en cours de collapse avec une lyse de sa membrane plasmique (flèches). Echelles : (B) 500µm ; (C) 10µm ; (D, F) 2µm et (E) 500nm.

Figures modifiées à partir de Van de Velde et al., 2006

fixateurs d'azote, mais ayant perdu toute capacité reproductrice (Mergaert et al., 2006; Van de Velde et al., 2010). Pour ces deux types de nodosité, la fixation d'azote est optimale pendant les premières semaines post-infection (Puppo et al., 2005). Au-delà de cette période, la capacité fixatrice d'azote diminue du fait conduisant de la mise en place progressive du processus de sénescence (Puppo et al., 2005).

Chez les légumineuses de type déterminées comme *G. max*, la mise en place du processus de sénescence nodositaire est corrélée avec la réallocation des nutriments pour le remplissage des graines (Puppo et al., 2005). Ainsi, en plus de l'aspect fondamental visant à comprendre pourquoi et surtout comment est initié le processus de sénescence nodositaire, une meilleure connaissance de ce processus pourrait permettre la sélection de variétés présentant une sénescence nodositaire retardée avec donc une période de fixation d'azote plus étendue ; ce qui pourrait permettre après introgression de ces caractères d'optimiser les rendements culturaux des Légumineuses tout en limitant l'utilisation d'engrais azotés, développant ainsi une agriculture plus respectueuse de l'environnement.

VI.2 CHANGEMENTS STRUCTURAUX LORS DE LA SENESCENCE NODOSITAIRE

La sénescence nodositaire est associée à un changement de couleur de la zone de fixation d'azote, d'une couleur rose, due à une leghémoglobine fonctionnelle passe

progressivement au vert, ce changement est provoqué par la dégradation de la leghémoglobine provoquant l'accumulation de biliverdine (Lehtovaara & Perttila, 1978) (Figure 28A).

En se basant sur ce changement de couleur, de nombreuses analyses histologiques ont été conduites sur des sections longitudinales de nodosités déterminées et indéterminées, révélant la dégradation progressive et radiale des nodosités déterminées (Van de Velde et al., 2006 ; Puppo et al., 2005). Ces mêmes approches menées sur des nodosités de type indéterminées, ont conduit à visualiser la progression du processus de sénescence comme une structure dynamique et plane se propageant de la partie proximale vers l'apex de la nodosité (Puppo et al., 2005). Cette vision d'un front plan de sénescence pourrait évoluer vers une structure plus conique. En effet, récemment la coloration au bleu de toluidine permettant de discriminer les tissus sains des tissus sénescents, ainsi que l'observation *in situ* de l'expression de cystéine protéases *MtCP6* induite lors de sénescence – protéase faisant partie intégrante de cette étude, suggèrent une mise en place plus conique des évènements précoces de la sénescence nodositaire (Perez-Guerra et al., 2010).

Au niveau cellulaire de multiples changements de l'ultrastructure se mettent en place. Dans les nodosités déterminées comme chez le soja, où les cellules sénescentes présentent un cytoplasme moins dense aux électrons ainsi que l'apparition massive de nombreuses vésicules. Au niveau des organites, le nombre de peroxysomes augmente et la structure des mitochondries se complexifie. Concernant les symbiosomes, l'altération de leur membrane semble intervenir dès les premières étapes du processus de sénescence (Puppo et al., 2005).

L'étude des changements de l'ultrastructure de nodosités sénescentes de *M. truncatula* (Van de Velde et al., 2006) révèle de nombreuses similitudes avec les précédentes observations menées chez le soja. Ainsi, chez *M. truncatula* (Figure 28B), les cellules hôtes et les bactéroïdes subissent une dégradation séquentielle où les bactéroïdes et notamment la membrane péribactéroïdienne sont rapidement dégradés, dégradation corrélée à la présence de nombreuses vésicules. Puis la cellule hôte végétale commence à se résorber, suivie ensuite par le « collapse » des cellules compagnes, non infectées par *S. meliloti* (Perez Guerra et al., 2010; Timmers et al., 2000; Van de Velde et al., 2006; Vasse et al., 1990).

Les observations immunohistologiques menées par Limpens et coll. tout au long de la durée de vie du symbiosome ont pu mettre en évidence un changement d'identité de la membrane péribactéroïdienne dès les premières étapes du processus de sénescence (Limpens et al., 2009) (Figure 29). En effet, dès le relargage des bactéroïdes au sein de la cellule hôte, ceux-ci présentent une identité plasmique (Catalano et al., 2007). En effet, ce relargage par un processus similaire à l'endocytose conduit dans un premier temps à l'invagination progressive de la membrane plasmique finissant par entourer complètement le bactéroïde, formant ainsi le symbiosome. Ainsi lors des premières étapes les symbiosomes arborent la syntaxine SYP132 ; protéine appartenant à la famille des SNAREs (Catalano et al., 2007) marqueur de la membrane plasmique – marqueurs présents tout au long de la durée de vie du symbiosome, même durant les étapes de sénescence (Limpens et al, 2009). Puis, une fois leur capacité de division perdue, les symbiosomes ((Vasse et al., 1990) acquièrent également le marqueur Rab7, conférant aux symbiosomes une identité d'endosome tardif. Identité qu'ils conserveront tout au long de leurs

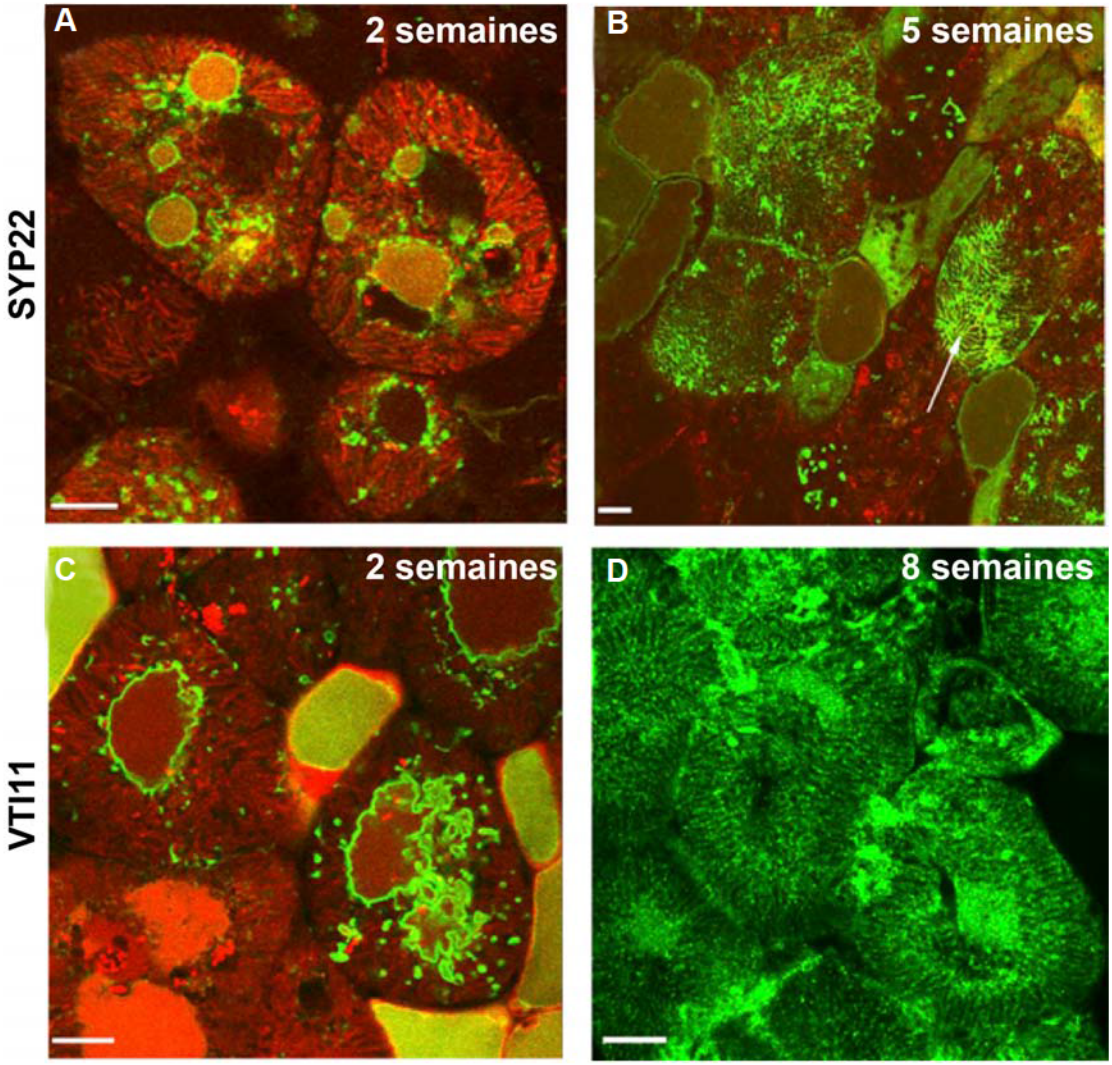


Figure 29 : Acquisition d'une identité vacuolaire des symbiosomes lors de la sénescence nodositaire

(A) Image confocale de cellules infectées de zone III issues de nodosités de 2 semaines exprimant la fusion GFP:SYP22 sous le contrôle du promoteur PLB (promoteur de la leghémoglobine). GFP:SYP22 est adressée au tonoplaste et à de petites structures cytoplasmiques indéfinies, mais pas aux symbiosomes. (B) Distribution de PLb:GFP:SYP22 dans des nodosités de 5 semaines, où GFP :SYP22 est adressée aux symbiosomes sénescents. (C) Image confocale de la distribution de *PLb:GFP:VTI11* dans des cellules infectées de zone III issue de nodosité de 2 semaines. (D). Immunolocalisation de VTI11 sur des nodosités sauvages sénescentes de 8 semaines, montrant la réallocation de VTI11 du tonoplaste à la PBM de symbiosomes sénescents. (A-C) Symbiosomes exprimant la RFP (fluorescence rouge). Echelle : 200 nm.

Figure d'après : Limpens et al., 2009

durées de vie (Limpens et al., 2009). Ces protéines contrôleraient la fusion de la membrane péribactéroïdienne avec les différentes vésicules cargos présentent dans le cytoplasme, participant ainsi à faire de l'espace péribactéroïdienne un compartiment d'échange entre l'hôte et le microsymbionte. Lors des premières étapes de la sénescence, les symbiosomes changent leur identité endosomiale pour une identité vacuolaire arborant les protéines SYP22 et VTI11 marqueurs du tonoplaste (Limpens et al., 2009). L'acquisition de cette identité vacuolaire pourrait permettre le recrutement de protéines vacuolaires notamment de protéases, qui sous conditions de leurs activations, pourraient assurer la dégradation des bactéroïdes et de ce fait initier le processus de sénescence nodositaire. Cette hypothèse peut être étayée par la hausse de l'activité protéase lors de la sénescence nodositaire observée aussi bien chez le soja (Malik et al., 1981), la luzerne (Pladys & Vance, 1993) et le pois (Groten et al., 2006). Les auteurs suggérant que lors de la sénescence, les symbiosomes pourraient être assimilés comme un compartiment lytique (Pladys & Vance, 1993).

VI.3 ANALYSES TRANSCRIPTOMIQUES DU PROCESSUS DE SENESCENCE NODOSITAIRE

Afin d'identifier les gènes différentiellement exprimés lors la sénescence nodositaire et de visualiser les réseaux de gènes assurant ce processus, plusieurs analyses transcriptomiques ont été conduites via différentes stratégies (comparaison de banque d'ADNc, « mRNA

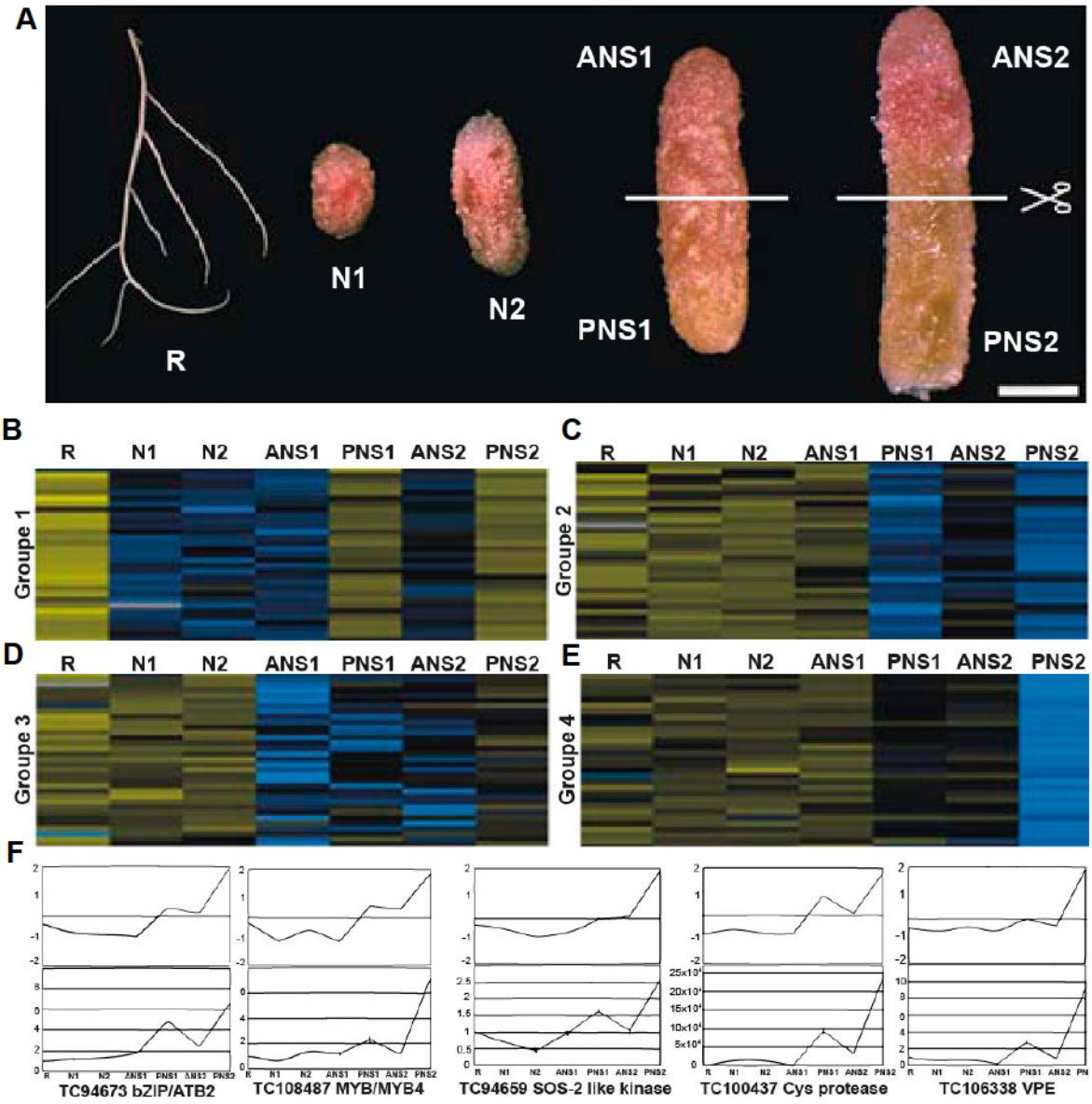


Figure 30 : Analyse transcriptionnelle par cDNA-AFLP de la sénescence nodositaire
(A) Stratégie d'échantillonnage de Van de Velde et coll. (2006). R. Racines carencées en azote ; N1, jeunes nodosités fixatrices d'azote, de forme ronde et dépourvue de zone IV ; N2 nodosités fixatrices d'azote de formes allongées sans zone IV ; ANS1 & PNS1, respectivement partie apicale (fixatrice) et proximale (sénescence) de nodosités matures ; ANS2 & PNS2, respectivement partie apicale et basale de nodosité présentant une zone IV plus importante. La démarcation indique la partie sectionnée lors de l'échantillonnage. Echelle : 1 mm. (B-E) Extrait des 4 profils différents d'expression génique identifiés lors du processus de sénescence ; gènes induits (B) ou réprimés (C) précocement et tardivement lors de la sénescence ; gènes réprimés précocement (D) ou tardivement lors de la sénescence (E). (F) Profil d'expression en cDNA-AFLP (graphiques supérieurs) et RT-qPCR (graphiques inférieurs) de différents gènes induits lors de la sénescence nodositaire dont *MtCP6* (TC100437) et *MtVPE* (TC106338). Les valeurs sont ici normalisées par rapport à l'expression en racine carencée en azote.

Figures modifiées d'après : Van de Velde et al., 2006

differential display » et cDNA-AFLP (Amplification Fragment Lengh Polymorphism) sur le soja (Webb et al, 2008 ; Alesandrini et al, 2003) et *M. truncatula* (Van de Velde et al, 2006 ; Fedorova et al, 2002). Pour affiner l'analyse et enrichir le matériel en tissus sénescents, Van de Velde et coll. ont sectionné transversalement les nodosités de *M. truncatula* en se basant sur le changement de couleur rose-vert de la nodosité (Figure 30A); et en comparant ainsi par cDNA – AFLP le transcriptome de la partie distale fixatrice d'azote à la partie proximale sénescente (Van de Velde et al, 2006). Cette analyse a mis en exergue 508 marqueurs différentiellement exprimés lors de la sénescence répartis selon leurs profils d'expression (Figure 30B-E). L'identification des gènes induits en zone de sénescence suggère l'implication des voies de signalisation de 3 phytohormones : l'éthylène, le jasmonate et les gibbérellines, mais également de différents facteurs de transcription. De plus, différents gènes impliqués dans le transport et le catabolisme comme des protéases et autres gènes impliqués dans la dégradation des acides nucléiques et lipides semblent également participer à la mise en place de ce processus de sénescence.

VI.4 SIGNALISATION HORMONALE LORS DE LA SENESCENCE

Si l'apport exogène d'ABA conduit à diminuer la fixation d'azote de la nodosité (Gonzales et al, 2001), aucun gène impliqué dans cette voie de signalisation n'a été identifié dans l'analyse transcriptomique de Van de Velde et coll (2006) ; mettant d'avantage en évidence les voies de signalisation et, ou de biosynthèse d'éthylène, de jasmonate et des

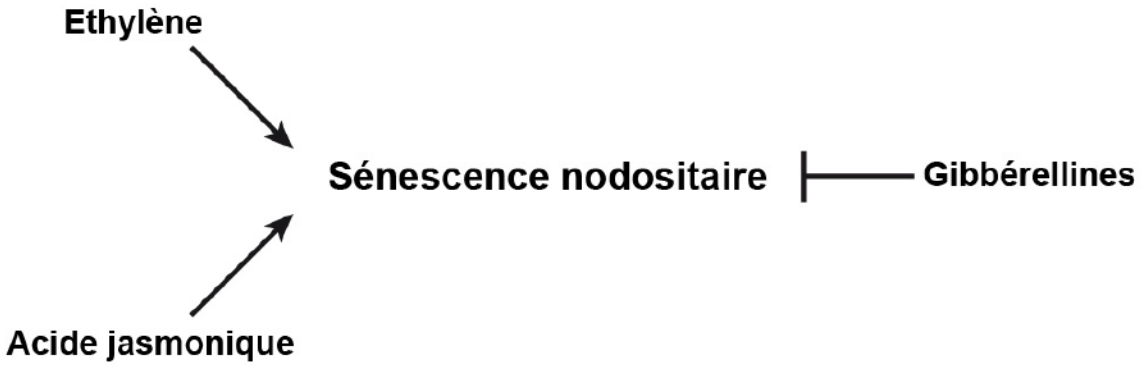


Figure 31 : Sénescence nodositaire et phytohormones
Schéma des connaissances actuelles de la régulation hormonale du processus de sénescence nodositaire ; où éthylène et acide jasmonique semblent jouer un rôle activateur alors que la voie de signalisation en réponses aux gibbérellines serait inhibitrice de la sénescence.

gibbérellines, lors de la sénescence (Figure 31). Ethylène et jasmonate semblent agir en tant qu'inducteur de la sénescence nodositaire. Ce rôle inducteur de l'éthylène est illustré par l'induction de facteur de transcription de la famille ERF (Ethylene Responsive Factors) et des gènes clefs dans sa biosynthèse comme la S-adénosylmethionine synthase , assurant la synthèse du premier précurseur de la voie de biosynthèse de l'éthylène, et l'ACC oxydase (Aminocyclopropanecarboxylique oxydase), dernière enzyme de la voie de biosynthèse de l'éthylène. De même pour le jasmonate, avec l'induction de lipoxygénase via l'oxydation des acides gras polyinsaturés qui initient la biosynthèse d'oxylipines (Feussner & Wasternack, 2002). L'application exogène de jasmonate induit l'accumulation de lipides peroxydés ainsi qu'une modification de la voie de biosynthèse de l'ascorbate, une des principales défenses antioxydantes de la nodosité (Becana et al., 2010), suggérant bien le rôle inducteur de l'acide jasmonique sur la sénescence nodositaire (Loscos et al., 2008). A l'inverse les gibbérellines semblent agir en tant qu'inhibiteurs de la sénescence, notamment du fait de leurs fortes inductions lors de la sénescence nodositaire de la GA2 oxydase qui convertit les gibbérellines en une forme inactive, suggérant un rétrocontrôle négatif de la voie de signalisation des gibbérellines (Thomas et al., 1999; Van de Velde et al., 2006). Cependant, à l'heure actuelle, aucune preuve directe de l'accumulation de gibbérellines n'a été observée.

Concernant le rôle de l'auxine et des cytokinines lors de la sénescence nodositaire contrairement à la sénescence foliaire, peu de données sont actuellement disponibles. A l'exception de l'induction de l'expression du gène LaHK1, homologue potentiel d'un récepteur aux cytokinines, chez *Lupinus albus* (Lupin) dans des nodosités lors de la sénescence nodositaire

naturelle ou induite par un traitement à l'obscurité des plantes ; suggérant l'implication de la voie des cytokinines dans ces différents processus (Coba de la Pena et al., 2008).

VI.5 FACTEURS DE TRANSCRIPTION

D'autres éléments régulateurs non directement reliés à la signalisation hormonale ont été mis en évidence lors de la sénescence nodositaire notamment différentes protéines kinases impliquées dans la signalisation en réponse à des stress environnementaux, mais aussi différents facteurs de transcription (Van de Velde et al., 2006). L'analyse transcriptomique par cDNA-AFLP du processus de sénescence nodositaire révèle l'induction de facteurs de transcription appartenant à la famille des MYB, bHLH (basic Helix-Loop-Helix) et bZIP (basic Leucine Zipper) (Van de Velde et al., 2006) (Figure 30). Cependant, le rôle de certains d'entre eux dans le processus de sénescence nodositaire reste encore à préciser, voire même remis en question. En effet, en poursuivant ces travaux le groupe de Marcelle Holster et Sophie Goormachtig ont pu préciser le rôle du facteur de transcription *ATB2* dans les nodosités de *M. truncatula* (D'Haeseleer et al., 2010) (Figure 32A). En effet bien qu'une augmentation d'expression de ce gène ait été observée lors de la sénescence nodositaire naturelle et induite (Van de Velde et al., 2006 ; Perez Guerra et al., 2010), l'étude *in situ* de l'expression de *MtATB2* a mis en évidence une expression au niveau de l'apex et des vaisseaux vasculaires des nodosités matures (D'haeseleer et al., 2010) (Figure 32C, D). Aucun signal n'est détecté au niveau de la

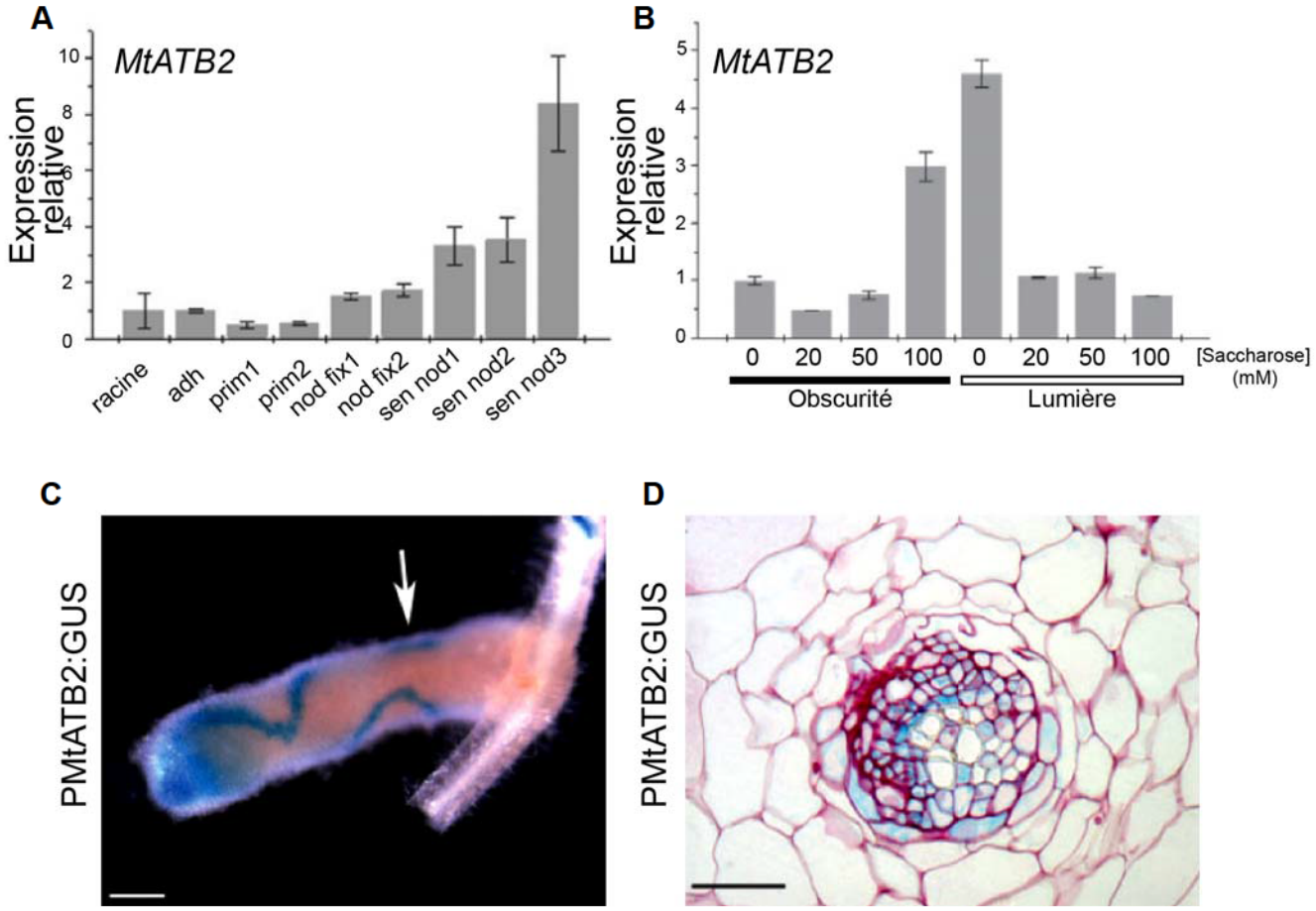


Figure 32 : Induction de *MtATB2* lors de la sénescence nodositaire

(A) Expression relative de *MtATB2* au cours de la nodulation. Racine : racines non infectées en carence azotée. Adh : racine à 5 jours post inoculation après adhésion racinaire des rhizobia ; prim1 : primordium nodositaire précoce de 7 jours post-inoculation ; prim2 : primordium tardif avec présence de cordon d'infection dans le primordium, 8 jours post-inoculation ; nod fix1 : nodule fixateur de forme ronde ; nod fix2 : nodule fixateur de forme allongé ; nod sen1 : nodule avec une zone de sénescence inférieur à 50% de la taille de la nodosité ; nod sen2 : nodosité avec plus de 50% de sénescence ; nod sen3 : nodosité pleinement sénescente. (B) Expression relative de *MtATB2* dans des plantules germées après 5 jours à la lumière ou à l'obscurité en présence de concentration croissante de saccharose (0 – 100mM), mettant en évidence la corrélation entre l'expression de *MtATB2* et le déficit ou l'excès de saccharose, suggérant l'implication de *MtATB2* dans le contrôle de l'homéostasie en saccharose de la nodosité. (C) Détection histochimique de l'expression de *MtATB2* dans des nodosités transgéniques P*MtATB2:GUS* sur des nodosités matures présentant une zone de sénescence. *MtATB2* est exprimé au niveau de l'apex et des vaisseaux vasculaires (flèche) de la nodosité, mais pas au niveau de la zone de sénescence. Echelle : 1,5 mm. (D) Agrandissement illustrant d'un faisceau vasculaire nodositaire illustrant l'expression de *MtATB2*. Section colorée au rouge de ruthénium marquant ici les parois. Echelle : 0,5 mm.

Figures d'après : D'haeseleer et al., 2010

zone de sénescence ou à la jonction entre zone III fonctionnelle et la zone IV sénescente. De plus, les auteurs mettent en évidence une régulation d'*MtATB2* par la lumière et le saccharose suggérant l'induction de *MtATB2* lors de conditions de carence en saccharose comme lors d'une sénescence induite par un stress obscurité (Figure 32B), expliquant ainsi l'induction observée par Pérez-Guerra et coll. (2010). Ainsi *MtATB2* participerait d'avantage à la régulation de l'homéostasie en glucides, altérée lors de la sénescence nodositaire, que directement de la mise en place d'un processus de dégradation des bactéroïdes et des cellules hôtes végétales. Cependant, l'implication des autres facteurs transcriptions de la famille MYB et bHLH lors de la sénescence nodositaire restent encore à déterminer. Plus récemment, les travaux menés par de Zéliourt et coll. (2012) suggèrent l'implication du facteur de transcription *Mt*NAC969 dans la l'adaptation des racines au stress salin mais également dans le processus de sénescence nodositaire. En effet, la diminution de l'expression de *MtNAC969* par RNAi conduit à une accumulation d'amylopastes et à l'induction de gènes marqueurs de sénescence dont *MtCP6*, suggérant ainsi l'induction du processus de sénescence nodositaire (de Zelicourt et al., 2012). De nouvelles études, menées par la même équipe, sont actuellement en cours pour préciser le rôle de *Mt*NAC969 dans le processus de sénescence.

VI.6 ALTERATION DE LA LEGHEMOGLOBINE ET DE LA BALANCE REDOX

La leghémoglobine assure un rôle fondamental dans le fonctionnement de la nodosité en participant à la fois à la microoxie et à la diffusion de l'oxygène aux bactéroïdes au sein de la zone III. De ce fait, l'altération de la leghémoglobine peut être utilisée comme marqueur de la sénescence nodositaire. La diminution de transcrits *Lb1* ainsi que la diminution de la teneur en leghémoglobine sont corrélées à la mise en place du processus de sénescence (Puppo et al, 2005) (Figure 33A). Outre la diminution de la microoxie et de la disponibilité de l'oxygène pour les bactéroïdes, la dégradation de la leghémoglobine et de son groupement héminique conduit à la libération de fer dans le cytoplasme pouvant conduire, via la réaction de Fenton, à la production d'espèces réactives de l'oxygène (Becana & Klucas, 1992). Hypothèse validée sur des nodosités transgéniques de lotier présentant une expression réduite par ARN interférence de la leghémoglobine. Cette réduction de la leghémoglobine induit la diminution de la quantité de peroxyde d'hydrogène au sein de la nodosité (Gunther et al., 2007) (Figure 33B, D). Egalement, le peroxyde d'hydrogène est détecté au niveau des cellules infectées du tissu central sénescent et son augmentation est corrélé à la présence de cystéine protéases (Alesandrini et al., 2003).

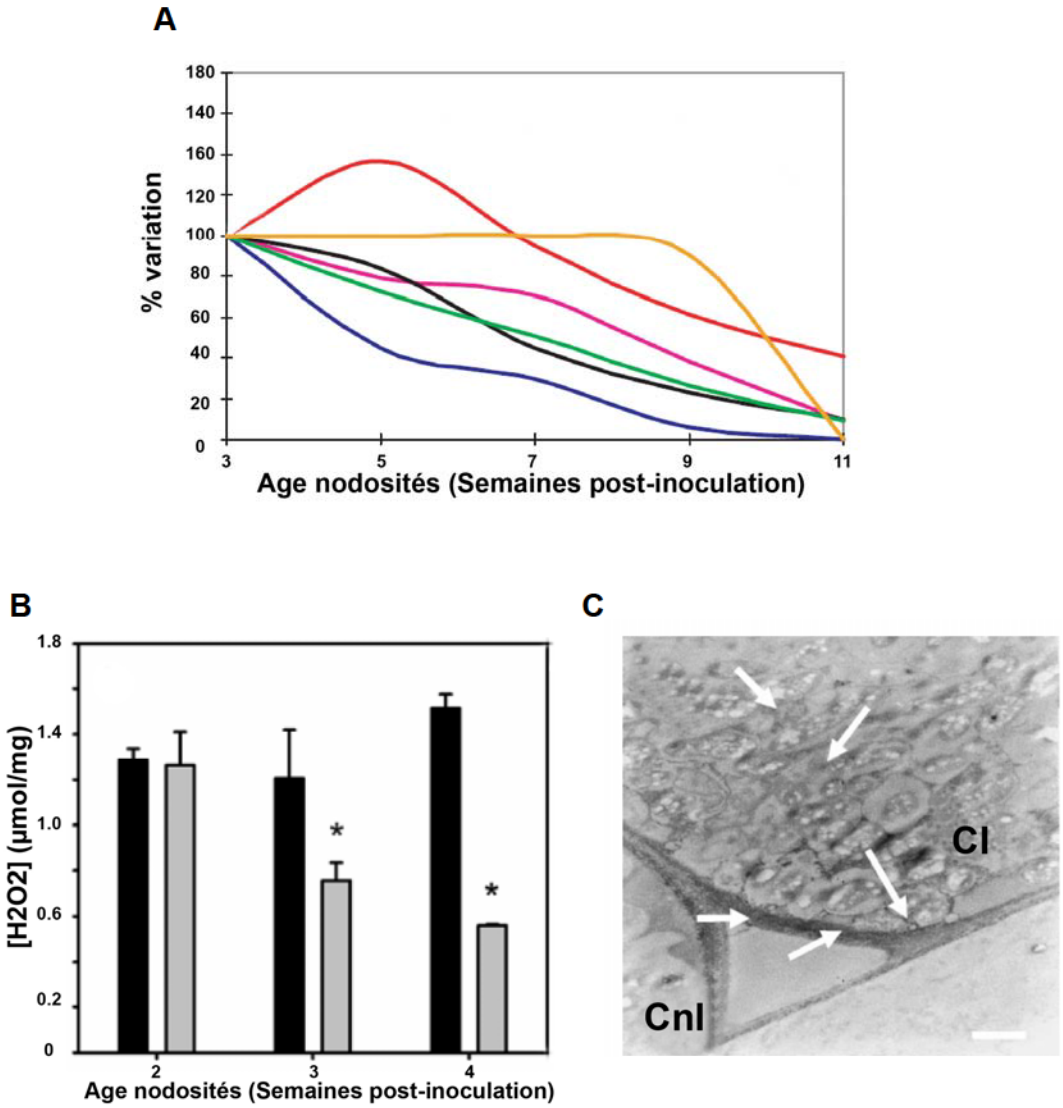


Figure 33 : Sénescence nodositaire et perturbation de l'équilibre redox
(A) Altération des paramètres physiologiques lors de la sénescence nodositaire. Activité nitrogénase (bleu) ; taux d'ascorbate (noir) ; taux de glutathion (vert) ; activité catalase (rouge) ; transcrit leghémoglobine (orange). Valeurs fixées à 100% à 3 semaines post-inoculation. (B) Valeurs obtenues sur nodosités de *P. sativum*. Concentration de peroxyde d'hydrogène (B) pour des nodosités sauvages (gris) et transgéniques présentant une expression leghémoglobine réduite par ARNi (noir). * différences significatives à $p<0.05$, t-test de Student. (D) Détection *in situ* du peroxyde d'hydrogène par marquage au cérium de nodosités sénescentes de 10 semaines, nodosités collectées chez *G. max*. CI : cellules infectées ; CnI : cellules non-infectées. Echelle : 0,8 µm.

Figure d'après : Puppo et al., 2005 ; Gunther et al., 2007 ; Alesandrini et al., 2003

Outre cette production de ROS due à la dégradation de la leghémoglobine, la sénescence nodositaire est accompagnée d'une altération de la balance Redox ; à savoir, de l'équilibre entre défense antioxydante et espèces réactives de l'oxygène (Apel & Hirt, 2004). En effet, l'ascorbate (Asc), le glutathion (GSH) et l'homoglutation (hGSH) sont les principaux antioxydants au sein de la nodosité (Becana et al., 2010). La répression des gènes impliqués dans la biosynthèse de l'Asc et du GSH sur des nodosités de *Phaseolus vulgaris* lors de la sénescence nodositaire développementale met en lumière la diminution de l'Asc et du GSH lors de la sénescence nodositaire (Loscos et al., 2008) (Figure 33A). Récemment des travaux menés sur *P. vulgaris* suggèrent que lors de la sénescence, les mitochondries au sein des tissus de la nodosité seraient une des premières cibles des modifications de la balance redox (Matamoros et al., 2012). En effet, les auteurs ont observé une hausse des lipides et protéine oxydées associée à une diminution de la concentration d'Asc et de GSH mitochondriale sans pour autant observer de tels dommages dans le cytoplasme.

Le rôle et surtout le mécanisme par lequel(s) cette altération de la balance redox influe sur la sénescence nodositaire n'a pas encore été totalement élucidé. S'agirait-il d'un stress oxydant ou bien d'un signal oxydatif qui en tant que messager secondaire conduirait à l'activation d'autres gènes ou protéines en aval ?

VI.7 SENESCENCE NODOSITAIRE ET PROTEASES

La production d'espèces réactives de l'oxygène dans la nodosité est corrélée à l'induction de protéases. En effet, la sénescence nodositaire conduit à l'activation d'activités protéolytiques, et ce chez de nombreux modèles végétaux, dont *G. max* (Figure 34A-E) et *M. truncatula* (Figure 34F-H) (Malik et al., 1981; Pladys & Vance, 1993). Plus précisément, l'induction de cystéine protéases a été mise en évidence dans des nodosités sénescentes de soja (Alesandrini et al., 2003), d'astragale (Naito et al., 2000), de pois (Kardailsky & Brewin, 1996) et de *M. truncatula* (Fedorova et al., 2002). De plus, la réduction par ARN interférence de l'expression de la cystéine protéase *AsNodF32* conduit à retarder la mise en place du processus de sénescence conduisant à une fixation d'azote accrue des nodosités matures (Li et al., 2008) ; suggérant ainsi un rôle essentiel de cette protéase dans le processus de sénescence nodositaire. L'analyse transcriptomique menée par Van de Velde et coll. (2006) confirme bien l'induction de cystéine protéases, parmi lesquels deux protéases induites précocement lors du processus de sénescence, une papain-like protéase (*Mt*CP6) et une légumaine protéase, également appelée Vacuolar Processing Enzyme, *Mt*VPE. Ces protéases également induites lors de la sénescence nodositaire induite par un stress à l'obscurité (Perez Guerra et al., 2010). Ces observations sont étayées par la hausse des activités cystéine protéases observées lors de la sénescence nodositaire chez le pois (Figure 34I) (Groten et al., 2006) et la luzerne (Pladys & Vance, 1993).

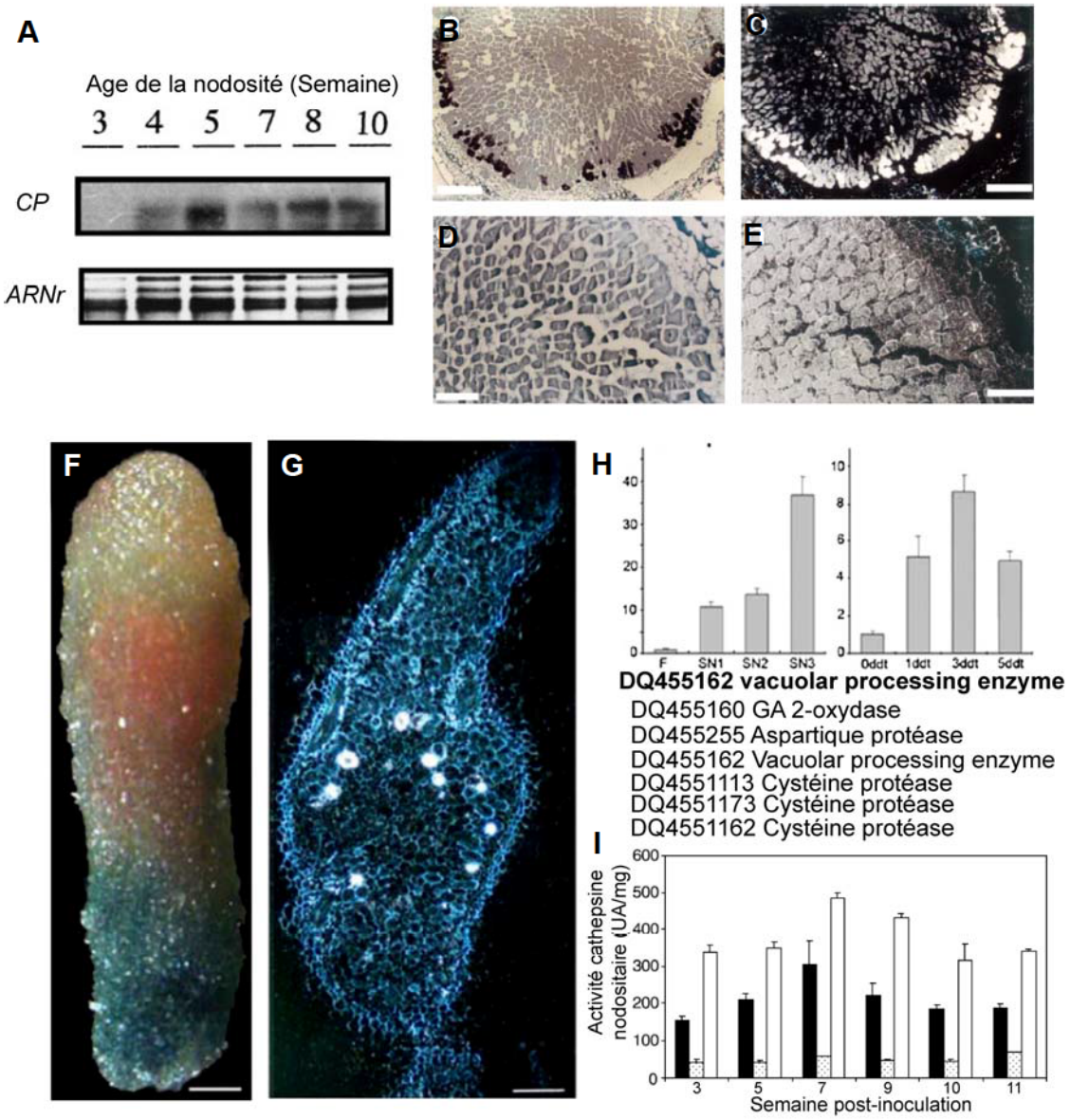


Figure 34 : Cystéine protéases lors de la sénescence nodositaire développementale ou induite
(A) Accumulation des transcrits d'une cystéine protéase (*CP*) lors de la sénescence nodositaire chez *Glycine max*. Analyse en Northern-blot avec une sonde antisens radiomarquée ^{32}P. La qualité et quantité (10µg/piste) des ARN totaux sont visualisées par marquage au Bromure d'éthidium comme contrôle de charge. (B-E) Localisation des transcrits *CP* par hybridation *in situ* sur des coupes de nodosité de 5 semaines (B-C) et 10 semaines (D-E). Hybridation réalisée avec une sonde antisens radiomarquée au ^{35}S. Le contrôle avec une sonde sens n'est pas illustré ici. Echelle : (B-C) 80µm, (D-E) 40µm. (F) Détection histochimique de l'expression la protéase *MtCP6* via fusion promoteur-GUS sur des nodosités transgéniques de 4 semaines post-inoculation chez *M. truncatula*. Activité glucuronidase (GUS) formant ici un précipité bleu. (G) Détection par hybridation *in situ* des transcrits *CPs* (*MtCP1-6*) via une sonde antisens commune à ces 6 transcrits radiomarqués au ^{35}S. (H) Analyse en RT-qPCR de l'accumulation de différents transcrits de *M. truncatula* lors de la sénescence nodositaire naturelle ou induite par un traitement des plantes à l'obscurité (F, nodosités fixatrices ; SN1 moins de 50% des nodosités sont sénescentes ; SN2 près de 50% des nodosités sont sénescentes et SN3 où plus de 50% des nodosités sont sénescentes ; 0ddt nodosités fixatrices contrôles ; 1, 3 et 5ddt nodosités après 1, 3 et 5 jours d'obscurité. (I) Evolution des activités cystéine protéases cathepsine-L (noir), -H (pointillé) et -B (blanc) lors de la sénescence nodositaire chez *P. sativum*.

Figures modifiées d'après : Alesandrini et al., 2003 ; Pérez-Guerra et al., 2010 et Groten et al., 2006

VI.8 LA SENESCENCE NODOSITAIRE DITE INDUITE

L'exposition excessive à différentes variations environnementales peut conduire à différents stress de la plante et notamment de la nodosité. Par exemple, un stress hydrique et salin ou encore la privation prolongée de lumière ou l'exposition à de trop faibles températures affectant l'équilibre symbiotique de la nodosité conduisent à altérer la fixation d'azote et à terme à induire la rupture de l'interaction. C'est ce que l'on appelle la sénescence nodositaire induite.

Si la sénescence nodositaire développementale conduit à partir de 6 semaines post-inoculation à diminuer progressivement la fixation d'azote et à mettre en place une zone IV (Puppo et al., 2005 ; Van de Velde et al., 2006), ces paramètres évoluent beaucoup plus rapidement lors de la sénescence nodositaire induite. La fixation d'azote peut ainsi être fortement impactée en quelques jours par une exposition trop prolongée à un stress hydrique (Gonzalez et al., 1995; Larrainzar et al., 2007), salin (Soussi et al., 1998), obscurité (Gogorcena et al., 1997; Matamoros et al., 1999) ou encore d'exposition au froid (van Heerden et al., 2008) conduisant ainsi à la mise en place rapide et précoce d'une zone IV de sénescence devenant majoritaire dans l'ensemble de la nodosité (Perez Guerra et al., 2010) (Figure 35).

La mise en place rapide du processus de rupture symbiotique laisse suggérer que la sénescence nodositaire induite pourrait être une approche rapide pour l'étude de la sénescence nodositaire. Cependant, il reste à s'assurer que bien qu'en apparence semblable la

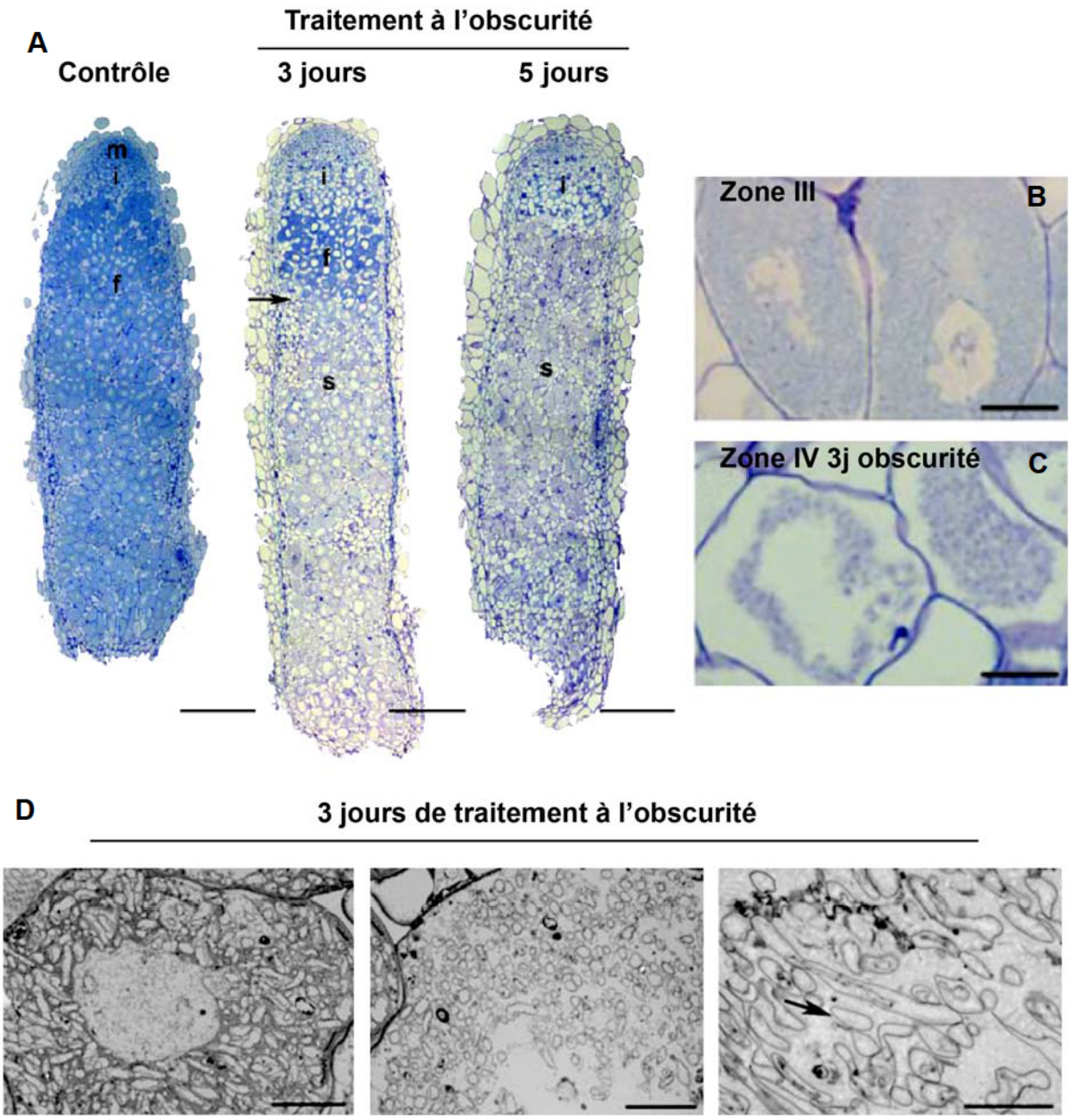


Figure 35 : Altération de la structure de nodosités de *M. truncatula* après traitement de 3 ou 5 jours à l'obscurité

(A) Coupe transversale de nodosités de 21 jours après 3 ou 5 jours de traitement prolongé des plantes nodulées à l'obscurité (coloration au bleu de toluidine). La flèche indique le front de la zone de sénescence, soit l'interzone entre zone III et zone IV. m: zone méristématique ; i : zone d'infection. f : zone fixatrice d'azote. s: zone de sénescence. Echelle : 500 µm (B). Cellules infectées issues de zone III fonctionnelle. Echelle : 10µm. (C) Cellules infectées de zone IV en cours de dégradation. Echelle : 10µm. (D) Micrographie en microscopie électronique à transmission de cellules infectées après 3 jours de stress à l'obscurité. Les bactéroïdes sont dégradés, mais la membrane péribactéroïdienne (PBM) reste intacte (flèche) même après lyse de la vacuole centrale (image centrale). Echelle : 10 µm.

Figure d'après : Perez Guerra et al., 2010

mise en place de ces deux processus emprunte bien un même mécanisme moléculaire conduisant au même processus de rupture de l'interaction symbiotique. Et ce en réponse aux différents inducteurs de la sénescence nodositaire.

VI.8.A La sénescence nodositaire développementale et induite, des caractéristiques propres et communes

Diverses données pointent les divergences structurelles, mais aussi physiologiques entre la sénescence nodositaire développementale et la sénescence nodositaire induite par différents facteurs abiotiques (Perez Guerra et al., 2010).

Le processus varie au niveau structurel. En effet, chez *M. truncatula*, si le processus de sénescence induite conduit à une expansion rapide de la zone IV, il ne conduit pas à la l'apparition massive de vésicules ni à la dégradation des symbiosomes. Certes, la sénescence induite par un traitement prolongé à l'obscurité provoque la condensation des bactéroïdes, qui conservent leur membrane péribactéroïdienne (PBM) intacte. La PBM est conservée même après la totale disparition du bactéroïde (Perez Guerra et al., 2010). Alors que cette PBM est la première cible dégradée lors de la sénescence nodositaire développementale (Van de Velde et al., 2006).

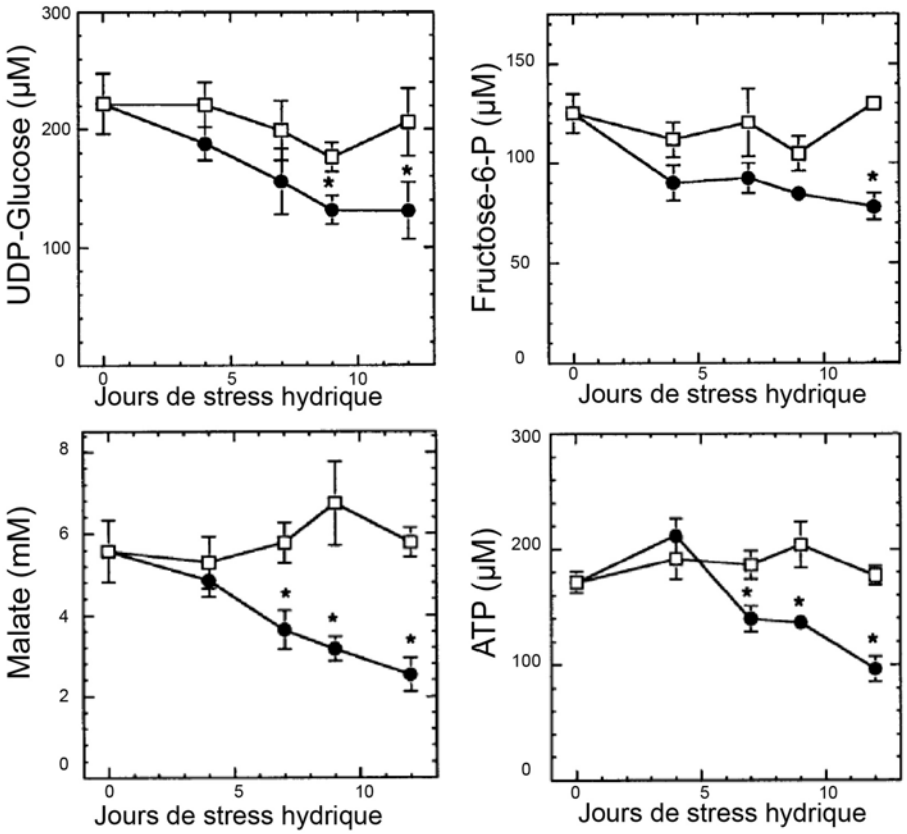
Ce processus de sénescence induite provoque également de rapides changements physiologiques au sein de la nodosité particulièrement vis-à-vis de son métabolisme carboné. En effet, un traitement prolongé à l'obscurité (Matamoros et al., 1999 ; Gogorcena et al., 1997),

un stress hydrique (Galvez et al., 2005) ou salin (Lopez et al., 2008) provoquent la diminution de la concentration en glucides au sein de la nodosité, comme le glucose, fructose et saccharose (Figure 36A, B). Cette diminution du saccharose traduit une altération du métabolisme de la nodosité et conduit irrémédiablement à la diminution de la synthèse d'ATP via la phosphorylation oxydative (Figure 36A) (énergie indispensable à l'activité nitrogénase). Le taux de malate, substrat préférentiel pour la respiration du bactéroïde décroit également suite à ces mêmes stress (Figure 36A) (Marino et al., 2007; Galvez et al., 2005).

La pression partielle en O_2, au sein de la nodosité et plus précisément au sein des cellules infectées de la zone III, est finement régulée pour maintenir un environnement microoxique propice à la respiration du bactéroïde et à l'activité de la nitrogénase. Ainsi, la diffusion de l'O_2 a été étudiée lors de la sénescence nodositaire induite par différents stress, notamment hydrique, salin, obscurité (Aydi et al., 2004; Gogorcena et al., 1997; Naya et al., 2007). Ces stress conduisent à diminuer la diffusion de l'O_2 réduisant ainsi sa disponibilité pour les bactéroïdes, tendant à diminuer l'activité respiratoire et à terme l'activité nitrogénase (Figure 36C) (Gogorcena et al., 1997).

De même, au niveau transcriptomique, certains gènes induits lors de la sénescence nodositaire développementale ne présentent pas de différenciel d'expression lors de la sénescence induite par un stress à l'obscurité (Figure 37) (Perez Guerra et al., 2010). En effet, près de 50% des gènes étudiés par Perez-Guerra et coll. ne sont pas significativement induits lors de la sénescence nodositaire induite par un stress obscurité, alors que ceux-ci présentent

A



B

	Traitement obscrurité (jours)			
	0	1	2	4
Glc	348a	109b	125b	94b
Fru	70a	33b	11c	10c
Sac	8946a	313b	207b	34c
Amidon	8002a	2048b	1526b	1235b
% O_2 en zone infectée	ND	0,9a	1,5a	3,9b

C

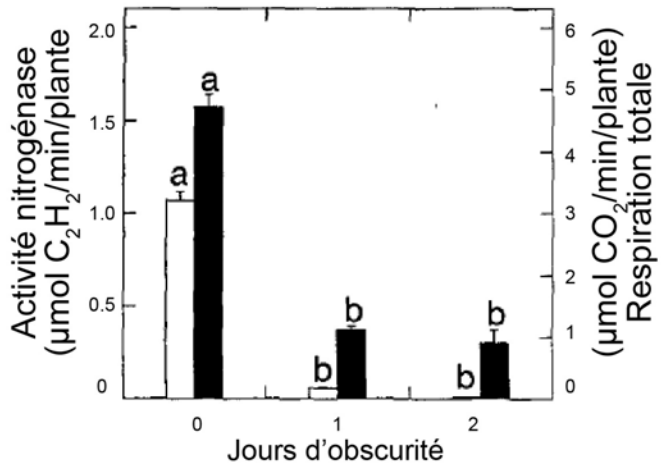


Figure 36 : Altération du métabolisme carboné et de la respiration lors de la sénescence induite
(A) Effet du stress hydrique sur la concentration en UDP-glucose, Fructose-6-phosphate, malate et ATP sur des nodosités de pois contrôles (carrés blancs) et stressées (ronds noirs). Astérisque : différences significatives à P<0,05 sur un effectif de 12. Moyenne ± erreur standard. (B) Effet d'un traitement prolongé à l'obscurité sur la concentration en glucose (Glc), fructose (Fru), saccharose (Sac), amidon (µg/g de poids frais) et pourcentage d'oxygène dans la zone infectée de nodosité WT. Différences significatives à P<0,05. (C) Diminution suite à un traitement de 1-2 jours à l'obscurité de l'activité nitrogénase (blanc) et de la respiration (noir) de plants de pois (*P. sativum*) nodulés. Différence significative à P<0,05.

Figure modifiées d'après : Galvez et al, 2005 ; Gorgocera et al, 1997

une augmentation de leur expression lors de la sénescence développementale. Parmi ces gènes, sont présents différents gènes régulateurs, dont des kinases et facteurs de transcription, des transporteurs, mais aussi des syntaxines et des phosphatidyl-4-phosphate kinases protéines impliquées dans le trafic vésiculaire et plus précisément dans l'identité des différents compartiments membranaires) (Catalano et al., 2007; Di Paolo & De Camilli, 2006; Roth, 2004). Cependant, si la sénescence nodositaire induite diverge de la sénescence naturelle, certains paramètres sont cependant semblables. En effet, la comparaison menait par Pérrez-Guerra et coll. sur une soixantaine de gènes en RT-qPCR, met également en exergue une trentaine de gènes à la fois induits lors de la sénescence nodositaire développementale, mais également induits par un traitement à l'obscurité (Figure 37). Deux profils d'expression ont ainsi été mis en évidence, le groupe A pour lequel les gènes sont induits lors des deux processus de sénescence et le groupe B dont les gènes sont induits progressivement lors de la mise en place de ces deux processus ; les gènes *MtCP6* (DQ455113) et *MtVPE* (DQ455162) étudiés dans cette étude faisant partie de ce groupe B.

De même, l'expression de la leghémoglobine qui joue un rôle fondamental dans le fonctionnement de la nodosité (Ott et al., 2009; Ott et al., 2005) est également un bon marqueur du processus de sénescence nodositaire induit comme de sénescence nodositaire développementale. En effet, la leghémoglobine diminue lors de la sénescence nodositaire naturelle (Puppo et al., 2005) ou induite aussi bien suite à la suite d'un stress hydrique (Gogorcena et al., 1995; Gordon et al., 1997), salin (Gordon et al., 1997) ou obscurité (Gogorcena et al., 1997; Gordon et al., 1997). La dégradation de la leghémoglobine conduit au

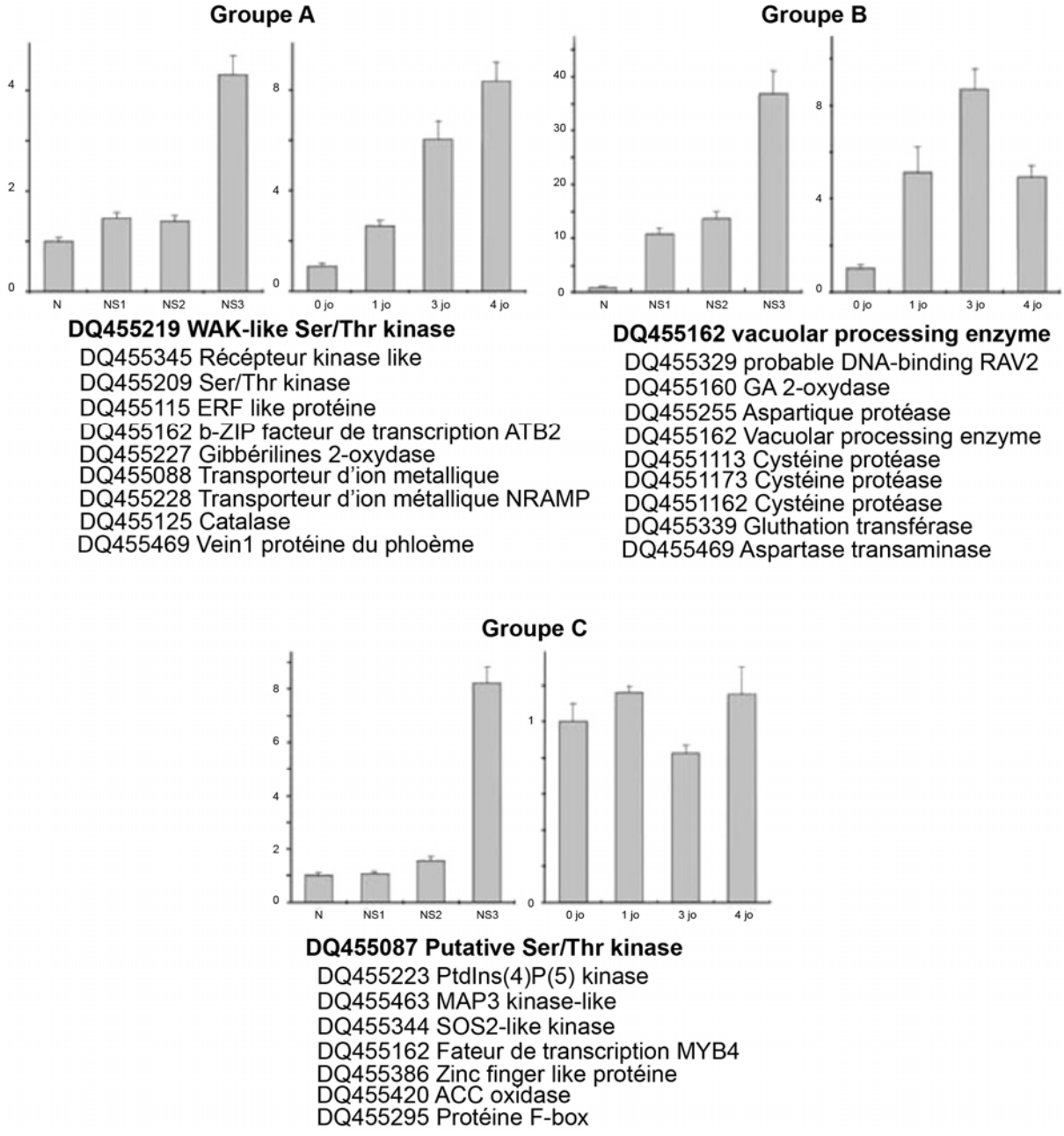


Figure 37 : Sénescence nodositaire développementale et induite, similarités et divergences
Comparaison par RT-qPCR du profile d'expression en sénescence nodositaire induite par un traitement prolongé à l'obscurité de 58 gènes induits lors de la sénescence nodositaire développementale. Trois profils d'expressions se distinguent ; le groupe A, composé de gènes induits dans les deux types de sénescence ; le groupe B composé de gènes induits par l'obscurité ; le groupe C est composé de gènes uniquement induits lors de la sénescence développementale et ne présentant aucun différentiel d'expression significatif lors de la sénescence induite par un traitement prolongé à l'obscurité. N, nodosités fixatrices de 21 jours ; NS1 moins de 50% des nodosités sont sénescentes ; NS2 près de 50% des nodosités sont sénescentes et NS3 où plus de 50% des nodosités sont sénescentes ; 0j nodosités fixatrices contrôles ; 1, 3 et 5j nodosités après 1, 3 et 5 jours d'obscurité.

Figure modifiée d'après : Perez Guerra et al., 2010

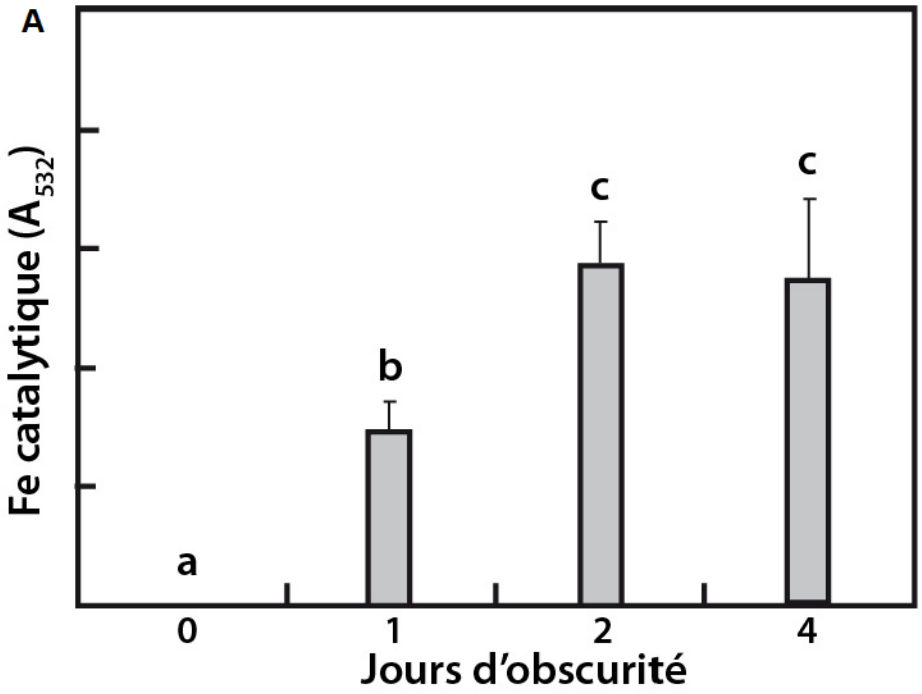
changement de coloration de rose à vert dans la nodosité sénescente (Lehtovaara & Perttila, 1978), mais participe également à l'altération de la microoxie et à la modification de la balance redox nodositaire observée lors de la sénescence développementale (Puppo et al., 2005).

VI.8.B Altération de l'équilibre redox nodositaire lors de la sénescence induite

La sénescence nodositaire développementale provoque une altération de la balance redox au sein de la nodosité, via la production d'espèces réactives de l'oxygène (Gunther et al., 2007) notamment par la dégradation de la leghémoglobine qui entraine la libération d'ion Fe (Becana & Klucas, 1992). De plus, ce processus de sénescence provoque également la diminution des défenses antioxydantes enzymatiques et non enzymatiques de la nodosité (Loscos et al., 2008).

Un processus similaire semble se dérouler lors de la sénescence nodositaire induite. En effet, l'accumulation de Fe libre, également appelé fer catalytique, a été observée lors de sénescence nodositaire induite par un stress à l'obscurité (Figure 38A) (Gogorcena et al., 1997) ou hydrique (Gogorcena et al., 1995). Cette observation est corrélée avec l'induction dans la nodosité de l'expression de ferritines lors de stress hydrique (Clement et al., 2008). Ces protéines étant impliquées dans la chélation et donc la détoxication des métaux de transition, dont le fer.

A



B

	Traitement obscurité (jours)			
	0	1	2	4
ASC	940a	770b	690c	570d
(h)GSH	690a	540b	440b	240c
SOD	384a	382a	332b	263c
CAT	1660a	1900a	1590a	500b

Figure 38 : Altération de la balance redox lors de la sénescence induite
(A) Augmentation du taux de fer dans des nodosités stressées à l'obscurité. Teneur en Fe exprimé en A_{532}, pour lequel 0,20 unité d'absorbance correspond à environ 1µM de fer catalytique. (B) Effet d'un traitement prolongé à l'obscurité sur la concentration en ascorbate (ASC), et glutathion GSH et homoglutathion (h)GSH (nmol/g poids frais) ; et diminution des activités superoxyde dismutase (SOD) et catalase (CAT) (µmol/min/g poids frais dans des nodosités de haricot (*P. vulgaris*). Différences significatives à $p<0,05$.

Figures modifiées d'après : Gorgocera et al., 1997

De plus, la teneur en GSH et en Asc, les deux antioxydants majeurs au sein de la nodosité (Becana et al., 2010) est diminuée lors de la sénescence nodositaire induite par un stress hydrique (Gogorcena et al., 1995) ou à l'obscurité (Figure 38B) (Gogorcena et al., 1997). De même, l'expression de superoxyde dismutases et de catalases, enzymes impliquées dans la détoxication de ROS, sont fortement réprimées lors de ces mêmes stress hydriques (Gogorcena et al., 1995; Rubio et al., 2004) ou à l'obscurité (Figure 38B) (Gogorcena et al., 1997; Matamoros et al., 1999).

VI.9 SENESCENCE PRECOCE ET BACTEROÏDES NON FONCTIONNELS

La nodosité étant un organe symbiotique, la déficience du partenaire bactérien peut également entrainer l'altération du développement ou de l'homéostasie de la nodosité pouvant conduire à l'induction précoce du processus de sénescence nodositaire. Ces mutants peuvent être affectés pour la machinerie de fixation d'azote (*nifH*, *fixA*, *fixJ* et *fixK*) (Figure 39C) (Maunoury et al., 2010), la défense antioxydante (*gshB*, *katA*, *katC*) (Harrison et al., 2005; Jamet et al., 2003), la biosynthèse de lipopolysaccharide (*lspB*) (Maunoury et al., 2010), mais aussi pour des protéines ribo-régulatrices (*hfq*) (Figure 39F-K) (Torres-Quesada et al., 2010) ou impliqué dans la réponse aux stress environnementaux (*rpoH1*) (Figure 39B) (Mitsui et al., 2004). Ces différents mutants produisent des nodosités non fonctionnelles qui conduisent à l'induction précoce du processus de sénescence. Cependant, ces phénotypes mutants ont été caractérisés par leurs capacités fixatrices d'azote, leurs impacts sur la biomasse végétale ainsi que sur la structure nodositaire et parfois sur l'ultrastructure de la cellule infectée et des bactéroïdes. Cependant, l'absence de donnée transcriptomique, moléculaire et cellulaire limite la caractérisation plus fine de ces mutants, empêchant pour l'instant d'établir le rôle précis de ces gènes bactéroïdiens.

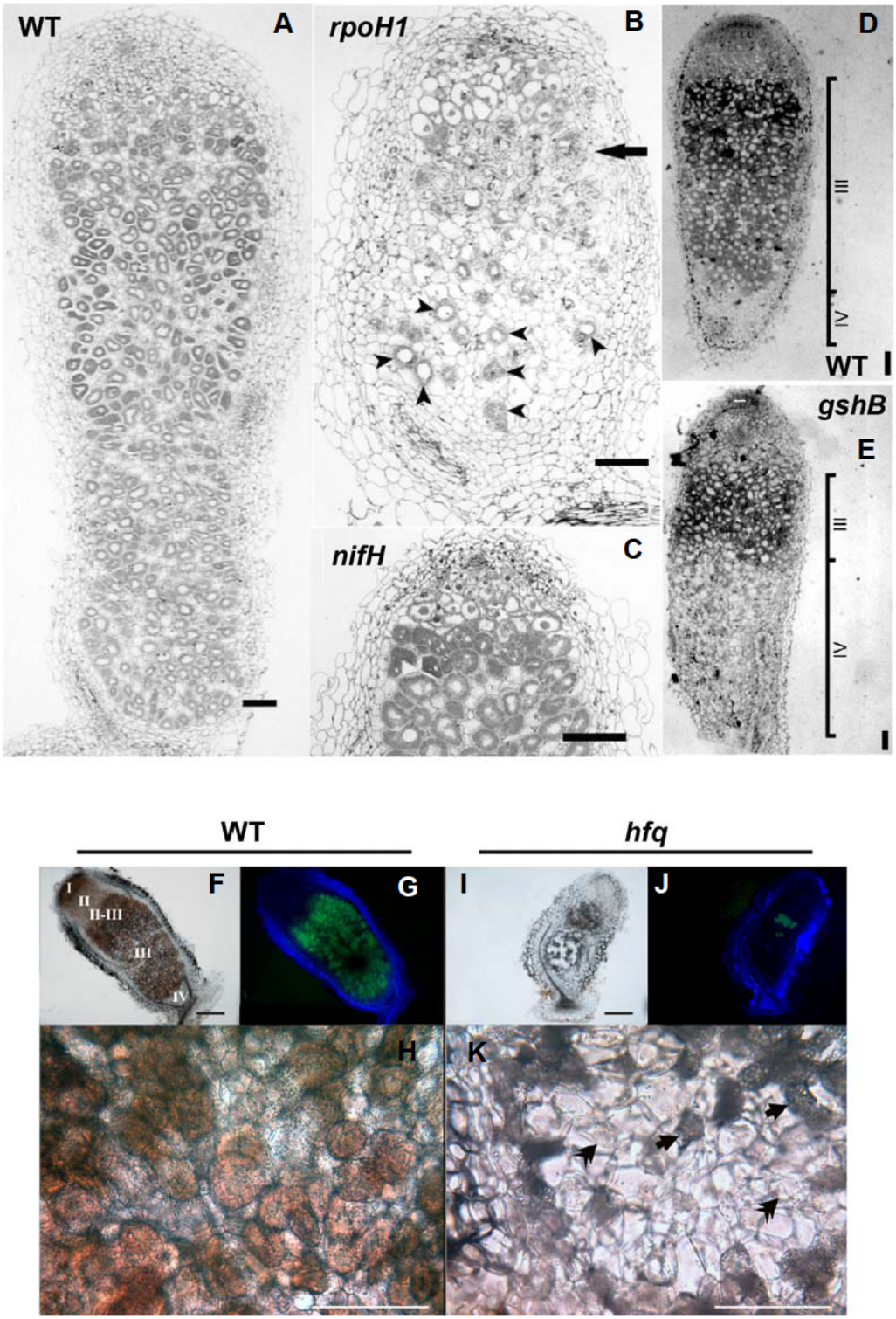


Figure 39 : Sénescence précoce et bactéroïdes non fonctionnels
(A-K) Coupe de nodosité de *M. sativa* inoculée avec différentes souches de *S. meliloti* sauvage (WT) ou mutantes (*rpoH*, *nifH*, *gshB*, *hfq*) conduisant à induire une sénescence précoce de la nodosité. (F-G) et (I-J) Comparaison en microscopie à fluorescente (filtres LP470nm et LP520nm) de la structure de nodosité sauvage (F-H) et du mutant *hfq* (I-K). (H-K) Agrandissement de la partie centrale de la nodosité présentant de cellules infectées fonctionnelles remplies de leghémoglobine (H) et en cours de dégradation avec un collapse cellulaire (double flèche) et débris cellulaire (flèche), illustrant la mise dégradation effective des tissus (K).

Figures modifiées d'après : Mitsui et al., 2004 ; Harrison et al., 2005 ; Torres-Quesada et al., 2010

Ainsi, bien que certaines réponses soient divergentes, la sénescence nodositaire induite s'avère être une approche intéressante et rapide pour la caractérisation de gènes candidats potentiellement impliqués dans le processus de rupture de l'interaction symbiotique.

VII. OBJECTIFS DE CE TRAVAIL DE THESE

Nos connaissances actuelles tendent à caractériser le processus de sénescence nodositaire, comme un processus développemental contrôlé, programmé, faisant appel à des voies de régulations hormonales, à un changement de l'état redox, ainsi qu'à divers agents protéiques avec des rôles de signalisation, de dégradation et de transport, assurant probablement la mise en place du processus de dégradation et la réallocation des nutriments dans le reste de la plante.

Ainsi pour mieux caractériser ce processus de sénescence nodositaire nous avons développé de nouveaux outils cytologiques afin d'étudier plus finement la transition de l'état symbiotique à l'état sénescent. Dans un premier temps, nous avons mis en place une approche *in vivo* permettant de visualiser la viabilité, mais également le fonctionnement des bactéroïdes au sein même de la nodosité, via respectivement l'utilisation des sondes fluorescentes Live/Dead BacLight et LysoTrackers. Travail ayant permis la publication de trois articles (Cam et al., 2012; Haag et al., 2011; Pierre et al., 2013).

En parallèle, nous avons cherché à déterminer l'implication des cystéines protéases *MtCP6* et *MtVPE* dans la rupture de l'interaction symbiotique chez *M. truncatula* par des approches de génétiques inverses, biochimiques, cytologiques et histologiques. Travail faisant l'objet d'un article soumis au journal « The New Phytologist » (Pierre et al, submitted). Cette caractérisation du rôle de ces deux protéases a permis de développer l'utilisation de la fusion transcriptionnelle *PMtCP6:GUS* comme marqueur moléculaire de l'induction du processus de sénescence. Outil publié en collaboration lors de la publication (Cam et al, 2012) et également en cours d'utilisation au sein de la « communauté *Medicago* » (Dr M.H. Walter, Haale, Allemagne et Pr V. Gruber, Gif-sur-Yvette, France).

CHAPITRE II MATERIELS ET METHODES

I. MATERIELS BIOLOGIQUE ET CONDITIONS DE CULTURE

I.1 M. TRUNCATULA

Afin de permettre leurs stérilisation et germination, les graines d'*M. truncatula* (écotype A17) sont , comme précédemment décrite (Boisson-Dernier et al., 2001), immergées 5 minutes dans l'acide sulfurique (H_2SO_4) 95% (m/v) puis vernalisées à 4°C sur une nuit. Après 5 jours de germination à 16°C à l'obscurité, les plantules sont transférées sur un milieu sableux (B5, Silice et Réfractaires de la Méditerranée, Biot) et placées en chambre de culture sous une photopériode de 16 heures et une nyctipériode de 8 heures associée à une thermopériode de 23/21°C. Le cycle d'arrosage alterne une fois sur deux eau distillée et milieu nutritif sans azote (Puppo et al, 1982). Cinq jours après germination les plantes sont inoculées avec *S. meliloti*.

I.2 SOUCHES BACTERIENNES

I.2.A ESCHERICHIA COLI

Les différentes souches d'*Escherichia coli* sont cultivées à 37°C, sur milieu riche Luria Bertani, LB (extrait de levure 5 g / L ; tryptone 10 g / L ; NaCl 10 g / L ; Sambrook et al., 1989) additionné ou non d'agar agar à 15 g / L. Milieu supplémenté avec l'antibiotique *ad hoc*.

I.2.B AGROBACTERIUM RHIZOGENES

A. rhizogenes est une bactérie tellurique phytopathogène, induisant l'émergence et la prolifération de chevelu racinaire (*hairy root*) à partir du point d'infection de la bactérie. Ce chevelu racinaire présente un gravitropisme altéré. Prolifération racinaire résultant du transfert dans le génome de la plante d'un segment d'ADN bactérien appelé ADN de transfert ou ADN-T encodant des gènes qui exprimés dans la plante induisent la rhizogénèse. L'insertion dans cet ADN-T d'une construction relative à un gène d'intérêt (surexpression, ARN interférence) permet des analyses en génétique inverse sur des plantes transgéniques chimériques avec une partie aérienne sauvage et une partie racinaire transgénique. La souche *A. rhizogenes* A4S est utilisée pour transformer *M. truncatula* (Alpizar et al., 2006). Elles sont cultivées à 28°C, respectivement sur milieu sur milieu Tryptone Yeast (TY) (Extrait de levure 3 g / L, Tryptone 5 g / L ± Agar15 g / L, pH 7,2) supplémenté après autoclavage de 6 mM de $CaCl_2$ et additionnée de l'antibiotique *ad hoc*.

I.2.C SINORHIZOBIUM MELILOTI

S. meliloti est cultivé, à 30°C, sur milieu LB supplémenté de 2,5 mM de $CaCl_2$ et de 2,5 mM de $MgSO_4$ (milieu LB_{MC}) et additionné avec l'antibiotique *ad hoc*.

Les plantes composites et sauvages sont inoculées par ajout de 10 ml / plante d'une suspension de bactéries *S. meliloti* dilués à D.O.600 nm de 0,05 unité, obtenue après deux lavages successifs à l'eau distillée stérile (5000 rpm, 10 min, à 20°C) à partir d'une culture bactérienne en phase de croissance exponentielle.

II. METHODES

II. 1 OBTENTION DE PLANTES M. TRUNCATULA COMPOSITES

Deux techniques différentes de transgénèse par *Agrobacterium rhizogenes* ont été utilisées au cours de cette étude. Ces deux approches divergent par leurs conditions de transgénèse et de croissance végétale (axénique, non axénique) ; conditions, qui dans nos chambres de cultures, permettent une persistance étendue (Vieweg et al., 2004) ou non (Boisson-Dernier et al., 2001) de *M. truncatula*. Ainsi l'ensemble des plantes transgéniques produites pour l'analyse fonctionnelle de *Mt*CP6 et *Mt*VPE (surexpression et RNAi, fusion transcriptionnelle promoteur GUS) ont été générées par la technique de Vieweg et coll. permettant la génération de nodosités transgéniques de plus de 6 semaines. Les plantes transgéniques servant à la production de lignées racinaires surexprimant *MtCP6* ou *MtVPE* en fusion avec la GFP ont été générées par la technique de Boisson-Dernier et coll. Les racines transgéniques sont mises en culture *in vitro* sur un milieu SHb10 agar (Ramos & Bisseling, 2003) pendant 4 semaines à 20°C à l'obscurité.

Pour ces deux techniques de transgénèse, l'induction du « hairy-root » a été médiée via l'utilisation de la souche *A. rhizogenes* A4S (Alpizar et al., 2006).

II.1.A En conditions non axeniques, derivant de (Vieweg et al., 2004).

Afin d'étudier les étapes tardives de la nodulation, des plantes composites possédant des racines transgéniques sont générées en conditions non axéniques (Vieweg et al., 2004). Après stérilisation et vernalisation, les graines sont mises à germer pendant quatre jours à 16°C dans l'obscurité sur de l'agar 0,4 %, puis transférées 24 heures à 4°C. En parallèle les *A. rhizogenes* sont mis en culture sur milieu gélosé sélectif durant 48 heures puis sont mises en solution dans du milieu liquide PS (saccharose 10 g/L, Bactopeptone 10g/L, pH ajusté à 7,4. Une fois en solution les agrobactéries sont injectées dans l'hypocotyle de plantules (Aiguille 25G 5/8 0.5-16mm). Les plantules sont transférées sur sable et placées pendant une semaine à 20°C puis transférées à 25°C. Trois semaines après injection, les racines ne présentant pas de fluorescence – fluorescence issue de l'expression d'une cassette de sélection GFP ou DsRED sous promoteur constitutif – sont ôtées sous la loupe binoculaire (MZFLIII Leica, Leica Microsystems,Wetzlar, Allemagne). Ainsi élaguées, les plantules transgéniques chimériques sont transplantées dans de nouveaux pots contenant un substrat sableux et inoculées avec *S. meliloti*. Une semaine avant élagage et inoculation les plantes sont carencées en azote.

II.1.B En conditions axeniques (Boisson-Dernier et al., 2001)

Après stérilisation à l'H_2SO_4 à 95 %, les plantules sont de nouveau stérilisées par un traitement successif de 4 min à 0.2% de chlorure mercurique ($HgCl_2$), puis après rinçage abondant, de 1.2% à l'hypochlorite de sodium NaClO. Après rinçage, les graines sont mises à germer 36 heures à 16°C à l'obscurité. Stérilement, la zone méristématique de la radicule des plantules est sectionnée puis la zone blessée est ensuite mise au contact d'un tapis bactérien d'*A. rhizogenes* ayant poussé en milieu riche gélosé durant 48 heures à 28°C. Les plantes sont ensuite mises en culture sur milieu Fahraeus gélosé supplémenté en $NH_4^+NO_3^-$ à 0,5mM. La partie supérieure du milieu de culture est ôtée afin d'éviter son contact avec les parties aériennes des plantes. La partie inférieure des boîtes, contenant les racines, est maintenue à l'obscurité emballée dans de l'aluminium et les boîtes sont scellées à cette étape par du Micropore (Sparadrap chirurgical, 3M, Cergy-Pointoise, France). Les plantes sont cultivées sept jours à 20°C (photopériode 16 h), afin de favoriser l'agroinfection. Puis, elles sont transférées à 25°C durant sept jours afin de favoriser la croissance des racines transgéniques (Boisson-Dernier et al., 2001). Comme précédemment, les racines transgéniques sont sélectionnées stérilement pour leur fluorescence sous loupe binoculaire à fluorescence (MZFLIII Leica, Leica Microsystems, Allemagne) et mises en culture *in vitro*.

II.2 CULTURE RACINAIRE IN VITRO

Les racines transgéniques sont prélevées sur des plantes composites obtenues après transformation selon la technique de Boisson-Dernier et coll. Elles sont mises en culture sur milieu SHb10 (Ramos & Bisseling, 2003) supplémenté en amoxicilline clavulanate (Sigma-Aldrich®, Augmentin) 200 µg/mL pour éliminer les agrobactéries. Les racines sont mises en culture à 20°C à l'obscurité pendant 3 semaines. Les lignées racinaires sont maintenues en culture par des repiquages toutes les trois semaines des apex racinaires.

II.3 GENETIQUE BACTERIENNE

II.3.A TRANSFORMATION D'E.COLI

Les bactéries *E. coli* XL1blue thermocompétentes sont préparées et transformées selon le protocole établi par Inoue et coll. 1990. 100ml de milieu SOB (20 g/L tryptone ; 5 g/L d'extrait de levure ; 10mM NaCl ; 2,5mM KCl ; 10mM $MgSO_4$ et 10mM $MgCl_2$ stérile ajouté après autoclavage) sont inoculés avec 0,3 ml d'une culture d'XL_1blue en phase stationnaire et mis en culture à 30°C à 220 rpm jusqu'à une DO 600nm de 0,6. La culture est alors directement mise à 4°C pendant 10 minutes puis centrifugés 10 minutes à 3000 rpm à 4°C. Le culot est ensuite resuspendu dans 8 ml de TB prérefroidi (10mM PIPES ; 55mM $MnCl_2$; 15mM $CaCl_2$; 250 mM KCl) et incubé sur glace 10 minutes. La culture est ensuite centrifugée 10 minutes à 4°C à 3000 rpm. Le culot est alors resuspendu dans 2ml de TB supplémenté de 7% final de DMSO. Les

cellules sont ainsi refroidies sur glace 10 min avant d'être aliquotées toujours à froid dans des fractions de 20-500 µl et congelé dans l'azote liquide. Fractions aliquotes stockées à -80°C.

Les bactéries thermocompétentes sont mélangées avec 50-100 mg de vecteur puis mises sur glace pendant 30 minutes. Les cellules sont alors placées 45s à 42°C puis 2 minutes sur glace suivit de 2 minutes à température ambiante avant ajout de 400 µl de milieu SOC à 42°C (SOB ; 20 mM glucose). Les cellules sont alors incubées 1h à 37°C, 220 rpm puis 100 µl sont alors étalés sur milieu sélectif gélosé.

***II.3.B TRANSFORMATION* A. RHIZOGENES**

Les *A. rhizogenes* électrocompétents sont préparés selon le protocole modifié de (Quandt et al., 1993) à partir d'une culture en milieu TY de bactéries à une D.O. 600-nm = 0,5. Après deux centrifugations successives de 10 minutes de 4000 rpm, à 4°C, les bactéries sont mises en solution dans 200 µl de glycérol froid à 10 %. Les cellules compétentes sont aliquotées par 25 µL, puis congelées dans l'azote liquide et conservées à -80°C jusqu'à leur utilisation.

Les *A. rhizogenes* électrocompétentes sont mises en présence de 1 µg de plasmide puis électroporées par un choc électrique à 2.5kV 5-6ms dans une cuve d'1 mm prérefroidie à 4°C. Juste après le choc, les cellules sont délicatement resuspendues dans 960 µl de TY froid, transférées dans un tube de culture et incubées 3h à 28°C puis étalées sur milieu sélectif.

II.3.C SOUCHES UTILISEES

Liste des souches utilisées au cours de ces travaux de thèse.

Annotation	Résistance	Propriétés	Références
S. meliloti			
Sm102F34 Rif^{R}	Rif^{R}	Résistant spontanté à la Rif de 120F34	Pocard *et al.*, 1997
Sm 1021	Sm^{R}	Résistant spontanté à la Sm de 1021	Meade at al., 1982
Sm 1021NifH	SmR /Neo^{R}	1021 niH avec insertionTn5	Ruvkun et al., 1982
Sm 1021BacA	SmR/SpR	1021 bacA avec insertion aad gene Sp^{R} cassette	Oke & Long, 1999
Sm2011	SmR	Résistant spontanéité à la Sm de 2011	Pobigaylo et al, 2008
Sm2011Hmp	SmR	2011 hmp::Tn5-STM-2,23,A01	Pobigaylo et al, 2008
Sm2011Hmp++	SmR/SpR	2011 contenant pBBR-hmp	del Guidice et al, 2011
Sm2011 gshb	SmR/TetR	2011 contenant pSup202 :gshB	Don de l'équipe du Pr. P. Frendo (ISA, Sophia-Antipolis)
A. rhizogenes			
A4S	Rif^{R}	Résistant spontané à la Rif	Alpizar *et al.*, 2006
E. coli			
XL1-Blue MRF'	Tet^{R}	Δ(*mcrA*)*183* Δ(*mcrCB-hsdSMR-mrr*)*173 endA1 supE44 thi-1 recA1* gyrA96 relA1 lac *[F'* proAB lacI^{q}ZΔM15 *Tn*10 *(Tet^{r})]*	Stratagene
DB3.1	Sm^{R}	F- gyrA462 endA1 glnV44 Δ(sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(r_B^-, m_B^-) ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Sm^{r}) xyl5 Δleu mtl1	Invitrogen

II.4. Mesure de la capacite fixatrice d'azote

La capacité fixatrice d'azote des nodosités de *M. truncatula* est estimée par une méthode non destructrice basée sur la relative aspécificité de la nitrogénase. En effet, cette enzyme bactérienne peut prendre en charge le diazote atmosphérique, mais également l'acétylène (C_2H_2) qu'elle réduit en éthylène (C_2H_4). Cette capacité réductrice de la nitrogénase est quantifiée par chromatographie en phase gazeuse (Agilent Technology 6890N) équipée d'une colonne GS-Alumina 30 mx0,53 m (J&N Scientific) capable de discriminer l'éthylène de l'acétylène. Les racines nodulées sont placées dans une bouteille de 30 ml hermétiquement fermée. 10 % du volume d'air est remplacé par de l'acétylène. Les échantillons sont ensuite placés à 28°C pendant 30 min. Après incubation, 0,5 mL de volume gazeux est prélevé en *duplicata*, puis 0,2 ml sont injectés dans le chromatographe. Les nodosités sont collectées, puis séchées à 60°C pendant 7 jours afin de normaliser les dosages effectués par le poids sec des nodosités.

II.5 Histologie et cytologie

II.5.A Detection histochimique de l'activite GUS

Une fois collectées, les nodosités sont fixées pendant 1h dans l'acétone à 90 % (vol./vol.) à -20°C. Puis une fois rincées, les nodosités sont mises en présence d'une solution de

coloration composée de 0,5 mg/ml de X-gluc ; 0,5 mM de ferricyanide de potassium ; 0,5mM de ferrocyanide de potassium) préparée dans du tampon Na phosphate 1 mM à pH 7,4. Le temps de coloration étant fonction de la force du promoteur d'intérêt et les échantillons ont été incubés à 37°C à l'obscurité. Après arrêt de la réaction par rinçage avec un tampon Na-phosphate 100 mM, les échantillons sont préparés pour les réalisations de coupes fines de 5 µm d'épaisseur.

II.5.B REALISATION DE COUPES FINES (5 µM)

Après collecte, les échantillons sont placés dans un tampon Sodium-Phosphate 0,1 M et fixés à l'aide de 4% de formaldéhyde et 1% de glutaraldéhyde. Les échantillons sont ensuite placés sous vide pendant 30 minutes puis la fixation est prolongée pendant la nuit à température et pression ambiante. Après fixation les nodosités sont rincées 30 minutes dans le tampon Sodium-Phosphate 0,1 M, puis déshydratées par des bains successifs d'éthanol à 10%, 30%, 50%, 70%, 90% et 100% à raison de 10 min par bain sous agitation lente (30 rpm). Après déshydratation, les nodosités sont incluses dans la résine Technovit 7100 (Heraeus) selon les recommandations du fabricant. Les blocs de résine obtenus sont ensuite sectionnés sur une épaisseur de 5 µm à l'aide d'un microtome (Reichert Jung 1130). Les microsections obtenues sont colorées si besoin au bleu de Toluidine 0,05 %, avant d'être observées avec un microscope (Zeiss Axioplan 2) couplé à la caméra Zeiss AxioCam. Les micrographies sont visualisées avec le logiciel AxioVision (Zeiss). L'ensemble des images obtenues pour chaque nodosité est fusionné

par le logiciel ImageJ (Wayne S. Rasband, NIH, USA) afin de reconstituer l'ensemble de la nodosité.

II.5.C Realisation de coupes semi-fines (70 µM)

Après collecte, les nodosités sont introduites dans un tampon Na-phosphate 50mM, pH 7,2. Après un rapide séchage, les échantillons sont inclus dans de l'agarose à 4%. Puis, à l'aide d'un vibratome (Microm HM650V) des coupes semi-fines de 70 µm d'épaisseur sont réalisées.

II.5.D Microscopie confocale et sondes acidophiles

Les vibrosections ont été collectées et mises en présence de 5 µM de la sonde acidophile LysoTracker/ Red DND-99 ou LysoTracker Green DND-189 pendant 20 minutes dans un tampon 50 mM Tris, pH = 7,0. Après rinçage, les échantillons sont montés entre lame et lamelle et observés avec un microscope confocale LSM510 META (Carl Zeiss) avec un objectif plan-Apo 63x/1,2W. Les paramètres du confocal ont été calibrés sur les échantillons contrôles marqués également avec le DND-99 ou DND-189.

Pour l'analyse ratiométrique du pH, les vibrosections de nodosités ont été marquées avec 5 µM de LysoTracker Yellow-Blue DND-160 pendant 20 min. dans un tampon Tris pH 7,0 puis traitées comme décrit précédemment. Les échantillons ont été observés avec un microscope confocal LSM780 (Carl Zeiss) équipé d'un objectif plan-Apo 63x/1,4 Oil DIC. Les

échantillons ont été illuminés avec une diode à 405 nm et la fluorescence émise collectée dans deux canaux distincts (427-480 nm ; 524-577 nm) avec le même détecteur spectral. Les intensités de ratios ont été directement calculées avec le logiciel ZEN (Carl Zeiss) avec l'équation (1) où Ch1 : 427-480 nm et Ch2 : 524-577 nm). Equation implémentée sur une courbe de calibration de pH permettant la génération d'une image en pseudo-couleurs permettant la mesure du pH pour chaque pixel dans une gamme de pH de 4,0 à 6,5.

$$Ratio = \frac{(I_{Ch2} - I_{Ch1})}{(I_{Ch2} + I_{Ch1})} \qquad (1)$$

Pour obtenir un ratio signal / bruit optimal, le niveau d'offset a été abaissé dans chaque canal et un filtre médian avec un rayon inférieur à la résolution latérale du microscope (~150 nm) a été appliqué sur chaque image. Les valeurs de pH du PBS ont été extraites de l'image radiométrique par l'utilisation d'un filtre Laplacien ; filtre dit « passe-haut » qui extrait les contrastes d'intensité permettant l'extraction à façon de différentes zones de l'image dont ici entre autres pour l'espace péribactéroïdien.

II.5.E MICROSCOPIE CONFOCALE ET VIABILITE IN PLANTA DES BACTEROÏDES (LIVE/DEAD)

Les vibrosections de nodosités sont incubées avec la sonde Live/Dead BacLight (Invitrogen) (5 µM SYTO9 ; 50 µM Iodure de Propidium (IP) dans 50 mM de Tris pH 7,0 pendant 20 minutes. Après lavage de l'excès de colorant, les échantillons sont montés entre lames et

lamelles et observés avec un microscope confocal LSM510 META (Carl Zeiss) équipé des objectifs plan-Apo 20x/0,75 et plan-Apo 63x/1,2W. Les échantillons ont été illuminés séquentiellement avec un laser Argon 488 nm et d'un laser HeNe 543 nm pour exciter respectivement le SYTO9 et l'IP. La fluorescence émise par chaque sonde est collectée avec deux détecteurs séparés. Pour quantifier *in planta* la proportion de bactéroïdes viables et de bactéroïdes en cours de lyse, nous avons mesuré la surface des bactéroïdes marqués au SYTO9 et à l'IP, puis calculé le ratio moyen de surface intégré pour chaque signal. L'ensemble des images a été acquis et traités avec le logiciel LSM510 META (Carl Zeiss).

II.5.F PHARMACOLOGIE ET MESURE DU PH IN PLANTA

Les vibrosections ont été incubées dans un tampon Tris 50 mM pH 7,0 avec différents inhibiteurs avant ajout de la sonde ratiométrique DND-160. Ainsi, les échantillons ont été préincubés avec des inhibiteurs de la respiration comme le cyanure de potassium (KCN) 10mM pendant 1,5 h et 5 µg/mL d'oligomycine pendant 2h ; mais également avec des inhibiteurs d'activité H^+-ATPase comme 500µM d'orthovanadate (VO_3^-) et 100µM de bafilomycine sur 2h. Comme contrôle, les échantillons ont été incubés avec 10 µM de FCCP pendant 1,5 h. Les échantillons ont été observés avec un microscope confocal LSM780 (Carl Zeiss). Les différents inhibiteurs proviennent de Sigma-Aldrich (St Louis, USA).

II.6 BIOLOGIE MOLECULAIRE

II.6.A Extraction des ARN

Les échantillons sont broyés dans un mortier refroidi à l'azote liquide et réduis en fine poudre. Les ARN totaux sont extraits à l'aide de TRIzol en suivant les recommandations du fournisseur (Invitrogen). Deux cents mg d'échantillons en poudre sont homogénéisés en présence de 800 µl de TRIzol, puis incubés 15 minutes à température ambiante. La solution est ensuite centrifugée 10 min., à 12000 g et à 4°C. ARN, ADN et protéines sont séparés par ajout de chloroforme au surnageant. La phase aqueuse contenant les ARN est alors prélevée et mise en présence d'isopropanol pour précipiter les ARN durant 10 minutes à température ambiante. Les échantillons sont ensuite centrifugés 20 minutes, à 12000 g à 4°C. Les culots d'ARN sont lavés deux fois avec de l'éthanol 75% puis 95%, puis séchés à l'air durant dix minutes. Les ARN totaux sont enfin solubilisés dans 30 µL d'eau DEPC (diéthyl pyrocarbonate), puis placés 5 minutes à 65°C et 1h sur glace pour maximiser la solubilisation. La concentration d'ARN est mesurée ensuite grâce à un spectrophotomètre (Biophotometer, Eppendorf, LePecq, France), en mesurant l'absorption de la solution d'ARN à 260 nm. La pureté des ARN est contrôlée en vérifiant l'absorbance à 280 nm (absorbance des protéines) et à 230 nm (absorbance des composés phénoliques ou sucrés). L'intégrité des ARN totaux est vérifiée sous UV après électrophorèse sur gel d'agarose dans du TAE. L'ADN est coloré au bromure d'éthidium (BET).

II.6.B Transcription inverse et réaction de polymérase en chaine (PCR)

2 µg d'ARN totaux ont été utilisés pour la réaction de transcription inverse suivant le protocole du kit Omniscript RT (Qiagen) en utilisant une amorce oligodT_{18}. Après transcription inverse, la présence d'ADNc et d'une éventuelle contamination d'ADN génomique est vérifiée par PCR. Pour cette vérification, un couple d'amorces spécifiques correspondant au gène Lb1 a été utilisé. Ces deux amorces hybrident sur deux exons contigus séparés sur l'ADN génomique par un intron de 900 pb. Ainsi toute contamination d'ADN génomique conduira à la génération d'un amplicon de poids moléculaire supérieur à celui généré à partir de l'ADN complémentaire. La réaction PCR a été réalisée dans un volume final de 25 µL contenant 2,5µL de tampon Taq polymérase 10x, de 2,5 mM d'$MgCl_2$, de 0,8 mM de dNTP, d'1 µM de chaque amorce spécifique ainsi que de 1U de Taq polymérase. La réaction PCR est menée comme suit : 5 min à 94°C pour dénaturer l'ADN puis 30 cycles comprenant 45s de dénaturation à 94°C, 45s à 60°C pour l'hybridation des amorces et 45s d'élongation à 72°C. La réaction est terminée par une élongation finale de 5 min à 72°C. Les résultats sont ensuite analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 1% comme effectué précédemment pour les ARN.

II.6.C PCR quantitative en temps réel

Pour la réalisation de la PCR quantitative, chaque échantillon est testé en *triplicata* selon le protocole du kit « qPCR mastermix plus for SYBER GREEN I » (Eurogentec). La réaction PCR est réalisée sur un mélange réactionnel de 15 µL contenant 5 µL d'ADNc (dilution 1/20ème), 30

nM de chaque amorce spécifique et 7,5 µL de Mastermix SYBER GREEN I 2x contenant le tampon Taq, 5mM de $MgCl_2$, 5 mM de dNTP et 5U de HotGoldStar Taq DNA polymérase. La réaction est menée sur 2 min à 50°C, 10 min à 95°C pour dénaturer l'ADN, puis 40 cycles de 15s de dénaturation à 95°C et d'1 min à 60°C pour l'hybridation des amorces et l'élongation. Une mesure de l'intensité de fluorescence est effectuée à la fin de chaque cycle. Enfin, une courbe de fusion, pendant laquelle la température monte jusqu'à 95°C où l'intensité de fluorescence est lue tous les 0,5°C, est réalisée afin de s'assurer de la spécificité d'amplification des amorces lors de chaque réaction. L'intensité de fluorescence est détectée par le Dyad disciple Chromo4 detector (BioRad) et visualisée avec le logiciel Monitor Opticon 3 (BioRad).

II.6.D Conception d'amorces

La conception et la spécificité des amorces sont réalisées via l'utilisation du logiciel Primer-Blast (www.ncbi.nlm.gov/tools/primer-blast/index.cgi). Les amorces sont dessinées pour avoir une température de fusion comprise entre 58°C et 62°C (idéalement 60°C) avec une taille de 18 à 30 nucléotides et donner un amplicon de 80 à 150 nucléotides avec une température de fusion comprise entre 70 et 90°C. La probabilité de dimérisation des amorces est ensuite vérifiée avec le logiciel NetPrimer (http://www.premierbiosoft.com/netprimer).

II.6.E Amorces utilisées

Liste des amorces utilisées au cours de ces travaux de thèse.

Annotation	Amorces Sens	Amorces antisens
MtCP6	AAAAAGCAGGCTTCACCATGACTGCCAATAATCAATTA	AGAAAGCTGGGTGTCAAGCAGTGGGATAAGATGC
MtVPE	AAAAAGCAGGCTTCACCATGGACTTTTCTCAATTTTCC	AGAAAGCTGGGTGCTATGCACTGAAACCCCTTTG
RNAi-MtCP6	AAAAAGCAGGCTTCGACTTTGTGGCATTGCAATGATG	AGAAAGCTGGGTGAGCATAATTTACATAGTTTGG
RNAi-MtVPE	AAAAAGCAGGCTTCTCAGCTCTTACAGGTGGGAGTG	AGAAAGCTGGGTGCTGCATTTGAAGCCGTTGTCGC
PMtCP6	GAGAGCTCCGCCATCTATCTTCATTCGTCA	GGGTAAAAGCACAGCACTTCTTTCTAGAACTAGTCC
PMtVPE	AAAAAGCAGGCTTCGAAATTCATGAAATTCACTAACC	AGAAAGCTGGGTGAGTGAAGAGGAAGTGATAGGG
MtCP6-qPCR	CCTGCTGCTACTATTGCTGGATATG	CACTCGCATCAATGGCTACGG
MtVPE-qPCR	CCAGGGGTTCTTGGTATGCCCG	ACTGCCAGATTCACATGCCTCCA
MtLb1-qPCR	ATAGCTCATATGAGGCATTCAA	GAGTTGAGGACTATCTTGTACT
MtCP1-qPCR	GGGAGTCGATGCAGCCGAAGG	CTGCTAAATGGAAGAACAACCACA
MtCP2-qPCR	AAGGGGAGTCGATGCAGCCG	GCTAATAGATGATAAATGCACAATCAATC
MtCP3-qPCR	TGTTGACGGGACATGCAACG	AGTGCCTGCTCATTGTTGGTCGG
MtCP4-qPCR	TGGATCACGGTGTCACTGCCG	GCCCTTCAGCAGCTTCAACTCCC
MtCP5-qPCR	TCTCGCTCTCTCCAAGTTGACTCCA	TGTGACGTTCCTCCCTTTCTTGTGG
MtVPEchr1-qPCR	CGCCTTCAACAGCAGTTAACCAAAGG	CCGCAGAGAACCCTCAGGTGC
MtVPEchr4-qPCR	TGGAACCTGCCCCACCTCCA	TGTGCGACTCACTGTCTTCCATCCA
MtLb1-qPCR	ATAGCTCATATGAGGCATTCAA	GAGTTGAGGACTATCTTGTACT
MtAmOx-qPCR	TTGCAAGGCACAAGATTCAG	AGCCACGAGTTTGTTTCGAC
MtNCR001-qPCR	CACTTCTGACGCTAACTG	TGAACCTTCAATATACCACC
MtSusy-qPCR	GTTGAGAATGAAGAGCACATA	ATTCAACTTGTAGGTCTCGAT

MtZR1-qPCR	AGTTGCGGTCGGTTATTCAC	CGTATGCCATGTTCCACAAG
MtCP6trans-qPCR	AGGAGCGTAGATGCTGCTCAAGGA	TTGCGGAAGAAAGCTGGGTGTCA
MtVPEtrans-qPCR	GTGCCAGTATTCCTGCCAACCCTTG	TGATTTTTGCGGAAGAAAGCTGGGTG
Mtc27-qPCR	TGAGGGAGCAACCAAATACC	GCGAAAACCAAGCTACCATC
MtA39-qPCR	CGGCAACTAGATCTTTGACA	CATTTGCTGTTGGTGTGTACG
MtRP40S-qPCR	TTGTCCAAGTTTGATGCTGCAC	TCCTACCAACTTCAAAACACCG

II.6.F Clonage d'ADN et technologie Gateway

La technologie Gateway, dérivée du phage λ, est une méthode de clonage qui permet l'intégration efficace de fragments d'ADN dans différents plasmides prêts à l'emploi et spécialisés pour différentes approches de génétique inverses (surexpression, ARNi, fusion traductionnelle et transcriptionnelle, *etc*…). Elle utilise des enzymes de recombinaison (clonases LR et BP) et des séquences de recombinaison (attB, attP, attL, attR) présentes sur le fragment à intégrer et sur le vecteur dans lequel on souhaite l'intégrer. L'intégration d'un fragment d'ADN d'intérêt dans un premier vecteur, appelé vecteur d'Entrée (pDONR ou pENTR), est possible respectivement par recombinaison (grâce à une enzyme BP clonase) ou par restriction et permet l'obtention d'un clone d'Entrée possédant le fragment d'ADN d'intérêt. Le fragment est ensuite recombiné grâce à l'enzyme LR clonase dans des vecteurs de destination choisi.

II.6.G Construction de fusion transcriptionnelle promoteur:GUS

Le plasmide d'entrée pENTL4L1-*PMtCP6* contenant les 1,73kb du promoteur du gène *MtCP6* a été fourni généreusement par l'équipe de S. Goormachtig et M. Hoslter (Van de Velde et al., 2006). Promoteur recombiné avec les vecteurs pENTR-GUS, pENTL2L3-T35S dans le vecteur de destination pKM43GWD-P*MtCP6*:GUS. Le promoteur P*MtVPE* a été amplifié par réaction PCR avec la Phusion HotStart Taq polymerase (Finnzymes) avec les amorces PVPE-S/PVPE-R conduisant à un fragment de 2kb recombiné dans le vecteur pDONR-207. pDONR-207-P*MtVPE* est ensuite recombiné dans le vecteur final pKGWFS7, générant ainsi une fusion transcriptionnelle P*MtVPE*:GUS.

II.6.H Expression ectopique et ARN interférence

Les séquences codantes d'*MtCP6* et *MtVPE* ont été amplifiées par PCR via les amorces CP6-S/CP6-R et VPE-S/VPE-R. Amplifia recombinés dans le vecteur d'entrée pDONR-207 conduisant à générer les vecteurs pDONR-207-*MtCP6* et pDONR207-*MtVPE*. Ces vecteurs sont ensuite recombinés dans un vecteur final de surexpression pKM43GWD en utilisant le promoteur P*MtNCR001* comme élément 5' et T35S comme élément 3' avec ma technologie Gateway. Pour la construction RNAi, le promoteur CaMV P35S du vecteur pK7GWIWG2D(II),0 a été remplacé par le promoteur P*MtCP6* (Van de Velde et al., 2006). Pour cela, les sites de restriction *Sac*I et *Spe*I ont été placés aux extrémités de la zone codante d'*MtCP6* par amplification PCR avec les amorces P*MtCP6*SacI-S et P*MtCP6*SpeI-R en utilisant le vecteur

pDONR207 *MtCP6* comme matrice ; l'amplifia ainsi obtenu a été sous-cloné dans le vecteur pGEM-T (Proméga).

L'insertion de ce promoteur en remplacement de P35S dans pK7GWIWG2D(II),0 a été faite en trois étapes de sous-clonage. Le segment de 2472 pb SacI-P35S:ccdB :intron-*Mlu*I du vecteur pK7GWIWG2D(II),0 a été sous-cloné dans le vecteur pGEM-t modifié, Δ*Eag*I pGEM-T pour lequel le site SpeI a été ôté. Puis, dans ce vecteur Δ*Eag*I pGEM-T, le promoteur P35S est remplacé par le promoteur P*MtCP6* dans les sites *Sac*I-*Spe*I. Enfin, le segment *Sac*I-P*MtCP6*:ccdB:intron-*Mlu*I dans le vecteur originel pK7GWIWG2D(II),0. Les différentes constructions RNAi ont été obtenues par amplification PCR de l'extrémité 5'UTR d'*MtCP*6 avec les amorces RNAiCP6-S et -R, générant un amplifia de 80 pb. Ces 80pb ont été ensuite recombinés dans le vecteur pDONR207 finalement recombiné dans le vecteur pK7GWIWG2D(II),0, P*MtCP6* :RNAiCP6. La même stratégie a été effectué pour la construction RNAi-VPE, pour laquelle 270 pb spécifiques d'*MtVPE* ont été amplifiés et recombiné dans pDONR207, ensuite recombiné dans le vecteur RNAi final générant le vecteur pK7GWIWG2D(II),0, *PMtCP6* :RNAiVPE. L'efficacité des constructions ARNi et l'absence de cible non spécifique ont été vérifiées en utilisant l'outil RNAiScan (Xu et al., 2006).

II.6.I Fusions traductionnelle avec la GFP

Les séquences codantes d'*MtCP6* et *MtVPE* ont été placées en fusion carboxyterminale avec le gène rapporteur GFP également par stratégie Gateway. Pour cela, les vecteurs pDONR207-*MtCP6* ou –*MtVPE* ont permis la recombinaison des séquences codantes respectives dans le vecteur final pK7FWG2. Recombinaison plaçant *MtCP6* et *MtVPE* sous le contrôle du promoteur fort et constitutif P35S et du terminateur T35S.

II.6.J Plasmides utilisés

Liste des plasmides utilisés au cours de ces travaux de thèse.

Annotation	Résistance	Propriétés	Références
pDONR207	Gm^R	Vecteur d'entrée Gateway	Invitrogen
pGEM-T vector	Amp^R	Vecteur de clonage	Promega
pGEM-T ΔEagI	Amp^R	Vecteur de clonage avec un profil de restriction SpeI modifié	Cette étude
pGEM-T ΔEagI PMtCP6	Amp^R	pGEM-T ΔEagI avec PMtCP6 remplaçant P35S	Cette étude
pENTL4L1-PMtCP6	Km^R	pENTR4 avec 1,7kb du promoteur MtCP6	Don de l'équipe de M. Holster (VIB, gent)
pKGWFS7	Km^R	Vecteur de destination Gateway pour fusion transcriptionnelle promoteur GUS:GFP	Invitrogen
pKM43GWD	Sm^R/Sp^R	Vecteur de destination triple entrée pour expression ectopique, rolD:GFP	Karimi *et al.*, 2002
PNCR001 5'element	Km^R	pDONRP4P1R 5'entrée avec le promoteur MtNCR001	Cette étude
T35S 3'element	Km^R	pDONRP2R-P3 3' entrée avec le terminateur 35S	Cette étude

PNCR001:MtCP6:T35S	Sm^R/Sp^R	pKM43GWD avec MtCP6 sous le contrôle de PMtNCR001 et T35S	Cette étude
PNCR001:MtVPE:T35S	Sm^R/Sp^R	pKM43GWD avec MtVPE sous le contrôle de PMtNCR001 et T35S	Cette étude
pK7FWG2,0	Sm^R/Sp^R	Vecteur de destination pour surexpression via le promoteur P35S en fusion carboxyterminale avec GFP	Karimi *et al.*, 2002
P35S:MtCP6:GFP	Sm^R/Sp^R	pK7FWG2,0; avec les 1.2kb de l'ADNc MtCP6	Cette étude
P35S:MtVPE:GFP	Sm^R/Sp^R	pK7FWG2,0; avec les 1.5kb de l'ADNc MtVPE	Cette étude
pKGWFS7	Sm^R/Sp^R	Destination vector for promoter analysis	Karimi *et al.*, 2002
PMtCP6	Sm^R/Sp^R	pKL43GWD avec les 1,7kb du promoteur MtCP6	Cette étude
PMtVPE	Km^R	pKL43GWD avec les 2.0kb du promoteur MtVPE	Cette étude
pK7GWIWG2D(II),0	Sm^R/Sp^R	Vecteur de destination ARNinterférence, vecteur contrôle ARNi « vide »	Karimi *et al.*, 2002
pK7GWIWG2D(II),0 PMtCP6	Sm^R/Sp^R	Vecteur de destination ARNinterférence, avec ARNi sous contrôle de PMtCP6	Cette étude
PMtCP6:RNAi MtCP6	Sm^R/Sp^R	Vecteur de destination pK7GWIWG2D(II),0 avec insert specific du 5'UTR d'MtCP6	Cette étude
PMtCP6:RNAi MtVPE	Sm^R/Sp^R	Vecteur de destination pK7GWIWG2D(II),0 PMtCP6 avec insert spécifique d'MtVPE	Cette étude
pBluescriptSK(-)	Amp^R	Vecteur pUC19 modifié avec f1(-) oriR	Stratagene
pBluescriptSK(-) Ms ZR1	Amp^R	pBluescriptSK(-) avec ADNc d'MsZR1	K. Zweger, AJ409163
pENTR4	Km^R	Vecteur d'entrée Gateway	Invitrogen
pK7WG2D,1	Sm^R/Sp^R	Vecteur de destination pour surexpression via P35S, rolD:GFP	Karimi *et al.* , 2002
P35S:ZR1	Sm^R/Sp^R	pK7WG2D,1; 3.7kb ADNc de ZR1	Cette étude
P35S:GUS	Sm^R/Sp^R	pK7WG2D,1; cassette GUS venant de pENTR-GUS	Cette étude
BUBR1:GFP	Sm^R/Sp^R	pK7WG2D; cassette AtBUBR1	Caillaud et al. 2009
BUB3.1:GFP	Sm^R/Sp^R	pK7WG2D; cassette AtBUBR3,1	Caillaud et al. 2009
pK7FWG2,0	Sm^R/Sp^R	Vecteur de destination pour surexpression, via P35S PRold:GFP	Karimi *et al.* , 2002
P35S:ZR1:GFP	Sm^R/Sp^R	pK7FWG2,0; 3.7kb ADNc de ZR1 , GFP fusion	Cette étude

pKGWFS7	Sm^R/Sp^R	Vecteur de destination pour analyse de promoteur	Karimi *et al.* , 2002
PMtZR1:GFP:GUS	Sm^R/Sp^R	pKGWFS7, 2.13kb du promoteur Mt ZR1:GFP:GUS	Cette étude
pK7GWIWG2D(II),0	Sm^R/Sp^R	Vecteur de destination pour ARNinterférence, vecteur ARNinterférence contrôle	Karimi *et al* ., 2002
P35S:RNAiZR1	Sm^R/Sp^R	pK7GWIWG2D(II),0, contre les 256bp de l'extrémité 5'UTR de MsZR1	Cette étude

II.6.K Séquençage

L'ensemble des séquences ainsi amplifiées et clonées a été vérifiée par séquençage, travail sous-traité à la société Cogenics (http://www.beckmangenomics.com).

II.7 Biochimie

II.7.A Extraction protéique et activité protéolytique

Après collecte des racines transgénique surexprimant *M*tCP6 et *Mt*VPE, les protéines totales ont été extraites dans le tampon d'extraction (50 mM Tris pH 8,5 mM EDTA, 20 mM NaCl et 10% glycérol) par broyage à 4°C. L'extrait a ensuite été centrifugé à 10000g 10 min à 4°C. La concentration protéique a été mesurée par la technique Bradford et 5 µg de protéines totales a été utilisé pour les différents tests d'activités enzymatiques. Pour cela, les cinétiques de clivage des différents substrats sont détectés par la libération de la coumarine qui fluoresce à 460 nm après excitation à 380 nm. Les activités ont ainsi été mesurées avec un spectrofluorimètre Xenius (SAFAS, Monaco) dans un milieu réactionnel de 100 mM de tampon sodium acétate, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10 µg/ml d'extrait protéique totale et 50 µM du

substrat correspondant, mélange incubé à 28°C pendant 20 minutes. Ainsi, les activités DEVDase, YVADase, ESENase, GGRase, FRase, RRase ont été mesurées en utilisant respectivement les substrats N-Acetyl-DEVD7-amido-4-methylcoumarin, N-Acetyl-YVAD7-amido-4-methylcoumarin, N-Acetyl-ESEN7-amido-4-methylcoumarin (PEPTIDE INSTITUTE), N-Acetyl-GGR7-amido-4-methylcoumarin,N-Acetyl-FR7-amido-4-methylcoumarin et N-Acetyl-RR7-amido-4-methylcoumarin (SIGMA). Comme contrôle de spécificité de l'activité protéolytique, une fois à son maxima, la réaction protéolytique est inhibée par un inhibiteur *ad hoc* à 50µM (Ac-YVAD ; Ac-DEVD ; Iodoacetamide ; E64d)

II.7.B Analyse en Western-blot

La surexpression d'*Mt*CP6 et *Mt*VPE dans les différents extraits protéiques a été validée par Western-blot. Pour cela, 30 µg d'extrait protéique ont été analysés par SDS-PAGE sur un gel à 12% puis transférés sur une membrane (PVDF) à 300 mA pour 45 min. La membrane est ensuite saturée dans une solution de lait à 10% dilué dans du PBS-Tween pH 7.5, sous agitation. Puis, la membrane est incubée sur la nuit en présence d'anticorps primaire polyclonal anti-GFP (1/1 000) sous agitation. Après trois rinçages successifs de 10 min en PBS-Tween pH 7,5, la membrane est incubée dans une solution de lait à 10% dilué avec du PBS-Tween pH 7.5 contenant un anticorps secondaire contre l'isotype de l'anticorps primaire (1/2 500); l'anticorps secondaire étant couplé à une phosphatase alcaline. Enfin, l'activité phosphatase est révélée par l'ajout de BCPIP/NCB (Sigma).

II.8 PHYLOGENIE

Les différentes séquences de papaïnes et légumaines protéases ont été collecté via BlastP (Altschul et al., 1997) à partir des séquences protéiques d'*Mt*CP6 et *Mt*VPE sur la base de données NR (« Non-Redondant sequences ») et MEROPS, base de données spécifique des protéases et des différents inhibiteurs (Rawlings et al., 2011). L'analyse a été effectuée en utilisant la plateforme Phylogeny.fr (Dereeper et al., 2008) offrant l'ensemble des outils nécessaires pour l'analyse phylogénétique : MUSCLE pour les alignements multiples de séquences (Edgar, 2004), Gblock pour ôter les régions non informatives (Castresana, 2000), PhyML (Guindon & Gascuel, 2003) et ProTest (Abascal et al., 2005) pour la génération de l'arbre phylogénétique et enfin TreeDyn (Chevenet et al., 2006) pour la représentation graphique de l'arbre.

CHAPITRE II : RESULTATS

I. DEVELOPPEMENT DE NOUVEAUX OUTILS POUR L'ETUDE *IN VIVO* DE LA SENESCENCE NODOSITAIRE

Les approches histologiques sur coupes de nodosités (Harrison et al., 2005; Maunoury et al., 2010; Perez Guerra et al., 2010; Van de Velde et al., 2006) sont des outils indispensables permettant de visualiser la structure de la nodosité et sa zonation, surtout après coloration au bleu de toluidine. Cette coloration permet de visualiser aisément la zone IV de sénescence ainsi que l'ampleur de son extension. Cependant, cette technique permet uniquement d'observer un processus de sénescence déjà effectif, où la dégradation des bactéroïdes et cellules hôtes végétales est déjà amorcée voir terminée.

Nous avons donc cherché à développer de nouveaux outils cytologiques permettant de visualiser les étapes précoces de ce processus – à savoir l'altération de l'intégrité membranaire des bactéroïdes et donc, *a fortiori* leur lyse, mais également toute perturbation de la physiologie des symbiosomes, qui pourrait suggérer un dysfonctionnement des bactéroïdes, et ce au sein des cellules hôtes de la nodosité.

L'étude de ces paramètres, au sein même de la nodosité, permet de conserver la zonation, ce qui permet de déterminer, en réponse à différentes conditions - stress abiotique, lignée ou souche mutante de *M. truncatula* ou *S. meliloti*, à quelle étape du développement des bactéroïdes, le processus de sénescence est initié.

Nous avons ainsi pu développer *in vivo* l'utilisation de la sonde Live/Dead BacLight (Invitrogen) et des sondes fluorescentes acidophiles LysoTrackers permettant respectivement de visualiser la viabilité des bactéroïdes, mais aussi leurs fonctionnements au sein même de la nodosité.

I. 1 ETUDES IN VIVO DE LA VIABILITE DES BACTEROÏDES

Afin de déterminer la viabilité des bactéroïdes, nous avons utilisé la sonde Live/Dead BacLight, très utilisée pour évaluer la viabilité de bactéries en culture libre ou sur différents substrats (sols, biofilms…) (Filoche et al., 2007; Vriezen et al., 2012). En effet, cette sonde consiste en un cocktail de deux agents fluorescents intercalant de l'ADN, le SYTO9 et l'iodure de propidium (IP). Ces deux sondes possèdent également des caractéristiques spectrales bien distinctes, qui leur permettent après illumination adéquate de fluorescer en vert pour le SYTO9 et en rouge pour l'IP. De plus, ces deux sondes possèdent des propriétés physico-chimiques différentes faisant du SYTO9, une sonde diffusant librement au travers des membranes, alors que l'IP, lui, ne peut traverser les membranes. Enfin, l'IP étant plus affin que le SYTO9 pour l'ADN, la compétition entre ces deux sondes dans une cellule en cours de lyse conduira à un unique marquage au PI, évitant ainsi un double marquage $SYTO9^{+}/IP^{+}$ (Virta et al., 1998). Ainsi, après marquage avec cette sonde Live/Dead, les cellules viables présentant une membrane intègre seront marquées par le SYTO9 (en vert) alors que les cellules en cours de lyse présentant une altération de leur intégrité membranaire seront-elles marquées par l'IP (en

rouge). Nous avons donc développé l'utilisation de ces sondes, *in vivo*, sur des coupes de nodosités de *M. truncatula,* par microscopie confocale. Le développement de ce nouvel outil, nous a permis en collaboration avec l'équipe de Peter Mergaert (Gif-sur-Yvette, France) et Claude Bruand (Castanet-Tolosan, France) de mieux caractériser à la fois la persistance des bactéroïdes de *S. meliloti* aux peptides NCR, mais également d'évaluer le rôle du monoxyde d'azote (NO) chez les bactéroïdes comme agent inducteur du processus de sénescence nodositaire.

I.1.A CARACTERISATION DU ROLE DE LA PROTEINE BACTERIENNE BACA DANS LA PERSISTANCE DES BACTEROÏDES DE S. MELILOTI FACE AUX PEPTIDES ANTIMICROBIENS NCR.

I.1.A.1 INTRODUCTION

L'analyse du transcriptome des nodosités *de M. truncatula* au cours de leur développement a mis en évidence une vaste famille multigénique de plus de 300 membres, les NCR ou « Nodule Cysteine Rich peptides » (Mergaert et al., 2003). Ces gènes codent de courts peptides de 60 à 90 acides aminés riches en cystéine et présentent différents profils d'expression spatio-temporels au cours de l'organogénèse de la nodosité (Mergaert et al., 2003). Les peptides NCR présentent des structures similaires aux toxines de scorpions (*Conus sp*) et aux défensines de plantes ou de Mammifères (Mergaert et al., 2003). Il a été récemment démontré que certains peptides NCR participent au contrôle de la différenciation des bactéries en bactéroïdes et présentent une activité antimicrobienne sur les bactéries et bactéroïdes de *S. meliloti* (Haag et al., 2012; Van de Velde et al., 2010). La protéine BacA codée par *S. meliloti* a également été démontrée comme nécessaire à l'accomplissement de ce même processus de différenciation en bactéroïdes (Glazebrook et al., 1993; Maunoury et al., 2010). Présente chez différentes bactéries pathogènes de Mammifères, les homologues de BacA sont nécessaires à leur persistance et donc au succès de l'infection de *B. abortus* ou *M. tuberculosis* (Ferguson et

al., 2004). Cependant, le rôle *in vivo* de BacA dans ces différents modèles reste encore inconnu et différentes hypothèses sont proposées. En effet, de fortes identités de séquences suggèrent que BacA serait un transporteur de lipopolysaccharides membranaires, et pourrait participer au transport et à la maturation d'un puissant antigène, le lipide A, en une conformation moins immunogène. Une telle conformation pourrait ainsi tendre à masquer la bactérie à l'hôte et faciliter ainsi sa persistance et son pouvoir infectieux. Enfin, ces lipopolysaccharides de surface pourraient également participer au renforcement de la stabilité membranaire (Ferguson et al., 2004). Cependant, l'équipe de Gail Fergusson (Aberdeen, Royaume-Unis) a également pu mettre en évidence la sensibilité accrue des mutants bactériens *bacA* aux peptides antimicrobiens, en limitant l'influx ou en favorisant l'efflux de ces peptides de la bactérie (Ferguson et al., 2006; Marlow et al., 2009; Mergaert et al., 2006).

C'est sur la validation de cette dernière hypothèse que nous avons collaboré avec les équipes de Gail Fergusson et de Peter Mergaert en étudiant la persistance de *S. meliloti* au sein de *M. truncatula*.

Nous avons ainsi apporté à cette étude notre capacité à déterminer *in vivo* la viabilité de *S. meliloti* au sein de la nodosité via la maitrise de l'approche Live/Dead BacLight, et ainsi d'étudier la viabilité des bactéroïdes *bacA* au sein de la nodosité et ce dans un fond génétique de *M. truncatula* sauvage ou bien altéré pour l'apport de peptides NCR aux bactéroïdes (*Mtdnf1*) (Wang et al., 2010). Une telle approche permettrait de mieux caractériser le rôle de BacA dans la protection de *S. meliloti* envers les peptides NCR.

OPEN ACCESS Freely available online

PLoS BIOLOGY

Protection of *Sinorhizobium* against Host Cysteine-Rich Antimicrobial Peptides Is Critical for Symbiosis

Andreas F. Haag[1☯], Mikhail Baloban[2☯], Monica Sani[3,4], Bernhard Kerscher[1], Olivier Pierre[5], Attila Farkas[6], Renato Longhi[3], Eric Boncompagni[5], Didier Hérouart[5], Sergio Dall'Angelo[7], Eva Kondorosi[2,8], Matteo Zanda[3,7], Peter Mergaert[2]*, Gail P. Ferguson[1]*

1 School of Medicine & Dentistry, Institute of Medical Sciences, University of Aberdeen, Aberdeen, United Kingdom, **2** Institut des Sciences du Végétal, Centre National de la Recherche Scientifique, Gif-sur-Yvette, France, **3** Consiglio Nazionale delle Ricerche–Istituto di Chimica del Riconoscimento Molecolare C.N.R.-I.C.R.M., Milano, Italy, **4** KemoTech s.r.l., Pula, Italy, **5** Interactions Biotiques et Santé Végétale, Institut National de la Recherche Agronomique, Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Nice–Sophia Antipolis, Sophia-Antipolis, France, **6** Institute for Plant Genomics, Human Biotechnology and Bioenergy, Bay Zoltan Foundation for Applied Research, Szeged, Hungary, **7** School of Medical Sciences, Institute of Medical Sciences, University of Aberdeen, Aberdeen, United Kingdom, **8** Biological Research Centre, Hungarian Academy of Sciences, Szeged, Hungary

Abstract

Sinorhizobium meliloti differentiates into persisting, nitrogen-fixing bacteroids within root nodules of the legume *Medicago truncatula*. Nodule-specific cysteine-rich antimicrobial peptides (NCR AMPs) and the bacterial BacA protein are essential for bacteroid development. However, the bacterial factors central to the NCR AMP response and the *in planta* role of BacA are unknown. We investigated the hypothesis that BacA is critical for the bacterial response towards NCR AMPs. We found that BacA was not essential for NCR AMPs to induce features of *S. meliloti* bacteroids in vitro. Instead, BacA was critical to reduce the amount of NCR AMP-induced membrane permeabilization and bacterial killing in vitro. Within *M. truncatula*, both wild-type and BacA-deficient mutant bacteria were challenged with NCR AMPs, but this resulted in persistence of the wild-type bacteria and rapid cell death of the mutant bacteria. In contrast, BacA was dispensable for bacterial survival in an *M. truncatula dnf1* mutant defective in NCR AMP transport to the bacterial compartment. Therefore, BacA is critical for the legume symbiosis by protecting *S. meliloti* against the bactericidal effects of NCR AMPs. Host AMPs are ubiquitous in nature and BacA proteins are essential for other chronic host infections by symbiotic and pathogenic bacteria. Hence, our findings suggest that BacA-mediated protection of bacteria against host AMPs is a critical stage in the establishment of different prolonged host infections.

Citation: Haag AF, Baloban M, Sani M, Kerscher B, Pierre O, et al. (2011) Protection of *Sinorhizobium* against Host Cysteine-Rich Antimicrobial Peptides Is Critical for Symbiosis. PLoS Biol 9(10): e1001169. doi:10.1371/journal.pbio.1001169

Academic Editor: Jeffery L. Dangl, The University of North Carolina at Chapel Hill, United States of America

Received May 12, 2011; **Accepted** August 22, 2011; **Published** October 4, 2011

Copyright: © 2011 Haag et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: Microscopy was performed at the facilities of the IMAGIF platform in Gif-sur-Yvette (www.imagif.cnrs.fr), which is supported by the Conseil Général de l'Essonne. Work in our laboratories is supported by the French Agence Nationale de la Recherche, grant ANR-09-BLAN-0396-01; the Hungarian National Office for Research and Technology, grants OMFB-00441/2007 and OMFB-00128/2010; and was supported by a Medical Research Council New Investigator grant (G0501107). AFH and BK are supported by University of Aberdeen PhD studentships. The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abbreviations: NCR, nodule-specific cysteine-rich; PI, propidium iodide

* E-mail: Peter.Mergaert@isv.cnrs-gif.fr (PM); g.ferguson@abdn.ac.uk (GPF)

☯ These authors contributed equally to this work.

Introduction

The alpha-proteobacterium *Sinorhizobium meliloti* forms a symbiosis within specialized root organs, called nodules with *Medicago* species of leguminous plants, including the agriculturally important alfalfa and the model legume *Medicago truncatula* [1]. The bacteria induce the organogenesis of nodules and infect the host plant via tubular structures called infection threads from which they are delivered into the nodule cells by an endocytosis-like process. The internalized bacteria are encapsulated within a plant-derived membrane, forming an organelle-like symbiosome compartment [1]. Within the symbiosome, *S. meliloti* differentiates into nitrogen-fixing bacteroids, which persist resulting in a chronic intracellular infection and symbiosis [2]. *S. meliloti* bacteroids formed within *M. truncatula* have elongated morphologies, undergo extensive genome amplification, have a decreased cytoplasmic membrane integrity, and lack reproductive capacity (i.e., terminal differentiation) relative to their free-living, bacterial form [3]. Bacteroid differentiation is mediated within the host compartments by a large family of several hundred legume nodule-specific cysteine-rich (NCR) peptides, which are transported into these compartments [4]. A subset of NCR peptides (here called NCR AMPs) exhibits antimicrobial activity in vitro [4]. NCR AMPs are structurally and functionally similar to plant and mammalian defensins, as they have conserved cysteine residues, which are predicted to form defined disulfide (S-S) bridges, and are cationic [5]. Defensins are a widespread class of AMPs, which are key effectors of innate immunity in both animals and plants [6,7].

Despite knowledge of the critical role of *Medicago* NCR AMPs in mediating bacteroid development, the bacterial factors central to

Author Summary

Certain bacterial species have the unique capacity to enter into eukaryotic host cells and establish prolonged infections, which can be beneficial (e.g. bacterial-legume symbiosis) or detrimental (e.g. chronic disease) for the host. However, the mechanisms by which bacteria persist in host cells are poorly understood. Legume peptides and the bacterial BacA membrane protein play essential roles in enabling bacteria to establish prolonged legume infections. However, the biological function of BacA in persistent legume infections has eluded scientists for nearly two decades. In this article, we investigated a potential relationship between legume peptides and BacA in the establishment of prolonged bacterial-legume infections. We found that BacA was critical to protect bacteria against the antimicrobial action of legume peptides, thereby allowing the peptides to induce bacterial persistence within the legume rather than rapid bacterial death. Mammalian hosts also produce peptides in response to invading microorganisms and BacA proteins are critical for medically important bacterial pathogens such as *Mycobacterium tuberculosis* to form prolonged mammalian infections. Therefore, our results suggest that BacA-mediated protection against host peptides might be a conserved mechanism used by both symbiotic and pathogenic bacterial species to establish long-term host infections.

this response are unknown. Nearly two decades ago, the *S. meliloti* cytoplasmic membrane BacA protein was discovered to be essential for bacteroid development within *Medicago* legumes [8]. *S. meliloti* BacA-deficient mutant bacteria infect nodule cells and enter into the host symbiosome compartments but were unable to develop into the typical elongated bacteroids, which persist [8,9]. Mammalian pathogens such as *Brucella abortus* and *Mycobacterium tuberculosis* also have BacA homologs, which were found to be critical for prolonged murine infections [10,11]. Therefore, BacA proteins are essential for bacterial symbionts and pathogens to establish prolonged intracellular infections of plants and mammals, respectively.

The precise in vivo function of BacA proteins is unknown. *S. meliloti*, *B. abortus*, and *M. tuberculosis* produce unusual fatty acid-modified lipids [10,12,13]. BacA proteins of *S. meliloti* and bacterial pathogens are involved in the modification of lipids with these unusual fatty acids in vitro [12]. However, these unusual lipid modifications were found to be important but not essential for *S. meliloti* bacteroid development during the legume symbiosis [14]. It was recently discovered that BacA proteins are critical for rhizobial bacteroid development in other legume hosts producing NCR peptides such as *Pisum sativum* (pea) and *Astragalus sinicus*, but they are dispensable for this process in *Phaseolus vulgaris* (bean), *Vigna unguiculata* (cowpea), and *Lotus japonicus*, which are legume hosts naturally devoid in these peptides (Table S1) [15–19]. The presence of NCR peptides and the requirement of BacA for an effective symbiosis also correlate with the formation of elongated, terminal bacteroids in nodules. In contrast, bacteroids are morphologically undifferentiated and can de-differentiate (i.e., reversible differentiation) in legumes that lack NCR peptides and do not require a functional BacA for symbiosis (Table S1) [3,5,20]. Since mammalian pathogens also encounter host AMPs early in their infection process, in the extracellular environment, as well as in their intracellular niche [6,7], we hypothesized that BacA proteins are critical for chronic intracellular infections by playing a central role in the bacterial response towards host AMPs. In this study, we found that the BacA protein is essential for protection of *S. meliloti* both in vitro and *in planta* against the antimicrobial activities of host NCR peptides. Since BacA proteins are found in diverse bacterial species [8,10,11] and AMPs are ubiquitous in nature [7], these findings have important implications for the molecular mechanisms of other chronic bacterial-host interactions.

Results

A Specifically Folded NCR Peptide Induces *S. meliloti* Bacteroid Features In Vitro

To enable us to investigate a potential role for BacA in the bacterial response towards NCR AMPs, we synthesized the *M. truncatula* NCR247 peptide (Figure 1A; Figure S1A,B) using a procedure [21] which protects the sulphydryl groups of cysteine-rich peptides during their synthesis preventing inappropriate inter-peptide disulphide (S-S) bridge formation. Using Chou-Fasman rules [22], we predicted the most likely S-S bridges of NCR247 were between cysteines 1 and 2 and cysteines 3 and 4 (Figure 1A) and thus synthesized this folded state of NCR247 through selective de-protection of the sulphydryl groups. The synthesized NCR247 peptide had a mass of 3004.5 Da, confirming two S-S bridges, and a purity of greater than 95% (w/v) (Figure S1A,B).

Treatment of the *S. meliloti* wild-type strain in vitro with 2 or 4 μM NCR247 induced cell elongation (Figures S2A,C) and genomic DNA amplification (Figure S2B,D), which are features of *in planta S. meliloti* bacteroids. When *S. meliloti* differentiates into a bacteroid, it increases in length approximately 5–10-fold and has a 12–24-fold increase in its genomic DNA content [3]. We found that, although there was variation in the response of individual *S. meliloti* cells within the population towards NCR247 exposure, a large proportion of the cells showed a considerable increase in their forward scatter (a measure for cell size) and contained up to 16 copies of their genomic DNA content after treatment with 4 μM NCR247 (Figure S2C and D, respectively). However, no difference was observed in the ability of the same concentrations of NCR247 to induce these bacteroid features in the *S. meliloti* BacA-deficient mutant in vitro (Figure S2E to H). Therefore, NCR247 was sufficient in itself to induce features of *in planta S. meliloti* bacteroids, but BacA function was not critical for this process, despite the inability of the BacA-deficient mutant to form bacteroids *in planta* [8,9].

BacA Proteins Protect *S. meliloti* Against the Antimicrobial Activity of NCR Peptides

A subset of NCR peptides possesses antimicrobial activity in vitro and reduces the colony forming ability of *S. meliloti* [4]. Hence, treatment of wild-type *S. meliloti* with 20 μM NCR247 reduced its subsequent colony forming ability (Figure 1B). The 2–4 μM concentrations were found to be sub-lethal (unpublished data), indicating that the effects on cell size and DNA content at low NCR247 concentrations were uncoupled from the killing, which is only observed at higher concentrations. Importantly, an *S. meliloti* BacA-deficient mutant was more sensitive towards the antimicrobial action of NCR247 in vitro (Figure 1B), showing that BacA was critical to prevent hypersensitivity of *S. meliloti* towards this host peptide. The plasmid-encoded wild-type *S. meliloti bacA* gene (p*SmbacA*) restored the colony forming ability of the BacA-deficient mutant after exposure to NCR247 (Figure 1B), confirming that BacA mediated protection of *S. meliloti* against NCR247 in vitro. NCR peptides reduce the colony forming ability of *S. meliloti* in vitro by lowering the integrity of the cytoplasmic membrane, resulting in the entry of the usually non-membrane permeable fluorescent dye, propidium iodide (PI) [4]. We found that

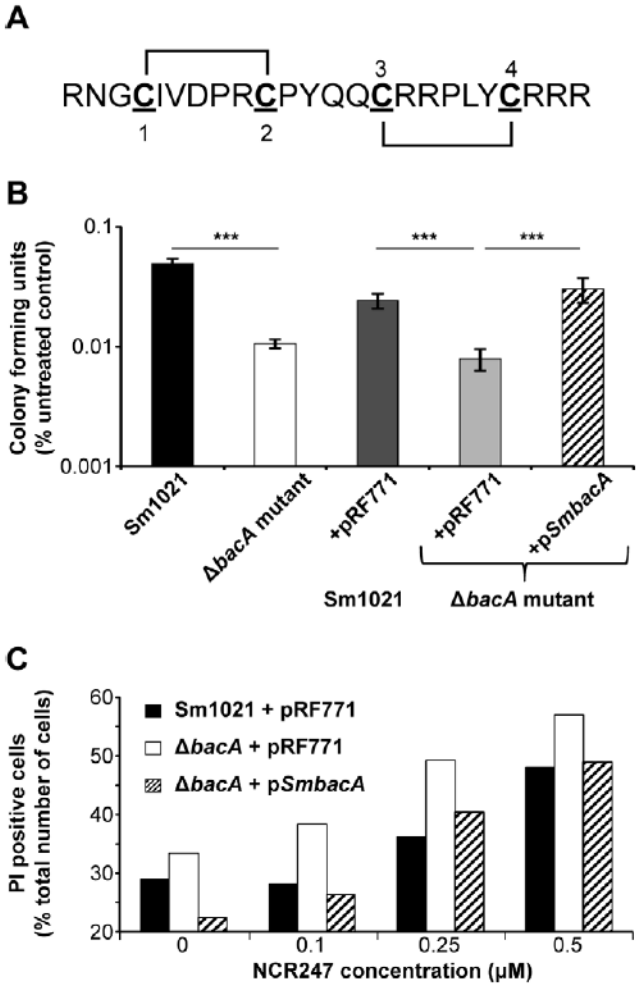


Figure 1. BacA proteins protect *S. meliloti* in vitro against the antimicrobial activity of NCR247. (A) NCR247 peptide sequence showing the two S-S bridges between cysteine residues 1 and 2 and 3 and 4. (B) Colony forming ability of the indicated strains was assessed after exposure towards 20 μM of the NCR247 peptide for 3 h. (C) The PI fluorescence of cells was determined by flow cytometry after treatment of cultures with and without the NCR247 peptide for 3 h. Bars represent mean ± SD. The significance value ***$p \leq 0.001$ was determined using ANOVA followed by a Student Newman-Keuls post-test and results are representative for at least two independent experiments.
doi:10.1371/journal.pbio.1001169.g001

NCR247 treatment increased the PI fluorescence of the BacA-deficient mutant to a greater extent than the wild-type strain and the presence of p*SmbacA* restored the PI fluorescence of the BacA-deficient mutant to that of the wild-type strain with control plasmid in the presence of NCR247 (Figure 1C). These findings demonstrated that the hypersensitivity of the *S. meliloti* BacA-deficient mutant towards the NCR247 peptide in vitro was due to an increase in NCR247-induced loss of cytoplasmic membrane integrity. We also found that the *S. meliloti* BacA-deficient mutant was hypersensitive to another *M. truncatula* NCR AMP, NCR035, in vitro relative to the wild-type strain (Figure S3A,B). Taken together, these findings showed that BacA protected *S. meliloti* against the antimicrobial activity of different *M. truncatula* NCR AMPs in vitro.

The *B. abortus* BacA protein is essential for chronic intracellular mammalian infections [11]. A plasmid-encoded *B. abortus* wild-type *bacA* gene (p*BabacA*) complements the chronic infection defect of an *S. meliloti* BacA-deficient mutant in *Medicago* species of legumes [23]. We also found that p*BabacA* protected the *S. meliloti* BacA-deficient mutant strain to a similar extent as the wild-type *S. meliloti bacA* gene against the antimicrobial action of NCR247 in vitro (Figure S4). These findings provide further evidence that the *S. meliloti* and *B. abortus* BacA proteins are functional homologs and demonstrated that *B. abortus* BacA protected bacteria against the antimicrobial activity of a defensin-like AMP.

An *S. meliloti* BacA-Deficient Mutant Is Challenged with NCRs In Vivo

The hypersensitivity of the BacA-deficient mutant to NCRs in vitro suggested a scenario for the inability of this strain to develop into bacteroids within the legume. Upon entry into the host compartment, *S. meliloti* is confronted with NCRs leading to bacteroid differentiation in the case of a wild-type strain, which has a sufficient level of resistance to NCRs. In contrast, the BacA-deficient mutant would be killed by NCR AMP challenge, preventing bacteroid differentiation. This scenario required that NCRs be transported into the symbiosome containing the BacA-deficient mutant as well. Using RT-PCR in combination with *NCR* specific primers, we analyzed *NCR* gene expression in roots and nodules induced by wild-type *S. meliloti* and a BacA-deficient mutant strain (Figure S5). *NCR084*, *NCR247*, and *NCR035* were expressed to similar levels in nodules induced by both strains while *NCR001* was only weakly expressed in the nodules of the BacA-deficient mutant. This is in agreement with the previously described two consecutive transcriptome waves that characterize the transcriptional changes during nodule development [9]. *NCR084*, *NCR247*, and *NCR035* are induced during the first wave, which is still activated in nodules of the BacA-deficient mutant while *NCR001* is expressed during the second transcriptome switch, which is not activated anymore in nodules of the BacA-deficient mutant [9]. Thus, at least a subset of *NCR* genes is still expressed in nodules of the BacA-deficient mutant.

To test whether NCRs were also transported to symbiosomes, transgenic *M. truncatula* roots expressing translational fusions of either the NCR035 or NCR084 peptide with the mCHERRY red fluorescent protein, under the control of their own promoter, were inoculated with either the *S. meliloti* wild-type or BacA-deficient mutant. In agreement with our previous results [4], the fluorescently labelled NCR peptides co-localized entirely with the wild-type strain bacteroids (Figure 2A–D), consistent with their trafficking to the bacterial compartment. Likewise, we found that the NCRs also co-localized with the BacA-deficient mutant-bacteria within the symbiosomes (Figure 2E–H), demonstrating that the mutant bacteria were challenged with NCRs within their host compartment. However, in contrast to the wild-type strain-infected nodules, a proportion of the NCR peptides were secreted to the exterior of the plant cell in nodules infected with the BacA-deficient mutant (Figure S6). Combined, these findings showed that BacA is important for NCR peptide trafficking to the symbiosomes but also demonstrated that an *S. meliloti* BacA-deficient mutant is challenged with NCR peptides in vivo.

BacA Protects *S. meliloti* from Rapid Cell Death upon Entry Into the Host Compartment

Microscopy of root nodules induced by the *S. meliloti* BacA-deficient mutant showed that it was specifically defective in bacteroid development within the symbiosome compartments [8]. To more specifically investigate bacterial viability during the host interaction, we used a live/dead staining procedure involving a mixture of the nucleic acid fluorescent dyes, SYTO9 and PI,

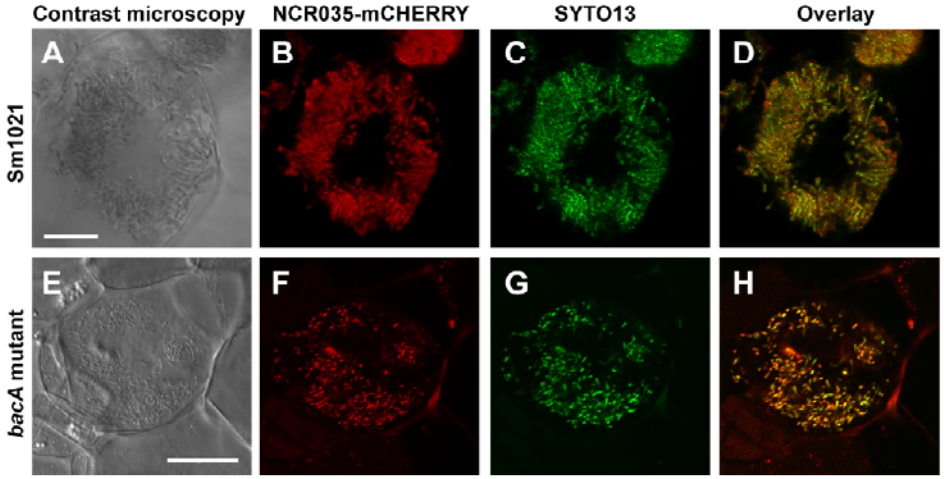


Figure 2. The *S. meliloti bacA* mutant is challenged with NCR peptides. Microscopy of transgenic *M. truncatula* nodule cells expressing NCR035-mCHERRY under the control of the *NCR035* promoter infected with either the *S. meliloti* wild-type (A–D) or BacA-deficient mutant (E–H) strains. Differential Interference Contrast microscopy (A,E), confocal microscopy of NCR035-mCHERRY localization (red) (B and F), bacterial localization with the DNA stain SYTO13 (green) (C,G), and an overlay of NCR035-mCHERRY and SYTO13 localization (D,H). In both the wild-type and BacA-deficient mutant infected nodules, NCR035 co-localizes with the bacteria. Scale bars are 10 μm.
doi:10.1371/journal.pbio.1001169.g002

which were applied to legume nodule sections. In the presence of both dyes, live bacterial cells with intact cytoplasmic membranes are stained by SYTO9 and fluoresce green while dead bacteria with damaged cytoplasmic membranes are stained by PI and fluoresce red [24]. Using this procedure, we found that as expected the wild-type bacteria fluoresced green within the host compartments, indicating they were viable and metabolically active (Figure 3A,B; Figure S7A). In contrast, although the BacA-deficient mutant in the infection threads, which deliver the bacteria into the host cell compartment [2], fluoresced green (Figure 3C,D, arrows), the vast majority of mutant bacteria fluoresced red upon their release into the host compartments (Figure 3C,D; Figure S7B). Thus, these findings showed that the BacA-deficient mutant bacteria are rapidly killed upon their uptake into the host compartment. They were also consistent with our in vitro findings demonstrating that BacA is critical to prevent the hypersensitivity of *S. meliloti* towards the antimicrobial activity of host NCRs.

BacA Is Dispensable for Bacterial Survival in a Legume Mutant Defective in NCR Trafficking

To provide further evidence in support of our hypothesis that the rapid death of the BacA-deficient bacteria within the host compartment was the result of NCR peptide challenge, we took advantage of the *M. truncatula dnf1* mutant, which is defective in a nodule-specific signal peptidase complex involved in the trafficking of NCR peptides [25]. As a consequence, the transport of NCRs into the symbiosomes is blocked in the *M. truncatula dnf1* mutant [4]. Since NCR peptide challenge is essential for *S. meliloti* to differentiate into persisting, nitrogen-fixing bacteroids, the *dnf1* mutant nodules become infected by *S. meliloti* bacteria, which are unable to differentiate into bacteroids [4]. Applying the live/dead staining procedure, we found that the *S. meliloti* wild-type strain fluoresced green within the symbiosomes of *dnf1* mutant nodules, indicating that they were healthy despite the absence of bacteroid differentiation (Figure 3E,F; Figure S7C). In fact, the bacteria remained healthy for an extended time, within several layers of symbiotic cells, and only died in the oldest, root-proximal symbiotic cells of the *dnf1* mutant nodules as revealed by the red PI staining (Figure S8). More importantly, we also found that, unlike in the host compartment of wild-type *M. truncatula* (Figure 3C,D; Figure S7B), the released bacteria of the BacA-deficient mutant fluoresced green within the symbiosome compartments of the *M. truncatula dnf1* mutant (Figure 3G,H; Figure S7D; compare with Figure 3C,D; Figure S7B). Consequently, these findings showed that in the absence of NCR challenge within the host compartment, the BacA-deficient mutant remained viable instead of being rapidly killed.

Discussion

In this study, we showed that (i) the cytoplasmic membrane protein BacA protects *S. meliloti* from being hypersensitive to NCR AMPs in vitro by reducing the degree of peptide-induced inner membrane permeabilization, (ii) BacA is essential for survival of *S. meliloti* in wild-type *M. truncatula* symbiosomes, and (iii) BacA is dispensable for *S. meliloti* symbiosome survival in an *M. truncatula dnf1* mutant legume, which is defective in trafficking NCR peptides to the symbiosome compartment. Therefore, our findings have shown that there is a strong correlation between the presence of symbiosome NCR AMPs and the requirement of BacA for *S. meliloti* symbiosome survival (Figure 4). These findings are also consistent with previous studies whereby BacA proteins were found only to be critical for the rhizobium-legume symbiosis in hosts such as *Medicago*, peas, and *Astragalus*, which produce NCR AMPs, but non-essential in legumes naturally devoid of NCR AMPs such as bean, cowpea, or *Lotus* (Table S1). Based on these findings, we propose a model whereby BacA is critical to minimize the antibacterial action of NCR AMPs on *S. meliloti*, thereby enabling proper bacteroid development. Since the function of bacterial BacA proteins in prolonged plant and mammalian infections have eluded investigators for many years [8,10,11], this study represents a significant advance in understanding the in vivo role of these proteins.

We found that the difference between the wild-type and BacA-deficient strain in their response to the in vitro treatments was relatively modest compared to the *in planta* observations, where the difference in viability between both strains was substantial. However, a major difference between the in vitro and *in planta*

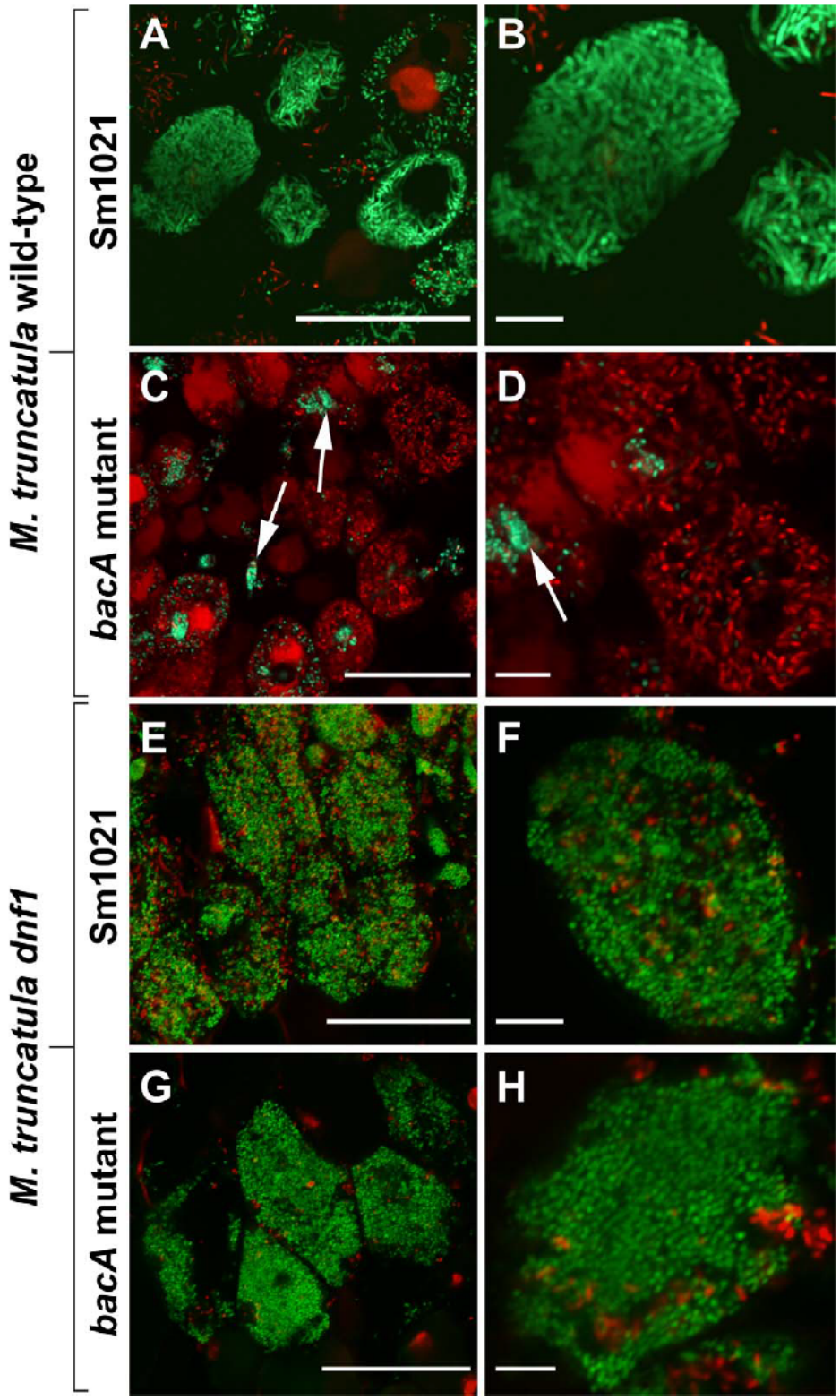


Figure 3. The *S. meliloti* BacA-deficient mutant undergoes rapid death in symbiosomes. Confocal microscopy of infected cells in nodules of wild-type *M. truncatula* (A–D) or the *M. truncatula dnf1* mutant (E–H). Nodules were infected by either the *S. meliloti* Sm1021 wild-type strain (A,B,E,F) or the BacA-deficient mutant (C,D,G,H). Nodules were stained with a mixture of SYTO9 (green signal) and PI (red signal). Live bacterial cells are stained by SYTO9 and dead bacteria are stained by PI. Arrows in (C,D) indicate rhizobia in infection threads. Scale bars are 50 μm (A,C,E,G) or 10 μm (B,D,F,H).

doi:10.1371/journal.pbio.1001169.g003

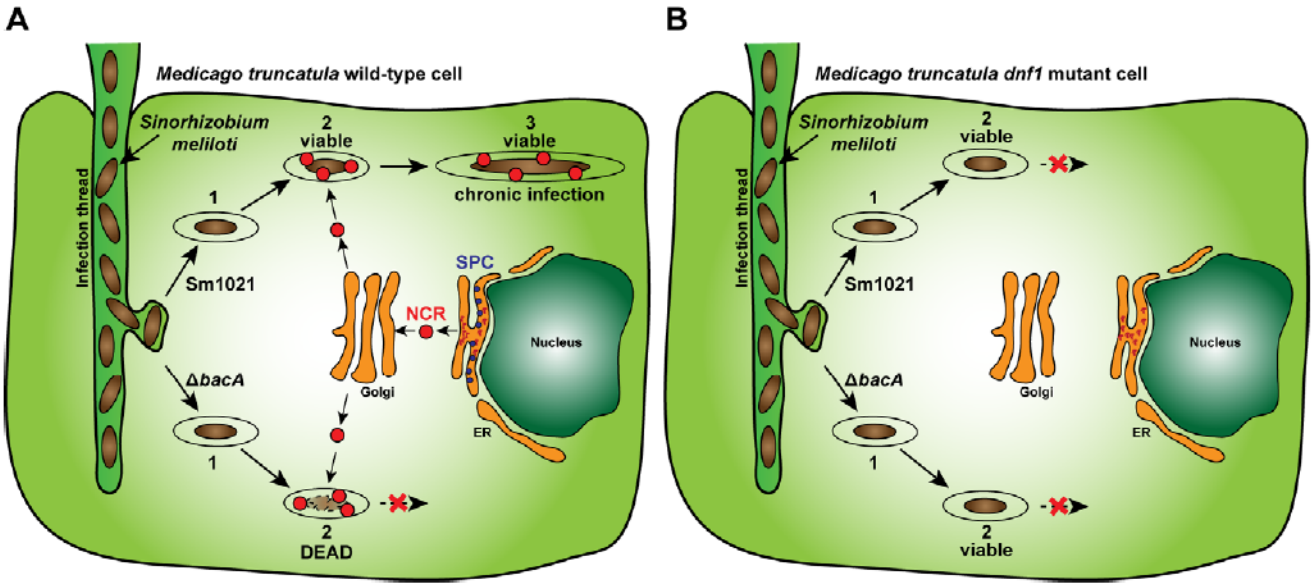


Figure 4. Hypersensitivity towards host AMPs prevents chronic bacterial infections. (A) In a wild-type *M. truncatula* nodule cell, the *S. meliloti* wild-type strain (Sm1021) and BacA-deficient mutant (Δ*bacA*) bacteria are released from the infection threads into the membrane-bound symbiosome (1). The bacteria are then challenged with host NCR AMPs (2), which mediate the differentiation of the wild-type strain into a nitrogen-fixing bacteroid, resulting in the chronic infection (3). In contrast, the BacA-deficient mutant is hypersensitive towards the host NCR AMPs and is killed by them rather than forming the chronic infection (2). (B) The *M. truncatula dnf1* mutant is defective in a nodule-specific signal-peptidase complex (SPC) and as a result the NCR peptides are no longer transported to the bacterial compartment but are retained in the endoplasmic reticulum (ER) [4]. The *S. meliloti* wild-type strain and BacA-deficient mutant enter into the symbiosomes (1) and remain viable due to the absence of NCR peptide challenge (2). However, neither strain can differentiate into N_2-fixing bacteroids due to the absence of NCRs.
doi:10.1371/journal.pbio.1001169.g004

conditions is that a highly complex cocktail of several hundred different NCR AMPs are produced *in planta* [5]. In addition, the environmental parameters within the nodule such as microaerobic conditions and low pH [1] might also impact the effect of NCRs on *S. meliloti*.

Although the BacA-deficient mutant bacteria were challenged with NCR peptides in vivo, a significant proportion of these peptides were transported to the plant cell surface rather than to the *S. meliloti* BacA-deficient-containing symbiosome compartment. Since the BacA-deficient mutant bacteria are killed within the symbiosomes [8], a reduced amount of target symbiosome compartments for NCR transport could lead to secretion of excess NCR peptides to the exterior of the plant cell. Further studies investigating NCR peptide trafficking with other *S. meliloti* mutants defective in bacteroid development would be necessary to confirm that this is the case.

Our data showed that the *S. meliloti* BacA protein is critical to reduce the amount of cytoplasmic membrane damage as a result of NCR AMP challenge in vitro. At present, we do not know the precise mechanism by which BacA limits NCR-induced cytoplasmic membrane damage. An *S. meliloti* BacA-deficient mutant has ~50% reduction in the content of an unusual outer membrane lipid relative to the wild-type strain [12,26]. Since this unusual lipid is important in outer membrane stability [27], one possibility is that NCR AMPs are more effective at disrupting the outer membrane of the *S. meliloti* BacA-deficient mutant relative to the wild-type strain leading to the increased damage to the inner membrane. However, an *S. meliloti* mutant, which completely lacks this unusual lipid, still forms persistent legume infections and can survive in NCR AMP-containing symbiosomes [14,27], suggesting that BacA must have an additional role in the response of *S. meliloti* towards host NCRs. Since an *S. meliloti acpXL* mutant, which is completely defective in the biosynthesis of the unusual lipid A [14,27], was osmotically unstable and lysed in the low osmolarity buffer used to test NCR peptide sensitivity in vitro (unpublished data), we were unable to determine the role of this unusual lipid in the bacterial response to the NCR AMPs. Moreover, BacA could affect the bacterial envelope in other ways, for example in its protein composition as suggested by transcriptome analysis in the *Rhizobium leguminosarum bacA* mutant [15], which in turn may be related to the hypersensitivity towards NCR peptides in the *bacA* mutants. In addition, BacA is predicted to be a cytoplasmic membrane subunit of an ABC transporter and our previous studies found that it plays a key role in the uptake of structurally diverse, non-membrane disrupting peptides in *S. meliloti* in vitro [15,28], suggesting that BacA may be a peptide transporter. At present it is not known if BacA is directly involved in peptide transport in bacteria or whether it indirectly influences the uptake of those peptides. If BacA is directly involved in peptide transport, BacA-mediated uptake of NCR peptides might reduce their ability to induce membrane damage. Alternatively, BacA might confer protection by being involved in the efflux of NCR peptides. However, further studies will be necessary to understand whether NCR AMPs have intracellular targets in *S. meliloti* and therefore whether their efflux would confer resistance.

BacA proteins are also critical for prolonged intracellular mammalian infections of *M. tuberculosis* and *B. abortus* [10,11]. A *B. abortus* BacA-deficient mutant establishes an acute infection but was specifically defective upon entering the chronic phase of the infection in mice [11]. Mammalian hosts produce a cocktail of different AMPs depending upon the cell type [7]. The legume NCR peptides used in our in vitro experiments are cationic and defensin-like [5]. Mammalian defensins are primarily produced by epithelial cells and neutrophils as part of the innate immune response and invading pathogens encounter these early in their infection [7]. AMPs are also produced as part of the innate

immune response by mammalian macrophages and pathogens such as *B. abortus* are challenged with these peptides within their phagosome compartments [29]. We showed previously that the *B. abortus* BacA protein complements the chronic infection defect of the *S. meliloti* BacA-deficient strain within *Medicago* legumes [23]. In this study, we were able to demonstrate that the *B. abortus* BacA protein complements the hypersensitivity of the *S. meliloti* BacA-deficient mutant towards the antimicrobial action of NCR247 in vitro. It is well established that bacterial protection against host AMPs is important for the establishment of acute bacterial pathogen-host infections [6]. For example, the two-component PhoPQ system protects *Salmonella enterica* serovar Typhimurium against AMPs and is essential for macrophage survival [30]. Our findings suggest that BacA-mediated protection of pathogens against host AMPs is also key for the establishment of chronic pathogen-host infections.

Since there are over three hundred different NCR peptides produced by *M. truncatula* root nodules [5], we took advantage of the *M. truncatula dnf1* mutant as a means to completely block NCR peptide trafficking into the symbiosome compartment (Figure 4B). However, since the *M. truncatula dnf1* mutant is defective in a nodule-specific signal peptidase complex [25], it could also be affected in transport of other proteins to the symbiosomes. Therefore, at this stage, we cannot formally rule out the possibility that survival of the *S. meliloti* BacA-deficient mutant in the *dnf1* mutant might be more complex than just the absence of NCRs and might also be due to the absence of one or more of these DNF1-dependent symbiosome proteins. We found, consistent with the published work [4,25], that *S. meliloti* eventually dies in the *M. truncatula dnf1* mutant (Figure 4B). It is thought that the ultimate death of *S. meliloti* in this mutant legume might simply be due to a senescence process initiated in non-functional nodules [31]. However, it is also possible that the *S. meliloti* bacteroid features induced by the NCR peptides in the wild-type legume hosts are key for their ability to form prolonged infections in the host compartment. Therefore, since these bacterial changes would not occur in the *M. truncatula dnf1*, the bacteria could only form shorter term infections. Indeed, mammalian AMPs induce changes in bacterial pathogens permitting prolonged infections [32]. However, due to the complexity of AMP genes in mammalian hosts, the precise roles of these peptides on invading pathogens are not fully understood. For example, no such model system exists that can prevent the expression/trafficking of all mammalian AMPs. Future studies, blocking the trafficking of mammalian AMPs, in a similar way to the *M. truncatula dnf1* mutant, hold potential to uncover their precise role during mammalian infections.

In conclusion, we have shown that BacA plays a key role in the protection of *S. meliloti* against the antimicrobial action of host NCRs. Since there are over three hundred different NCR peptides and these peptides are expressed in different locations within the root nodules, the future study of different effects of the peptides on *S. meliloti* during the legume symbiosis has the potential to reveal further important findings into prolonged bacterial-host interactions.

Materials and Methods

Bacterial Growth

The sequenced *S. meliloti* Sm1021 strain (wild-type strain; formerly known as Rm1021) [33] and the SmGF1 BacA-deficient mutant [26] were used for the in vitro experiments. For the complementation, p*SmbacA* and p*BabacA* were used [23], whereby respectively the *S. meliloti* and *B. abortus bacA* genes were cloned into the broad host range vector pRF771 under the control of the *trp* promoter [34]. To obtain early exponential phase cultures, all strains were grown initially in LB medium [35] supplemented with 2.5 mM $MgSO_4$ and 2.5 mM $CaCl_2$ (LB/MC) and with 500 µg ml^{-1} streptomycin (5 µg ml^{-1} tetracycline was also added for plasmid-containing strains) for 48 h at 30°C, 200 rpm. The cultures were then diluted into fresh LB medium and grown overnight at 30°C, 200 rpm until an OD_{600} = 0.1 to 0.3. Stationary phase cultures were obtained by growth in LB/MC for 72 h at 30°C, 200 rpm. For solid media, 15 g of agar was added per liter of medium.

Flow Cytometry

To examine the effect of NCR247 on the cell elongation and genome amplification, early exponential phase cultures were washed in 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), diluted to an OD_{600} of 0.1, treated with either 0, 2, or 4 µM of NCR247 peptide for 3 h at 30°C, washed in buffer, and then re-suspended in 50 µl of buffer supplemented with 1% (v/v) toluene. Stationary cultures were also fixed following the same procedure. All fixed cells were then stored at 4°C until required and then 450 µl of buffer containing 10 µg ml^{-1} PI was added. After 15 min incubation on ice, flow cytometric measurements were performed on a Becton-Dickinson LSR II flow cytometer. To assess the permeabilization of the bacteria by the NCR247 peptide, cells were incubated directly after washing in 500 µl of buffer containing 10 µg ml^{-1} PI and then immediately measured by flow cytometry. PI fluorescence was excited using a 488 nm laser and detected using a 610/20 band pass filter detecting emissions between 600 and 620 nm. 10,000 events were recorded per measurement. All experiments were performed at least in duplicate and the flow cytometry data shown are a representative data set.

Colony Forming Ability

Exponential phase cultures were washed three times in 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.0, diluted to an OD_{600} of 0.1, and treated with either 0, 20, or 30 µM of NCR peptide for 3 h at 30°C. The samples were serially diluted in buffer and 10 µl aliquots of each dilution spotted in triplicate on LB agar. Colony-forming units per ml were determined after 72 h at 30°C. The error bars represent the standard deviation from the mean of the CFU of the three aliquots and the significance was tested using the Student's unpaired *t* test for comparison of a single data pair and ANOVA followed by a Student Newman-Keuls post-test for pairwise multiple comparisons. The data were plotted as a percentage of the untreated control culture and the data sets shown are representative of at least two independent experiments.

Gene Expression Analysis by RT-PCR

RNA and cDNA were prepared from duplicate Jemalong root samples, wild-type nodules, and nodules induced by the BacA-deficient mutant as described [5]. Semi-quantitative analysis of gene expression was performed by PCR using the primer pairs CTTTGCTTGGTGCTGTTTAGATGG and ATTCCAAAGGCGGCTGCATA for the constitutive gene Histone 3-like (accession number TC106487); CACGGGTATGCCATGTAAGA and CACAGTAGATGAATGGAAACCGTA for *NCR084*; CCATACCAACAGTGTCGCCG and CTTCACTTTCCAAGTTCCACCC for *NCR247*; TTTTAGGTGTCGTAAAGGCACA and TCTCAGGCTTAACCACAATGAA for *NCR035*; and TGGCTCAGTTTCTTCTCTTTGTT and ATGTGATGTCCCCTGGTTTC for *NCR001*.

Cellular Localization of NCR Peptides

M. truncatula Jemalong was transformed with *Agrobacterium rhizogenes* strain ARqua1, carrying either a *NCR035-mCHERRY* fusion under the control of the *NCR035* promoter on plasmid pK7m34GW-rolD::EGFP-pNCR035:NCR035-cherryNOHDEL-T35S [4] or a *NCR084-mCHERRY* fusion under the control of the *NCR084* promoter on plasmid pK7m34GW-rolD::EGFP-pNCR084::NCR084-cherryNOHDEL-T35S. Nodulation on transgenic roots was induced with either *S. meliloti* Sm1021 (wild-type strain) or Sm8386 (BacA-deficient mutant) [8]. Green fluorescence due to the presence of a *rolD*::eGFP-ER reporter cassette on the binary vectors was used to select transgenic roots/nodules. 2- to 3-wk-old nodules were harvested and embedded in 6% (w/v) agarose. Nodule sections of 70 µm were prepared with a Leica VT1200S vibratome and stained in 1 µM SYTO13 solution in water for 5 min. Sections were removed from the staining solution and mounted in deionized water for microscopy observation. Images were acquired at 1024×1024 pixels resolution with a Leica confocal laser scanning microscope TCS SP2.

In Situ Live/Dead Staining

Wild-type and *dnf1-1 M. truncatula* Jemalong were grown and inoculated with either the *S. meliloti* wild-type strain Sm1021 or BacA-deficient strain, Sm8386. 3-wk-old nodules were harvested and embedded in 6% (w/v) agarose. Nodule sections of 70 µm were prepared with a Leica VT1200S vibratome and incubated for 20 min in live/dead staining solution (5 µM SYTO9 and 30 µM PI in 50 mM Tris pH 7.0 buffer; Live/Dead BacLight, Invitrogen). Sections were removed from the staining solution and mounted in deionized water for microscopy observation. Images were acquired at 1024×1024 pixels resolution with a Leica confocal laser scanning microscope TCS SP2.

NCR247 Synthesis

NCR247 was assembled on a peptide synthesizer (Applied Biosystem), using the stepwise solid phase Fmoc method on Fmoc-Rink-Amid AM resin on a 0.1 mmol scale. The N-9-Fluorenyl-methoxycarbonyl amino acid used for the synthesis had the following side-chain protecting groups: trityl for cysteine at positions 1–2 and acetoamidomethyl for cysteine at positions 3–4, trityl for asparagine and glutamine, tert-butyl for aspartic acid, and 2,2,4,6,7,-pentamethyl-dihydrobenzofuran-5-sulfonyl for arginine. For each coupling step, the Fmoc-protected amino acid and coupling reagent were added in 5-fold molar excess with respect to resin substitution. Couplings were carried out with O-Benzotriazole-N,N,N′,N′-tetramethyl-uronium-hexafluoro-phosphate (HBTU). Cleavage from the resin and side chain deprotection of the synthesized peptides were carried out by treatment with a solution of 80% (v/v) trifluoroacetic acid, 5% (v/v) water, 5% (v/v) phenol, 5% (v/v) thioanisole, 2.5% (v/v) ethandithiol, and 2.5% (v/v) triisopropylsilane for 2 h. After precipitation with a cold 1:1 mixture of tert-butylmethyether-petroleum ether and repeated washing with tert-butylmethyether-petroleum ether (1:1), all peptides were purified to homogeneity by reversed-phase HPLC.

NCR247 Folding

To create the disulfide bridge between the 1st and 2nd cysteine residues, a purified peptide solution was used from a semi-preparative column. A 1 M aqueous sodium hydroxide solution was added until a pH 7.5-7.8 was reached and then 1 M Tris-HCl buffer pH 8 was added until a 250 µM peptide concentration was obtained. Eight molar equivalents of a 0.1 M aqueous hydrogen peroxide solution were then added and the oxidative folding was followed by analytical RP-HPLC. After completion of the folding (30–60 min), the peptide solution was buffered to pH 2.2 with phosphoric acid and purified to homogeneity by semi-preparative RP-HPLC. To create the second disulfide bridge in the peptide between the 3rd and 4th cysteine residues, the purified peptide solution from a semi-preparative column was diluted with a 1:1 mixture of water-methanol to reach a 150 µM final peptide concentration. An aqueous 0.1 M HCl solution (3 molar equivalents) and a 0.15 M solution of iodine in MeOH (5 molar equivalents) were added. The folding was followed by analytical RP-HPLC. After completion of the folding (60–120 min), the excess iodine was quenched by ascorbic acid (1 M in water) and the solvent was evaporated under vacuum. The peptides were then purified to homogeneity by semi-preparative RP-HPLC, analyzed by ESI-MS, and lyophilized.

Reversed Phase HPLC

Analytical and semi-preparative Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) was carried out on a Tri Rotar-VI HPLC system equipped with a MD-910 multichannel detector for analytical purposes or with a Uvidec-100-VI variable UV detector for preparative purpose (all from JASCO, Tokyo, Japan). A Jupiter 5u C18 300A column (150×4.6 mm) was used for analytical runs and a Jupiter 10u C18 Proteo 90A (250×21.2 mm) for peptide purification. Crude peptides were purified by semi-preparative RP-HPLC. The column was eluted with a solvent system consisting of (1) 0.1% aqueous trifluoroacetic acid and (2) 0.7% of trifluoroacetic acid in 70% aqueous acetonitrile in a linear gradient mode for 40 min at 14 ml min^{-1} flow. The eluent was monitored at 220 nm. The fractions were checked by analytical RP-HPLC using a linear gradient elution with the two-solvent system described above at a flow rate of 1 ml min^{-1}. The peaks were monitored at 220 nm.

NCR035 Peptide Synthesis and Analysis

NCR035 was commercially synthesized (Innovagen, Lund, Sweden) and its purity and mass determined by HPLC and ESI-MS, respectively. RP-HPLC confirmed that the purified NCR035 peptide contained one peptide species with greater than 90% (w/v) purity. ESI-MS showed that the peptide had a mass of 3906.61 Da, consistent with the presence of two non-localized S-S bridges.

Supporting Information

Figure S1 Mass spectrometry and HPLC analysis of NCR247 peptide. (A) ESI-MS of the NCR247 peptide. This analysis is in agreement with a peptide of 3004.5 Da and demonstrates the correct localization of the S-S bridges. (B) RP-HPLC analysis of the NCR247 peptide. The arrow indicates the single peptide peak with greater than 95% purity.
(TIF)

Figure S2 NCR247 peptide induces bacteroid-like features in cultured *S. meliloti*. Flow cytometry analysis of the in vitro *S. meliloti* wild-type strain (A–D) or the BacA-deficient mutant (E–H) with (shaded peaks, solid lines) and without (white peaks, dashed lines) 2 µM (A,B,E,F) or 4 µM NCR247 (C,D,G,H) exposure for 3 h. The forward scatter (FSC) was measured to estimate relative bacterial cell size (A,C,E,G) and the PI fluorescence was measured to estimate the relative bacterial DNA content (B,D,F,H).
(TIF)

Figure S3 BacA proteins protect *S. meliloti* in vitro against the antimicrobial activity of NCR035. (A) NCR035 peptide sequence

with the conserved cysteine residues in bold and underlined. (B) Colony forming ability of the indicated strains was assessed after exposure towards 30 µM NCR035 peptide for 3 h. Bars represent mean ± SD. The significance value $**p \leq 0.01$ was determined using the two-sided Student's unpaired *t* test and results are representative for two independent experiments.
(TIF)

Figure S4 The hypersensitivity of the BacA-deficient *S. meliloti* mutant towards NCR247 is complemented by reintroduction of the *S. meliloti bacA* gene or the *B. abortus bacA* gene. Colony forming ability in the indicated strains was assessed after exposure towards 20 µM of the NCR247 peptide for 3 h. Control vector (pRF771), wild-type *S. meliloti bacA* gene cloned into pRF771 (p*SmbacA*), and wild-type *B. abortus bacA* gene cloned into pRF771 (p*BabacA*). Bars represent mean ± SD. The significance value $***p \leq 0.001$ was determined using ANOVA followed by a Student Newman-Keuls post-test and results are representative for at least two independent experiments.
(TIF)

Figure S5 RT-PCR analysis of *NCR* gene expression. Expression analysis of the indicated *NCR* genes in *M. truncatula* wild-type roots and nodules induced by either the *S. meliloti* wild-type strain or the BacA-deficient mutant. Histone 3-like (H3 like) is used as a constitutive control.
(TIF)

Figure S6 NCR035 and NCR084 are transported to symbiosomes, even in the absence of bacterial BacA. Confocal microscopy of the *S. meliloti* wild-type (A,C,E) and BacA-deficient mutant (B,D,F) strains infected transgenic nodules expressing NCR035-mCHERRY under the control of the *NCR035* promoter (A–D) or NCR084-mCHERRY under the control of the *NCR084* promoter (E–F). Whole nodule transversal sections are shown in (A,B) and symbiotic nodule cells in (C–F). In wild-type strain-infected nodules, NCR035 or NCR084 co-localize with bacteroids. NCRs also co-localize with the rhizobia in the BacA-deficient mutant infected cells, but a proportion of the peptides are secreted to the outside of the nodule cells. The green fluorescence in (A,B) originates from the *rolD*::eGFP-ER reporter cassette which is present on the binary vector and used to select transgenic roots/nodules. Scale bars are 100 µm (A,B) or 10 µm (C–F).
(TIF)

Figure S7 The *S. meliloti* BacA-deficient mutant undergoes rapid death in symbiosomes. Confocal microscopy of either the *S. meliloti* wild-type strain-infected nodules (A,C) or the BacA-deficient mutant-infected nodules (B,D) from wild-type *M. truncatula* (A,B) and from an *M. truncatula dnf1* mutant (C,D) stained with a mixture of SYTO9 (green signal) and PI (red signal). Live bacterial cells are stained by SYTO9 and dead bacteria are stained by PI. The nodule meristem is indicated by an asterisk. The strong red PI staining in the meristem is resulting from the staining of plant nuclei. Scale bars are 50 µm.
(TIF)

Figure S8 Viability of symbiosome bacteria in the *M. truncatula dnf-1* mutant nodules. (A–C) Confocal microscopy of *S. meliloti* wild-type-infected *dnf1* nodules stained with a mixture of SYTO9 (green signal) and PI (red signal). (C) Enlargement of the image in (B). These nodules have an extended zone with symbiotic cells containing live bacteria stained with SYTO9 (green) (double asterisk). In older, root-proximal zones of the nodule (triple asterisk), the bacteria are dead as revealed by their red PI staining most likely reflecting senescence of the cells. The nodule meristem is indicated by a single asterisk. The strong red PI staining in the meristem in (A) is resulting from the staining of plant nuclei. Scale bars are 50 µm.
(TIF)

Table S1 Correlation between NCR gene expression in nodules, requirement of BacA, and bacteroid type. [1] Reported presence (yes) or absence (no) of NCR gene expression in nodules. [2] Requirement of BacA protein for efficient, nitrogen-fixing symbiosis; nd, no data available. [3] Mergaert et al., 2006 [3] and unpublished data.
(DOC)

Acknowledgments

This work is dedicated to the memory of Adam Kondorosi. We thank Willem van de Velde (Institut des Sciences du Végétal) for the NCR084-mCherry construct and Graham Walker for the provision of strains and many helpful discussions on BacA function.

Author Contributions

The author(s) have made the following declarations about their contributions: Conceived and designed the experiments: GPF PM AFH MZ DH EK. Performed the experiments: AFH MB MS BK OP AF RL EB SDA. Analyzed the data: GPF AFH PM MZ DH EK. Contributed reagents/materials/analysis tools: GPF PM MZ DH. Wrote the paper: GPF PM AFH.

References

1. Jones KM, Kobayashi H, Davies BW, Taga ME, Walker GC (2007) How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model. Nat Rev Microbiol 5: 619–633.
2. Gibson KE, Kobayashi H, Walker GC (2008) Molecular determinants of a symbiotic chronic infection. Annu Rev Genet 42: 413–441.
3. Mergaert P, Uchiumi T, Alunni B, Evanno G, Cheron A, et al. (2006) Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the *Rhizobium*-legume symbiosis. Proc Natl Acad Sci U S A 103: 5230–5235.
4. Van De Velde W, Zehirov G, Szatmari A, Debreczeny M, Ishihara H, et al. (2010) Plant peptides govern terminal differentiation of bacteria in symbiosis. Science 327: 1122–1126.
5. Mergaert P, Nikovics K, Kelemen Z, Maunoury N, Vaubert D, et al. (2003) A novel family in *Medicago truncatula* consisting of more than 300 nodule-specific genes coding for small, secreted polypeptides with conserved cysteine motifs. Plant Physiol 132: 161–173.
6. Maróti G, Kereszt A, Kondorosi E, Mergaert P (2011) Natural roles of antimicrobial peptides in microbes, plants and animals. Res Microbiol 162: 363–374.
7. Ganz T (2003) Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. Nat Rev Immunol 3: 710–720.
8. Glazebrook J, Ichige A, Walker GC (1993) A *Rhizobium meliloti* homolog of the *Escherichia coli* peptide-antibiotic transport protein SbmA is essential for bacteroid development. Genes Dev 7: 1485–1497.
9. Maunoury N, Redondo-Nieto M, Bourcy M, Van De Velde W, Alunni B, et al. (2010) Differentiation of symbiotic cells and endosymbionts in *Medicago truncatula* nodulation are coupled to two transcriptome-switches. PLoS ONE 5: e9519. doi:10.1371/journal.pone.0009519.
10. Domenech P, Kobayashi H, Levier K, Walker GC, Barry III CE (2009) BacA, an ABC transporter involved in maintenance of chronic murine infections with *Mycobacterium tuberculosis*. J Bacteriol 191: 477–485.
11. LeVier K, Phillips RW, Grippe VK, Roop II RM, Walker GC (2000) Similar requirements of a plant symbiont and a mammalian pathogen for prolonged intracellular survival. Science 287: 2492–2493.
12. Ferguson GP, Datta A, Baumgartner J, Roop II RM, Carlson RW, et al. (2004) Similarity to peroxisomal-membrane protein family reveals that *Sinorhizobium* and *Brucella* BacA affect lipid-A fatty acids. Proc Natl Acad Sci U S A 101: 5012–5017.
13. Haag AF, Wehmeier S, Muszynski A, Kerscher B, Fletcher V, et al. (2011) Biochemical characterization of *Sinorhizobium meliloti* mutants reveals gene products involved in the biosynthesis of the unusual lipid A very long-chain fatty acid. J Biol Chem 286: 17455–17466.
14. Haag AF, Wehmeier S, Beck S, Marlow VL, Fletcher V, et al. (2009) The *Sinorhizobium meliloti* LpxXL and AcpXL proteins play important roles in bacteroid development within alfalfa. J Bacteriol 191: 4681–4686.
15. Karunakaran R, Haag AF, East AK, Ramachandran VK, Prell J, et al. (2010) BacA is essential for bacteroid development in nodules of galegoid, but not phaseoloid, legumes. J Bacteriol 192: 2920–2928.

16. Tan XJ, Cheng Y, Li YX, Li YG, Zhou JC (2009) BacA is indispensable for successful *Mesorhizobium-Astragalus* symbiosis. Appl Microbiol Biotechnol 84: 519–526.
17. Maruya J, Saeki K (2010) The *bacA* gene homolog, mlr7400, in *Mesorhizobium loti* MAFF303099 is dispensable for symbiosis with *Lotus japonicus* but partially capable of supporting the symbiotic function of *bacA* in *Sinorhizobium meliloti*. Plant Cell Physiol 51: 1443–1452.
18. Ardissone S, Kobayashi H, Kambara K, Rummel C, Noel KD, et al. (2011) Role of BacA in lipopolysaccharide synthesis, peptide transport and nodulation by *Rhizobium* sp.NGR234. J Bacteriol. pp 2218–2228.
19. Kereszt A, Mergaert P, Maróti G, Kondorosi É (2011) Innate immunity effectors and virulence factors in symbiosis. Curr Opin Microbiol 14: 76–81.
20. Alunni B, Kevei Z, Redondo-Nieto M, Kondorosi A, Mergaert P, et al. (2007) Genomic organization and evolutionary insights on *GRP* and *NCR* genes, two large nodule-specific gene families in *Medicago truncatula*. Mol Plant Microbe Interact 20: 1138–1148.
21. Gray WR, Luque FA, Galyean R, Atherton E, Sheppard RC, et al. (1984) Conotoxin GI: disulfide bridges, synthesis, and preparation of iodinated derivatives. Biochemistry 23: 2796–2802.
22. Chou PY, Fasman GD (1978) Empirical predictions of protein conformation. Annu Rev Biochem 47: 251–276.
23. Wehmeier S, Arnold MF, Marlow VL, Aouida M, Myka KK, et al. (2010) Internalization of a thiazole-modified peptide in *Sinorhizobium meliloti* occurs by BacA-dependent and -independent mechanisms. Microbiology 156: 2702–2713.
24. Virta M, Lineri S, Kankaanpää P, Karp M, Peltonen K, et al. (1998) Determination of complement-mediated killing of bacteria by viability staining and bioluminescence. Appl Environ Microbiol 64: 515–519.
25. Wang D, Griffitts J, Starker C, Fedorova E, Limpens E, et al. (2010) A nodule-specific protein secretory pathway required for nitrogen-fixing symbiosis. Science 327: 1126–1129.
26. Ferguson GP, Roop II RM, Walker GC (2002) Deficiency of a *Sinorhizobium meliloti bacA* mutant in alfalfa symbiosis correlates with alteration of the cell envelope. J Bacteriol 184: 5625–5632.
27. Ferguson GP, Datta A, Carlson RW, Walker GC (2005) Importance of unusually modified lipid A in *Sinorhizobium* stress resistance and legume symbiosis. Mol Microbiol 56: 68–80.
28. Marlow VL, Haag AF, Kobayashi H, Fletcher V, Scocchi M, et al. (2009) Essential role for the BacA protein in the uptake of a truncated eukaryotic peptide in *Sinorhizobium meliloti*. J Bacteriol 191: 1519–1527.
29. Roop II RM, Gaines JM, Anderson ES, Caswell CC, Martin DW (2009) Survival of the fittest: how *Brucella* strains adapt to their intracellular niche in the host. Med Microbiol Immunol 198: 221–238.
30. Prost LR, Sanowar S, Miller SI (2007) *Salmonella* sensing of anti-microbial mechanisms to promote survival within macrophages. Immunol Rev 219: 55–65.
31. Van De Velde W, Guerra JCP, De Keyser A, De Rycke R, Rombauts S, et al. (2006) Aging in legume symbiosis. A molecular view on nodule senescence in *Medicago truncatula*. Plant Physiol 141: 711–720.
32. Bader MW, Sanowar S, Daley ME, Schneider AR, Cho U, et al. (2005) Recognition of antimicrobial peptides by a bacterial sensor kinase. Cell 122: 461–472.
33. Galibert F, Finan TM, Long SR, Pühler A, Abola P, et al. (2001) The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. Science 293: 668–672.
34. Wells DH, Long SR (2002) The *Sinorhizobium meliloti* stringent response affects multiple aspects of symbiosis. Mol Microbiol 43: 1115–1127.
35. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring HarborNY: Cold Spring Harbor Laboratory.

Figure S1

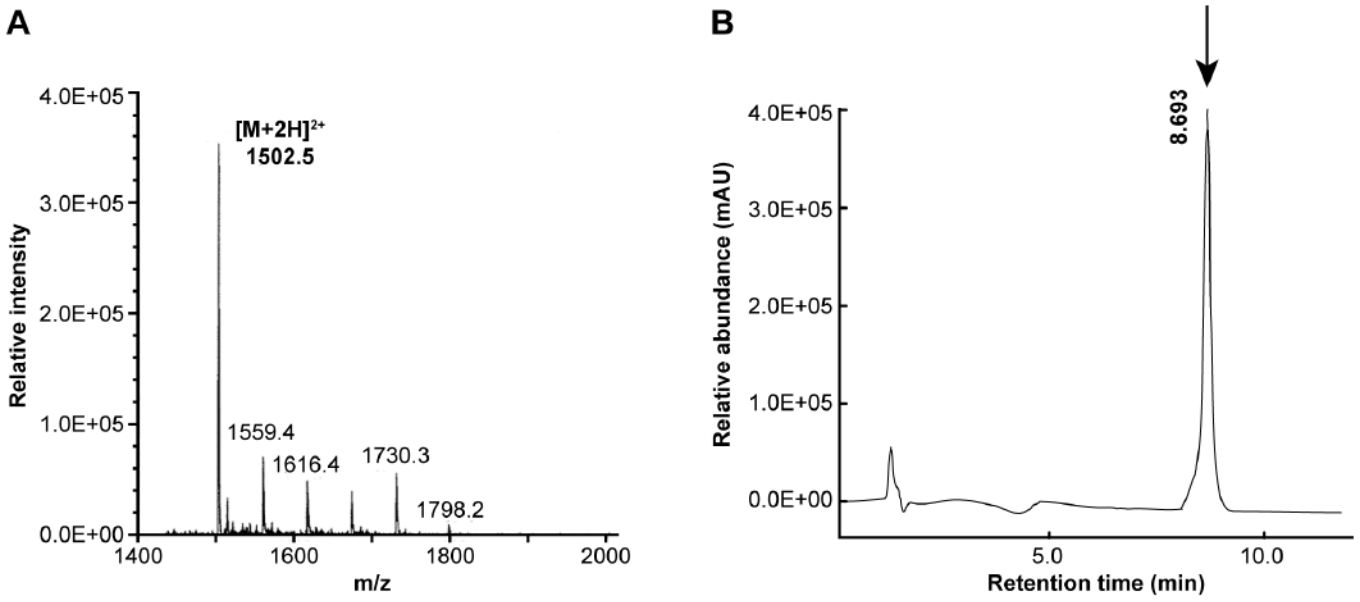

A
4.0E+05
3.0E+05
2.0E+05
1.0E+05
0.0E+00
Relative intensity
[M+2H]2+
1502.5
1559.4
1616.4
1730.3
1798.2
1400
1600
1800
2000
m/z
B
8.693
4.0E+05
3.0E+05
2.0E+05
1.0E+05
0.0E+00
Relative abundance (mAU)
5.0
10.0
Retention time (min)

Figure S2

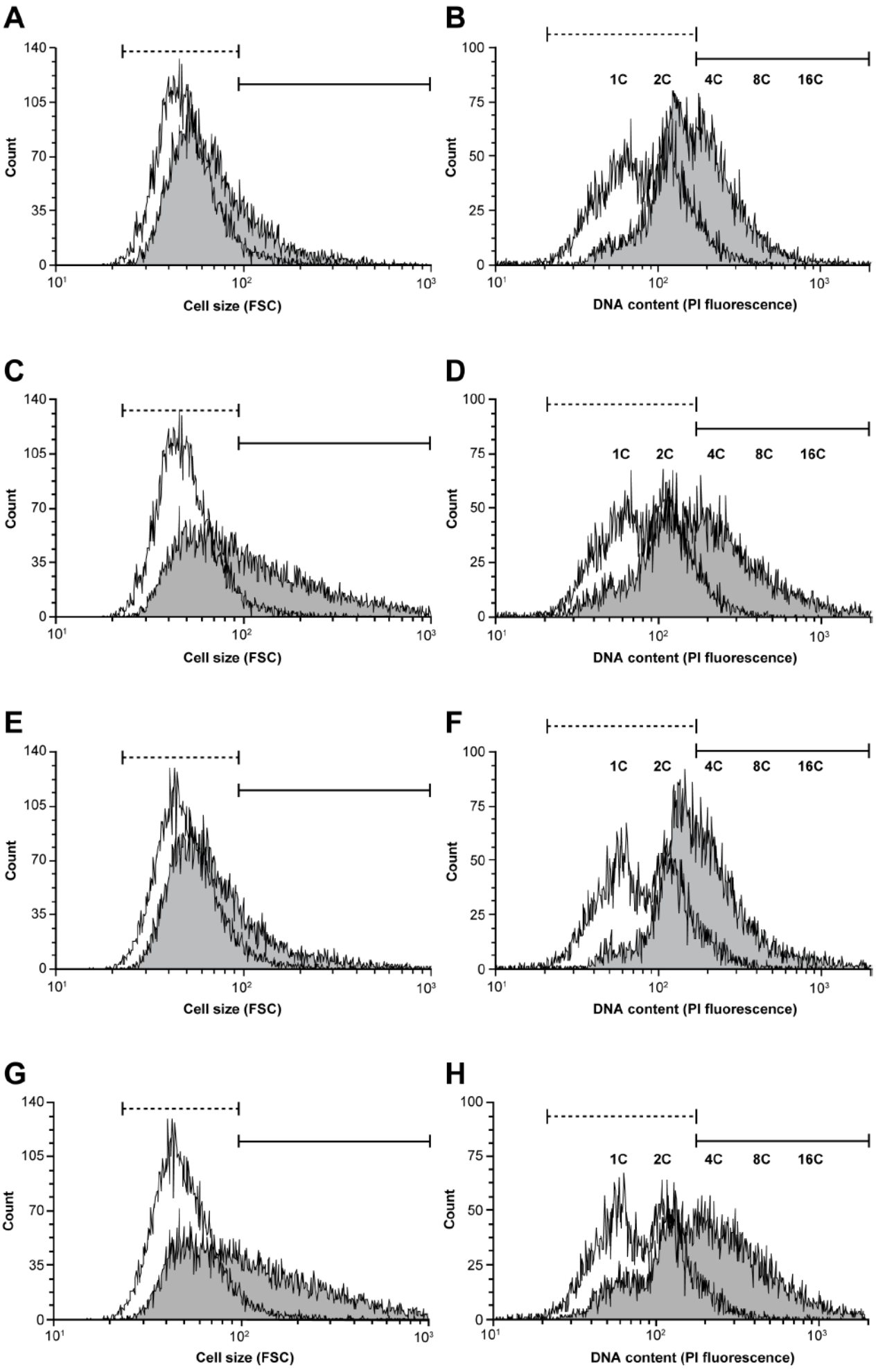

A
B
C
D
E
F
G
H
Count
Cell size (FSC)
DNA content (PI fluorescence)
1C
2C
4C
8C
16C

Figure S3

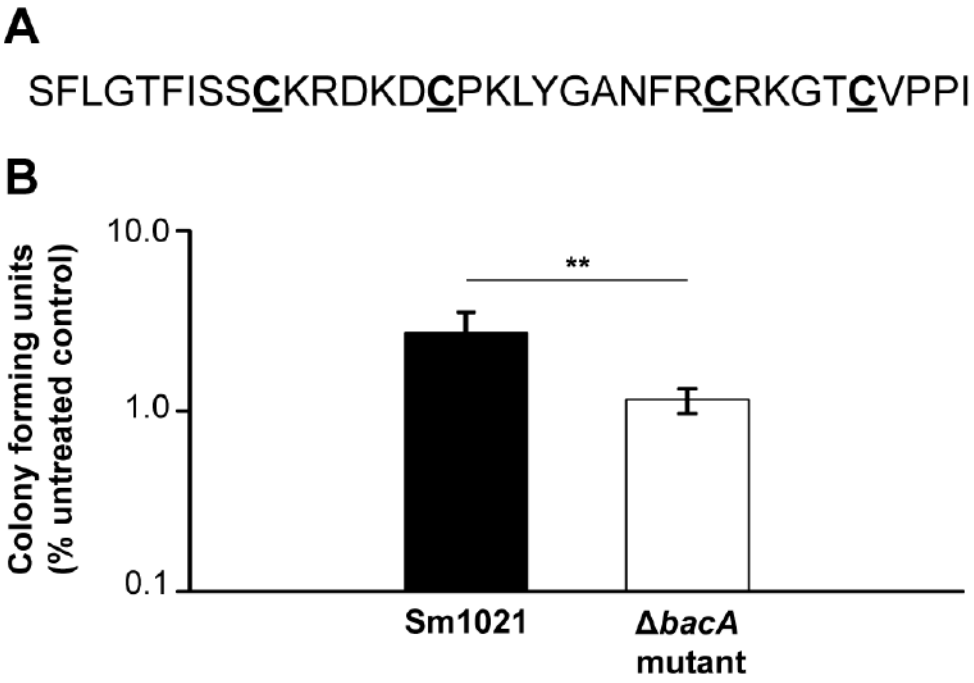

A
SFLGTFISSCKRDKDCPKLYGANFRCRKGTCVPPI
B
Colony forming units
(% untreated control)
10.0
1.0
0.1
**
Sm1021
ΔbacA
mutant

Figure S4

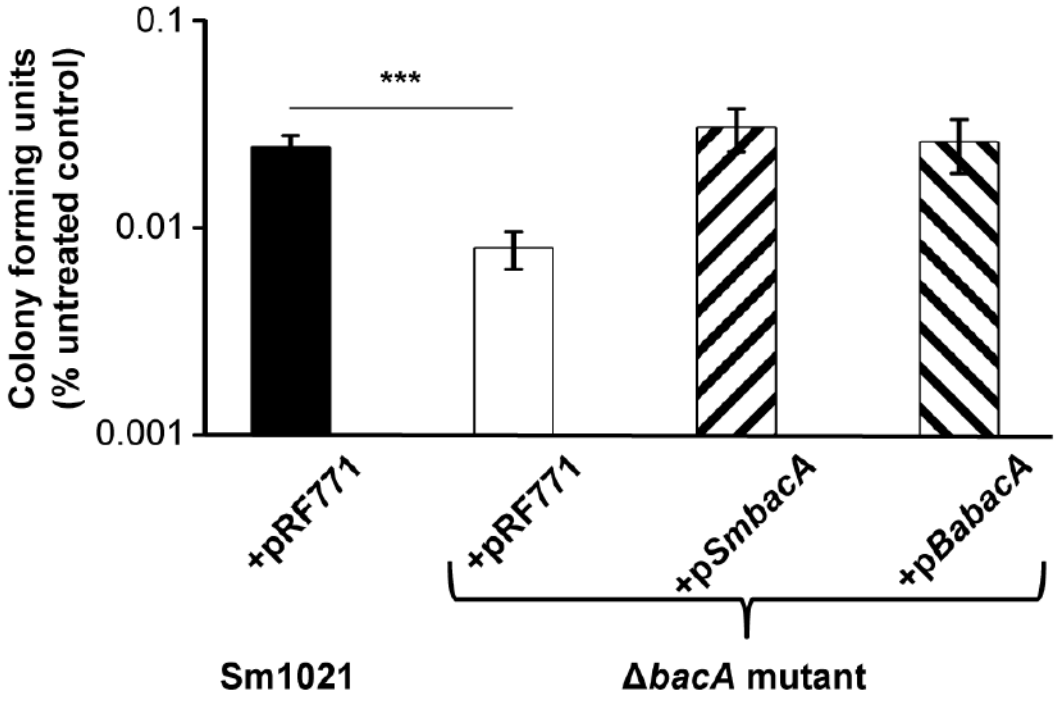

Colony forming units
(% untreated control)
0.1
0.01
0.001
***
+pRF771
+pRF771
+pSmbacA
+pBabacA
Sm1021
ΔbacA mutant

Figure S5

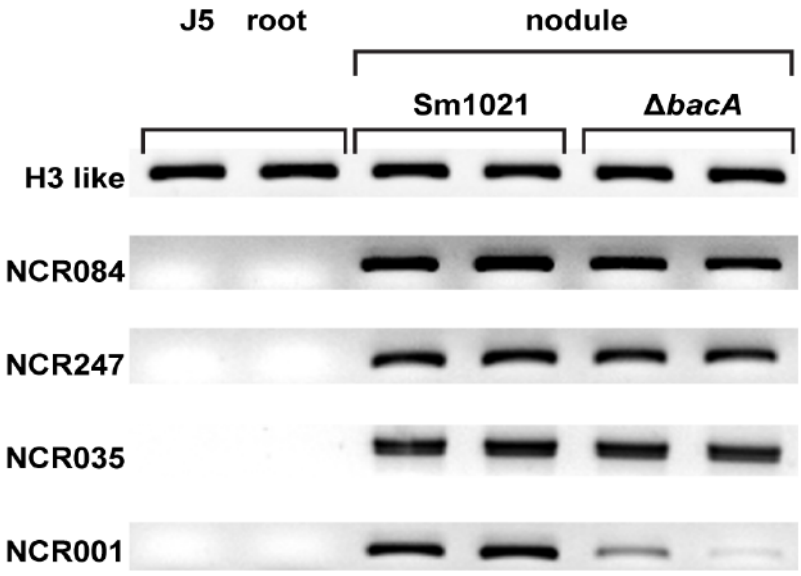

J5
root
nodule
Sm1021
ΔbacA
H3 like
NCR084
NCR247
NCR035
NCR001

Figure S6

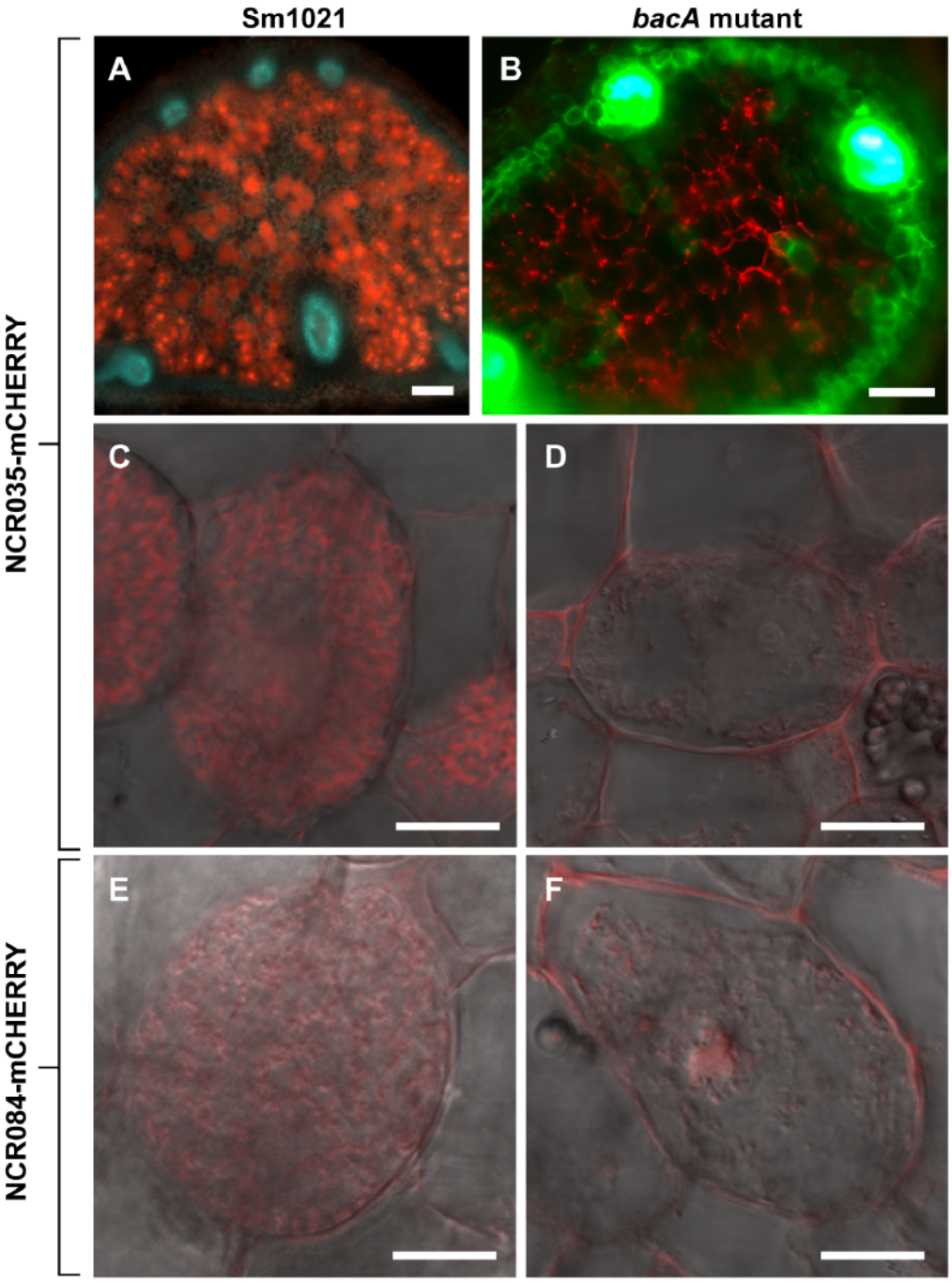


Figure S7

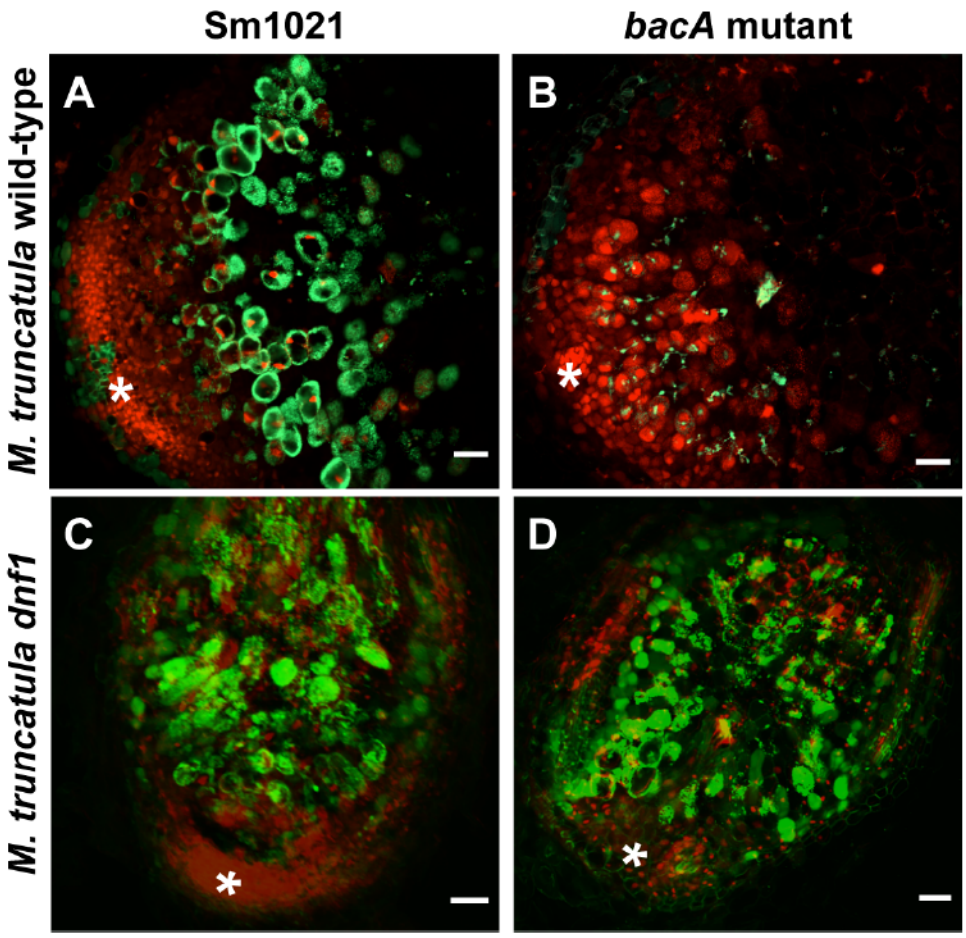

Sm1021
bacA mutant
M. truncatula wild-type
M. truncatula dnf1
A
B
C
D

Figure S8

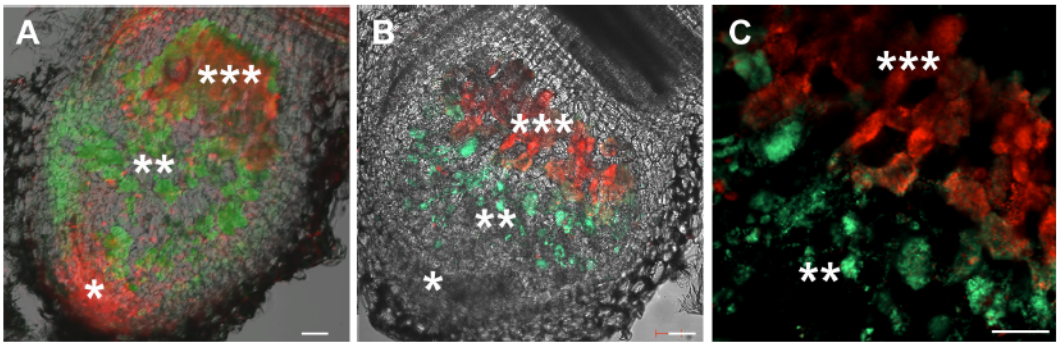


Table S1 Correlation between NCR gene expression in nodules, requirement of BacA and bacteroid type.

Legume species	NCRs[1]	Source	Rhizobial symbiont	BacA[2]	Source	Bacteroid type[3]
Phaseolus vulgaris (bean)	no	http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/	*Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*	no	[1]	reversible
			Rhizobium etli	no		
Vigna unguiculata (cowpea)	no	http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/	*Sinorhizobium* NGR234	no	[2]	reversible
Lotus japonicus	no	[3]	*Mesorhizobium loti*	no	[4]	reversible
Glycine max (soybean)	no	[3]	*Bradyrhizobium japonicum*	nd		reversible
			Sinorhizobium fredii HH103	nd		
Medicago truncatula	yes	[5,6]	*Sinorhizobium meliloti* Sm1021	yes	[7]	terminal
Medicago sativa (alfalfa)	yes	[8]	*Sinorhizobium meliloti* Sm1021	yes	[9]	terminal
Pisum sativum (pea)	yes	[10,11]	*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*	yes	[1]	terminal
Astragalus sinicus	yes	[12]	*Mesorhizobium huakuii*	yes	[13]	terminal
Trifolium repens (white clover)	yes	[14]	*Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*	nd		terminal
Galega orientalis (goat's rue)	yes	[15]	*Rhizobium galegae*	nd		terminal
Vicia faba (broad bean)	yes	[16]	*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*	nd		terminal

[1] reported presence (yes) or absence (no) of NCR gene expression in nodules.
[2] requirement of BacA protein for efficient, nitrogen-fixing symbiosis; nd: no data available.
[3] Mergaert et al., 2006 [3] and data not shown.

References

1. Karunakaran R, Haag AF, East AK, Ramachandran VK, Prell J, et al. (2010) BacA is essential for bacteroid development in nodules of galegoid, but not phaseoloid, legumes. J Bacteriol 192: 2920-2928.
2. Ardissone S, Kobayashi H, Kambara K, Rummel C, Noel KD, et al. (2011) Role of BacA in lipopolysaccharide synthesis, peptide transport and nodulation by *Rhizobium* sp. NGR234. J Bacteriol: 2218–2228.
3. Alunni B, Kevei Z, Redondo-Nieto M, Kondorosi A, Mergaert P, et al. (2007) Genomic organization and evolutionary insights on *GRP* and *NCR* genes, two large nodule-specific gene families in *Medicago truncatula*. Mol Plant Microbe Interact 20: 1138-1148.

4. Maruya J, Saeki K (2010) The *bacA* gene homolog, mlr7400, in *Mesorhizobium loti* MAFF303099 is dispensable for symbiosis with *Lotus japonicus* but partially capable of supporting the symbiotic function of *bacA* in *Sinorhizobium meliloti*. Plant Cell Physiol 51: 1443-1452.
5. Mergaert P, Nikovics K, Kelemen Z, Maunoury N, Vaubert D, et al. (2003) A novel family in *Medicago truncatula* consisting of more than 300 nodule-specific genes coding for small, secreted polypeptides with conserved cysteine motifs. Plant Physiol 132: 161-173.
6. Graham MA, Silverstein KA, Cannon SB, VandenBosch KA (2004) Computational identification and characterization of novel genes from legumes. Plant Physiol 135: 1179-1197.
7. Maunoury N, Redondo-Nieto M, Bourcy M, Van De Velde W, Alunni B, et al. (2010) Differentiation of symbiotic cells and endosymbionts in *Medicago truncatula* nodulation are coupled to two transcriptome-switches. PLoS ONE 5: e9519.
8. Jimenez-Zurdo JI, Frugier F, Crespi MD, Kondorosi A (2000) Expression profiles of 22 novel molecular markers for organogenetic pathways acting in alfalfa nodule development. Mol Plant Microbe Interact 13: 96-106.
9. Glazebrook J, Ichige A, Walker GC (1993) A *Rhizobium meliloti* homolog of the *Escherichia coli* peptide-antibiotic transport protein SbmA is essential for bacteroid development. Genes Dev 7: 1485-1497.
10. Scheres B, van Engelen F, van der Knaap E, van de Wiel C, van Kammen A, et al. (1990) Sequential induction of nodulin gene expression in the developing pea nodule. Plant Cell 2: 687-700.
11. Kato T, Kawashima K, Miwa M, Mimura Y, Tamaoki M, et al. (2002) Expression of genes encoding late nodulins characterized by a putative signal peptide and conserved cysteine residues is reduced in ineffective pea nodules. Mol Plant Microbe Interact 15: 129-137.
12. Chou MX, Wei XY, Chen DS, Zhou JC (2006) Thirteen nodule-specific or nodule-enhanced genes encoding products homologous to cysteine cluster proteins or plant lipid transfer proteins are identified in *Astragalus sinicus* L. by suppressive subtractive hybridization. J Exp Bot 57: 2673-2685.
13. Tan XJ, Cheng Y, Li YX, Li YG, Zhou JC (2009) BacA is indispensable for successful *Mesorhizobium-Astragalus* symbiosis. Appl Microbiol Biotechnol 84: 519-526.
14. Crockard A, Bjourson J, Dazzo B, Cooper JE (2002) A white clover nodulin gene, *dd23b*, encoding a cysteine cluster protein, is expressed in roots during the very early stages of interaction with *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* and after treatment with chitolipooligosaccharide Nod factors. J Plant Res 115: 439-447.
15. Kaijalainen S, Schroda M, Lindstrom K (2002) Cloning of nodule-specific cDNAs of *Galega orientalis*. Physiol Plant 114: 588-593.
16. Frühling M, Albus U, Hohnjec N, Geise G, Pühler A, et al. (2000) A small gene family of broad bean codes for late nodulins containing conserved cysteine clusters. Plant Sci 152: 67-77.

I.1.A.2 Discussion

Cette étude a permis de mettre en évidence le rôle *in vivo* de BacA dans la persistance des bactéroïdes face aux peptides NCR. Plus précisément, BacA protège de l'effet antimicrobien de NCR247 sans pour autant empêcher son action d'inducteur de la différenciation de *S. meliloti* en bactéroïdes – élongation et endoréduplication du génome. Ces peptides NCR possèdent plusieurs cystéines capablent de former différents ponts disulfures. Ces différentes combinaisons de ponts disulfures modulent leur conformation tridimensionnelle et donc potentiellement leurs activités. Les équipes de Gail Ferguson et Peter Mergaert ont poursuivi cette étude et démontré l'importance de ces ponts disulfures, et donc de la conformation du peptide, sur leur pouvoir antimicrobien, mais aussi sur leurs capacités à induire la différenciation de *S. meliloti*. Ainsi, les formes réduites de NCR247 s'avèrent être plus virulentes que la forme oxydée (Haag et al., 2012). Cette même étude confirme le rôle protecteur de BacA dans la symbiose et démontre que BacA protège *S. meliloti* uniquement de la forme oxydée de NCR247.

Du fait que l'état redox de NCR247 module son activité, il serait pertinent de déterminer l'état redox et donc la conformation de ces NCR *in planta* et ce au cours de leur acheminement de la cellule hôte végétale jusqu'aux bactéroïdes. La présence en N-terminal d'un peptide signal conduit à la translocation des NCR dans le réticulum endoplasmique (RE), transfert contrôlé en partie par une signal-peptidase – dont une sous-unité nodule spécifique est encodée en partie par Dnf1 (Van de Velde et al., 2010; Wang et al., 2010). Une fois dans le RE, un trafic vésiculaire

assure le transfert des NCR aux symbiosomes. Il a été montré que le RE comme le périplasme des bactéroïdes sont des environnements oxydants (Haag et al., 2012), ce qui suggère que les NCR seraient transférés aux bactéroïdes sous une forme oxydée. Cependant, l'état redox de l'espace péribactéroïdien (PBS) par lequel transitent les NCR reste actuellement inconnu. Nos études montrent que cet espace est acide, avec une fortement acidité en zone III (passant de 5,5-6,0 en zone II à 4,5-5,0 en zone III) (Pierre et al., 2013). Cette augmentation d'un facteur 100 de la concentration en proton suggèrerait que le PBS serait un environnement potentiellement réducteur. De plus, l'analyse du protéome du PBS et de la membrane péribactéroïdienne révèle la présence de « Proteine Disulfide Isomérase » (PDI) de *M. truncatula*, protéine impliquée dans la formation ou la réduction des ponts disulfures (Catalano et al., 2004). De même, des thiorédoxines exprimées spécifiquement dans les nodosités de *M. truncatula* ont été identifiées (Alkhalfioui et al., 2008). Ces thiorédoxines symbiotiques sont adressées au RE (Alkhalfioui et al., 2008), mais également aux symbiosomes et plus précisément au PBS comme le montre nos données préliminaires effectuées en collaboration avec le Pr. Pierre FRENDO (Données non publiées). Ainsi ces thiorédoxines symbiotiques pourraient participer à la régulation de l'état redox des NCR et ainsi leurs conformations et donc leurs actions sur *S. meliloti*. L'étude du rôle de ces thiorédoxines dans la modulation de la virulence des NCR devra être envisagé, notamment la présence de ponts disulfures, *in vitro,* en présence ou en absence de ces différentes thiorédoxines, mais également *in planta* dans un fond génétique invalidé pour ces différentes thiorédoxines.

Enfin, nous avons pu montrer *in vivo* le rôle protecteur de BacA envers les peptides NCRs (Haag et al., 2011). Cependant son mécanisme reste encore à préciser. BacA, qui possède des homologies avec des transporteurs de peptides antimicrobiens (Ferguson et al., 2006; Marlow et al., 2009; Mergaert et al., 2006), assure-t-il son pouvoir protecteur en agissant directement sur les NCR oxydés en permettant leur efflux hors des bactéroïdes et/ou plus indirectement BacA participe-t-il à la maturation de lipopolysaccharides membranaires (lipide A) renforçant la stabilité membranaire face aux NCR qui tendent à la perméabiliser (Van de Velde et al., 2010) ? A l'heure actuelle, c'est cette dernière hypothèse qui semble être privilégiée. Enfin, malgré le rôle fondamental que jouent les peptides NCR et le potentiel qu'offrent les interactions entre les différentes NCR sur le contrôle et la différenciation de la population de *S. meliloti* au sein de la nodosité, l'étude d'une autre famille de peptide ne devrait pas être écartée. En effet, les « Glycine Rich Proteines » (GRP) codent également des peptides sécrétés qui à l'instar des NCR, sont exprimés à différentes étapes du développement de la nodosité et présentent une activité antimicrobienne récemment démontrée chez le caféier (*Coffea canephora*) (Zottich et al., 2013).

I.1.B Rôle du monoxyde d'azote dans les étapes tardives de la symbiose, un inducteur de la sénescence ?

I.1.B.1 Introduction

Le monoxyde azote ou NO est une espèce réactive de l'azote ayant le rôle de messager secondaire, mais qui a forte concentration est également toxique du fait de sa nature radicalaire. Chez les animaux, le NO est impliqué dans de nombreux processus biologiques comme la neurotransmission ou la réponse immunitaire au cours duquel le NO participe à la médiation de la réponse inflammatoire et à la lyse du pathogène une fois celui-ci phagocyté dans le macrophage (Das et al., 2010; Schmidt & Walter, 1994). De même, chez les plantes, le NO est impliqué comme messager secondaire dans divers processus développementaux comme la germination, la floraison, et la réponse aux stress abiotiques et biotiques (Shi et al., 2012). Au cours de l'interaction *M. truncatula* – *S. meliloti*, le NO est nécessaire à la nodulation (del Giudice et al., 2011). La détection du NO dans les cellules infectées et notamment au niveau des bactéroïdes, suggèrent que le NO pourrait également jouer un rôle dans les nodosités matures (Baudouin et al., 2006).

Le NO pourrait agir au niveau du métabolisme énergétique de la nodosité via l'établissement au niveau mitochondrial d'une respiration NO-nitrate (Horchani et al., 2011). Cependant, diverses études suggèrent que le NO serait aussi un inhibiteur de l'activité

nitrogénase chez le lotier et le soja (Kato et al., 2010; Trinchant & Rigaud, 1982). Ce rôle ambivalent du NO suggère que la production et la concentration de NO doivent être finement régulées au sein de la cellule infectée et/ou des bactéroïdes.

Au niveau bactérien, des protéines Hmp, appartenant à la famille des flavohémoglobines, sont capables de réduire le NO en nitrate. Cette réduction du NO tend ainsi à limiter sa toxicité et favorise la virulence de diverses bactéries pathogènes comme *Staphylococcus aureus* (Richardson et al., 2006), mais aussi phytopathogènes comme *Erwinia chrysanthemi* (Favey et al., 1995). L'invalidation d'*Hmp* chez *S. meliloti* conduit à augmenter la sensibilité de cette bactérie en culture pure pour le NO, tout en altérant la fixation d'azote des nodosités (Meilhoc et al., 2010). L'équipe de Claude BRUAND (Castanet-Tolosan, France) a cherché à déterminer le rôle du NO dans les nodosités lors des étapes tardives de l'interaction symbiotique en modulant le niveau de NO endogène dans la nodosité via la surexpression ou l'invalidation du gène *Hmp* tout en cherchant à déterminer mise en place précoce ou retardée du processus de sénescence nodositaire. Ainsi la visualisation *in vivo* de la viabilité des bactéroïdes au sein de la nodosité via la technique Live/Dead BacLight, mais également l'utilisation d'une fusion promoteur:GUS (*PMtCP6:GUS*) avec le promoteur d'un gène spécifique de la sénescence nodositaire (*PMtCP6*), nous a permis de visualiser cette induction précoce de la sénescence lors de l'invalidation d'*Hmp*. Ces travaux nous ont ainsi permis de caractériser le NO comme un inducteur du processus de sénescence nodositaire.

New Phytologist

Research

Nitric oxide (NO): a key player in the senescence of *Medicago truncatula* root nodules

Yvan Cam[1,2], Olivier Pierre[3], Eric Boncompagni[3], Didier Hérouart[3], Eliane Meilhoc[1,2] and Claude Bruand[1,2]

[1]Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes (LIPM), INRA, UMR441, 24 Chemin de Borde Rouge – Auzeville, CS 52627, F-31326, Castanet-Tolosan Cedex, France; [2]Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes (LIPM), CNRS, UMR2594, 24 Chemin de Borde Rouge – Auzeville, CS 52627, F-31326, Castanet-Tolosan Cedex, France; [3]'Institut Sophia Agrobiotech', UMR ISA, INRA 1355-CNRS 7254-Université de Nice-Sophia Antipolis (UNS), 400 route des Chappes BP 167, F-06903, Sophia-Antipolis Cedex, France

Author for correspondence:
Eliane Meilhoc
Tel: +33 561285320
Email: eliane.meilhoc@toulouse.inra.fr

Received: *22 May 2012*
Accepted: *15 July 2012*

New Phytologist (2012)
doi: 10.1111/j.1469-8137.2012.04282.x

Key words: flavohaemoglobin, *Medicago truncatula*, nitric oxide (NO), nodule senescence, *Sinorhizobium meliloti*, symbiosis.

Summary

- Nitric oxide (NO) is a signalling and defence molecule involved in diverse plant developmental processes, as well as in the plant response to pathogens. NO has also been detected at different steps of the symbiosis between legumes and rhizobia. NO is required for an optimal establishment of the *Medicago truncatula–Sinorhizobium meliloti* symbiotic interaction, but little is known about the role of NO in mature nodules. Here, we investigate the role of NO in the late steps of symbiosis.
- Genetic and pharmacological approaches were conducted to modulate the NO level inside root nodules, and their effects on nitrogen fixation and root nodule senescence were monitored.
- An increase in endogenous NO levels led to a decrease in nitrogen fixation and early nodule senescence, characterized by cytological modifications of the nodule structure and the early expression of a specific senescence marker. By contrast, a decrease in NO levels led to a delay in nodule senescence.
- Together, our results strongly suggest that NO is a signal in developmental as well as stress-induced nodule senescence. In addition, this work demonstrates the pivotal role of the bacterial NO detoxification response in the prevention of early nodule senescence, and hence the maintenance of efficient symbiosis.

Introduction

Nitric oxide (NO) is a gaseous signalling molecule which can be toxic because of its ability to react with multiple targets in biological systems. For many years, NO has been recognized as an important biological mediator in animals, as it plays key roles in various physiological processes, such as neurotransmission, immunological and inflammatory responses, and defence against pathogenic bacteria (Schmidt & Walter, 1994; Das *et al.*, 2010). Although the interest in NO in plants is more recent, the emerging picture is that NO functions as a ubiquitous signal in diverse processes, including germination, root growth, flowering and adaptive responses to biotic and abiotic stresses (Delledonne *et al.*, 1998; Beligni & Lamattina, 2000; Pagnussat *et al.*, 2002; He *et al.*, 2004; Qiao & Fan, 2008). A role of NO has been anticipated in plant tissue senescence, even though contrasting conclusions have been reached. In a variety of plants, the progression of senescence is associated with a significant decrease in endogenous NO emission (Prochazkova & Wilhelmova, 2011). For example, the abolition of NO generation led to an early senescence phenotype in *Arabidopsis* (Mishina *et al.*, 2007). By contrast, in a recent study, NO was found to be a pivotal mediator of light-dependent leaf cell death in rice (Lin *et al.*, 2012). NO has also been shown to be a crucial positive mediator in cell senescence (Carimi *et al.*, 2005) and in programmed cell death in cell cultures of *Arabidopsis* (De Michele *et al.*, 2009b).

Interestingly, most of the pioneering work on NO in plant–microbe interactions has been performed on the host response to pathogen attack (Romero-Puertas *et al.*, 2004; Wendehenne *et al.*, 2004; Delledonne, 2005; Leitner *et al.*, 2009; Gaupels *et al.*, 2011). Contrary to pathogenic interactions, the association between legumes and rhizobia leads to the establishment of a symbiotic relationship, characterized by the formation of new differentiated organs, called nodules, in which bacteria differentiate into bacteroids with the ability to fix atmospheric nitrogen. Several studies have shown the occurrence of NO in mature nodules (Baudouin *et al.*, 2006; Pii *et al.*, 2007), but also during the first steps of the interaction (Nagata *et al.*, 2008). Using pharmacological and genetic approaches, the role of plant nitrate reductase and the mitochondrial electron transport chain (ETC) in NO production in *Medicago truncatula–Sinorhizobium meliloti* nodules has been demonstrated recently (Horchani *et al.*, 2011). Denitrification operated by the bacteria is also a probable source of NO in nodules, although the part of NO supplied by the bacterial partner may vary with the bacterial species and/or the culture conditions (Meakin *et al.*, 2007; Sanchez *et al.*, 2010; Horchani *et al.*, 2011).

The role(s) of NO in mature nodules remains uncertain. NO may have a metabolic role, as it has been suggested that, under the

© 2012 The Authors
New Phytologist © 2012 New Phytologist Trust

microaerobic conditions prevailing in nodules, a nitrate–NO respiratory pathway contributes to energy supply (Horchani *et al.*, 2011). However, NO has been reported to be a potent inhibitor of nitrogenase activity in soybean (*Glycine max*) and *Lotus* (Trinchant & Rigaud, 1982; Kato *et al.*, 2010). Hence, the NO concentration should be tightly regulated to fully achieve its signalling and/or metabolic functions in nodules and, at the same time, should be maintained at levels compatible with nitrogenase activity. The level of NO inside nodules can be controlled by symbiotic (leghaemoglobin) or nonsymbiotic plant haemoglobins (Herold & Puppo, 2005; Perazzolli *et al.*, 2006; Sasakura *et al.*, 2006; Shimoda *et al.*, 2009; Gupta *et al.*, 2011). On the bacterial side, a major candidate for NO detoxification is a flavohaemoglobin (Hmp) (Meilhoc *et al.*, 2010). Indeed, the *S. meliloti hmp* mutant strain was less resistant to NO in culture relative to the wild-type (wt), and a lower nitrogen fixation efficiency was observed when plants of *M. truncatula* were inoculated with the *hmp* strain, suggesting a role of the bacterial flavohaemoglobin in symbiosis (Meilhoc *et al.*, 2010).

The roles and effects of NO at the late stages of symbiosis are still puzzling. In this work, we address this issue using the model legume *M. truncatula* and its symbiont *S. meliloti*. The strategy was mainly based on the use of the bacterial *hmp* gene to modulate the NO content inside nodules, and the investigation of the details of subsequent temporal modifications of the phenotype over a 10-wk period. Our data suggest that NO may be a nonsystemic nodule senescence signal and that the bacterial response is essential to avoid an early nodule senescence process.

Materials and Methods

Bacterial strains and growth conditions

The bacterial strains and plasmids are listed in Table 1. *Sinorhizobium meliloti* strains were grown in Luria–Bertani medium supplemented with 2.5 mM $CaCl_2$ and 2.5 mM $MgSO_4$ (LBMC). Antibiotics, when required, were added at the following concentrations: streptomycin, 100–300 μg ml^{-1}; tetracycline, 10 μg ml^{-1}; gentamycin, 40 μg ml^{-1}; carbenicillin, 50 μg ml^{-1}; kanamycin, 50 μg ml^{-1}.

Plasmids were introduced into *S. meliloti* by triparental mating, using pRK2013 as a helper, and subsequent selection for antibiotic resistance. Binary vectors were introduced into *Agrobacterium rhizogenes* A4S by electrotransformation and selection for spectinomycin resistance (100 μg ml^{-1}).

Plant growth conditions

Medicago truncatula Gaertn cv Jemalong A17 was cultivated in nitrogen-free Farhäeus medium in test tubes, as described by del Giudice *et al.* (2011). *Sinorhizobium meliloti* strains were grown on LBMC plates, resuspended in sterile water to a final optical density at 600 nm (OD_{600}) of 0.001, and plant roots were inoculated with 100 μl of the bacterial suspension. When needed, at 4 wk post-inoculation (wpi), plant roots were treated with 100 μl diethylamine NONOate (DEA-NONOate; Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) at various concentrations. For dark stress treatment, at 3 wpi, plants were removed from light by covering the tubes with a dark box for 72 h.

Plant assays

Assessment of nodule senescence Series of 20–38 plants were grown for each condition tested. At 3 wpi and every week during six additional weeks, root nodules were observed under a binocular microscope. A nodule was considered to be senescent when at least half of its length was green. The percentage of senescent nodules was calculated for each plant as the ratio (×100) of the senescent nodule number over the total number of nodules per root. The average was calculated from these data.

Microscopic analyses of nodule sections (80–100 μm) were carried out at the same time points. Nodule sections were fixed in Z'

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Description	Reference or source
Sinorhizobium meliloti		
GMI11495 (wt)	Sm^r derivative of Rm2011	Pobigaylo *et al.* (2008)
BT602 (*hmp*$^{++}$)	GMI11495 containing pBBR-hmp	del Giudice *et al.* (2011)
GMI11549 (*hmp*)	*hmp*:: mTn*5*-STM-2.12.A01	Pobigaylo *et al.* (2008)
Escherichia coli		
DH5α	*supE44* Δ*lacU169* (Φ80 *lacZ*ΔM15) *hsdR17recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*	Sambrook *et al.* (1989)
Plasmids		
pRK2013	Helper plasmid for triparental matings	Figurski & Helinski (1979)
pXLGD4	Plasmid expressing *lacZ* constitutively	Ditta *et al.* (1985)
pBBR-hmp	pBBR1MCS-5 + *hmp*	Meilhoc *et al.* (2010)
psma1289-lacZ	Plasmid expressing a *sma1289-lacZ* reporter fusion	del Giudice *et al.* (2011)
pENTL4L1-PMtCP6	Plasmid carrying a 1.73-kb promoter fragment of the *Medicago truncatula CP6* cysteine protease gene	Perez Guera *et al.* (2010)
pENTRTMGus	Gateway entry vector	Invitrogen
pENTL2L3-T35S	Gateway entry vector	VIB, Ghent, Belgium
pKM43GWD	Gateway destination vector	VIB, Ghent, Belgium
pKM43GWD-PMtCP6:GUS	Binary vector for hairy root transformation carrying the PMt*CP6*:GUS reporter fusion	This work

© 2012 The Authors
New Phytologist © 2012 New Phytologist Trust

buffer (0.1 M Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 pH 7.4, 10 mM KCl, 1 mM $MgSO_4$) with 2% glutaraldehyde for 1.5 h under vacuum. Sections were then washed three times in water and stained with toluidine blue (0.01% in water) for 5 min at room temperature, and then washed again three times in water. Observations were made with a Zeiss Axioplan2 microscope in dark field. Photographs were taken with an AxioCam (Zeiss) and processed with the corresponding software.

Acetylene reduction assay and shoot dry weight Nitrogenase activity was determined by the acetylene reduction assay (Hardy *et al.*, 1968). Nitrogen fixation was assayed on plants grown in test tubes fitted with rubber stoppers. Six millilitres of air inside the tube were replaced by 6 ml of acetylene. Tubes were incubated at room temperature for 3–3.5 h. Gas samples (200 or 300 µl) were analysed in a gas chromatograph (Intersmat IGC 120FL; Intersmat, Courtry, France, or Hewlett-Packard 5890 series II; Hewlett-Packard, Avondale, PA, USA). For each plant, the amount of ethylene produced was assessed by measuring the height of the ethylene peak on the chromatogram relative to the length of the reaction. Series of 7–10 plants were analysed for each time point or condition. The shoot dry weight was measured after incubation of plant shoots for 48 h at 65°C. Series of 10–46 plants were analysed depending on the time point or condition.

NO detection in root nodules

Confocal microscopy Experiments were performed on 3-wpi nodule sections (80–100 µm) obtained with a vibratome (Bio-Rad Microcut H1200). Sections were incubated in detection buffer (DB; 10 µM Tris pH 7.5, 10 mM KCl) in the presence of 10 µM 4,5-diaminofluorescein-2-diacetate (DAF-2DA; Calbiochem, San Diego, CA, USA) for 30 min in the dark at room temperature. Observations were made with a confocal microscope (Leica SP2 AOBS; Leica, Nanterre, France) on excitation at 488 nm with an argon laser. Fluorescence emission was detected at 530 nm. Images were processed and analysed using Leica software 3 d. When needed, 1 mM of 2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethyl imidazoline-1-oxyl-3-oxide (cPTIO; Sigma-Aldrich) was added 30 min before the addition of DAF-2DA.

Fluorimetric quantification of NO production using DAF-2 The NO produced by nodules and released into the detection medium was quantified using the fluorescent nonpermeable probe DAF-2 (Sigma-Aldrich) as described by Horchani *et al.* (2011). At least 70 nodules (25–65 mg) from the same plant series were pooled in a multiwell plate in 1 ml of DB in the presence of 10 µM DAF-2. Fluorescence was measured every 5 min during 2.5 h using a microplate spectrofluorimeter (Fluostar Omega, BMG Labtech, Champigny sur Marne, France) at 28°C (excitation wavelength, 495 nm/emission wavelength, 515 nm). The slope of the curve was calculated and expressed as fluorescence units per minute per milligram of wet nodule. Fluorescence measured from wt-elicited nodules pre-incubated with cPTIO was considered to be NO nonspecific. The fluorescence measured when only cPTIO and DAF-2 were present in the reaction was deduced from the nonspecific fluorescence (in the presence of wt nodules). Indeed, we observed that cPTIO enhanced DAF-2 fluorescence even in the absence of NO. This effect has been described previously with DAF-FM (Vitecek *et al.*, 2008).

Detection of NO using biosensor strains *in planta* NO-biosensor strains consist of *S. meliloti* strains carrying psma1289-lacZ, a plasmid carrying a transcriptional *lacZ* reporter fusion to the *S. meliloti sma1289* gene promoter. Three weeks after the inoculation of plants with a biosensor strain, nodule sections (80–100 µm) obtained with a vibratome were fixed in Z' buffer with glutaraldehyde (1.25%) under vacuum for 1.5 h. Nodules were then washed three times for 10 min in Z' buffer and stained in a solution containing Z' buffer, potassium ferricyanide (5 mM), potassium ferrocyanide (5 mM) and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galacto-pyranoside (X-gal) (0.8%). Nodule sections were incubated under vacuum at room temperature for 1 h and then at 37°C for 1 h. Finally, they were left at 4°C overnight. The next day, sections were observed by bright light optical microscopy (Axioplan2 Imaging from Zeiss). Photographs were taken with an AxioCam (Zeiss) and processed with the corresponding software.

Quantification of NO using biosensor strains In order to assay the β-galactosidase activity of NO-biosensor strains *in planta*, at least 25 nodules taken from the roots of *M. truncatula* at 2 wpi were frozen in liquid nitrogen, crushed and resuspended in Z' buffer supplemented with mannitol (0.5 M). Plant debris was allowed to settle for 20 min on ice. Then, the supernatant containing the bacteroids was spinned down (twice) at 12 000 ***g*** for 10 min at 4°C. One hundred microlitres of extract were used to quantify total proteins in the sample, employing the Bradford kit (Bio-Rad). β-galactosidase assays were performed on samples as described previously (del Giudice *et al.*, 2011).

Co-inoculation experiments

Plants were inoculated with a 1 : 1 mixture of wt and mutant strains (OD_{600} = 0.001). In order to verify that the number of cells used for inoculation with each strain was identical, colony-forming units (CFUs) were determined for each strain before inoculation. To determine the relative proportions of nodules occupied by *hmp* or wt bacteria, we made use of a wt strain containing a plasmid (pXLGD4) constitutively expressing the β-galactosidase enzyme. As controls, we used: plants inoculated with only one of the strains, and plants co-inoculated with the *hmp* strain and an *hmp*$^{++}$ strain containing pXLGD4. Senescent (greenish) and nonsenescent (pink) nodules from the same plant series were collected separately at 4 wpi. Nodules were wounded and incubated (1.5 h) in Z' buffer containing glutaraldehyde (2%) under vacuum. Nodules were then washed three times in Z' buffer and incubated in the same buffer containing potassium ferricyanide (5 mM) and X-gal (0.8%). Blue-stained nodules infected by the wt or *hmp*$^{++}$ strain and nonstained nodules elicited by the *hmp* strain were numbered in each category (senescent or not). Forty-seven (unique inoculation) to 380 (co-inoculation) nodules obtained from 10 to 60 plants were analysed in each experiment. The percentage of

© 2012 The Authors
New Phytologist © 2012 New Phytologist Trust

wt-elicited senescent nodules in the co-inoculation experiment was calculated as the ratio (×100) of the number of senescent nodules containing wt bacteria over the total number of nodules containing wt bacteria. The experiment was repeated four times.

Construction of promoter PMt*CP6*:GUS fusion, a binary vector for hairy root transformation

Using Gateway Technology (Invitrogen), a MultiSite Gateway® three-fragment recombination reaction between entry clones pENTL4L1-PMt*CP6*, pENTRTMGus, pENTL2L3-T35S and the destination vector, pKM43GWD, was performed in order to obtain the pKM43GWD-PMt*CP6*:GUS plasmid.

Root transformation and inoculation with *S. meliloti*

Roots were transformed with *A. rhizogenes* A4S as described by Vieweg *et al.* (2004) with modifications. Germination was allowed for 24 h at 20°C and the plantlets were transferred at 4°C for 7 d. Agrotransformation was achieved by injection into plant hypocotyls of a 1% peptone–sucrose mixture. *Agrobacterium rhizogenes* transgenic roots were allowed to develop for 7 d at 20°C, followed by 21 d at 25°C in a phytotron with a 16 h light : 8 h dark photoperiod. The tap root was then removed, leaving only lateral transgenic roots to develop. Plants were supplied with a nitrogen-free mineral solution and then inoculated with 0.01 OD_{600} units of wt or *hmp S. meliloti* strains. Nodules were harvested 3–6 wk after inoculation and fixed for histochemical analysis experiments.

Histological analysis of transgenic tissues

For dark field microscopy, nodules were fixed in 1% glutaraldehyde, 4% formaldehyde in 0.1 M phosphate buffer at pH 7.2, washed, dehydrated and embedded in Technovit 7100 (Kulzer Histo-Technik, Wehrheim, Germany), according to the manufacturer's instructions. Sections (5 μm) were cut with a Jung-type microtome and mounted with DPX (VWR International S.A.S, Fontenay-sous-Bois, France). β-glucuronidase (GUS) activity was localized, in nodule sections, with the histochemical substrate 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide, cyclohexylammonium salt (X-Gluc) (Sigma-Aldrich), as described by Journet *et al.* (1994). Dark field images were taken on an Axioplan2 microscope (Zeiss).

In situ Live/Dead staining

Medicago truncatula was grown and inoculated with either the wt or *hmp S. meliloti* strain (Meilhoc *et al.*, 2010). Three- to seven-week-old nodules were harvested, embedded in 6% (w/v) agarose and prepared for Live/Dead staining as described by Haag *et al.*, 2011. Nodule sections (70 μm) were prepared with a Leica VT1200S vibratome and incubated for 20 min in Live/Dead staining solution (5 mM SYTO9, 30 mM propidium iodide (PI) in 50 mM Tris pH 7.0 buffer; Live/Dead®BacLightTM, Invitrogen). Sections were removed from the staining solution and mounted in deionized water for microscopy observation. Images were acquired with a Zeiss confocal laser scanning microscope (LSM510 META).

Split root experiments

The split root method in pouches is described in Tran *et al.* (2012). Briefly, seeds were prepared as described above, except that, once germinated, they were deposited in pouches (eight seeds per pouch) containing Farhäeus medium supplemented with 1 mM $CaCl_2$. Two days later, the tip of the main root was cut. After incubation of the plants for 3–5 d at 22°C, those presenting at least two long lateral roots were selected and their additional lateral roots were removed. Each selected plantlet was transferred individually into a split root pouch. These pouches consist of a classical pouch separated into two heat-sealed independent compartments. Lateral roots from the same plantlet were carefully split into each of the two independent compartments. The two compartments were then inoculated with either the same bacterial strain or two different strains (wt and *hmp* strain). Four weeks later, nodules were numbered on each root. After the whole process, only 7–12% of initial plants were exploitable. Senescent and total nodules were counted as described previously on each root. The percentage of senescent nodules was calculated as the ratio (×100) of the number of senescent nodules over the total number of nodules per root.

When needed, 1 mM DEA-NONOate (100 μl) was added to one of the two roots 4 wk after the appearance of the first nodules. Three days after treatment, total and senescent nodules were numbered on each root and the percentage of senescent nodules was estimated.

Results

The bacterial flavohaemoglobin Hmp modulates the NO content of mature nodules

We have shown previously that the flavohaemoglobin Hmp is a major NO-detoxifying enzyme in *S. meliloti* (Meilhoc *et al.*, 2010). To determine whether Hmp was able to modify the NO content in nodules, we used the cell-permeable NO-specific fluorescent probe DAF-2DA. Detection of NO by confocal fluorescence microscopy was performed on sections of nodules induced on *M. truncatula* roots by the wt, *hmp* null mutant strain (*hmp*) or *hmp* over-expressing strain (hmp^{++}), hereafter referred to as wt, *hmp* and hmp^{++} nodules, respectively. Observations were completed at 3 wpi. Fluorescence was detected in wt nodules and was strongly reduced when nodules were pretreated with the NO scavenger cPTIO (Fig. 1a,b), confirming that NO is present in mature nodules (Baudouin *et al.*, 2006). Interestingly, *hmp* nodules displayed more fluorescence than wt nodules, and a drastic reduction in NO-specific fluorescence was observed in hmp^{++} nodules (Fig. 1c,d). This suggests that Hmp can modulate the NO level in nodules. To confirm these observations, a quantitative assay based on the detection of NO diffusing from entire nodules with a nonpermeable fluorescent dye (DAF-2) was performed (Horchani *et al.*, 2011). The results obtained with nodules collected at 2 wpi are shown in Fig. 2. They revealed a 26% NO decrease in hmp^{++}

© 2012 The Authors
New Phytologist © 2012 New Phytologist Trust

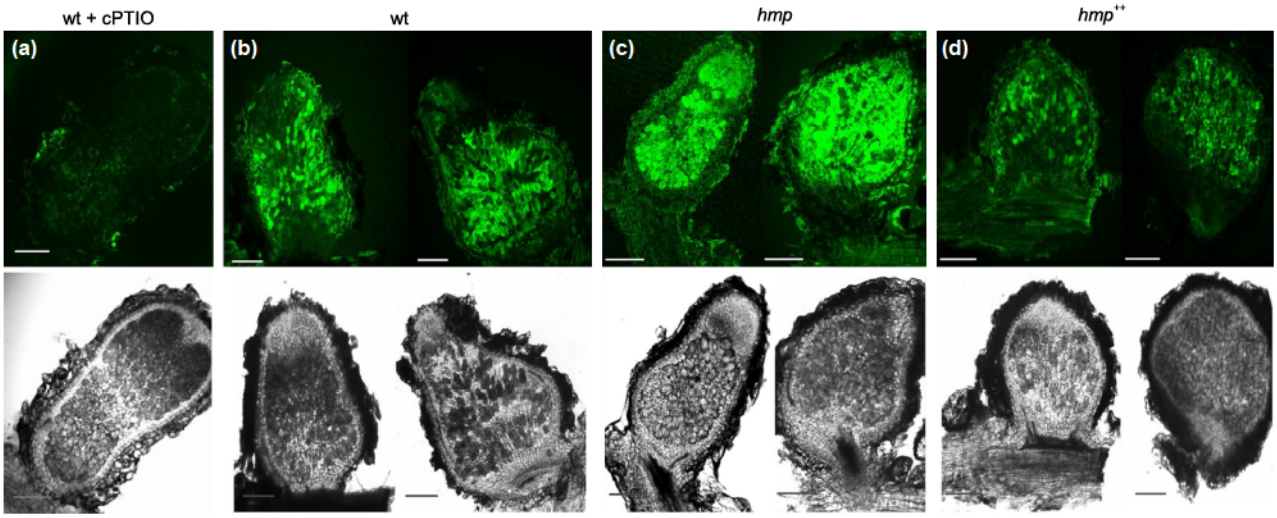


Fig. 1 Nitric oxide (NO) detection in *Medicago truncatula* root nodules by confocal microscopy. Nodule sections (80–100 μm) were obtained at 3 wk post-inoculation (wpi) with the indicated strains. Light and fluorescence micrographs of 4,5-diaminofluorescein-2-diacetate (DAF-2DA)-treated nodule sections are shown in the bottom and top parts of the figure, respectively. The nodule slices in (a) were pretreated with 1 mM of the NO scavenger 2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethyl imidazoline-1-oxyl-3-oxide (cPTIO) for 15 min before treatment with the DAF-2DA probe. The photographs shown are representative of *c.* 20 nodules from five different plants observed for each strain. Bars, 250 μm.

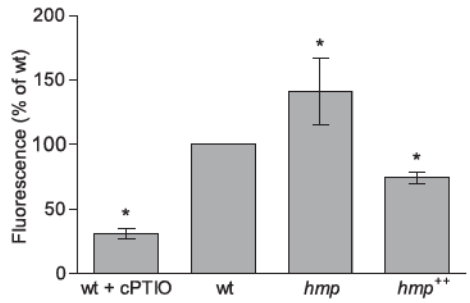


Fig. 2 Nitric oxide (NO) production by *Medicago truncatula* nodules. *Medicago truncatula* plants were inoculated with *Sinorhizobium meliloti* wild-type (wt), *hmp* or *hmp*$^{++}$ strains. At 3 wk post-inoculation (wpi), NO production on entire nodules was measured using the nonpermeable fluorescent probe diaminofluorescein-2 (DAF-2). In a control experiment, 1 mM 2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethyl imidazoline-1-oxyl-3-oxide (cPTIO) was added 30 min before addition of the probe. Fluorescence was expressed as a percentage of the fluorescence value obtained with wt nodules from the same experiment. Data are means ± SD of three (wt + cPTIO) or four (wt, *hmp*, *hmp*$^{++}$) independent experiments (assayed in duplicate). Raw data were analysed by ANOVA followed by a Tukey multiple comparison test. Asterisks indicate significant differences ($P < 0.05$) when compared with the wt.

nodules, whereas a 42% NO increase was detected in *hmp* nodules. NO levels measured in wt nodules were comparable at 2 and 4 wpi.

To rule out the possibility of NO-nonspecific fluorescence, we initiated a second approach based on the use of a reporter plasmid carrying a transcriptional *lacZ* fusion to the promoter of *sma1289*, an *S. meliloti* gene specifically induced by NO (de Bruijn *et al.*, 2006; Meilhoc *et al.*, 2010; del Giudice *et al.*, 2011). Bacteria (wt, *hmp*, *hmp*$^{++}$) carrying the reporter fusion were used to inoculate *M. truncatula* plantlets. At 2 wpi, nodules were collected, crushed and the expression of the reporter fusion was assessed by measurement of β-galactosidase activity (Fig. 3a). The enzyme activity was increased by 33% when the *hmp* mutant was used to inoculate the plants, when compared with the wt, whereas a 35% reduction was observed in nodules containing the *hmp*$^{++}$ strain. The expression of the fusion was also assessed at 3 wpi on nodule sections by X-gal staining and microscopic analysis (Fig. 3b). Some blue-stained bacteria were detected in the centre of zone III (fixation zone) of wt nodules. No staining was detected in the *hmp*$^{++}$ nodules, whereas dark-blue staining was obtained in *hmp* nodules.

Together, these results confirm that NO is present in mature nodules and that bacteria respond to NO. They also demonstrate that NO accumulates in the absence of *hmp*, whereas over-expression of the bacterial flavohaemoglobin gene allows a drastic decrease in nodule NO levels.

The NO level inside the nodules influences nitrogenase activity and plant shoot dry weight

We have shown previously that *hmp* may play a role in symbiosis, as an *hmp* mutant, when inoculated into plants, leads to a lower nitrogen fixation efficiency when compared with the wt strain (Meilhoc *et al.*, 2010). In an attempt to correlate NO levels in mature nodules and symbiosis efficiency, we monitored the nitrogen fixation activity using the acetylene reduction assay, and measured the dry weight of plant shoots. Figure 4(a) shows the nitrogenase activity measured over 10 wk from plants inoculated with wt, *hmp* or *hmp*$^{++}$ strains. For plants inoculated with the wt strain, the nitrogenase activity increased until a peak was reached at *c.* 6 wpi; it then declined gradually until 10 wk. Although the nitrogenase activity also declined with age in *hmp*$^{++}$ nodules, it was significantly higher (2.3-fold at 10 wpi) than that of control nodules of the same age. Interestingly, at 9 wpi, the nitrogenase activity was still as high as at 6 wpi with wt bacteria. The nitrogen fixation efficiency of *hmp*-inoculated plants remained very low.

© 2012 The Authors
New Phytologist © 2012 New Phytologist Trust

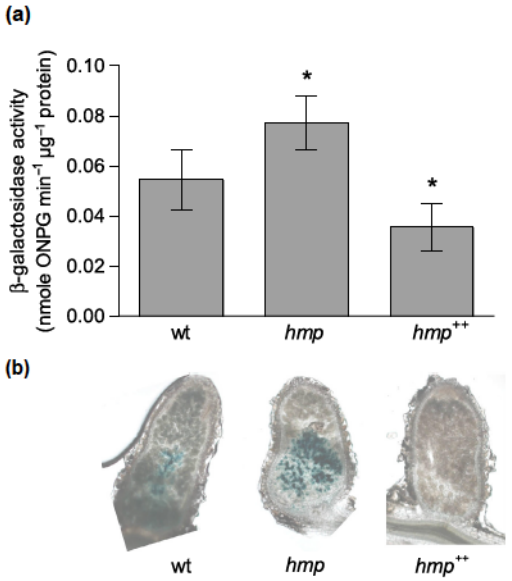


Fig. 3 Nitric oxide (NO) detection in *Medicago truncatula* nodules using NO-biosensor *Sinorhizobium meliloti* strains. *Medicago truncatula* roots were inoculated with the wild-type (wt), *hmp* or *hmp*$^{++}$ strains harbouring the *sma1289-lacZ* fusion. (a) Nodules were collected at 2 wk post-inoculation (wpi) and β-galactosidase activity was measured. Three independent experiments assayed in duplicate were performed; the mean is shown on the graph ± SD. Asterisks indicate significant differences ($P < 0.05$) when compared with the control (wt) according to Student's *t*-test. ONPG, orthonitrophenyl-beta-D-galactopyranoside. (b) Sections (80–100 µm) of nodules collected at 3 wpi were stained for β-galactosidase activity. Observations were made with an optical microscope (10×); *c.* 20 nodules from five different plants were observed. Representative images are shown in the figure.

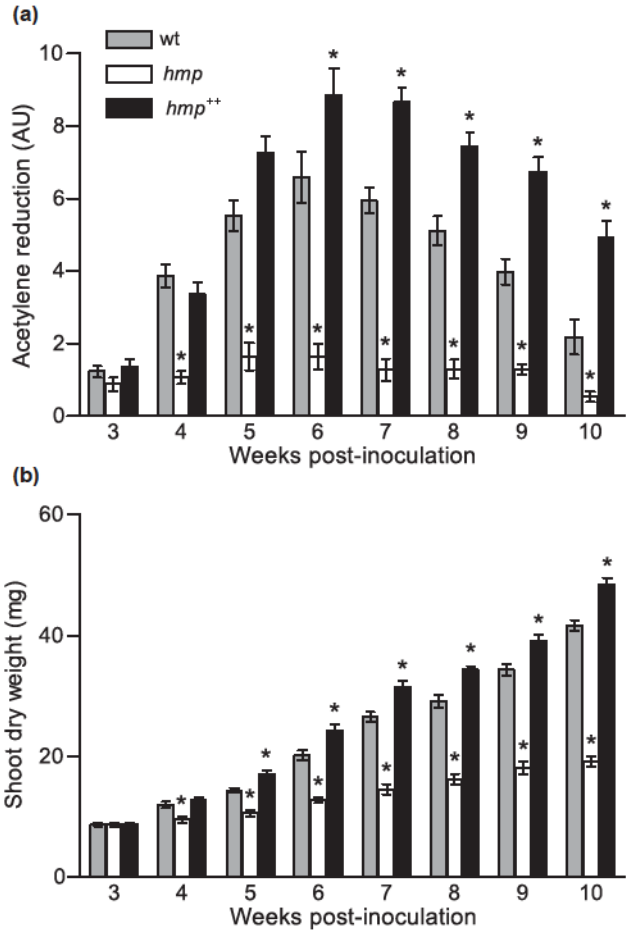


Fig. 4 Nitrogenase activity and shoot dry weight of *Medicago truncatula* plants inoculated with *hmp* mutants. *Medicago truncatula* plantlets were inoculated with *Sinorhizobium meliloti* wild-type (wt) (grey bars), *hmp* (white bars) or *hmp*$^{++}$ (black bars) strains. From 3 wk post-inoculation (wpi), plants were tested every week for nitrogen fixation efficiency using an acetylene reduction assay (a) and dry weight of the aerial part of the plant (b). The whole experiment was repeated twice. For each strain and time point, 15–20 plants were tested for the acetylene reduction assay and 16–37 plants for the shoot dry weight measurements. The mean ± standard error (SEM) is shown on the graphs. Asterisks indicate significant differences ($P < 0.05$) when compared with the control (wt) according to Student's *t*-test. AU, arbitrary units.

These effects on nitrogenase activity correlated with the shoot dry weight of the plants (Fig. 4b). Indeed, plants inoculated with the *hmp*$^{++}$ strain displayed a slight, but significant, increase in their shoot dry weight, whereas those inoculated with the *hmp* mutant had a lower average dry weight than those inoculated with the wt strain.

Taken together, these results suggest that NO accumulation in mature nodules may cause a limitation in nitrogen fixation efficiency, and hence influence plant fitness; by contrast, degradation of the NO present in nodules could benefit the plant by improving nitrogen fixation and leading to an overall expansion of the nitrogen fixation period.

Nodule senescence correlates with the endogenous NO level

Whilst following the kinetics of nitrogen fixation, the phenotype of nodules elicited by *hmp* bacteria caught our attention. Indeed, between 3 and 4 wpi, some *hmp* nodules displayed a senescence phenotype. Nodule senescence is visible macroscopically by a colour shift in the nitrogen-fixing zone from pink to green (associated with the degradation of the plant leghaemoglobin). In order to estimate the evolution of the senescence phenotype, we monitored the colour changes of nodules over a 10-wk period on plants inoculated with the wt, *hmp* or *hmp*$^{++}$ strains. The results are reported in Fig. 5. The first signs of senescence appeared at *c.* 4–5 wpi with the wt strain and *c.* 80% of the nodules were senescent by 9 wpi. They appeared much earlier on *hmp* nodules, 40% being considered to be senescent as early as 4–5 wpi. Interestingly, the first senescent *hmp*$^{++}$ nodules appeared only at 6 wpi, and barely 35% were senescent at 9 wpi. These data were confirmed by microscopic analyses of nodule sections stained with toluidine blue (Supporting information Fig. S1). Senescent purple cells appeared at 3 wpi (not shown) and were easily visible at 4 wpi in nodules containing the *hmp* mutant; they occupied the major part of the nodules at 5 wpi. In this large purple zone, we reproducibly noted what could have been an incipient zone V (Timmers *et al.*, 2000) with completely senescent cells (purple) and remnant infection threads. The first cytological signs of senescence were detected at only 7–8 wpi in *hmp*$^{++}$ nodules, indicating that the degradation of NO in mature nodules

© 2012 The Authors
New Phytologist © 2012 New Phytologist Trust

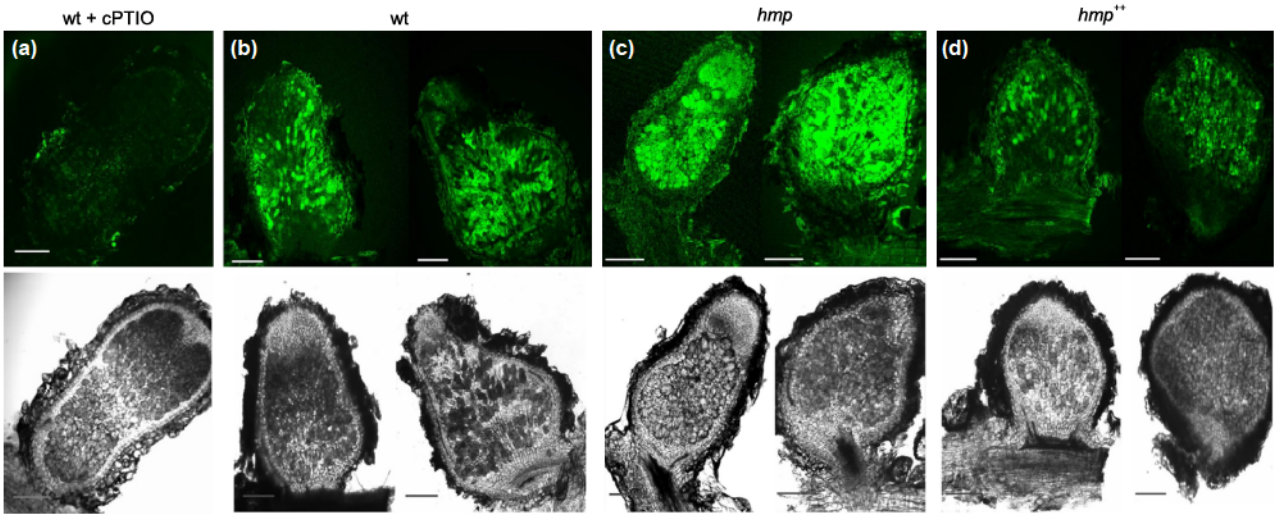


Fig. 1 Nitric oxide (NO) detection in *Medicago truncatula* root nodules by confocal microscopy. Nodule sections (80–100 μm) were obtained at 3 wk post-inoculation (wpi) with the indicated strains. Light and fluorescence micrographs of 4,5-diaminofluorescein-2-diacetate (DAF-2DA)-treated nodule sections are shown in the bottom and top parts of the figure, respectively. The nodule slices in (a) were pretreated with 1 mM of the NO scavenger 2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethyl imidazoline-1-oxyl-3-oxide (cPTIO) for 15 min before treatment with the DAF-2DA probe. The photographs shown are representative of *c.* 20 nodules from five different plants observed for each strain. Bars, 250 μm.

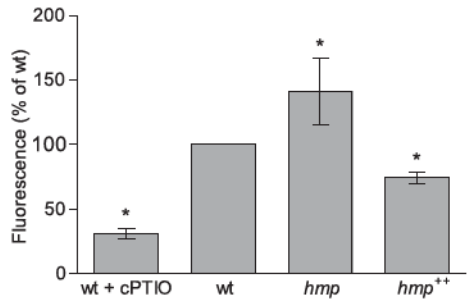


Fig. 2 Nitric oxide (NO) production by *Medicago truncatula* nodules. *Medicago truncatula* plants were inoculated with *Sinorhizobium meliloti* wild-type (wt), *hmp* or *hmp*$^{++}$ strains. At 3 wk post-inoculation (wpi), NO production on entire nodules was measured using the nonpermeable fluorescent probe diaminofluorescein-2 (DAF-2). In a control experiment, 1 mM 2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethyl imidazoline-1-oxyl-3-oxide (cPTIO) was added 30 min before addition of the probe. Fluorescence was expressed as a percentage of the fluorescence value obtained with wt nodules from the same experiment. Data are means ± SD of three (wt + cPTIO) or four (wt, *hmp*, *hmp*$^{++}$) independent experiments (assayed in duplicate). Raw data were analysed by ANOVA followed by a Tukey multiple comparison test. Asterisks indicate significant differences ($P < 0.05$) when compared with the wt.

nodules, whereas a 42% NO increase was detected in *hmp* nodules. NO levels measured in wt nodules were comparable at 2 and 4 wpi.

To rule out the possibility of NO-nonspecific fluorescence, we initiated a second approach based on the use of a reporter plasmid carrying a transcriptional *lacZ* fusion to the promoter of *sma1289*, an *S. meliloti* gene specifically induced by NO (de Bruijn *et al.*, 2006; Meilhoc *et al.*, 2010; del Giudice *et al.*, 2011). Bacteria (wt, *hmp*, *hmp*$^{++}$) carrying the reporter fusion were used to inoculate *M. truncatula* plantlets. At 2 wpi, nodules were collected, crushed and the expression of the reporter fusion was assessed by measurement of β-galactosidase activity (Fig. 3a). The enzyme activity was increased by 33% when the *hmp* mutant was used to inoculate the plants, when compared with the wt, whereas a 35% reduction was observed in nodules containing the *hmp*$^{++}$ strain. The expression of the fusion was also assessed at 3 wpi on nodule sections by X-gal staining and microscopic analysis (Fig. 3b). Some blue-stained bacteria were detected in the centre of zone III (fixation zone) of wt nodules. No staining was detected in the *hmp*$^{++}$ nodules, whereas dark-blue staining was obtained in *hmp* nodules.

Together, these results confirm that NO is present in mature nodules and that bacteria respond to NO. They also demonstrate that NO accumulates in the absence of *hmp*, whereas over-expression of the bacterial flavohaemoglobin gene allows a drastic decrease in nodule NO levels.

The NO level inside the nodules influences nitrogenase activity and plant shoot dry weight

We have shown previously that *hmp* may play a role in symbiosis, as an *hmp* mutant, when inoculated into plants, leads to a lower nitrogen fixation efficiency when compared with the wt strain (Meilhoc *et al.*, 2010). In an attempt to correlate NO levels in mature nodules and symbiosis efficiency, we monitored the nitrogen fixation activity using the acetylene reduction assay, and measured the dry weight of plant shoots. Figure 4(a) shows the nitrogenase activity measured over 10 wk from plants inoculated with wt, *hmp* or *hmp*$^{++}$ strains. For plants inoculated with the wt strain, the nitrogenase activity increased until a peak was reached at *c.* 6 wpi; it then declined gradually until 10 wk. Although the nitrogenase activity also declined with age in *hmp*$^{++}$ nodules, it was significantly higher (2.3-fold at 10 wpi) than that of control nodules of the same age. Interestingly, at 9 wpi, the nitrogenase activity was still as high as at 6 wpi with wt bacteria. The nitrogen fixation efficiency of *hmp*-inoculated plants remained very low.

© 2012 The Authors
New Phytologist © 2012 New Phytologist Trust

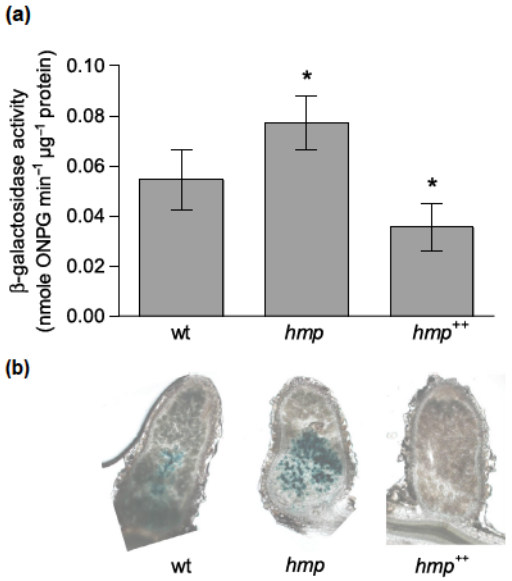


Fig. 3 Nitric oxide (NO) detection in *Medicago truncatula* nodules using NO-biosensor *Sinorhizobium meliloti* strains. *Medicago truncatula* roots were inoculated with the wild-type (wt), *hmp* or *hmp*$^{++}$ strains harbouring the *sma1289-lacZ* fusion. (a) Nodules were collected at 2 wk post-inoculation (wpi) and β-galactosidase activity was measured. Three independent experiments assayed in duplicate were performed; the mean is shown on the graph ± SD. Asterisks indicate significant differences ($P < 0.05$) when compared with the control (wt) according to Student's *t*-test. ONPG, orthonitrophenyl-beta-D-galactopyranoside. (b) Sections (80–100 µm) of nodules collected at 3 wpi were stained for β-galactosidase activity. Observations were made with an optical microscope (10×); *c.* 20 nodules from five different plants were observed. Representative images are shown in the figure.

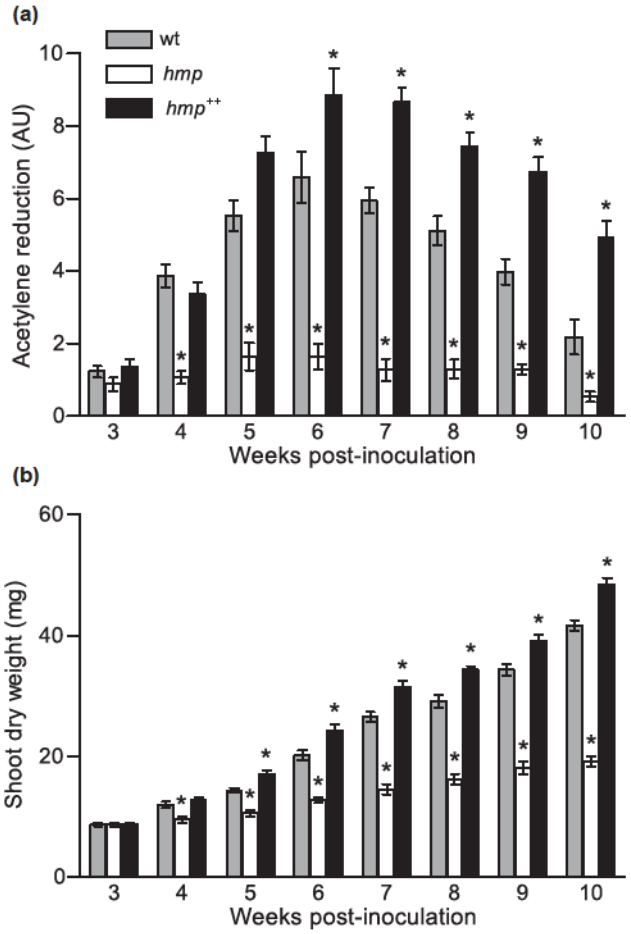


Fig. 4 Nitrogenase activity and shoot dry weight of *Medicago truncatula* plants inoculated with *hmp* mutants. *Medicago truncatula* plantlets were inoculated with *Sinorhizobium meliloti* wild-type (wt) (grey bars), *hmp* (white bars) or *hmp*$^{++}$ (black bars) strains. From 3 wk post-inoculation (wpi), plants were tested every week for nitrogen fixation efficiency using an acetylene reduction assay (a) and dry weight of the aerial part of the plant (b). The whole experiment was repeated twice. For each strain and time point, 15–20 plants were tested for the acetylene reduction assay and 16–37 plants for the shoot dry weight measurements. The mean ± standard error (SEM) is shown on the graphs. Asterisks indicate significant differences ($P < 0.05$) when compared with the control (wt) according to Student's *t*-test. AU, arbitrary units.

These effects on nitrogenase activity correlated with the shoot dry weight of the plants (Fig. 4b). Indeed, plants inoculated with the *hmp*$^{++}$ strain displayed a slight, but significant, increase in their shoot dry weight, whereas those inoculated with the *hmp* mutant had a lower average dry weight than those inoculated with the wt strain.

Taken together, these results suggest that NO accumulation in mature nodules may cause a limitation in nitrogen fixation efficiency, and hence influence plant fitness; by contrast, degradation of the NO present in nodules could benefit the plant by improving nitrogen fixation and leading to an overall expansion of the nitrogen fixation period.

Nodule senescence correlates with the endogenous NO level

Whilst following the kinetics of nitrogen fixation, the phenotype of nodules elicited by *hmp* bacteria caught our attention. Indeed, between 3 and 4 wpi, some *hmp* nodules displayed a senescence phenotype. Nodule senescence is visible macroscopically by a colour shift in the nitrogen-fixing zone from pink to green (associated with the degradation of the plant leghaemoglobin). In order to estimate the evolution of the senescence phenotype, we monitored the colour changes of nodules over a 10-wk period on plants inoculated with the wt, *hmp* or *hmp*$^{++}$ strains. The results are reported in Fig. 5. The first signs of senescence appeared at *c.* 4–5 wpi with the wt strain and *c.* 80% of the nodules were senescent by 9 wpi. They appeared much earlier on *hmp* nodules, 40% being considered to be senescent as early as 4–5 wpi. Interestingly, the first senescent *hmp*$^{++}$ nodules appeared only at 6 wpi, and barely 35% were senescent at 9 wpi. These data were confirmed by microscopic analyses of nodule sections stained with toluidine blue (Supporting information Fig. S1). Senescent purple cells appeared at 3 wpi (not shown) and were easily visible at 4 wpi in nodules containing the *hmp* mutant; they occupied the major part of the nodules at 5 wpi. In this large purple zone, we reproducibly noted what could have been an incipient zone V (Timmers *et al.*, 2000) with completely senescent cells (purple) and remnant infection threads. The first cytological signs of senescence were detected at only 7–8 wpi in *hmp*$^{++}$ nodules, indicating that the degradation of NO in mature nodules

© 2012 The Authors
New Phytologist © 2012 New Phytologist Trust

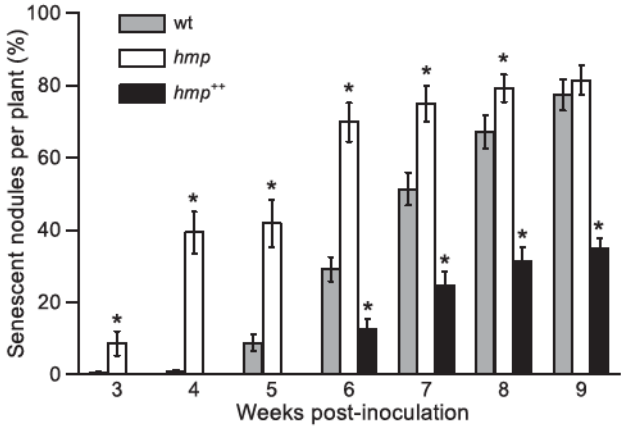


Fig. 5 Nodule senescence kinetics of *Medicago truncatula* infected with *hmp* mutants. *Medicago truncatula* plantlets were inoculated with *Sinorhizobium meliloti* wild-type (wt) (grey bars), *hmp* (white bars) or *hmp*$^{++}$ (black bars) strains. Three weeks post-inoculation (wpi) and for each following week, total and senescent nodules were counted for each plant. The experiment was repeated twice. The total number of plants assayed was 28 for *hmp*, 29 for *hmp*$^{++}$ and 32 for the wt strain. The percentage of senescent nodules was calculated for each plant. The mean ± standard error (SEM) is shown on the graph. The kinetics of nodule appearance were similar for the different strains, at least during the first 7 wpi; at 8 and 9 wpi, the total number of nodules per plant was slightly higher for *hmp*-inoculated plants.

contributes to delay the initiation of developmental nodule senescence.

As a whole, these results show that premature nodule senescence accompanies an increase in endogenous NO level, whereas the process is delayed by removing NO inside the nodule.

Subcellular events associated with nodule senescence correlate with the endogenous NO level

In order to better characterize the senescence process of nodules induced by the *S. meliloti hmp* strain, we used the promoter of the Mt*CP6* cysteine protease gene (TC100437), which is highly and specifically expressed during developmental and dark-induced nodule senescence in *M. truncatula* (Van de Velde *et al.*, 2006; Perez Guerra *et al.*, 2010). The spatio-temporal expression pattern of a PMt *CP6*:GUS reporter fusion was determined in young and mature transgenic nodules after inoculation with wt or *hmp* *S. meliloti* strains (Fig. 6). No GUS staining was found in young wt nodules (3 wpi), whereas, at 5–6 wpi, GUS staining was mostly restricted to the proximal part of the nodule, which could correspond to a nascent senescing zone. However, plants inoculated with the *hmp* strain displayed a strong GUS staining as early as 3 wpi (Fig. 6). These results clearly indicate that the *S. meliloti* *hmp* mutant induces an increase in Mt*CP6* gene expression in nodules, which correlates with the early senescence phenotype.

To investigate the viability of *hmp* bacteroids throughout the symbiotic interaction, we incubated nodule sections with the Live/Dead®BacLightTM probe (Invitrogen). This probe is a mixture of two fluorescent DNA intercalating agents, SYTO9 and PI. Living cells with an intact membrane are stained green by SYTO9, whereas dying cells with damaged membranes are stained red by PI (Virta

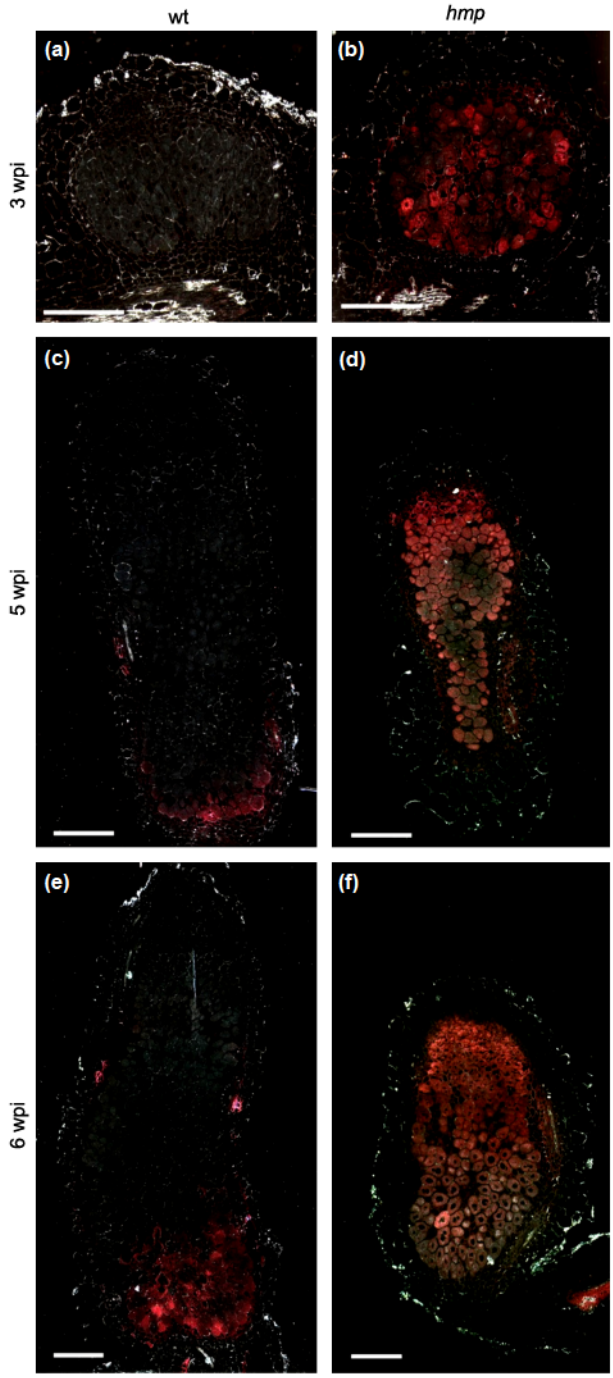


Fig. 6 Expression of the early senescence marker fusion PMt*CP6*:GUS in nodules. *Medicago truncatula* plantlets were inoculated with either the wild-type (wt) or the *hmp Sinorhizobium meliloti* strain; 3, 5 and 6 wk post-inoculation (wpi) nodule sections were fixed, embedded in Technovit and stained for β-glucuronidase (GUS) activity. Representative dark field images are shown in the figure. Bars, 250 μm.

et al., 1998; Haag *et al.*, 2011). Analysis of wt and *hmp* nodules showed green bacteria inside infection threads (Fig. 7). wt bacteroids fluoresced green during the entire nodule development (3–7 wpi) (Fig. 7a–d), whereas an early PI red staining of bacteroids was observed with the *hmp* strain (Fig. 7e–h), suggesting their rapid death. Remarkably, a large number of infection threads

© 2012 The Authors
New Phytologist © 2012 New Phytologist Trust

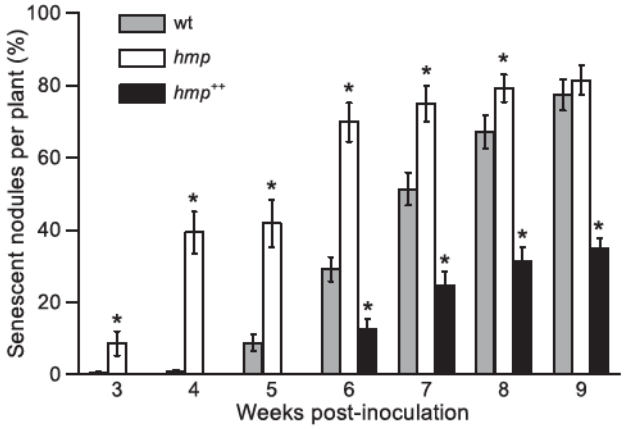


Fig. 5 Nodule senescence kinetics of *Medicago truncatula* infected with *hmp* mutants. *Medicago truncatula* plantlets were inoculated with *Sinorhizobium meliloti* wild-type (wt) (grey bars), *hmp* (white bars) or *hmp*$^{++}$ (black bars) strains. Three weeks post-inoculation (wpi) and for each following week, total and senescent nodules were counted for each plant. The experiment was repeated twice. The total number of plants assayed was 28 for *hmp*, 29 for *hmp*$^{++}$ and 32 for the wt strain. The percentage of senescent nodules was calculated for each plant. The mean ± standard error (SEM) is shown on the graph. The kinetics of nodule appearance were similar for the different strains, at least during the first 7 wpi; at 8 and 9 wpi, the total number of nodules per plant was slightly higher for *hmp*-inoculated plants.

contributes to delay the initiation of developmental nodule senescence.

As a whole, these results show that premature nodule senescence accompanies an increase in endogenous NO level, whereas the process is delayed by removing NO inside the nodule.

Subcellular events associated with nodule senescence correlate with the endogenous NO level

In order to better characterize the senescence process of nodules induced by the *S. meliloti hmp* strain, we used the promoter of the Mt*CP6* cysteine protease gene (TC100437), which is highly and specifically expressed during developmental and dark-induced nodule senescence in *M. truncatula* (Van de Velde *et al.*, 2006; Perez Guerra *et al.*, 2010). The spatio-temporal expression pattern of a PMt *CP6*:GUS reporter fusion was determined in young and mature transgenic nodules after inoculation with wt or *hmp* *S. meliloti* strains (Fig. 6). No GUS staining was found in young wt nodules (3 wpi), whereas, at 5–6 wpi, GUS staining was mostly restricted to the proximal part of the nodule, which could correspond to a nascent senescing zone. However, plants inoculated with the *hmp* strain displayed a strong GUS staining as early as 3 wpi (Fig. 6). These results clearly indicate that the *S. meliloti* *hmp* mutant induces an increase in Mt*CP6* gene expression in nodules, which correlates with the early senescence phenotype.

To investigate the viability of *hmp* bacteroids throughout the symbiotic interaction, we incubated nodule sections with the Live/Dead®BacLightTM probe (Invitrogen). This probe is a mixture of two fluorescent DNA intercalating agents, SYTO9 and PI. Living cells with an intact membrane are stained green by SYTO9, whereas dying cells with damaged membranes are stained red by PI (Virta

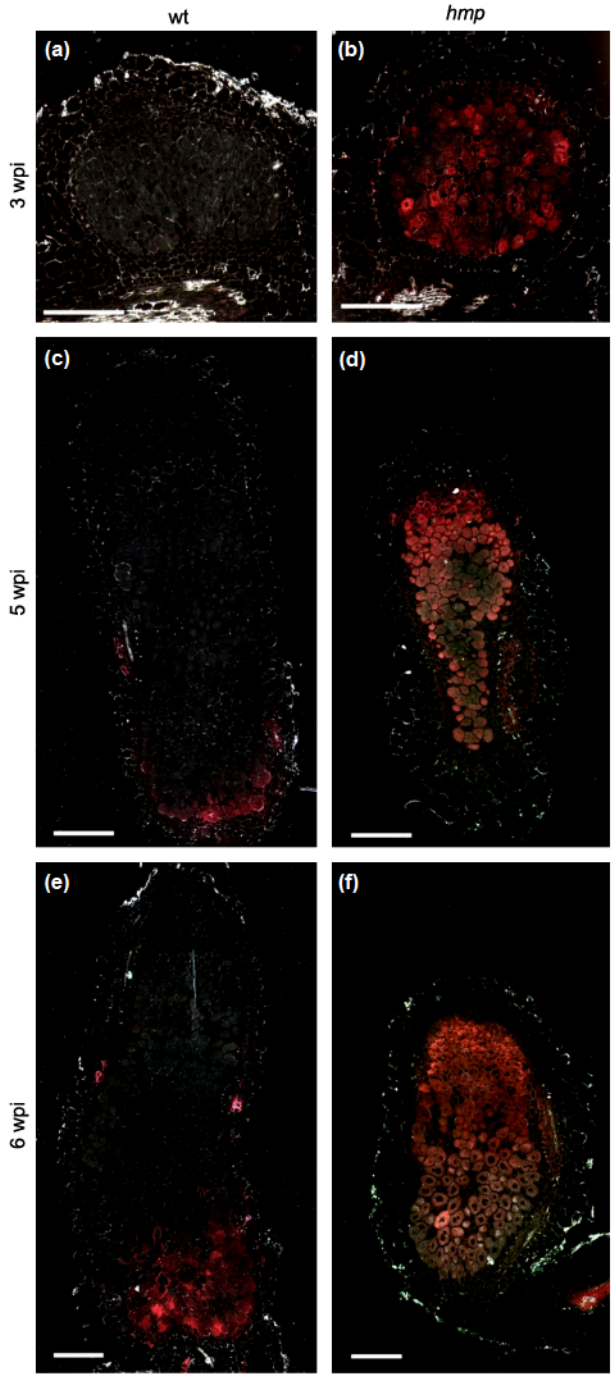


Fig. 6 Expression of the early senescence marker fusion PMt*CP6*:GUS in nodules. *Medicago truncatula* plantlets were inoculated with either the wild-type (wt) or the *hmp Sinorhizobium meliloti* strain; 3, 5 and 6 wk post-inoculation (wpi) nodule sections were fixed, embedded in Technovit and stained for β-glucuronidase (GUS) activity. Representative dark field images are shown in the figure. Bars, 250 μm.

et al., 1998; Haag *et al.*, 2011). Analysis of wt and *hmp* nodules showed green bacteria inside infection threads (Fig. 7). wt bacteroids fluoresced green during the entire nodule development (3–7 wpi) (Fig. 7a–d), whereas an early PI red staining of bacteroids was observed with the *hmp* strain (Fig. 7e–h), suggesting their rapid death. Remarkably, a large number of infection threads

© 2012 The Authors
New Phytologist © 2012 New Phytologist Trust

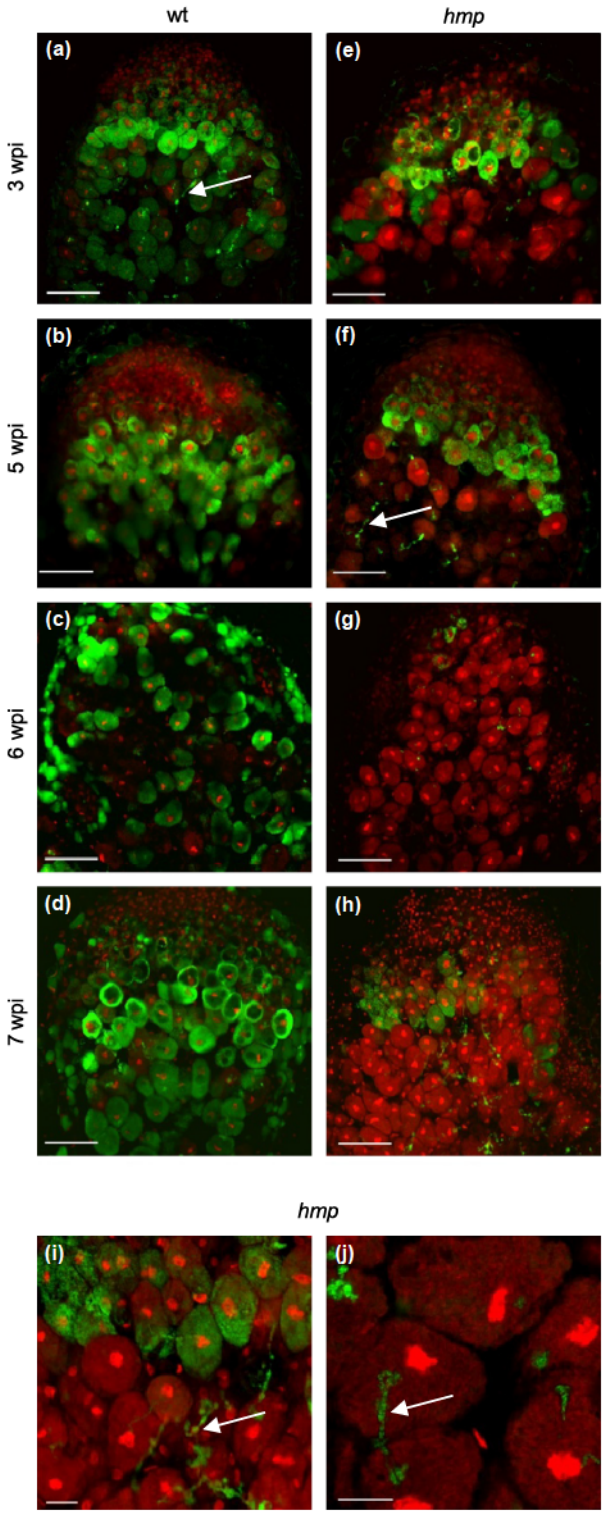


Fig. 7 *hmp* bacteroids undergo rapid death in symbiosomes. *Medicago truncatula* plantlets were inoculated with either the wild-type (wt) or *hmp Sinorhizobium meliloti* strain; 3–7 wk post-inoculation (wpi), nodule sections were stained with a mixture of SYTO9 and propidium iodide (PI) dyes to test the viability of bacteroids. Viable bacteria and bacteroids are stained in green by SYTO9 and dying cells in red with PI. Representative images obtained by confocal microscopy are shown in the figure. Bars, 100 μm. Images (i) and (j) are enlargements of (h) and feature dying *hmp* bacteroids in infected cells with infection threads stained in green. Bars, 20 μm. White arrows indicate infection threads.

stained green were detected in the proximal part of the nodule, suggesting a possible release of new viable bacteria in infected cells (Fig. 7h–j).

Together, these results show that an increase in the NO level in nodules correlates with subcellular events associated with nodule senescence.

Induction of nodule senescence following exogenous NO addition

In order to confirm the role of NO in triggering nodule senescence, we undertook a series of experiments in which the roots of nodulated plants were treated with 0.25 or 1 mM of an NO donor (DEA-NONOate, 100 μl). In both cases, nitrogenase activity, measured 24 h after treatment, was not affected (Table S1). The percentage of senescent nodules was evaluated 3 d later (Table 2). Because DEA-NONOate also releases DEA, which may be toxic, a set of control plants was treated with DEA (1 mM). We observed that the lowest concentration of DEA-NONOate was able to cause nodule senescence (21% senescent nodules) and the effect was even more drastic with 1 mM of NO donor. The percentage of senescent nodules remained very low when DEA alone was used. Interestingly, there was a decrease in senescence (down to 10.7%) in *hmp*$^{++}$ nodules. As Hmp is known to degrade NO, we conclude that NO is responsible for the triggering of senescence. These results confirmed that exogenous NO is capable of causing nodule senescence.

NO could be an intermediate in dark stress-induced senescence

It is known that continuous dark treatment interferes with nodule function and leads to full nodule senescence (Matamoros *et al.*, 1999; Perez Guerra *et al.*, 2010). In order to determine whether NO could play a role in dark stress-induced senescence, the following experiment was performed: 4 wk after inoculation with either wt or *hmp*$^{++}$ strains, plants were either kept as controls and treated under the regular regime (16 h light/8 h dark) or placed for 3 d in continuous dark. The percentage of senescent nodules per plant was then evaluated 1 wk later (Table 3). In control roots, 6% of the nodules were senescent, whereas no senescent nodules were visible with the *hmp*$^{++}$ strain. After dark treatment, 65% of the wt nodules were senescent, in contrast with only 35% of the *hmp*$^{++}$ nodules. These results suggest that dark-induced senescence is reduced by removing NO from the nodules, therefore indicating that NO could be an intermediate in this process.

Local and systemic responses to NO in *M. truncatula* root nodules

To determine whether NO acts as a systemic signal to provoke nodule senescence, we initiated split root experiments. Plants were grown individually in pouches and lateral roots were equally split into two separate compartments, allowing us to examine the effect

© 2012 The Authors
New Phytologist © 2012 New Phytologist Trust

Table 2 Effect of root treatment with diethylamine NONOate (DEA-NONOate) on *Medicago truncatula* nodule senescence

		Senescent nodules per plant (%)*	
		wt	*hmp*$^{++}$
DEA (control)	1 mM	6.5 (± 1.0)	6.5 (± 2.3)
DEA-NONOate	0.25 mM	21.4 (± 2.3)	ND
	1 mM	44.6 (± 2.5)	10.7 (± 2.1)

*25–76 plants were analysed. ND, not determined.

Table 3 Effect of nitric oxide (NO) on dark stress-induced *Medicago truncatula* nodule senescence

	Senescent nodules per plant (%)*	
	wt	*hmp*$^{++}$
Control	6.0 (± 1.9)	< 0.5
Dark stress	65.5 (± 3.3)	34.9 (± 3.4)

*24–30 plants were analysed. Values in brackets are standard errors of the mean (SEM).

of the inoculation of one root system on the second root system (Fig. 8). Here, the NO level was increased in one of the plant roots either endogenously by inoculating the root with the *hmp* strain, or exogenously by adding an NO donor (DEA-NONOate, 1 mM) on wt nodules (4 wpi). In all cases, the second plant root was infected with the wt strain, without any NO treatment. The percentage of senescent nodules was evaluated for each root at 4 wpi or 3 d after DEA-NONOate treatment. In a few plants used as controls, both roots were inoculated with the same strain, either wt or *hmp*. The percentage of senescent nodules was very low with the wt strain. About 95% of the nodules were senescent with the *hmp* control, which is higher than that observed previously (Fig. 5), and is probably a result of the peculiar culture system used in split root experiments. When plants were inoculated with either wt/*hmp*, or wt ± DEA-NONOate, significant nodule senescence was only seen on the root inoculated with the *hmp* strain (in the former case) or in wt nodules treated with the NO donor (in the latter case). Together, these results show that an increase in NO level in nodules present on one half of the plant root system does not lead to nodule senescence on the other half of the root, thus suggesting that NO is not a systemic signal.

To test whether NO could be a signal acting locally, we performed co-inoculation experiments using wt and *hmp* strains (1 : 1 ratio). Both strains have the same competitiveness (49.7 ± 1.0% and 50.3 ± 1.0% for the wt and *hmp* strains, respectively); thus, each occupies half of the root nodules. From the results described above, we would anticipate that, at 4 wpi, if there is no influence of one nodule on another, most of the nodules occupied by the *hmp* strain would be senescent, whereas most of the wt nodules would be nonsenescent. Interestingly, up to 35.5% of the nodules elicited by the wt strain were senescent when the plants were co-inoculated with both strains, when compared with 7.5% when only the wt strain was used as inoculum (Fig. 9). In addition,

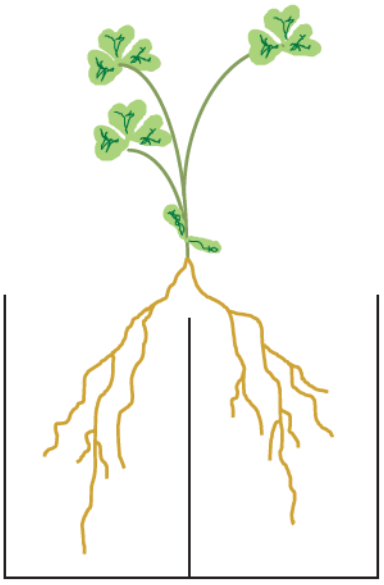


Fig. 8 Nitric oxide (NO) is not a systemic senescence signal. *Medicago truncatula* plantlets were cultured in pouches in a split root system. As indicated in the figure, both sides of the root were inoculated with either the same strain (wild-type (wt) or *hmp*) or with different strains, one on each root. In the last series, both roots were inoculated with the wt, and the NO donor diethylamine NONOate (DEA-NONOate) (1 mM) (100 µl) was added at 4 wk post-inoculation (wpi) on one of the roots. The percentage of senescent nodules was evaluated for each root at 4 wpi, or 3 d after DEA-NONOate treatment. The means ± SEM are shown. *n*, number of plants tested.

a series of plants were co-inoculated with the *hmp* and *hmp*$^{++}$ strains; in this case, 10.4 ± 3.9% of the *hmp*$^{++}$ elicited nodules were senescent, which suggests that NO may act locally, as an increase in NO level in one nodule led to senescence of the neighbouring nodules. During the course of these experiments, we observed that the effect was even more visible when nodules were close to each other.

Discussion

Although many studies have provided evidence of the presence of NO at different stages of the legume–rhizobium symbiosis, little is known about the role(s) played by NO in mature nodules. Our results clearly show that NO causes premature senescence of *S. meliloti–M. truncatula* nodules. Two strategies were used. The first involved an increase in the NO level inside the nodule

© 2012 The Authors
New Phytologist © 2012 New Phytologist Trust

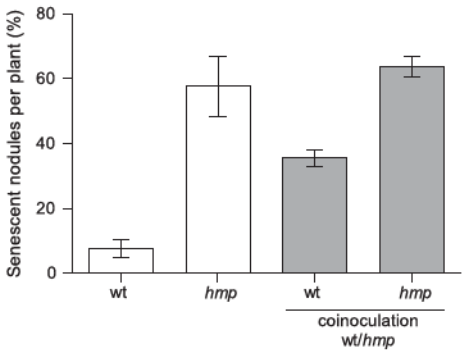


Fig. 9 Local effect of nitric oxide (NO) on *Medicago truncatula* nodule senescence. *Medicago truncatula* plantlets were inoculated with the wild-type (wt), *hmp* or a mixture (1 : 1 ratio) of both strains. At 4 wk post-inoculation (wpi), nodules were collected and separated into two groups: senescent or not senescent. The wt strain contains a plasmid expressing constitutively the β-galactosidase-encoding gene; hence, the proportion of nodules occupied by the wt or *hmp* strain was determined after X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galacto-pyranoside) staining of the nodules. The percentage of wt (or *hmp*) senescent nodules represents the ratio (×100) of senescent nodules containing the wt (or *hmp*) strain over the total number of nodules containing this strain. The experiment was repeated four times. The total numbers of nodules analysed were as follows: wt alone, $n = 315$; *hmp* alone, $n = 289$; co-inoculation wt/*hmp*, $n = 1065$. The mean ± SEM is shown.

using a *S. meliloti* strain carrying a mutation in the gene encoding the flavohaemoglobin (Hmp) involved in NO degradation (Meilhoc *et al.*, 2010). The second strategy was based on the addition of exogenous NO to the root nodules. Both strategies led to an early initiation of nodule senescence, characterized by the presence of a premature large green zone as a result of leghaemoglobin degradation, a reduction in nitrogen fixation and final shoot dry weight, and cytological modifications of the nodule structure, typical of the senescence process. Finally, subcellular events, such as the expression of a specific senescence marker (a cysteine protease), and premature death of the *hmp* bacteroids were also observed.

Thus, our results show that an increase in NO level causes nodule senescence. However, does an increase in NO precede the developmentally programmed nodule senescence? The quantification of NO in nodules at different times (2 and 4 wk) after inoculation did not provide an answer to this question as we failed to detect variations in NO level with nodule age. However, using an *S. meliloti* NO-sensor strain, we detected an increase in NO level in only a few cells in the centre of the nodule (Fig. 3b). Interestingly, Perez Guerra *et al.* (2010) showed that the earliest signs of senescence appear in a few infected cells in the centre of the fixation zone. The senescence zone then extends progressively towards the nodule periphery in subsequent proximal layers with a conical front (Perez Guerra *et al.*, 2010). Considering this pattern, we hypothesize that NO accumulates in only a few cells before their entrance into the senescence process. This could explain why no variation was observed at the whole nodule scale. Furthermore, co-inoculation experiments with either wt/*hmp* or *hmp*/*hmp*$^{++}$ *S. meliloti* strains showed that, on the same plant root, elevation of the NO level in one nodule (*hmp*) can cause senescence in wt nodules, but has no effect on *hmp*$^{++}$ nodules. These observations support the hypothesis that NO (probably at low concentration) is able to act as a local senescence signal, either directly or via the plant root. A third argument in favour of NO being a senescence signal is that over-expression of Hmp in wt nodules leads to a significant delay in nodule senescence. In agreement with our results, Navascues *et al.* (2012) have demonstrated that green leghaemoglobin of soybean is produced by the nitration of haem. Hence, these results provide evidence that reactive nitrogen species are produced, especially during aging of legume nodules. These data indicate that NO may also be an important player in the senescence process of determinate nodules, characteristic of soybean.

Finally, we have shown that dark-induced nodule senescence is partly relieved by decreasing the NO level using a strain over-expressing *hmp*, indicating that NO may also be a signal in stress-induced nodule senescence.

Together, these results provide evidence that NO may be a signal in developmental as well as stress-induced nodule senescence. Interestingly, split root experiments allowed us to rule out the possibility that NO could be a systemic senescence signal.

The source(s) of NO in nodules, together with the signal(s) triggering its synthesis, remains to be identified. However, recent reports have revealed the implication of nitrate reductase in NO synthesis (Sanchez *et al.*, 2010; Horchani *et al.*, 2011). Three putative nitrate reductase-encoding genes are present in the genome of *M. truncatula* (Young *et al.*, 2011), but the involvement of each in NO synthesis during nodule senescence is unknown.

How can NO provoke nodule senescence? NO regulates a number of physiological processes by affecting gene transcription (Ferrarini *et al.*, 2008; Moreau *et al.*, 2011), and we can hypothesize that NO regulates the expression of genes involved in the senescence programme. Contrary to the first steps of the legume–rhizobium interaction (i.e. recognition and signalling), which have been well studied, the factors that coordinate root nodule senescence have received little attention. A transcriptional analysis revealed that > 500 genes are regulated in senescent nodules of *M. truncatula* (Van de Velde *et al.*, 2006). More recently, genetic experiments have allowed the identification of two new players in *M. truncatula* nodule senescence: a transcription factor (MtNAC 969), which may negatively regulate nodule senescence, and a *STAY-GREEN* gene (Mt*SGR*), whose expression is higher in the senescence zone and even higher in nitrate-induced senescence (de Zelicourt *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2011). Nevertheless, the functional characterization of the genes acting in nodule senescence is very limited, and it remains to be determined whether these genes are also induced in the presence of NO. Such a study has been performed with *M. truncatula* to determine whether genes induced in senescent leaves are also induced in leaves treated with NO donors (De Michele *et al.*, 2009a). Surprisingly, < 10% of the genes were found in common. Nevertheless, the high proportion of regulatory genes expressed in both NO-treated and senescent leaves suggests a conserved mechanism between NO signalling and senescence.

NO may also act through the activation of guanylate cyclases (GCs), which produce the second messenger cyclic guanosine monophosphate (cGMP). Indeed, it has been postulated that the regulation of soybean nodule development is transmitted via cGMP through the activation of an NO-responsive GC (Keyster

© 2012 The Authors
New Phytologist © 2012 New Phytologist Trust

et al., 2010). To date, no NO-responsive GC has been found in plants and NO signalling appears to be manifested through post-translational protein modification by either *S*-nitrosylation of cysteine residues or tyrosine nitration. Indeed, in rice, two NO targets identified in an NO accumulation mutant are known to be implicated in *S*-nitrosylation-regulated cell death in animals (i.e. thioredoxin and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)) (Lin *et al.*, 2012). In addition, in *Arabidopsis*, *S*-nitrosylation of NADPH oxidase has been shown to regulate cell death in plant immunity (Yun *et al.*, 2011). In legumes, the only enzyme which has been proven to be a molecular target of NO in root nodules is the glutamine synthetase (GS), involved in the assimilation of ammonium released by nitrogen fixation. Indeed, GS is post-translationally regulated by tyrosine nitration in response to NO, specifically in nodules of *M. truncatula* (Melo *et al.*, 2011). Hence, an increase in NO level could lead to GS inhibition and a subsequent decrease in ammonium assimilation by the plant, leading to nodule senescence. Bacterial proteins may also be targets of NO. Thus, nitrogenase from soybean or lotus root nodules has been shown to be inhibited by NO (Trinchant & Rigaud, 1982; Shimoda *et al.*, 2009; Kato *et al.*, 2010). Furthermore, NO may have other bacterial targets, such as several enzymes of the tricarboxylic acid cycle. This was revealed in bacteria, such as *Mycobacterium tuberculosis* or *Salmonella* (Richardson *et al.*, 2011; Venugopal *et al.*, 2011). Finally, NO may also target and inhibit bacterial respiration (Stevanin *et al.*, 2000). The exploration and analysis of *S*-nitrosylated plant and bacterial proteins from nodules containing *hmp* bacteroids should provide essential information about the molecular targets of NO, and will help us to better define the role of NO in nodule senescence.

It is known that plant leghaemoglobin and nonsymbiotic haemoglobins are important players in symbiosis as regulators of NO levels inside nodules (Perazzolli *et al.*, 2006; Bustos-Sanmamed *et al.*, 2010; Sanchez *et al.*, 2010, 2011; Gupta *et al.*, 2011; Meilhoc *et al.*, 2011)). However, our results reveal that a defect in the bacterial haemoglobin can lead to early nodule senescence. Hence, the bacterial response is essential to maintain an efficient symbiosis. This could be for several reasons: the bacterial flavohaemoglobin is more efficient than the plant haemoglobins at degrading NO; in the presence of high levels of NO, the leghaemoglobin may bind NO and, as a consequence, not transport oxygen correctly, which may affect nitrogenase activity; *hmp* is essential to limit NO signalling by preventing NO post-translational modifications; and the flavohaemoglobin is critical to reduce the local NO concentration inside the bacteria. The fact that the developmental programme of senescence displays a first stage characterized by bacteroid degradation, and our results showed only dying bacteroids in the nitrogen fixation zone of the nodules elicited by *S. meliloti* strain *hmp*, speaks in favour of the latter point. However, the question remains as to whether or not the bacterial response is dedicated to the protection of bacteria against NO, or participates in the NO control in plant cells.

The strategy of the over-expression of flavohaemoglobin in order to modulate NO levels in mature nodules makes it possible to extend the nitrogen fixation period by delaying nodule senescence. Delayed nodule senescence and enhanced sustainability under field conditions are among the key aims of legume improvement programmes. The beneficial traits provided by the over-expression of NO-degrading enzymes thus offer the opportunity to contribute to forage improvement.

Acknowledgements

This work was supported, in part, by funds from the Agence Nationale de la Recherche (BLAN 071_184783) and the Laboratoire d'Excellence (LABEX) TULIP (ANR-10-LABX-41). Y.C. was a recipient of a Contrat Jeune Scientifique INRA. E.M. was supported by the National Institute for Applied Sciences (INSA-Toulouse, France). We would like to thank Julie Hopkins for providing technical expertise and assistance in the fixation of nodule material, Laurent Sauviac for technical advice and helpful discussions, and Etienne-Pascal Journet for training us in the split root technique.

References

Baudouin E, Pieuchot L, Engler G, Pauly N, Puppo A. 2006. Nitric oxide is formed in *Medicago truncatula–Sinorhizobium meliloti* functional nodules. *Molecular Plant–Microbe Interactions* **19**: 970–975.

Beligni MV, Lamattina L. 2000. Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants. *Planta* **210**: 215–221.

de Bruijn FJ, Rossbach S, Bruand C, Parrish JR. 2006. A highly conserved *Sinorhizobium meliloti* operon is induced microaerobically via the FixLJ system and by nitric oxide (NO) via NnrR. *Environmental Microbiology* **8**: 1371–1381.

Bustos-Sanmamed P, Tovar-Mendez A, Crespi M, Sato S, Tabata S, Becana M. 2010. Regulation of nonsymbiotic and truncated hemoglobin genes of *Lotus japonicus* in plant organs and in response to nitric oxide and hormones. *New Phytologist* **189**: 765–776.

Carimi F, Zottini M, Costa A, Cattelan I, de Michele R, Terzi M, Lo Schiavo F. 2005. NO signalling in cytokinin-induced programmed cell death. *Plant, Cell & Environment* **28**: 1171–1178.

Das P, Lahiri A, Chakravortty D. 2010. Modulation of the arginase pathway in the context of microbial pathogenesis: a metabolic enzyme moonlighting as an immune modulator. *PLoS Pathogens* **6**: e1000899.

De Michele R, Formentin E, Todesco M, Toppo S, Carimi F, Zottini M, Barizza E, Ferrarini A, Delledonne M, Fontana P *et al.* 2009a. Transcriptome analysis of *Medicago truncatula* leaf senescence: similarities and differences in metabolic and transcriptional regulations as compared with *Arabidopsis*, nodule senescence and nitric oxide signalling. *New Phytologist* **181**: 563–575.

De Michele R, Vurro E, Rigo C, Costa A, Elviri L, Di Valentin M, Careri M, Zottini M, Sanita di Toppi L, Lo Schiavo F. 2009b. Nitric oxide is involved in cadmium-induced programmed cell death in *Arabidopsis* suspension cultures. *Plant Physiology* **150**: 217–228.

Delledonne M. 2005. NO news is good news for plants. *Current Opinion in Plant Biology* **8**: 390–396.

Delledonne M, Xia Y, Dixon RA, Lamb C. 1998. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* **394**: 585–588.

Ditta G, Schmidhauser T, Yakobson E, Lu P, Liang XW, Finlay DR, Guiney D, Helinski DR. 1985. Plasmids related to the broad host range vector, pRK290, useful for gene cloning and for monitoring gene expression. *Plasmid* **13**: 149–153.

Ferrarini A, De Stefano M, Baudouin E, Pucciariello C, Polverari A, Puppo A, Delledonne M. 2008. Expression of *Medicago truncatula* genes responsive to nitric oxide in pathogenic and symbiotic conditions. *Molecular Plant–Microbe Interactions* **21**: 781–790.

Figurski DH, Helinski DR. 1979. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **76**: 1648–1652.

© 2012 The Authors
New Phytologist © 2012 New Phytologist Trust

Gaupels F, Kuruthukulangarakoola GT, Durner J. 2011. Upstream and downstream signals of nitric oxide in pathogen defence. *Current Opinion in Plant Biology* **14**: 707–714.

del Giudice J, Cam Y, Damiani I, Fung-Chat F, Meilhoc E, Bruand C, Brouquisse R, Puppo A, Boscari A. 2011. Nitric oxide is required for an optimal establishment of the *Medicago truncatula–Sinorhizobium meliloti* symbiosis. *New Phytologist* **191**: 405–417.

Gupta KJ, Hebelstrup KH, Mur LA, Igamberdiev AU. 2011. Plant hemoglobins: important players at the crossroads between oxygen and nitric oxide. *FEBS Letters* **585**: 3843–3849.

Haag AF, Baloban M, Sani M, Kerscher B, Pierre O, Farkas A, Longhi R, Boncompagni E, Herouart D, Dall'angelo S *et al.* 2011. Protection of *Sinorhizobium* against host cysteine-rich antimicrobial peptides is critical for symbiosis. *PLoS Biology* **9**: e1001169.

Hardy RW, Holsten RD, Jackson EK, Burns RC. 1968. The acetylene–ethylene assay for N(2) fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiology* **43**: 1185–1207.

He Y, Tang RH, Hao Y, Stevens RD, Cook CW, Ahn SM, Jing L, Yang Z, Chen L, Guo F *et al.* 2004. Nitric oxide represses the *Arabidopsis* floral transition. *Science* **305**: 1968–1971.

Herold S, Puppo A. 2005. Oxyleghemoglobin scavenges nitrogen monoxide and peroxynitrite: a possible role in functioning nodules? *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **10**: 935–945.

Horchani F, Prevot M, Boscari A, Evangelisti E, Meilhoc E, Bruand C, Raymond P, Boncompagni E, Aschi-Smiti S, Puppo A *et al.* 2011. Both plant and bacterial nitrate reductases contribute to nitric oxide production in *Medicago truncatula* nitrogen-fixing nodules. *Plant Physiology* **155**: 1023–1036.

Journet EP, Pichon M, Dedieu A, de Billy F, Truchet G, Barker DG. 1994. *Rhizobium meliloti* Nod factors elicit cell-specific transcription of the ENOD12 gene in transgenic alfalfa. *Plant Journal* **6**: 241–249.

Kato K, Kanahama K, Kanayama Y. 2010. Involvement of nitric oxide in the inhibition of nitrogenase activity by nitrate in *Lotus* root nodules. *Journal of Plant Physiology* **167**: 238–241.

Keyster M, Klein A, Ludidi N. 2010. Endogenous NO levels regulate nodule functioning: potential role of cGMP in nodule functioning? *Plant Signaling & Behavior* **5**: 1679–1681.

Leitner M, Vandelle E, Gaupels F, Bellin D, Delledonne M. 2009. NO signals in the haze: nitric oxide signalling in plant defence. *Current Opinion in Plant Biology* **12**: 451–458.

Lin A, Wang Y, Tang J, Xue P, Li C, Liu L, Hu B, Yang F, Loake GJ, Chu C. 2012. Nitric oxide and protein S-nitrosylation are integral to hydrogen peroxide-induced leaf cell death in rice. *Plant Physiology* **158**: 451–464.

Matamoros MA, Baird LM, Escuredo PR, Dalton DA, Minchin FR, Iturbe-Ormaetxe I, Rubio MC, Moran JF, Gordon AJ, Becana M. 1999. Stress-induced legume root nodule senescence. Physiological, biochemical, and structural alterations. *Plant Physiology* **121**: 97–112.

Meakin GE, Bueno E, Jepson B, Bedmar EJ, Richardson DJ, Delgado MJ. 2007. The contribution of bacteroidal nitrate and nitrite reduction to the formation of nitrosylleghaemoglobin complexes in soybean root nodules. *Microbiology* **153**: 411–419.

Meilhoc E, Boscari A, Bruand C, Puppo A, Brouquisse R. 2011. Nitric oxide in legume–rhizobium symbiosis. *Plant Science* **181**: 573–581.

Meilhoc E, Cam Y, Skapski A, Bruand C. 2010. The response to nitric oxide of the nitrogen-fixing symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Molecular Plant–Microbe Interactions* **23**: 748–759.

Melo PM, Silva LS, Ribeiro I, Seabra AR, Carvalho HG. 2011. Glutamine synthetase is a molecular target of nitric oxide in root nodules of *Medicago truncatula* and is regulated by tyrosine nitration. *Plant Physiology* **157**: 1505–1517.

Mishina TE, Lamb C, Zeier J. 2007. Expression of a nitric oxide degrading enzyme induces a senescence programme in *Arabidopsis*. *Plant, Cell & Environment* **30**: 39–52.

Moreau M, Lindermayr C, Durner J, Klessig DF. 2011. NO synthesis and signaling in plants – where do we stand? *Physiologia Plantarum* **138**: 372–383.

Nagata M, Murakami E, Shimoda Y, Shimoda-Sasakura F, Kucho K, Suzuki A, Abe M, Higashi S, Uchiumi T. 2008. Expression of a class 1 hemoglobin gene and production of nitric oxide in response to symbiotic and pathogenic bacteria in *Lotus japonicus*. *Molecular Plant–Microbe Interactions* **21**: 1175–1183.

Navascues J, Perez-Rontome C, Gay M, Marcos M, Yang F, Walker FA, Desbois A, Abian J, Becana M. 2012. Leghemoglobin green derivatives with nitrated hemes evidence production of highly reactive nitrogen species during aging of legume nodules. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA.* **109**: 2660–2665.

Pagnussat GC, Simontacchi M, Puntarulo S, Lamattina L. 2002. Nitric oxide is required for root organogenesis. *Plant Physiology* **129**: 954–956.

Perazzolli M, Romero-Puertas MC, Delledonne M. 2006. Modulation of nitric oxide bioactivity by plant haemoglobins. *Journal of Experimental Botany* **57**: 479–488.

Perez Guerra JC, Coussens G, De Keyser A, De Rycke R, De Bodt S, Van De Velde W, Goormachtig S, Holsters M. 2010. Comparison of developmental and stress-induced nodule senescence in *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* **152**: 1574–1584.

Pii Y, Crimi M, Cremonese G, Spena A, Pandolfini T. 2007. Auxin and nitric oxide control indeterminate nodule formation. *BMC Plant Biology* **7**: 21.

Pobigaylo N, Szymczak S, Nattkemper TW, Becker A. 2008. Identification of genes relevant to symbiosis and competitiveness in *Sinorhizobium meliloti* using signature-tagged mutants. *Molecular Plant–Microbe Interactions* **21**: 219–231.

Prochazkova D, Wilhelmova N. 2011. Nitric oxide, reactive nitrogen species and associated enzymes during plant senescence. *Nitric Oxide* **24**: 61–65.

Qiao W, Fan LM. 2008. Nitric oxide signaling in plant responses to abiotic stresses. *Journal of Integrative Plant Biology* **50**: 1238–1246.

Richardson AR, Payne EC, Younger N, Karlinsey JE, Thomas VC, Becker LA, Navarre WW, Castor ME, Libby SJ, Fang FC. 2011. Multiple targets of nitric oxide in the tricarboxylic acid cycle of *Salmonella enterica serovar typhimurium*. *Cell Host & Microbe* **10**: 33–43.

Romero-Puertas MC, Perazzolli M, Zago ED, Delledonne M. 2004. Nitric oxide signalling functions in plant–pathogen interactions. *Cellular Microbiology* **6**: 795–803.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edn*. New York, NY, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sanchez C, Cabrera JJ, Gates AJ, Bedmar EJ, Richardson DJ, Delgado MJ. 2011. Nitric oxide detoxification in the rhizobia–legume symbiosis. *Biochemical Society Transactions* **39**: 184–188.

Sanchez C, Gates AJ, Meakin GE, Uchiumi T, Girard L, Richardson DJ, Bedmar EJ, Delgado MJ. 2010. Production of nitric oxide and nitrosyl leghemoglobin complexes in soybean nodules in response to flooding. *Molecular Plant–Microbe Interactions* **23**: 702–711.

Sasakura F, Uchiumi T, Shimoda Y, Suzuki A, Takenouchi K, Higashi S, Abe M. 2006. A class 1 hemoglobin gene from *Alnus firma* functions in symbiotic and nonsymbiotic tissues to detoxify nitric oxide. *Molecular Plant–Microbe Interactions* **19**: 441–450.

Schmidt HHW, Walter U. 1994. NO at work. *Cell* **78**: 919–925.

Shimoda Y, Shimoda-Sasakura F, Kucho K, Kanamori N, Nagata M, Suzuki A, Abe M, Higashi S, Uchiumi T. 2009. Overexpression of class 1 plant hemoglobin genes enhances symbiotic nitrogen fixation activity between *Mesorhizobium loti* and *Lotus japonicus*. *Plant Journal* **57**: 254–263.

Stevanin TM, Ioannidis N, Mills CE, Kim SO, Hughes MN, Poole RK. 2000. Flavohemoglobin Hmp affords inducible protection for *Escherichia coli* respiration, catalyzed by cytochromes *bo'* or *bd*, from nitric oxide. *Journal of Biological Chemistry* **275**: 35868–35875.

Timmers AC, Soupene E, Auriac MC, de Billy F, Vasse J, Boistard P, Truchet G. 2000. Saprophytic intracellular rhizobia in alfalfa nodules. *Molecular Plant–Microbe Interactions* **13**: 1204–1213.

Tran N, Barker DG, Journet EP. 2012. Split-root systems. In: Mathesius U, Journet EP, Sumner LW, eds. *The* Medicago truncatula *handbook*. Ardmore, OK, USA: The Samuel Roberts Noble Foundation, ISBN 0-9754303-1-9.

Trinchant JC, Rigaud J. 1982. Nitrite and nitric oxide as inhibitors of nitrogenase from soybean bacteroids. *Applied and Environment Microbiology* **44**: 1385–1388.

Van de Velde W, Guerra JC, De Keyser A, De Rycke R, Rombauts S, Maunoury N, Mergaert P, Kondorosi E, Holsters M, Goormachtig S. 2006. Aging in legume symbiosis. A molecular view on nodule senescence in *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* **141**: 711–720.

Venugopal A, Bryk R, Shi S, Rhee K, Rath P, Schnappinger D, Ehrt S, Nathan C. 2011. Virulence of *Mycobacterium tuberculosis* depends on lipoamide

© 2012 The Authors
New Phytologist © 2012 New Phytologist Trust

dehydrogenase, a member of three multienzyme complexes. *Cell Host & Microbe* **9**: 21–31.

Vieweg MF, Fruhling M, Quandt HJ, Heim U, Baumlein H, Puhler A, Kuster H, Andreas MP. 2004. The promoter of the *Vicia faba* L. leghemoglobin gene VfLb29 is specifically activated in the infected cells of root nodules and in the arbuscule-containing cells of mycorrhizal roots from different legume and nonlegume plants. *Molecular Plant–Microbe Interactions* **17**: 62–69.

Virta M, Lineri S, Kankaanpaa P, Karp M, Peltonen K, Nuutila J, Lilius EM. 1998. Determination of complement-mediated killing of bacteria by viability staining and bioluminescence. *Applied and Environment Microbiology* **64**: 515–519.

Vitecek J, Reinohl V, Jones RL. 2008. Measuring NO production by plant tissues and suspension cultured cells. *Molecular Plant* **1**: 270–284.

Wendehenne D, Durner J, Klessig DF. 2004. Nitric oxide: a new player in plant signalling and defence responses. *Current Opinion in Plant Biology* **7**: 449–455.

Young ND, Debelle F, Oldroyd GE, Geurts R, Cannon SB, Udvardi MK, Benedito VA, Mayer KF, Gouzy J, Schoof H *et al.* 2011. The *Medicago* genome provides insight into the evolution of rhizobial symbioses. *Nature* **480**: 520–524.

Yun BW, Feechan A, Yin M, Saidi NB, Le Bihan T, Yu M, Moore JW, Kang JG, Kwon E, Spoel SH *et al.* 2011. S-nitrosylation of NADPH oxidase regulates cell death in plant immunity. *Nature* **478**: 264–268.

de Zelicourt A, Diet A, Marion J, Laffont C, Ariel F, Moison M, Zahaf O, Crespi M, Gruber V, Frugier F. 2011. Dual involvement of a *Medicago truncatula* NAC transcription factor in root abiotic stress response and symbiotic nodule senescence. *Plant Journal* **70**: 220–230.

Zhou C, Han L, Pislariu C, Nakashima J, Fu C, Jiang Q, Quan L, Blancaflor EB, Tang Y, Bouton JH *et al.* 2011. From model to crop: functional analysis of a *STAY-GREEN* gene in the model legume *Medicago truncatula* and effective use of the gene for alfalfa improvement. *Plant Physiology* **157**: 1483–1496.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Fig. S1 Localization of the senescence zone by means of nodule toluidine blue staining.

Table S1 Effect of root treatment with diethylamine NONOate (DEA-NONOate) on nitrogenase activity

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting information supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the *New Phytologist* Central Office.

© 2012 The Authors
New Phytologist © 2012 New Phytologist Trust

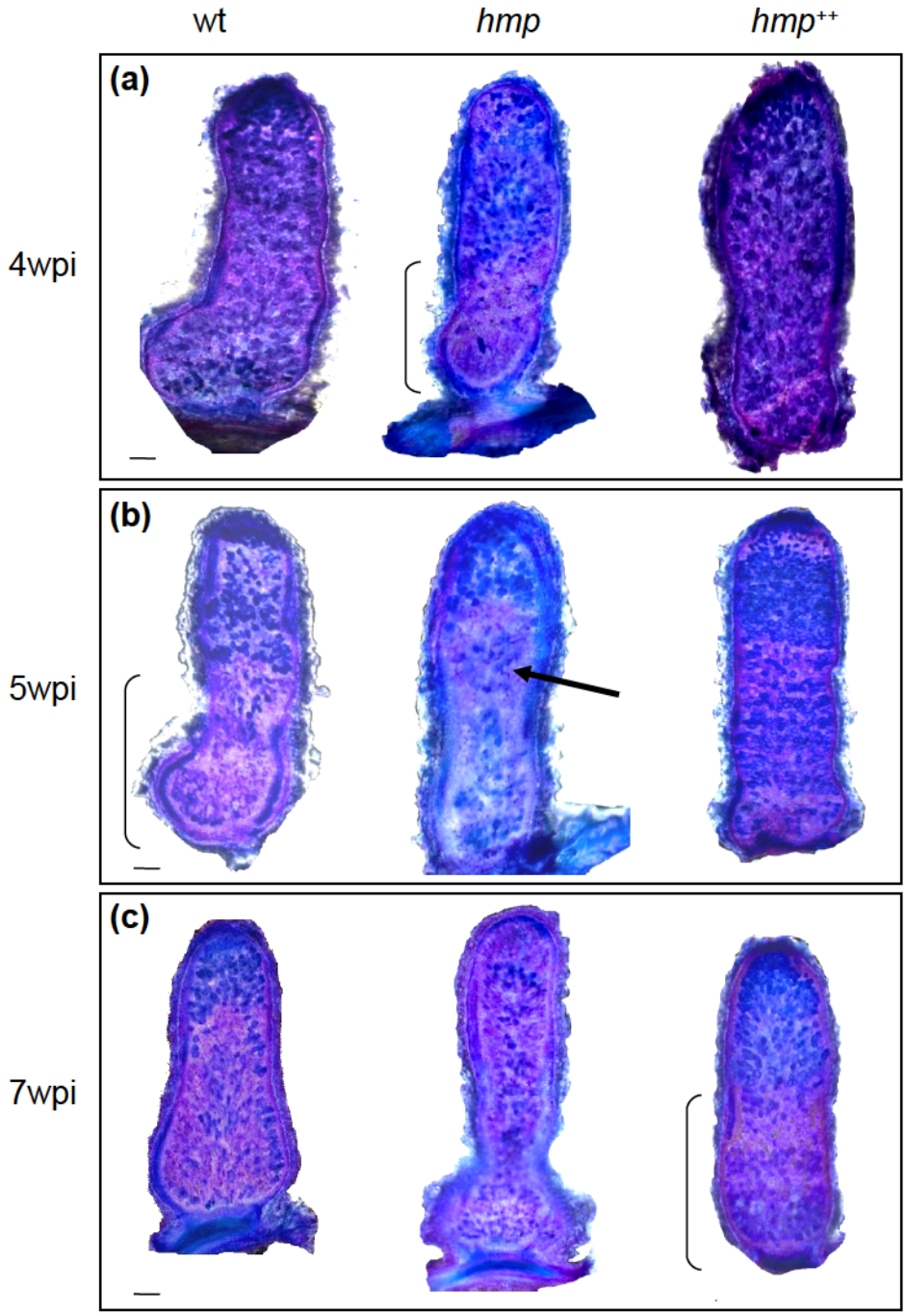


Figure S1: Localization of the senescence zone by mean of nodule toluidine blue-staining. Toluidine blue-stained longitudinal sections through *Medicago truncatula* nodules at 4 (a), 5 (b) and 7 (c) wpi showing the first cytological signs of senescence (brackets) in *hmp*, wt and *hmp*$^{++}$ nodules, respectively. Black arrow: remnant infection threads in the senescence zone of *hmp* nodules. Scale bars: 250µm

Table S1. Effect of root treatment with DEA-NONOate on nitrogenase activity

DEA-NONOate	Nitrogenase activity Acetylene reduction assay (A.U.)
-	3.5 ± 0.7
0.25mM	3.1 ± 0.9
1mM	3.9 ± 1.1

I.1.B.2 Discussion

L'ensemble de ces données *in planta* montrent que le NO est un inducteur de la sénescence nodositaire. En effet, la modulation dans la nodosité du niveau de NO endogène via invalidation ou surexpression de la flavohémoglobine *Hmp* conduit, respectivement, à promouvoir ou à retarder la sénescence. Conjointement, des études menées sur les nodosités de soja par une approche similaire confirment le rôle inducteur du NO dans ce processus de sénescence (Navascues et al., 2011), ce qui suggère que le rôle du NO comme promoteur de la sénescence serait conservé au moins dans les nodosités de *G. max* et *M. truncatula*.

De plus, grâce à une stratégie de « split root » que, il a été démontré que, bien que le NO soit un gaz diffusible, il semble être un signal de sénescence local et non systémique. Toutefois, il reste à déterminer le ou les mécanismes moléculaires induits par le NO pour promouvoir la sénescence nodositaire.

Le NO en tant qu'agent radicalaire est connu pour être impliqué dans la réponse contre les pathogènes aussi bien chez les mammifères via les macrophages (Tripathi, 2007), que chez les plantes lors de la réaction hypersensible (Mur et al., 2006; Zaninotto et al., 2006). En effet, la surexpression d'une flavohémoglobine d'*E. chrysanthemi* (assurant la dégradation du NO) chez *Pseudomonas syringae,* entraine une diminution de la réponse hypersensible de la plante (Boccara et al, 2005). De même, la hausse de la concentration en NO conduit d'une part à

inhiber la respiration, mais également à inhiber l'activité d'enzymes clefs du cycle de Krebs, et de protéines chaperonnes DnaJ bactérienne qui facilitent l'acquisition de la structure tridimensionnelle des protéines (Kroncke et al., 2001; Richardson et al., 2011; Stevanin et al., 2000). Ainsi, un excès de NO ou la défection d'enzyme impliquée dans son catabolisme pourraient rapidement conduire à l'altération du métabolisme de *S. meliloti* et induire l'initiation précoce du processus de sénescence nodositaire. De plus, le NO peut également altérer l'activité ou la demi-vie de protéines cibles par S-nitrosylation de cystéine ou nitratation de certaines tyrosines. Ces modifications post-traductionnelles induites par le NO émergent comme des potentiels régulateurs clefs chez les plantes, notamment lors de la symbiose rhizobienne (Melo et al., 2011; Puppo et al., 2013). Ainsi, une augmentation de la concentration de NO pourrait tendre à moduler l'activité et, ou la stabilité de protéines clefs de l'interaction symbiotique induisant l'initiation précoce du processus de sénescence nodositaire. Différentes données suggèrent que la dégradation de la leghémoglobine lors de la sénescence nodositaire serait due à sa Tyr-nitration (Navascues et al., 2011). La Tyr-nitration de la « glutamine synthétase-1 cytosolique » de *M. truncatula* (*MtGS1*) conduit à diminuer son activité en limitant ainsi l'assimilation de l'azote par la plante (Melo et al., 2011). Enfin, l'analyse bio-informatique de la nitrogénase montre que celle-ci possède trois sites potentiels de S-nitrosylation (Xue et al., 2010) modulant potentiellement son activité ou stabilité. Ces modifications post-traductionnelles médiées par le NO émergent également comme régulateurs lors de l'immunité innée ou adaptative chez les mammifères (Hernansanz-Agustin et al., 2013).

Une autre hypothèse serait que le NO induirait les défenses antioxydantes de *S. meliloti* contre la production d'espèces actives de l'oxygène produite par *M. truncatula* tout au long du développement de la nodosité (Jamet et al., 2007; Jamet et al., 2003; Marino et al., 2011). Etonnamment, il a été montré qu'une augmentation de la production de NO par la bactérie pathogène *Bacillus anthracis* conduit à augmenter ses défenses antioxydantes face aux macrophages (Shatalin et al., 2008). Ainsi, une courte exposition de *B. anthracis* au NO conduit à augmenter son activité catalase ce qui augmente de 100 fois sa capacité de survie en présence d'H_2O_2 (Shatalin et al., 2008) mais augmente aussi sa pathogénicité dans les tissus pulmonaires (Cybulski et al., 2009). En accord avec cette hypothèse, l'induction des défenses antioxydantes de *S. meliloti* a bien été démontrée au cours des différentes étapes de la symbiose avec *M. sativa*, avec l'induction des catalases KatB en zone II et III et de KatA en zone III (Jamet et al., 2003). De même, l'expression de « NADPH oxydase » (Rboh) impliquées dans la production d'anion superoxyde ($O2^{\cdot-}$) rapidement dismuté en H_2O_2 a été montrée dans l'ensemble de la zone II et III de la nodosité (Marino et al., 2011). Reste cependant à déterminer si l'induction et ou l'activité de ces protéines est bien liée au NO.

En conclusion, le NO pourrait initier le processus de sénescence en altérant le fonctionnement d'enzymes clefs intervenant dans le processus symbiotique. Mais une carence en NO pourrait-elle également empêcher les bactéroïdes de se prémunir contre un stress oxydatif imposé par la plante hôte limitant ainsi la persistance des bactéroïdes au sein de la nodosité.

I.2 L'ACIDIFICATION DE L'ESPACE PERIBACTEROÏDIEN : UN MARQUEUR DU FONCTIONNEMENT DES BACTEROÏDES CHEZ M. TRUNCATULA

I.2.A Introduction

Dans la nodosité, en zone III, la réduction du diazote atmosphérique est assurée par les symbiosomes. Le symbiosome est un compartiment composé du microsymbionte *S. meliloti*, différentié en bactéroïde fixateur, entouré d'une membrane végétale d'origine plasmique appelée membrane péribactéroïdienne (PBM : « peribacteroid membrane »). Les bactéroïdes et la PBM délimitent un espace intermembranaire appelé espace péribactéroïdien (PBS : « peribacteroid space »), qui est un compartiment d'échange entre la plante et son hôte. L'établissement d'échanges métaboliques entre la plante et le microsymbionte est essentiel pour assurer la persistance du symbionte au sein de la nodosité, mais aussi pour maintenir la fixation d'azote.

En effet, la plante fournit aux bactéroïdes des substrats carbonés, principalement sous forme de malate et de fumarate, pour assurer l'énergétique nécessaire à la nitrogénase. La présence d'H^+-ATPase a été localisées sur le PBM (Fedorova et al., 1999), et leurs activités ont été démontrés, *in vitro,* comme nécessaire pour l'import de malate aux bactéroïdes au travers de la PBM (Day et al., 2001). Le malate, via le cycle de Krebs et la respiration du bactéroïde, permet la synthèse d'ATP et de pouvoir réducteur nécessaire à la réduction du diazote

atmosphérique. Cependant, du fait du pH acide et de la présence d'activités lipases, phosphatases et protéases détectées dans la vacuole et dans le PBS, certains auteurs suggèrent que le symbiosome pourrait être un compartiment semblable aux lysosomes (Mellor, 1989; Truchet & Coulomb, 1973). Ainsi l'acidification de l'espace péribactéroïdien pourrait être un marqueur du fonctionnement de la nodosité ou bien, à l'inverse, un marqueur précoce de mise en place du processus de sénescence nodositaire.

Nous avons donc étudié *in vivo*, par microscopie confocale via l'utilisation de sondes fluorescentes acidophiles, l'évolution de l'acidification du PBS au cours de l'interaction *M. truncatula – S. meliloti* depuis le relargage des rhizobia au sein des cellules hôtes jusqu'à la rupture de l'interaction symbiotique et la mise en place du processus de sénescence nodositaire. Ces approches, nous ont permis non seulement de confirmer *in vivo* l'acidification du PBS, mais également d'observer une forte remontée du pH de ce compartiment entre la zone III fixatrice et le début de la zone IV, suggérant que l'acidification du PBS en zone III serait un bon marqueur *in vivo*, du fonctionnement des bactéroïdes au sein de la nodosité. De plus, par une seconde approche cytologique, nous avons pu mesurer, *in vivo,* le pH du PBS au cours de l'interaction symbiotique. Cette approche confirme nos résultats précédents relatifs à la transition de la zone III-IV, mais également met en évidence une acidification progressive du PBS de la zone II jusqu'à la zone III.

L'ensemble de nos résultats met en lumière le rôle du pH au sein du PBS dans la physiologie des bactéroïdes en zone III et montre de cette acidification du PBS est un marqueur *in vivo* de leur fonctionnement.

Plant, Cell & Environment

Plant, Cell and Environment (2013) doi: 10.1111/pce.12116

Peribacteroid space acidification a marker of mature bacteroid functioning in *Medicago truncatula* nodules

OLIVIER PIERRE[1], GILBERT ENGLER[1], JULIE HOPKINS[1], FRÉDÉRIC BRAU[2], ERIC BONCOMPAGNI[1] & DIDIER HÉROUART[1]

[1]UMR INRA 1355-CNRS 7254-Université de Nice Sophia-Antipolis, Institut Sophia Agrobiotech, 400 route des Chappes, F-06903 Sophia Antipolis, France and [2]CNRS, UMR 7275, Institut de Pharmacologie, 660 Route des Lucioles, Sophia Antipolis, F-06560 Valbonne, France

ABSTRACT

Legumes form a symbiotic interaction with Rhizobiaceae bacteria, which differentiate into nitrogen-fixing bacteroids within nodules. Here, we investigated *in vivo* the pH of the peribacteroid space (PBS) surrounding the bacteroid and pH variation throughout symbiosis. *In vivo* confocal microscopy investigations, using acidotropic probes, demonstrated the acidic state of the PBS. *In planta* analysis of nodule senescence induced by distinct biological processes drastically increased PBS pH in the N_2-fixing zone (zone III). Therefore, the PBS acidification observed in mature bacteroids can be considered as a marker of bacteroid N_2 fixation. Using a pH-sensitive ratiometric probe, PBS pH was measured *in vivo* during the whole symbiotic process. We showed a progressive acidification of the PBS from the bacteroid release up to the onset of N_2 fixation. Genetic and pharmacological approaches were conducted and led to disruption of the PBS acidification. Altogether, our findings shed light on the role of PBS pH of mature bacteroids in nodule functioning, providing new tools to monitor *in vivo* bacteroid physiology.

Key-words: *Sinorhizobium meliloti*; acidic compartment; confocal microscopy; nitrogen-fixing symbiosis; ratio imaging.

INTRODUCTION

Legumes are second only to cereal crops in agricultural importance worldwide. In 2004, leguminous crops were spread over 190 million hectares representing 13% of total cultivated lands (Gepts *et al.* 2005). Legumes interact with numerous microorganisms living in the rhizosphere, including devastating pathogens and mutually beneficial endosymbionts, and develop different strategies to thwart or limit their expansion inside vegetal tissues. For example, leguminous plants establish a compatible and beneficial association with soil bacteria of the Rhizobiaceae family only inside a specialized organ, the root nodule. Inside host cells, bacteria obtain photosynthates and differentiate into their endosymbiotic bacteroid forms. Using nitrogenase, the microsymbiont is able to reduce atmospheric nitrogen to ammonia, which can subsequently be metabolized by the plant. This symbiotic association is crucial for an optimal growth of leguminous plants under nitrogen-limiting conditions.

In *Medicago* sp./*Sinorhizobium meliloti* model symbiosis, sophisticated exchanges of signals between both partners, including plant flavonoids and bacterial Nod factors, elicit a number of cellular responses in roots: cell divisions in inner cortical cells leading to nodule primordium formation and the formation of a characteristic 'shepherd's crook' curl structure at the root-hair tip (reviewed in Gage 2004). Inside this specific curled structure, bacteria establish a microcolony and stimulate the reorientation of root hair cell wall growth, and infection threads form by deposition of new plant cell wall material and growth of the plasma membrane. Bacteria divide in the growing infection threads and finally infect the root cell. During the release of bacteria into the plant host cytoplasm, a plasmalemma-derived membrane, named the peribacteroid membrane (PBM) or symbiosome membrane, forms an uninterrupted membrane around each bacterium and delineates a new space between the PBM and the bacterial outer membrane, named the peribacteroid space (PBS) or symbiosome space (Verma & Hong 1996). Inside infected host cells, bacteria differentiate into nitrogen-fixing bacteroids. In parallel, the infected plant cells enter a differentiation programme, characterized by cell division arrest and the onset of endoreduplication accompanied by increased cell size. This co-differentiation of both partners leads to the development of a functional nodule. In 5-week-old mature nodules of *Medicago truncatula*, all stages from infection and differentiation processes to disruption of symbiotic interactions are present: a persistent apical meristem (zone I) gives rise to cells initiating the nodule differentiation program (zone II), bacteria differentiate into bacteroids (interzone II–III), which fully convert nitrogen into ammonia, which is exported to the plant in exchange for carbohydrates (zone III). However, a loss of symbiotic relationship (zone IV) occurs earlier than the global senescence of the plant partner with saprophytic bacteria surviving inside degenerate nodule tissues (zone V). Optimization of N_2 fixation of legume crops (e.g. soybean and alfalfa) is essential to reduce the need of nitrogen fertilizers to develop a more profitable and environment friendly agriculture. A better understanding of nodule functioning and physiology of nitrogen-fixing bacteroids *in vivo* is needed to enhance yield of legume crops. In zone III of *M. truncatula* nodule, the basic nitrogen-fixing unit is the symbiosome, which includes

Correspondence: E. Boncompagni. Tel: +33 492 38 66 34. Fax: +33 492 38 65 87; e-mail: boncompa@unice.fr

© 2013 John Wiley & Sons Ltd

one nitrogen-fixing bacteroid surrounded by the PBM and the plant-bacteroid exchange space, the PBS. In plant host cells, the symbiosome has been considered as an organelle-like structure (Roth & Stacey 1989). The establishment of metabolic exchanges between both partners is essential for optimal reduction of nitrogen and the survival of the bacteroid inside the symbiosome. These exchanges must take place across the PBM, the structure and function of which has been widely studied (Whitehead & Day 1997; Day *et al.* 2001). A major feature of the PBM is the presence of H^+-ATPases (Fedorova *et al.* 1999), which are involved in energization of this membrane by H^+-pumping. Biochemical studies of PBM in different legumes indicate that the activities of ATPases are Mg^{2+} dependent with an acidic pH optimum. They are inhibited by vanadate and stimulated by cations such as K^+ and NH_4^+, corresponding more to a plasmic P-type proton ATPase rather than a vacuolar V-type ATPase (for review, Nelson 1987). The H^+-ATPase activity is essential for the dicarboxylate transport toward bacteroids across the PBM (Day *et al.* 2001). Several *in vitro* studies using intact functional symbiosomes isolated from mature nodules of different legumes have shown that this H^+-ATPase localized in PBM could create a pH gradient and a membrane potential between the external medium and the symbiosome (Szafran & Haaker 1995; Day *et al.* 2001). The acidification of the PBS also depends on bacteroid metabolism, such as respiration (Bhandari & Nicholas 1985), leading to the energization of the inner bacteroid membrane (Bhandari & Nicholas 1985). The outer bacteroid membrane is probably not involved in maintaining a pH gradient due to the presence of porins (Benz 1988). The reduction of atmospheric nitrogen by nitrogenase is expensive: in terms of ATP and reducing power, 6 ATP and 8 e^- are needed to reduce one nitrogen molecule and a high respiratory rate is necessary to supply the energy required by this process. However, the low pH state of PBS of functional bacteroid remains debated. Indeed, *in vitro* data suggested that PBS acidity promotes the protomotive force crucial for metabolite exchange in soybean (Blumwald *et al.* 1985; Udvardi & Day 1989), whereas analysis of the lipopolysaccharide epitope expression of bacteroids by *in situ* immunolabelling of pea nodules has suggested that the PBS pH is not acidic but neutral in the nitrogen-fixing zone. Nevertheless, the symbiosome has been also considered as a form of lytic compartment due to proteases and acid trehalase activities typically found in vacuoles (Truchet & Coulomb 1973; Mellor 1989). A further acidification of PBS would lead, directly or indirectly, to the degradation of bacteroids in senescent zone IV by the activation of acid phosphatases, lipases, and proteases in the PBS (Mellor 1989; Brewin 1991). All previous data obtained on PBS pH and symbiosome physiology has been obtained, however, from measurements carried out on purified symbiosomes, and the beneficial role of the PBS acidity still remains debated. To our knowledge, no *in vivo* data are currently available to determine the pH of the PBS throughout the symbiotic process. Therefore, we developed an experimental setup using different pH-dependent fluorescent probes and applied them to fresh tissue slices of *M. truncatula* nodules to measure the PBS pH in different nodule zones by *in vivo* confocal imaging. Furthermore, we performed experiments to demonstrate that the pH of the PBS compartment is tightly related to the overall efficiency of the nodule N_2 fixation process.

MATERIALS AND METHODS

Plant materials and growth conditions

Medicago truncatula ecotype A17 seeds were surface-sterilized and germinated, as previously described (Boisson-Dernier *et al.* 2001). Wild-type *M. truncatula* and composite plants with transgenic roots were grown in a phytotron at 23/21 °C under a 16 h light/8 h dark photoperiod, respectively. Plants were watered with nitrogen-free nutrient medium (Puppo, Dimitrijevic & Rigaud 1982) and inoculated with *S. meliloti* 5 d after germination.

Bacterial strains

All the strains were grown on appropriate medium supplemented with selective antibiotics, at 30 °C for *S. meliloti* (*Sm*). When required, antibiotics were added at the following concentrations: streptomycin 100 μg mL^{-1}, neomycin 100 μg mL^{-1} and rifampicin 20 μg mL^{-1}. Strains used in this work are *S. meliloti 1021* (Meade *et al.* 1982), *Sm1021 bacA* (Glazebrook, Ichige & Walker 1993), *Sm1021 nifH* (Ruvkun, Sundaresan & Ausubel 1982) and *Sm102F34* (Ditta *et al.* 1980; Pocard *et al.* 1997).

RNA extraction and real-time quantitative PCR analysis

Total RNA was extracted with Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and cDNA pools were synthesized from 2 μg for RNA using the Omniscript RT kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions. Quantitative RT-PCR was performed using a DNA engine Chromo4 (MJ Research, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) with qPCR Master-Mix Plus for SYBR green I (Eurogentec, Seraing, Belgium). Each reaction was performed with 5 μL of 100-fold diluted cDNA template and 300 nM of each specific primer set (Supporting Information Table S1). Primers design and specificity have been tested with Primer-BLAST tools (Sayers *et al.* 2011) on non-redundant (nr) database. The primers used (Supporting Information Table S1) had a calculated melting temperature of 59 °C to 62 °C and were unique in the MTGI (TIGR) and *Medicago* EST Navigation System (Journet *et al.* 2002) databases. After 2 min at 50 °C and 10 min at 95 °C for initial denaturation, 40 thermal cycles of 15 s at 95 °C and 1 min at 60 °C were performed. The amplification quality was checked by the presence of a single dissociation peak in a melting curve performed for each well at the end of the PCR. Reactions were performed in triplicate and the results averaged. Two biological replicates have been performed. Expression level was calculated and normalized with the $2^{\Delta\Delta CT}$ method (Livak & Schmittgen 2001). As endogenous controls, the constitutively expressed *Mtc27* (Favery *et al.* 2002) and

© 2013 John Wiley & Sons Ltd,

40S ribosomal protein S8 genes (Fedorova *et al.* 2002) were used and their stability for each biological condition was checked with GENORM software (Vandesompele *et al.* 2002). Data statistical analysis had been performed by REST 2008 software (Pfaffl, Horgan & Dempfle 2002).

Nitrogen-fixin capacity of bacteroids

Nitrogen-fixing capacity of bacteroids inside nodules was determined *in vivo* by measuring the reduction of acetylene into ethylene, as previously described as acetylene-reducing activity (Hardy *et al.* 1968). Nodulated roots were harvested and incubated at 30 °C for 1 h in rubber-capped tubes containing a 10% acetylene atmosphere. Two biological replicates have been performed with five technical replicates. Ethylene concentrations were determined by gas chromatography (Agilent GC 6890N, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) equipped with a GS-Alumina (30 m × 0.534 mm) separating capillary column.

Confocal microscopy and acidophilic probes

Mature nodules were harvested and freshly sectioned with a Leica VT1200S vibratome (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) into 70 μm thick tissue slices. Nodule slices were stained with 5 μM of DND-99 LysoTracker Red or DND-189 LysoSensor Green (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) in a 50 mM Tris pH = 7 buffer. Excess of dye was removed by a short wash with buffer and samples were mounted and observed using a laser scanning confocal microscope (LSM510 META, Carl Zeiss, Le Pecq, France) using a plan-Apo 63x/1.2 NA water immersion objective. Confocal settings were optimized and calibrated using control nodules stained with DND-99 and DND-189. For pH ratiometric analysis, nodule sections were incubated in the presence of 5 μM of the pH-sensitive DND-160 LysoSensor Yellow/Blue cell permeant probe (Molecular Probes) for 20 min in 50 mM Tris buffer pH 7.0, and samples were prepared as previously described. Confocal imaging was performed using a laser scanning confocal microscope (LSM780, Carl Zeiss) equipped with a plan-Apo 63x/1.4 Oil DIC objective. Nodule sections were illuminated with a 405 nm laser diode and emission fluorescence intensities were recorded in two separate windows (427–480 nm and 524–577 nm) using the same spectral detector. Intensity ratios were directly calculated using ZEN software (Zeiss) with the following equation (1) (Ch1: 427–480 nm, Ch2: 524–577 nm) and implemented on the pH calibration curve producing pseudo-coloured images mapping pH within a 4.0–6.5 pH range.

$$R = (ICh2 - ICh1)/(ICh2 + ICh1) \quad (1)$$

To obtain an optimal signal to noise ratio, background signal was reduced during acquisition by applying a similar low offset for each channel. Noise signal was reduced by processing each ratio image with a median filter with a radius matching the lateral optical resolution (~150 nm). pH calibration was performed under identical imaging conditions using a range of buffer solutions from pH 4 to 6.5. pH values from the PBS were extracted from the ratio image by image analysis using ImageJ software (Wayne S. Rasband, NIH, MD, USA) by applying a Laplacian filter. The Laplacian filter is a high-pass filter enhancing edges, facilitating the extraction of cell features in the image.

In planta bacteroid viability assay with LIVE-DEAD staining system

Mature nodules were harvested, embedded in 4% agarose (w/v), sectioned into 70 μm slices with a Leica VT1200S vibratome and nodule sections were incubated in a Live-Dead (Molecular Probes) staining solution for 20 min. (Haag *et al.* 2011). The excess of dye was washed out and samples were mounted in water for confocal microscopy. Images were acquired using Zeiss LSM510 META using a plan-Apo 20x/0.75 objective. The 488 nm Argon and 543 nm HeNe laser lines were sequentially used to separately excite SYTO9 and propidium iodide (PI), respectively. Both fluorescence signals were recorded on separated detectors. A fluorescence intensity ratio plot of SYTO9 to PI of stained bacteroids was generated by calculating the mean surface integrated signal for both channels from individual bacteroids within host cells, measuring the mean surface of bacteroids stained with SYTO9 or PI. All images were treated and analysed using the Zeiss LSM510 META software.

Chemical treatment and *in planta* pH imaging

Nodule vibrosections were incubated in 50 mM Tris buffer pH 7.0 with different inhibitors before applying the pH ratiometric probe DND-160. Nodule vibroslices were firstly incubated either with respiration inhibitors such as 10 mM potassium cyanide (KCN) for 1.5 h and 5 μg mL^{-1} oligomycin for 2 h or H^+-ATPase inhibitors with 500 μM orthovanadate for 2 h (VO_3^-) and 100 μM bafilomycin for 2 h. As control for loss of proton gradient, samples were incubated with 10 μM of the FCCP protonophore for 1.5 h. Untreated control samples were treated using the same conditions and imaged with Zeiss LSM780 confocal microscope. All inhibitors were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA).

RESULTS

In planta detection of an acidic PBS of symbiosomes

Previous *in vitro* analyses of purified symbiosomes (Udvardi & Day 1989) revealed that, compared to the cytoplasmic pH of plant host cells, acidification of the PBS leads to energization of the PBM surrounding the bacteroid. In order to confirm *in planta* the acidic nature of the PBS in nodule infected cells, we labelled *in vivo* nodule sections with the LysoTracker DND-99 (Fig. 1b,e), a fluorescent probe specific for acidic compartments (Otegui *et al.* 2005). At neutral pH DND-99 freely permeates through membranes and upon

© 2013 John Wiley & Sons Ltd, *Plant, Cell and Environment*

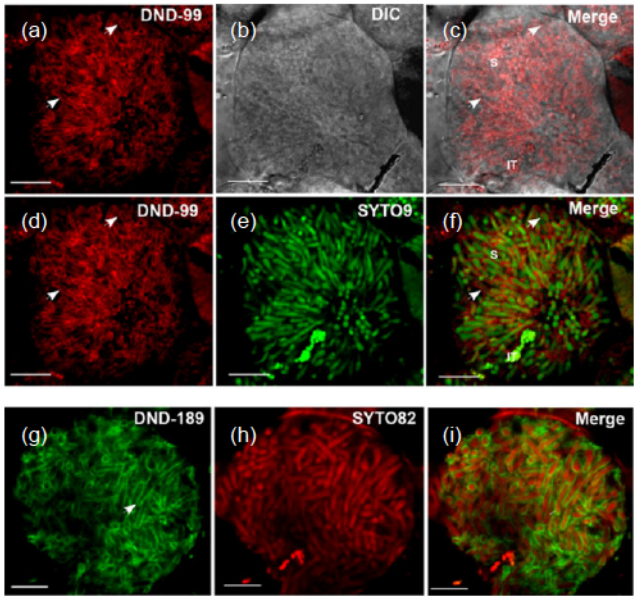


Figure 1. The peribacteroid space of nodules is a low pH compartment. (a–f) Confocal images of wild-type nodules stained with LysoTracker DND-99. At neutral pH DND-99 freely penetrates through membranes. Its protonation in a low pH compartment leads to its retention and accumulation in acidic organelles. In infected cells, DND-99 was accumulated in the peribacteroid space (PBS) (a, c, d and f) surrounding the bacteroids labelled with SYTO9 (e and f). Both green and red channels have been imaged on separate tracks using dual scanning mode. S, symbiosome; white arrow, peribacteroid space; IT, infection thread. Scale bar: 10 μm. (g–i) Confocal images of host cells from wild-type nodules in N_2 fixation zone (zone III) stained with LysoSensor DND-189 (green), a pH-sensitive probe, and counterstained with SYTO82 (red). Due to its low pKa value, DND-189 is only fluorescent in acidic compartments with a pH lower than 5.2. Differential interference of contrast (DIC) microscopy device generates contrasted image due to differences of refractive index of the specimen facilitating visualization of cell structures including bacteroids. Scale bar: 5 μm.

protonation at low pH leads to its retention and accumulation in acidic cellular compartments. To investigate the labelling pattern of DND-99 within nodule host cells, bacteroids were counterstained with the SYTO9 nucleic acid dye for DNA labelling (Fig. 1a,d). In infected cells from the mature nitrogen-fixing zone, DND-99 fluorescence did not show any overlap with the SYTO9 signal but surrounded the bacteroids, indicating that the PBS of symbiosomes is a low-pH compartment as compared to bacteroids and the host cell cytoplasm (Fig. 1c,f). These results were confirmed using the pH sensor probe LysoSensor DND-189 (Fig. 1h). This fluorescent probe is similar to DND-99 in that it is only able to accumulate in acidic compartments with a pH $\leq$ 5.2 with the specificity that its fluorescence intensity increases with the acidity of the cell compartment reaching an optimal emission between pH 4 and 5 (Lin, Herman & Lakowicz 2003). In mature host cells, DND-189 also accumulated in the PBS surrounding bacteroids (Fig. 1i), which were counterstained with the red nucleic acid dye SYTO83 (Fig. 1g). Based on these observations, we conclude that the PBS of active symbiosomes is indeed an acidic compartment *in planta*.

To follow the progress of acidification in the PBS, we analysed 6-week-old nodules with the DND-99 probe to monitor whether the pH of this compartment would change throughout the symbiotic process from infection to senescence (Fig. 2). DND-99 fluorescence observed in the PBS from infection zone (Fig. 2a–c) and fixative zone (Fig. 2d–f) remained constant suggesting no pH change. In contrast, a drastic alteration of DND-99 retention in the PBS was observed in senescent host cells (Fig. 2g–i), indicating that the acidification process of bacteroids in zone III is related to nodule function. To support this hypothesis PBS acidification was investigated during various biological processes promoting a disruption of bacteroid N_2 fixation.

PBS acidificatio of stressed or symbiosis defective bacteroids

We altered the symbiotic balance between both partners by applying a short (36 h) and a long (72 h) dark treatment on 6 week nodulated plants. Such a treatment interrupts the sugar supply to nodules and thereby lowers the overall ATP production in nodules leading to a disruption of bacteroid N_2 fixation (Matamoros *et al.* 1999; Vauclare *et al.* 2010). Corresponding nodule sections were used to follow PBS pH with LysoTracker DND-99 (Fig. 3). Accumulation of DND-99 in young symbiosomes in zone II was not altered after 36 or even 72 h of dark treatment, showing that acidification of the PBS of recently released bacteroids within infection zone (zone II) was not affected by this stress (Fig. 3a–c). In contrast, in zone III bacteroids, retention of DND-99 in the PBS was dramatically altered, inducing a loss of staining 36 h after dark treatment (Fig. 3k). A similar absence of DND-99 staining was observed in zone III of nodules 72 h after of dark treatment (Fig. 3i).

In parallel, the impact of the applied dark treatment on the physiology of infected nodule cells and nitrogen-fixing bacteroids was analysed by studying the expression of nodule-specific plant marker genes (Fig. 4a) and by evaluating *in planta* the viability of bacteroids (Fig. 4b) combined with their nodular nitrogen fixation (Fig. 4c). Expression of the *MtCP6* gene, an early marker of nodule senescence (Perez Guerra *et al.* 2010), the leghemoglobin *MtLb1* gene, essential for nitrogen fixation (Ott *et al.* 2005, 2009) and the zone III specific peptide *MtNCR001*, crucial for bacteroid differentiation (Mergaert *et al.* 2003; Van de Velde *et al.* 2010) were determined by RT-qPCR (Fig. 4a). Compared to unstressed nodules, we observed a fivefold increase in transcript level of the senescent-specific *MtCP6* gene suggesting the induction of the nodule senescence process already after 36 h of dark treatment. Moreover, a drastic decrease of *MtLb1* and *MtNCR001* transcripts were measured after 36 h after dark treatment, confirming an early disruption of bacteroid N_2 fixation. To ensure this early disruption of nodule functioning under dark treatments, we analysed bacteroid viability using the Live/Dead fluorescent system (Haag *et al.* 2011), which includes a mix of the fluorescent

© 2013 John Wiley & Sons Ltd, *Plant, Cell and Environment*

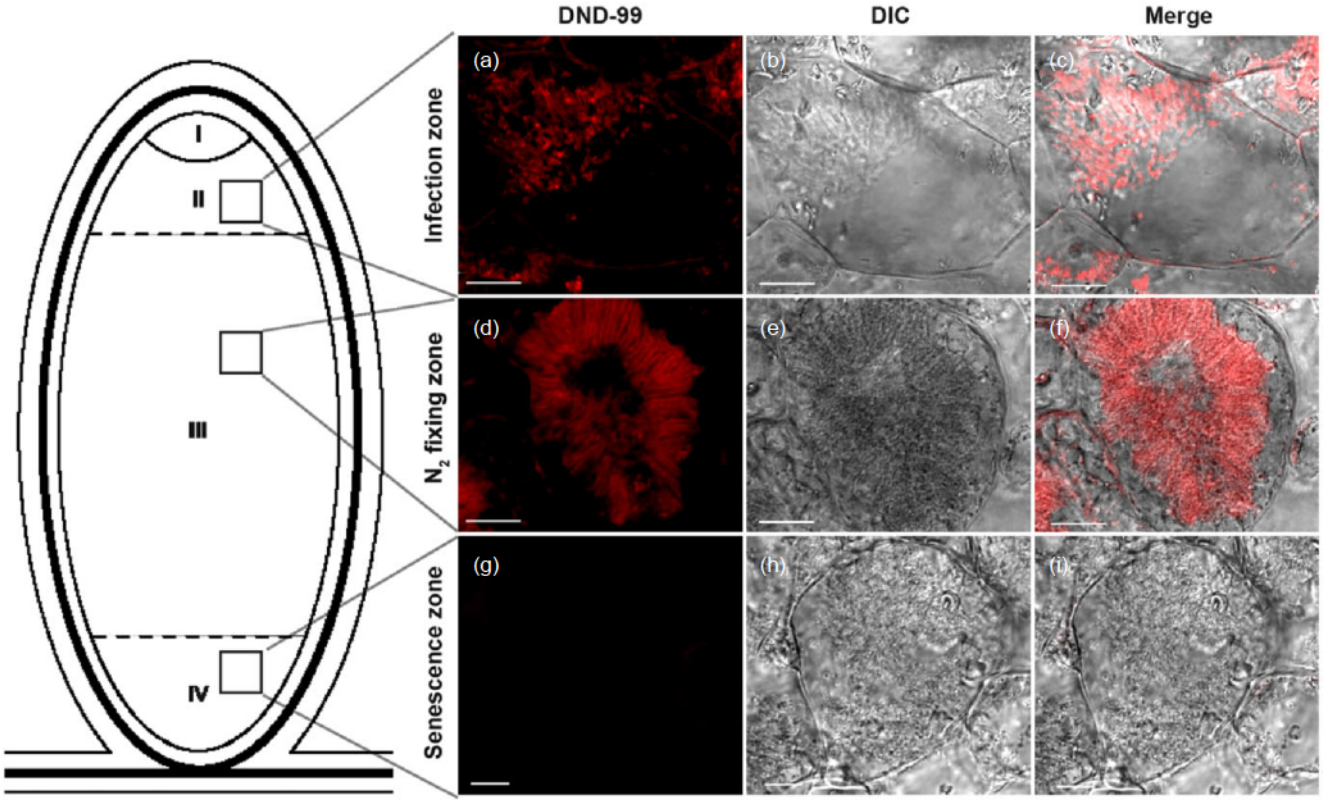


Figure 2. Changes of symbiosome acidification throughout symbiosis. Confocal images of infected host cells from wild-type nodules of 6 weeks post-inoculation stained with DND-99 highlight acidic compartments. Compared to recently differentiated bacteroids in the infection zone (zone II) (a–c) or in N_2-fixing zone (zone III) (d–f), DND-99 retention in the PBS was dramatically altered in the non-fixing senescent zone (g–i). Schematic indeterminate mature nodule: I, meristematic zone; II, infection zone; III, nitrogen-fixing zone; IV, senescence zone. Scale bar: 10 μm.

DNA intercalating agents SYTO9, green fluorescence and PI, red fluorescence (Fig. 4b). Viable bacteroids are only labelled with SYTO9, whereas dying bacteroids with damaged membranes are labelled with PI (Haag *et al.* 2011). Unstressed bacteroids from the nitrogen-fixing zone were SYTO9 labelled indicating their viability (Fig. 4b). In contrast, when applying a 36 h dark stress, the majority of the bacteroids were PI stained indicating their degradation (Fig. 4b). To confirm this result, the surfaces of bacteroids stained with SYTO9 or PI were measured on at least 11 distinct nodules in order to calculate their corresponding integrated surface signal intensity (ISSI). By determining the ISSI ratio of the SYTO9/PI staining, we estimated an eight-fold reduction in bacteroid viability after only 36 h of dark treatment (Supporting Information Fig. S1). A complete lack of staining was observed for 72 h dark-stressed nodules, indicating an advanced process of nodule senescence associated with a full degradation of the whole mature infected cells. We also assessed the impact of dark stress on the nitrogen fixation capacity of bacteroids from dark-stressed and unstressed nodules using the acetylene reducing assay. An 80% decrease in nitrogen fixation was already observed 36 h after dark stress, confirming the strong reduction of bacteroid viability (Fig. 4c). All these data show that the N_2-fixing capacity of viable bacteroids overlaps with PBS acidification of mature bacteroids (zone III). Moreover, a short dark stress (36 h) was sufficient to alter the nitrogen-fixing bacteroid physiology and to induce the senescence process in infected plant cells without inducing premature bacteroid degradation. However, dark treatment leads to a lowering of the global pool of ATP in nodules, impacting both symbiotic partners. Therefore, we investigated the effect on PBS acidification using mutant strains with an impaired N_2 fixation. Nodules promoted by *S. meliloti* mutant strains affected in their bacteroid development and nitrogen-fixing capacity, like *bacA* and *nifH* mutant strains, were used for analysis. *bacA* bacteria are released into host cells but do not completely differentiate into N_2 fixing bacteroids (Glazebrook *et al.* 1993; Maunoury *et al.* 2010), whereas *nifH* mutant bacteria differentiate completely into bacteroids but are unable to fix atmospheric N_2 (Ruvkun *et al.* 1982; Maunoury *et al.* 2010). Indeed, nifH codes for a 60 kDa subunit containing the Fe_4S_4 cluster of the MoFe nitrogenase (Lee *et al.* 2009). Therefore, *nifH*-promoted nodules appear to be similar to control nodules showing normal zonation but after 2 weeks post-inoculation a senescence zone is prematurely established (Hirsch, Bang & Ausubel 1983; Maunoury *et al.* 2010) Both *bacA* and *nifH* strains promote the formation of nodules devoid of a functional N_2-fixing zone (zone III). Retention of the LysoTracker DND-99 in PBS was restricted to newly

© 2013 John Wiley & Sons Ltd, *Plant, Cell and Environment*

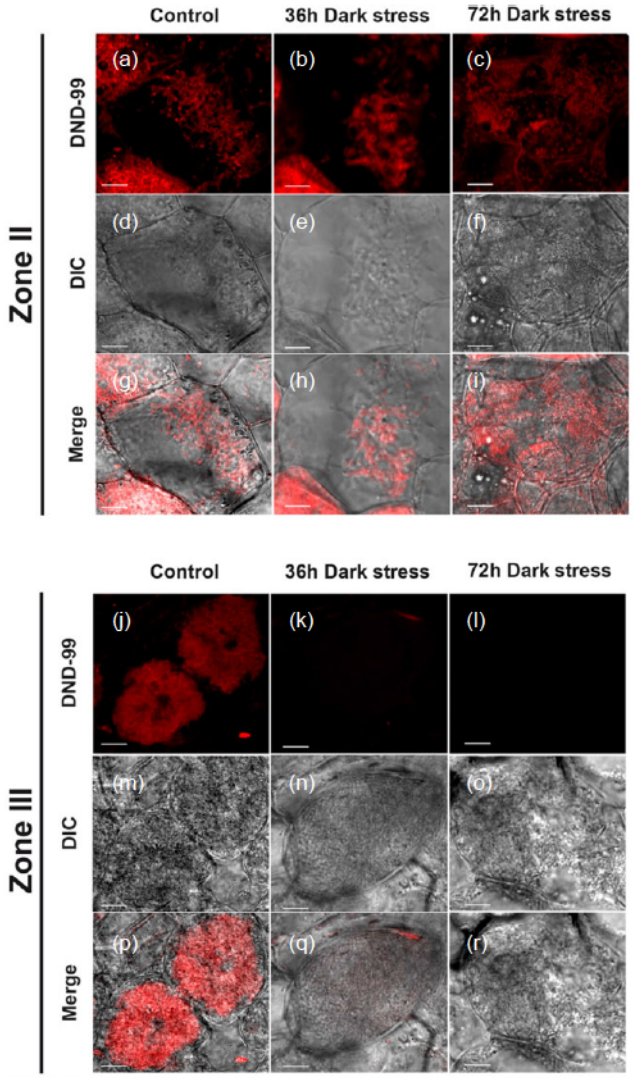


Figure 3. Dark treatment does not affect PBS acidification in recently release bacteroids (zone II) but drastically alters PBS acidity of N_2-fixing bacteroids (zone III). Six weeks post-inoculation, mature nodules were harvested after 36 and 72 h of dark treatment, sectioned and stained with DND-99 to determine PBS acidity by confocal imaging. Dye was excited with a 543 nm laser line and emission fluorescence was collected using a 585–615 nm bandpath channel. (a–i) PBS acidification of recently released bacteroids (zone II) was not altered after a plant dark treatment. (j–r) PBS acidity of N_2-fixing bacteroids (zone III) was drastically decreased after either 36 or 72 h of dark treatment. Scale bar: 10 μm.

released *bacA* and *nifH* bacteroids within zone II (Fig. 5j–r), whereas in comparison to control nodules in zone III, LysoTracker DND-99 retention in PBS is completely lost in non-functional *bacA* and *nifH* bacteroids, despite a completed differentiation of *nifH* bacteroids (zone III; Fig. 5j–r; Supporting Information Fig. S2). These results show that the alteration of N_2 fixation process either by inoculating with nod$^+$fix$^-$ *S. meliloti* mutant strains or by applying a dark stress strongly reduces PBS acidification in zone III.

Peribacteroid spaces show pH ranges between 4.5 and 5.0

Previous *in vitro* analyses showed that the PBS is an acidic compartment (Bhandari & Nicholas 1985; Udvardi & Day 1989; Fougere & Le Rudulier 1990; Haaker *et al.* 1996) and *in vivo* data described in this manuscript, using LysoTrackers DND-99 and DND-189, confirm and reinforce that the PBS compartment is acidic. However, it remains to be determined whether pH variations occur in the PBS throughout symbiosis. Therefore, we developed a new approach to accurately measure the *in situ* PBS pH directly in distinct zones of a nodule by using the ratiometric pH-sensitive probe DND-160. This cell permeant fluorescent probe is characterized by two emission peaks individually detectable using two bandpass filters. The emission fluorescence ratio is pH dependent and allows *in vivo* pH lifetime imaging (Lin *et al.* 2003; Otegui *et al.* 2005). This powerful method eliminates errors caused by variations in probe concentration inside the sample. Previous measurements obtained using the LysoSensor DND-189 probe indicated that the PBS pH is inferior or equal to 5.2 in the nitrogen-fixing zone III (Fig. 1). Therefore, we selected LysoSensor Yellow/Blue DND-160 as the most suitable ratiometric probe having a pKa (4.2) close to the pH of the PBS. A pH calibration curve for fluorescence ratios was generated before analysis of symbiosomes (Supporting Information Fig. S3). To measure PBS pH, PBS signals were extracted for quantitative analysis by applying a binary Laplacian filter on the ratiometric image using ImageJ software. This filter was used to optimize visualization of fluorescence from the PBS compartment by enhancing the signal/noise ratio and suppressing irrelevant signals emitted from cell compartments. Analyses of mature nodules with the LysoSensor DND-160 probe showed that, during the differentiation of bacteria into mature nitrogen-fixing bacteroids, the PBS pH decreased from 5.5–6.0 in the infection zone (zone II; Fig. 6a–c) to 4.5–5.0 in mature fixing host cells (zone III; Fig. 6d–f). This high acidity of the PBS in zone III drastically decreased to a pH of 6.0–6.5 in senescent host cells (Fig. 6g–j). The transitory increase of PBS acidity through the differentiation of *S. meliloti* (zone II) to mature nitrogen-fixing symbiosomes (zone III) corroborate our observations of PBS acidification with DND-99, showing a similar retention of DND-99 in zones II and III but with a different level of PBS acidity between these two zones. Finally, the rapid increase of PBS pH in senescent infected cells measured with DND-160 (Fig. 6) reinforces and supports our observations regarding the loss of DND-99 retention in zone IV (Fig. 2). To get a better insight on this acidification process, we investigated the involvement of both plant and bacteroid partners by conducting pharmacological and genetic approaches using the DND-160 pH-sensitive probe.

Is establishment of a functional PBS pH gradient due to both symbiotic partners?

Previous *in vitro* data suggest that plant H$^+$-ATPase(s) localizes in the PBM, being also involved in PBS acidification by

© 2013 John Wiley & Sons Ltd, *Plant, Cell and Environment*

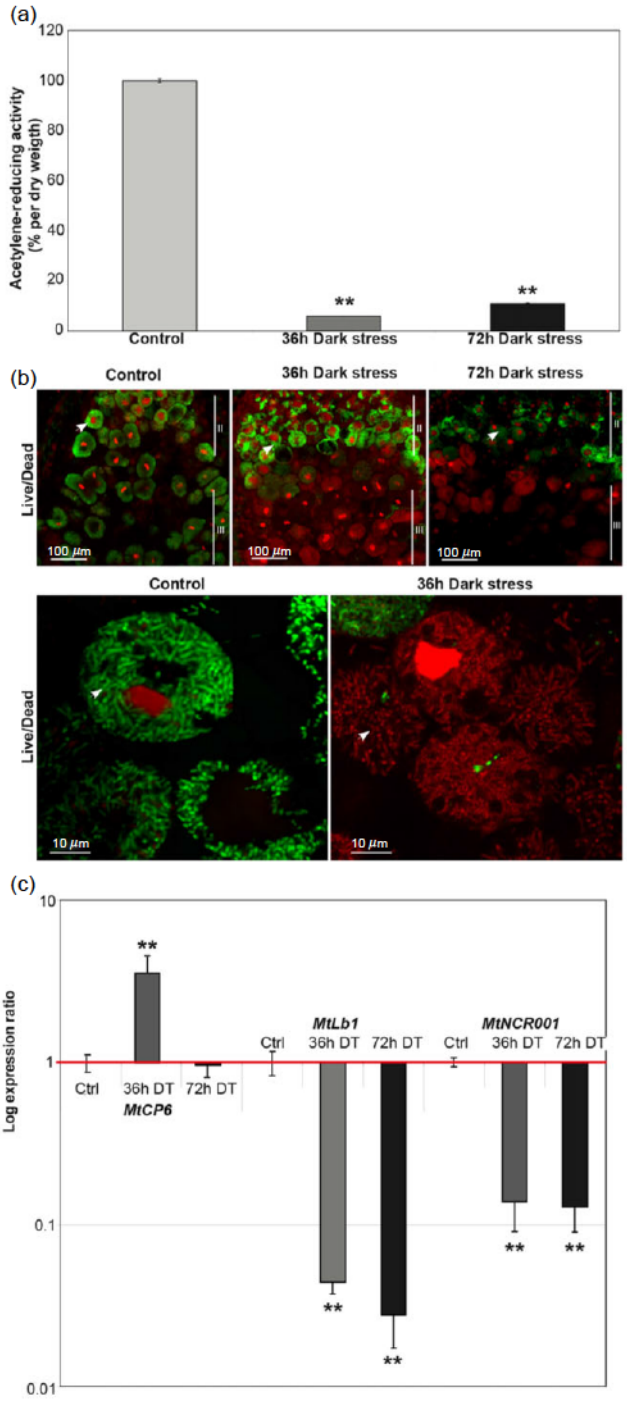


Figure 4. Dark treatment accelerates bacteroid senescence. (a) Dark treatment leads to a decrease in nodular N_2 fixation. Six weeks old mature nodules were dark stressed for 36 or 72 h, harvested and their acetylene-reducing activity was determined on two biological replicates. Error bars: standard error. Statistical analysis: $P < 0.001$, Kruskal–Wallis test. (b) Dark treatment induces a rapid bacteroid death of mature infected cells (zone III) but not of host cells undergoing infection (zone II). Confocal images of infected cells from dark-stressed and unstressed control plants. Six-week nodules were sectioned and stained with the Live/Dead probe, which is a mixture of the DNA intercalating dyes SYTO9 (green signal) and propidium iodide, PI (red signal). Living symbiosomes are SYTO9 labelled and dead symbiosomes accumulate the membrane impermeant PI. Enlarged images feature difference of viability of individual bacteroids within nodule infected cells in unstressed and 36 h dark-stressed nodules. White arrow: symbiosome. All images have been captured on mature nodule at 6 weeks post-inoculation. Scale bar: 10 μm. (c) Dark treatment induces rapid senescence of nodules. Expression of gene markers involved in nodule senescence *MtCP6* or in N_2-fixing nodule *MtLb1* (leghemoglobin-1 transcript) and *MtNCR001*, respectively. cDNA from control 6 weeks old nodules (Ctrl) and after 36 and 72 h of dark treatment (DT) were used for RT-qPCR gene expression analysis. Values were normalized with reference genes *Mtc27* and *RP40S*. Expression of the target gene in control (Ctrl) condition was used to define fold changes. PCR has been performed in triplicate on two biological replicates. Error bars: standard error. Statistical analysis performed with REST software: $P < 0.001$.

pumping protons from the plant cytoplasm into the PBS (Fedorova *et al.* 1999). However these observations remain to be determined *in vivo*. Using DND-99, we showed (Figs 2, 3, 5 & 6) that zone III PBS acidification and nodule function are interlocked processes. Before determining the symbiosome pH using the pH ratiometric DND-160 probe, we pretreated nodule sections with protonophore (FCCP) and inhibitors of both mitochondrial and bacteroid respiration (potassium cyanide and oligomycin). Furthermore, we investigated plant H^+-ATPase activity using specific inhibitors such as vanadate and bafilomycin. To support the implication of bacteroids in PBS acidification, we measured symbiosome pH in defective *nifH* bacteroids in which N_2 fixation is inefficient (Ruvkun *et al.* 1982; Maunoury *et al.* 2010). As a control, a membrane disruption driven by FCCP treatment led to proton leakage from their compartments resulting in an increase in one pH unit ($P < 0.01$, Kruskal–Wallis test) in symbiosomes (Fig. 7). A similar pH increase was observed after treatment with potassium cyanide, oligomycin, vanadate and bafilomycin but also in fully differentiated *nifH* symbiosomes.

DISCUSSION

High acidity in the peribacteroid space of mature bacteroids, a marker of functional symbiosis

In this study, we provided the first *in planta* evidence of the gradual acidification of the PBS throughout symbiosis using acidotropic fluorescent probes. We showed that within nodule host cells, the PBS is an acidic compartment with a pH value between 4.5 and 5.0. These data confirmed several previous *in vitro* analyses performed on extracts enriched in N_2 fixing bacteroids (Udvardi & Day 1989; Fougere & Le Rudulier 1990) highlighting a protomotive force on the PBM due to proton accumulation in the PBS (Corzo, Santamaria & Gutierrez-Navarro 1997). In zone III, the accumulation of protons in the PBS drives a protomotive force crucial for the uptake of osmoprotectants by bacteroids (Fougere & Le

© 2013 John Wiley & Sons Ltd, *Plant, Cell and Environment*

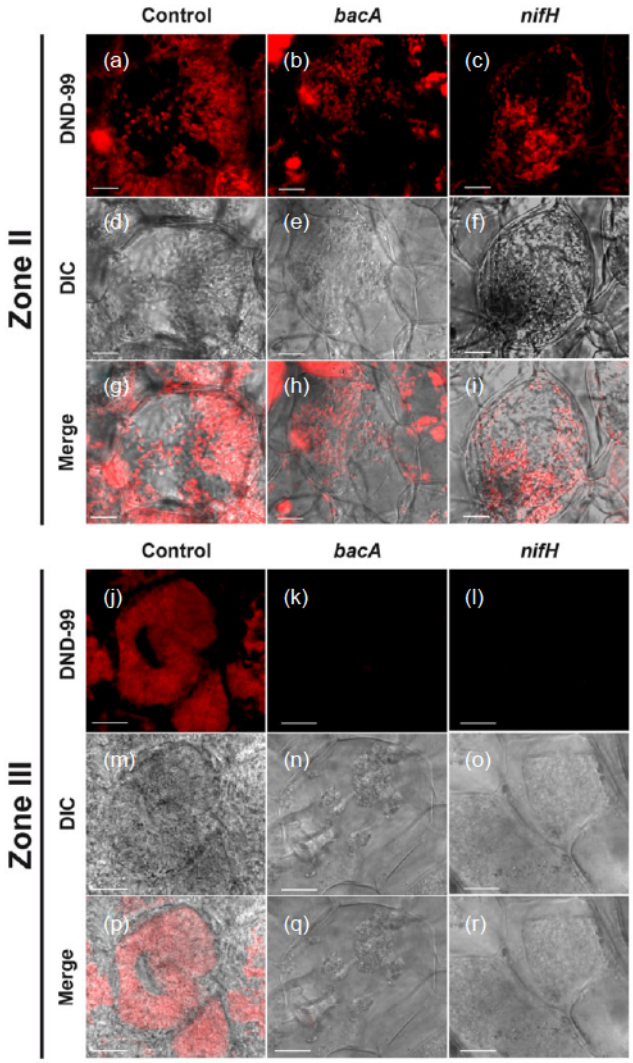


Figure 5. N_2 fixation defective *bacA* and *nifH S. meliloti* bacteroids feature an acidic PBS in infection zone (zone II) but this acidification is lost in zone III. *S. meliloti bacA* or *nifH* strains can both induce nodule formation but are unable to promote differentiation of N_2-fixing bacteroids, leading to non-functional nodules. Nodules were harvested 6 weeks post-inoculation with wild type or mutant *S. meliloti* strains, sectioned and stained with DND-99 to assess PBS acidity in infection zone (zone II) and N_2 fixation zone (zone III). (a–i) In infection zone (zone II), PBS acidification of *bacA* or *nifH* bacteroids was similar to that of wild-type bacteroids. (j–r) In N_2-fixing zone (zone III), PBS acidity was drastically decreased in either *bacA* or *nifH* bacteroids compared to wild-type nodule (control). Scale bar: 10 μm.

Rudulier 1990) and dicarboxylic acids such as malate (Corzo *et al.* 1997). Malate directly feeds the TCA cycle and thus supplies bacteroids with carbon substrates (Prell & Poole 2006). These previous *in vitro* experiments suggest that PBS acidification is essential for bacteroid functioning by providing the energy important for bacteroid respiration.

Our experimental approach allowed us to confirm and extend our knowledge of this symbiotic model regarding the acidification process of the PBS. Indeed, we measured the *in vivo* variations of PBS acidity throughout the whole symbiotic interaction, from the infection process and bacteroid differentiation in zone II through to bacteroid and host cell degradation in zone IV. We determined that while PBS pH remained acidic in zone II and zone III (Fig. 2), PBS acidification was drastically altered in senescent bacteroids (zone IV). The loss of acidity of the PBS during the transition of functional N_2 fixing bacteroids (zone III) to senescent bacteroids (zone IV) showed a correlation between N_2 fixing bacteroids and PBS acidity. Similar observations were obtained during nodule senescence driven by a carbohydrate deficiency induced by dark treatment (Fig. 3b), leading to disruption of the membrane integrity as revealed by PI staining of bacteroids (Fig. 4b). Disruption of membrane integrity occurs early in the symbiosome degradation process (Pladys & Rigaud 1985; Puppo, Herrada & Rigaud 1991). Similarly, except in the infection zone (zone II), no PBS acidification was observed in nodules promoted by impaired *S. meliloti* strains unable to fix atmospheric nitrogen such as *bacA* and *nifH* strains (Fig. 5). Thus, natural (Fig. 2) or stress-induced (Fig. 3b & 5b) alterations of N_2 fixation promote a loss of PBS acidity in zone III. Furthermore, the correlation between PBS acidification and nodule functioning is also supported by the *in vivo* quantification of PBS pH in senescent plant host cells (Fig. 6) as well as in fully differentiated *nifH* bacteroids (Fig. 7); the latter showing a strong alteration of PBS pH. The pH disruption in symbiosomes mediated by nitrogenase deficiency in *S. meliloti nifH* promoted nodules

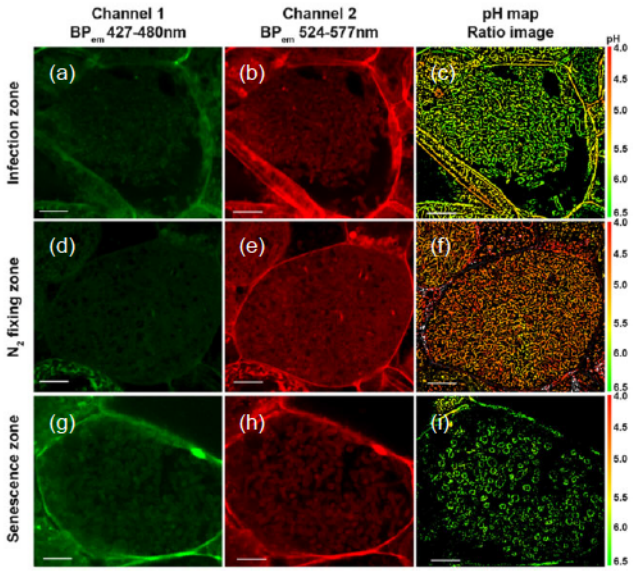


Figure 6. pH changes in PBS throughout symbiosis. DND-160 probe was excited with a 405 nm laser line and fluorescence emission was collected using 427–480 nm, channel 1 (a, d, g) and 524–577 nm, channel 2 (b, e, h) bandpass filters. Each image pixel from both channels was calculated using the ratiometric equation, producing a pseudo-coloured image ratio (c, f, i) mapping the pH between 4.0 and 6.5. pH values from peribacteroid space have been extracted from ratiometric image by applying a Laplacian filter using ImageJ software. Infection zone, zone II; N_2-fixing zone, zone III; senescence zone, zone IV. Scale bar: 10 μm.

© 2013 John Wiley & Sons Ltd, *Plant, Cell and Environment*

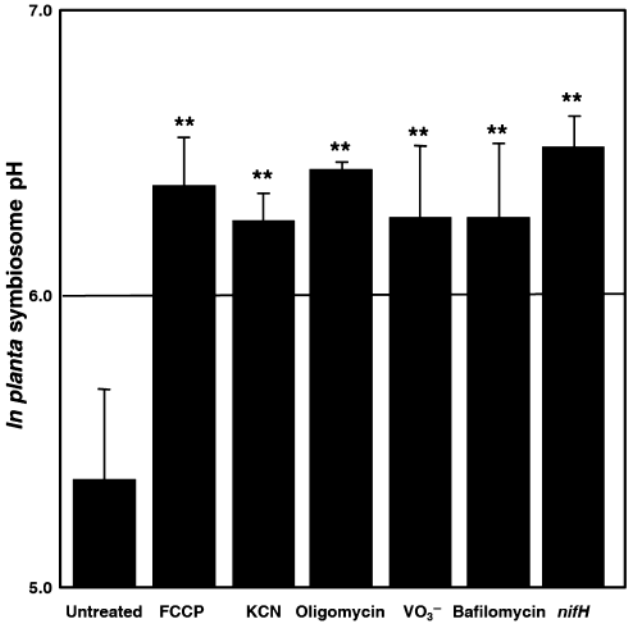


Figure 7. Inhibition of plant H^+-ATPase activity and disruption of bacteroid N_2 fixation alters pH of mature symbiosome (zone III). Nodule slices were incubated with different inhibitors: FCCP, a proton ionophore; potassium cyanide (KCN) and oligomycin, respectively, inhibitors of mitochondrial and bacteroid respiration; and orthovanadate (VO_3^-) and bafilomycin, inhibitors of H^+-ATPase activity. After incubation with inhibitors, tissue slices were washed and stained with the pH-sensitive probe DND-160 for ratiometric analysis, as described previously. Similarly, pH of mature symbiosomes was investigated in N_2 fixation defective nodule promoted by *S. meliloti nifH*. Ratiometric values were analysed using the ImageJ software. Statistical analysis: Kruskal–Wallis test with $P < 0.01$ (**).

(Ruvkun *et al*. 1982; Maunoury *et al*. 2010) was similar to the disruption of PBS acidification induced by either PBM permeabilization (FCCP) or inhibitors of both mitochondrial and bacteroid respiration (KCN, oligomycin). Previous *in vitro* studies on purified bacteroids already suggested that H^+-ATPase activity on the PBM is involved in pumping protons from the plant cytoplasm into the PBS indicating that plant H^+-ATPase activity is one of the key players in PBS acidification (Supporting Information Fig. S4; Udvardi & Day 1989; Szafran & Haaker 1995; Fedorova *et al*. 1999; Day *et al*. 2001). In agreement with these data, our findings on the inhibition of H^+-ATPase activity using vanadate and bafilomycin confirmed a similar decrease of PBS acidification (Fig. 7). In literature, it has been reported that, in zone III, PBS acidification drives a protomotive force ensuring the uptake of malate to feed bacteroids with carbon and energy, therefore conserving bacteroid function (Corzo *et al*. 1997; Prell & Poole 2006). Besides playing a role in altering PBS acidification promoted by natural (Figs 2 & 6) and stress-induced senescence (Fig. 3b) or by nitrogenase-defective bacteria (Figs 5b & 7), our data suggest that PBS acidification can be considered as an *in vivo* marker to assess nodule functioning in zone III.

PBS acidificatio precedes differentiation of functional bacteroids

We observed that in wild-type (Fig. 2), dark-stressed (Fig. 3a) and *nifH*-promoted nodules (Fig. 5a), the PBS of recently released bacteroids (zone II) remained acidic. PBS acidity is not altered in *bacA* bacteroids which are prematurely blocked in the differentiation process (Maunoury *et al*. 2010; Fig. 5a). These results suggest that, in zone II, PBS acidification is independent of bacteroid N_2 fixation and is initiated prior to bacteroid differentiation. This implies that this early PBS acidification may occur either during the release of bacteria from infection threads by an endocytosis-like process (Catalano *et al*. 2007; Limpens *et al*. 2009) and/or by fusion of the PBM with acidic cargo vesicles from the secretory pathway (Maunoury *et al*. 2010; Wang & Dong 2011). The localization of H^+-ATPase on the PBM of recently released bacteroids (zone II) of soybean nodules (Fedorova *et al*. 1999) suggests that the plant H^+-ATPase is one of the key players for an early acidification of the PBS to initiate malate and succinate uptake into bacteroids.

Bacteroid senescence, the dark side of PBS acidification

Furthermore, our data shed light on a possible role of PBS acidity in bacteroid senescence. Beyond 5 weeks post-inoculation, proximal nodule infected cells initiate a senescence process leading to an eventual complete degradation of bacteroids and nodule host cells (Puppo *et al*. 2005; Dupont *et al*. 2012). To understand the onset of the nodule senescence process, transcriptomic cDNA-AFLP analysis has been performed which identified a collection of differentially expressed genes (Van de Velde *et al*. 2006). Previous works suggest that key players of the degradation process may be cysteine proteases (Van de Velde *et al*. 2006; Perez Guerra *et al*. 2010) described as vacuole-specific proteins active at low pH (Muntz & Shutov 2002; Bosch *et al*. 2010). During the early steps of senescence, the PBM acquires vacuolar receptors (e.g. V-SNARE) (Limpens *et al*. 2009). V-SNAREs change PBM identity from a plasmic to a vacuolar identity. This new identity may allow docking of cargo vesicles aimed at the vacuole, ensuring the delivery of vacuolar proteases into the PBS. The acidic nature of the PBS may facilitate activation of these proteases, similar to a vacuole (Kuroyanagi, Nishimura & Hara-Nishimura 2002). Therefore, senescent symbiosomes become an acidic lytic compartment (Pladys & Vance 1993; Van de Velde *et al*. 2006), leading to membrane degradation and thus inducing a rapid neutralization of PBS pH (Fig. 6g–i).

In conclusion, the use of fluorescent acidotropic probes offers new prospects for *in planta* characterization of bacteroid physiology throughout the whole symbiotic process. Here, we highlighted the *in vivo* correlation between PBS acidification in mature fixing bacteroids (zone III) and nodule functioning. However, upon the onset of the senescence process, acidification of the PBS may promote activation of vacuolar proteases newly delivered into the PBS.

© 2013 John Wiley & Sons Ltd, *Plant, Cell and Environment*

The potential involvement of vacuolar cysteine proteases in *M. truncatula* nodule senescence has been reported (Van de Velde *et al.* 2006; Perez Guerra *et al.* 2010) as well as that of cysteine proteases, which are known to be activated at low pH (Muntz & Shutov 2002; Bosch *et al.* 2010). Therefore, PBS acidification may indirectly play a role in bacteroid degradation, which has been shown to be the first step in *M. truncatula* root nodule senescence (Van de Velde *et al.* 2006). We showed that *in vivo* PBS acidification is initiated before the completion of bacteroid differentiation (zone II; Figs 2 & 6). This early acidification of the PBS may be driven by H^+-ATPases just after bacteria are released within nodule host cells (Fedorova *et al.* 1999). Silencing of these H^+-ATPases by reverse genetics would help to elucidate the role of PBS acidification in bacteroid settlement and functioning within nodule host cells. Profound knowledge of the onset of PBS acidification and unravelling its precise roles in the physiology of symbiosomes will contribute to develop symbiosis-optimized legume crops to sustain a more profitable and environmentally friendly agriculture.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a doctoral fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, the Centre National de la Recherche Scientifique, the Institut National de la Recherche Agronomique and the Université de Nice-Sophia Antipolis.

REFERENCES

Benz R. (1988) Structure and function of porins from gram-negative bacteria. *Annual Review of Microbiology* **42,** 359–393.

Bhandari B. & Nicholas D.J. (1985) Proton motive force in washed cells of *Rhizobium japonicum* and bacteroids from *Glycine max*. *Journal of Bacteriology* **164,** 1383–1385.

Blumwald E., Fortin M.G., Rea P.A., Verma D.P. & Poole R.J. (1985) Presence of host-plasma membrane type H-ATPase in the membrane envelope enclosing the bacteroids in soybean root nodules. *Plant Physiology* **78,** 665–672.

Boisson-Dernier A., Chabaud M., Garcia F., Becard G., Rosenberg C. & Barker D.G. (2001) *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Medicago truncatula* for the study of nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations. *Molecular Plant-Microbe Interaction* **14,** 695–700.

Bosch M., Poulter N.S., Perry R.M., Wilkins K.A. & Franklin-Tong V.E. (2010) Characterization of a legumain/vacuolar processing enzyme and YVADase activity in *Papaver* pollen. *Plant Molecular Biology* **74,** 381–393.

Brewin N.J. (1991) Development of the legume root nodule. *Annual Review of Cell Biology* **7,** 191–226.

Catalano C.M., Czymmek K.J., Gann J.G. & Sherrier D.J. (2007) *Medicago truncatula* syntaxin SYP132 defines the symbiosome membrane and infection droplet membrane in root nodules. *Planta* **225,** 541–550.

Corzo J., Santamaria M. & Gutierrez-Navarro A.M. (1997) Transient energy coupling between rhizobia and legume cells mediated by the peribacteroid membrane ATPase proton pump. *Bioscience Reports* **17,** 389–400.

Day D.A., Poole P.S., Tyerman S.D. & Rosendahl L. (2001) Ammonia and amino acid transport across symbiotic membranes in nitrogen-fixing legume nodules. *Cellular and Molecular Life Sciences* **58,** 61–71.

Ditta G., Stanfield S., Corbin D. & Helinski D.R. (1980) Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **77,** 7347–7351.

Dupont L., Alloing G., Pierre O., El Msehli S., Hopkins J., Hérouart D. & Frendo P. (2012) The legume root nodule: from symbiotic nitrogen fixation to senescence. In *Senescence* (ed. T. Nagata) pp. 137–168. InTech, DOI: 10.5772/34438.

Favery B., Complainville A., Vinardell J.M., Lecomte P., Vaubert D., Mergaert P., Kondorosi A., Kondorosi E., Crespi M. & Abad P. (2002) The endosymbiosis-induced genes ENOD40 and CCS52a are involved in endoparasitic-nematode interactions in *Medicago truncatula*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **15,** 1008–1013.

Fedorova E., Thomson R., Whitehead L.F., Maudoux O., Udvardi M.K. & Day D.A. (1999) Localization of H^+-ATPases in soybean root nodules. *Planta* **209,** 25–32.

Fedorova M., van de Mortel J., Matsumoto P.A., Cho J., Town C.D., VandenBosch K.A., Gantt J.S. & Vance C.P. (2002) Genome-wide identification of nodule-specific transcripts in the model legume *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* **130,** 519–537.

Fougere F. & Le Rudulier D. (1990) Uptake of glycine betaine and its analogues by bacteroids of *Rhizobium meliloti*. *Journal of General Microbioly* **136,** 157–163.

Gage D.J. (2004) Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **68,** 280–300.

Gepts P., Beavis W.D., Brummer E.C., Shoemaker R.C., Stalker H.T., Weeden N.F. & Young N.D. (2005) Legumes as a model plant family. Genomics for food and feed report of the Cross-Legume Advances Through Genomics Conference. *Plant Physiology* **137,** 1228–1235.

Glazebrook J., Ichige A. & Walker G.C. (1993) A *Rhizobium meliloti* homolog of the Escherichia coli peptide-antibiotic transport protein SbmA is essential for bacteroid development. *Genes & Development* **7,** 1485–1497.

Haag A.F., Baloban M., Sani M., *et al.* (2011) Protection of *Sinorhizobium* against host cysteine-rich antimicrobial peptides is critical for symbiosis. *PLoS Biology* **9,** e1001169.

Haaker H., Szafran M., Wassink H., Klerk H. & Appels M. (1996) Respiratory control determines respiration and nitrogenase activity of *Rhizobium leguminosarum* bacteroids. *Journal of Bacteriology* **178,** 4555–4562.

Hardy R.W., Holsten R.D., Jackson E.K. & Burns R.C. (1968) The acetylene-ethylene assay for N_2 fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiology* **43,** 1185–1207.

Hirsch A.M., Bang M. & Ausubel F.M. (1983) Ultrastructural analysis of ineffective alfalfa nodules formed by *nif:Tn5* mutants of *Rhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology* **155,** 367–380.

Journet E.P., van Tuinen D., Gouzy J., *et al.* (2002) Exploring root symbiotic programs in the model legume *Medicago truncatula* using EST analysis. *Nucleic Acids Research* **30,** 5579–5592.

Kuroyanagi M., Nishimura M. & Hara-Nishimura I. (2002) Activation of *Arabidopsis* vacuolar processing enzyme by self-catalytic removal of an autoinhibitory domain of the C-terminal propeptide. *Plant & Cell Physiology* **43,** 143–151.

Lee C.C., Blank M.A., Fay A.W., Yoshizawa J.M., Hu Y., Hodgson K.O., Hedman B. & Ribbe M.W. (2009) Stepwise formation of P-cluster in nitrogenase MoFe protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106,** 18474–18478.

Limpens E., Ivanov S., van Esse W., Voets G., Fedorova E. & Bisseling T. (2009) *Medicago* N_2-fixing symbiosomes acquire the endocytic identity marker Rab7 but delay the acquisition of vacuolar identity. *The Plant Cell* **21,** 2811–2828.

Lin H.J., Herman P. & Lakowicz J.R. (2003) Fluorescence lifetime-resolved pH imaging of living cells. *Cytometry A* **52,** 77–89.

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

Matamoros M.A., Baird L.M., Escuredo P.R., Dalton D.A., Minchin F.R., Iturbe-Ormaetxe I., Rubio M.C., Moran J.F., Gordon A.J. & Becana M. (1999) Stress-induced legume root nodule senescence. Physiological, biochemical, and structural alterations. *Plant Physiology* **121,** 97–112.

Maunoury N., Redondo-Nieto M., Bourcy M., *et al.* (2010) Differentiation of symbiotic cells and endosymbionts in *Medicago truncatula* nodulation are coupled to two transcriptome-switches. *PLoS One* **5,** e9519.

Meade H.M., Long S.R., Ruvkun G.B., Brown S.E. & Ausubel F.M. (1982) Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* induced by transposon *Tn5* mutagenesis. *Journal of Bacteriology* **149,** 114–122.

Mellor R.B. (1989) Bacteroids in the *Rhizobium*-legume symbiosis inhabit a plant internal lytic compartment: implications for other microbial endosymbioses. *Journal of Experimental Botany* **40,** 831–839.

© 2013 John Wiley & Sons Ltd, *Plant, Cell and Environment*

Mergaert P., Nikovics K., Kelemen Z., Maunoury N., Vaubert D., Kondorosi A. & Kondorosi E. (2003) A novel family in *Medicago truncatula* consisting of more than 300 nodule-specific genes coding for small, secreted polypeptides with conserved cysteine motifs. *Plant Physiology* **132,** 161–173.
Muntz K. & Shutov A.D. (2002) Legumains and their functions in plants. *Trends in Plant Science* **7,** 340–344.
Nelson N. (1987) The vacuolar proton-ATPase of eukaryotic cells. *Bioessays* **7,** 251–254.
Otegui M.S., Noh Y.S., Martinez D.E., Vila Petroff M.G., Staehelin L.A., Amasino R.M. & Guiamet J.J. (2005) Senescence-associated vacuoles with intense proteolytic activity develop in leaves of *Arabidopsis* and soybean. *The Plant Journal* **41,** 831–844.
Ott T., van Dongen J.T., Gunther C., Krusell L., Desbrosses G., Vigeolas H., Bock V., Czechowski T., Geigenberger P. & Udvardi M.K. (2005) Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. *Current Biology* **15,** 531–535.
Ott T., Sullivan J., James E.K., Flemetakis E., Gunther C., Gibon Y., Ronson C. & Udvardi M. (2009) Absence of symbiotic leghemoglobins alters bacteroid and plant cell differentiation during development of *Lotus japonicus* root nodules. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22,** 800–808.
Perez Guerra J.C., Coussens G., De Keyser A., De Rycke R., De Bodt S., Van De Velde W., Goormachtig S. & Holsters M. (2010) Comparison of developmental and stress-induced nodule senescence in *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* **152,** 1574–1584.
Pfaffl M.W., Horgan G.W. & Dempfle L. (2002) Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research* **30,** e36.
Pladys D. & Rigaud J. (1985) Senescence in French-bean nodules: occurrence of different proteolytic activities. *Physiologia Plantarum* **63,** 43–48.
Pladys D. & Vance C.P. (1993) Proteolysis during development and senescence of effective and plant gene-controlled ineffective alfalfa nodules. *Plant Physiology* **103,** 379–384.
Pocard J.A., Vincent N., Boncompagni E., Smith L.T., Poggi M.C. & Le Rudulier D. (1997) Molecular characterization of the *bet* genes encoding glycine betaine synthesis in *Sinorhizobium meliloti* 102F34. *Microbiology* **143,** 1369–1379.
Prell J. & Poole P. (2006) Metabolic changes of rhizobia in legume nodules. *Trends in Microbiology* **14,** 161–168.
Puppo A., Dimitrijevic L. & Rigaud J. (1982) Possible involvement of nodule superoxide dismutase and catalase in leghemoglobin protection. *Planta* **156,** 374–379.
Puppo A., Herrada G. & Rigaud J. (1991) Lipid peroxidation in peribacteroid membranes from French-bean nodules. *Plant Physiology* **96,** 826–830.
Puppo A., Groten K., Bastian F., Carzaniga R., Soussi M., Lucas M.M., de Felipe M.R., Harrison J., Vanacker H. & Foyer C.H. (2005) Legume nodule senescence: roles for redox and hormone signalling in the orchestration of the natural aging process. *The New Phytologist* **165,** 683–701.
Roth L.E. & Stacey G. (1989) Bacterium release into host cells of nitrogen-fixing soybean nodules: the symbiosome membrane comes from three sources. *European Journal of Cell Biology* **49,** 13–23.
Ruvkun G.B., Sundaresan V. & Ausubel F.M. (1982) Directed transposon Tn5 mutagenesis and complementation analysis of *Rhizobium meliloti* symbiotic nitrogen fixation genes. *Cell* **29,** 551–559.
Sayers E.W., Barrett T., Benson D.A., *et al.* (2011) Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research* **2011,** 13–25.
Szafran M.M. & Haaker H. (1995) Properties of the peribacteroid membrane ATPase of pea root nodules and its effect on the nitrogenase activity. *Plant Physiology* **108,** 1227–1232.
Truchet G. & Coulomb P. (1973) Evidence for the evolution of a phytolysosomal system in various parts of the cells of the radical nodules of the pea (*Pisum sativum* L. *Journal of Ultrastructure Research* **43,** 36–57.
Udvardi M.K. & Day D.A. (1989) Electrogenic ATPase activity on the peribacteroid membrane of soybean (*Glycine max* L.) root nodules. *Plant Physiology* **90,** 982–987.
Van de Velde W., Guerra J.C., De Keyser A., De Rycke R., Rombauts S., Maunoury N., Mergaert P., Kondorosi E., Holsters M. & Goormachtig S. (2006) Aging in legume symbiosis. A molecular view on nodule senescence in *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* **141,** 711–720.
Van de Velde W., Zehirov G., Szatmari A., *et al.* (2010) Plant peptides govern terminal differentiation of bacteria in symbiosis. *Science* **327,** 1122–1126.
Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A. & Speleman F. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* **3,** research0034.0031–research0034.0011.
Vauclare P., Bligny R., Gout E., De Meuron V. & Widmer F. (2010) Metabolic and structural rearrangement during dark-induced autophagy in soybean (*Glycine max* L.) nodules: an electron microscopy and 31P and 13C nuclear magnetic resonance study. *Planta* **231,** 1495–1504.
Verma D.P. & Hong Z. (1996) Biogenesis of the peribacteroid membrane in root nodules. *Trends in Microbiology* **4,** 364–368.
Wang D. & Dong X. (2011) A highway for war and peace: the secretory pathway in plant-microbe interactions. *Molecular Plant* **4,** 581–587.
Whitehead L.F. & Day D.A. (1997) The peribacteroid membrane. *Physiologia Plantarum* **100,** 30–44.

Received 5 October 2012; received in revised form 27 March 2013; accepted for publication 2 April 2013

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site:

Figure S1. Confocal imaging of bacteroids by DNA counterstaining. (a) Bacteroid morphology visualized by SYTO9 or (b) by differential interference of contrast (DIC). (c) Merged SYTO9 and DIC images. Scale bars: 5 μm.

Figure S2. Dark treatment decreases symbiosome viability. Nodule sections were prepared as previously described in figure 4b. Ratio plot SYTO9/PI integrated surface signal intensity (ISSI) of control and dark treated (36 h) plants. In brackets: number of analysed nodule slices. Statistical analysis: $p < 0.001$, Mann-Witney U test. Error bars: Standard deviation.

Figure S3. PBS acidification is not maintained after release of bacteroids (zone II) in *bacA* or *nifH* impaired nodules. *S. meliloti bacA* or *nifH* strains can both induce nodule organogenesis but cannot promote differentiation of nitrogen fixing bacteroids leading to non-functioning nodules. Six weeks post-inoculation with wild type or mutant *S. meliloti* strains, nodules were harvested, sectioned and stained with DND-99 to investigate PBS acidity. On control nodule are indicated the meristematic zone (*), infection zone (II), N2. Scale bar: 100 μm.

Figure S4. pH calibration curve for fluorescence ratios using ratiometric probe DND-160. Ratio plot calibration of DND-160 fluorescence for both 427–480 nm (Ch1) and 524–577 nm (Ch2) emission bandpass filters. Each ratio value, from two independent replicates, was assigned a specific colour to map the pH of symbiosomes in infected cells (Figure 6). Error bars: Standard deviation.

Figure S5. Schematic representation of DND-99 retention in an acidic PBS and inhibitor sites of action in symbiosomes. DND-99 diffuses freely across membranes but upon its protonation in an acidic environment DND-99 becomes impermeant and accumulates in the PBS. On the plant side, H^+-ATPase activity on PBM participates in H^+ pumping into the PBS and is specifically inhibited by VO_3^- or bafilomycin. On the bacteroid side, an electrochemical gradient is generated by H^+ pumping at the different sites of the ETC. KCN is a specific inhibitor of cytochrome c oxidase of both

© 2013 John Wiley & Sons Ltd, *Plant, Cell and Environment*

mitochondrial and bacteroid ETC. ATP is synthesized due to bacteroid H^+-ATP synthase activity, which provides ATP for nitrogenase activity inside the bacteroid. Specific inhibition of H^+-ATP synthase is done using oligomycin, FCCP acts as an H^+ ionophore, uncoupling proton pumping from ATP synthesis. DH, NADH dehydrogenase; Q, ubiquinone; Cyt, cytochrome; PBM, peribacteroid membrane; PBS, peribacteroid space; ETC, electron transfer chain.

Table S1. Primer list used to quantify gene expression levels by RT-qPCR.

© 2013 John Wiley & Sons Ltd, *Plant, Cell and Environment*

Figure S1

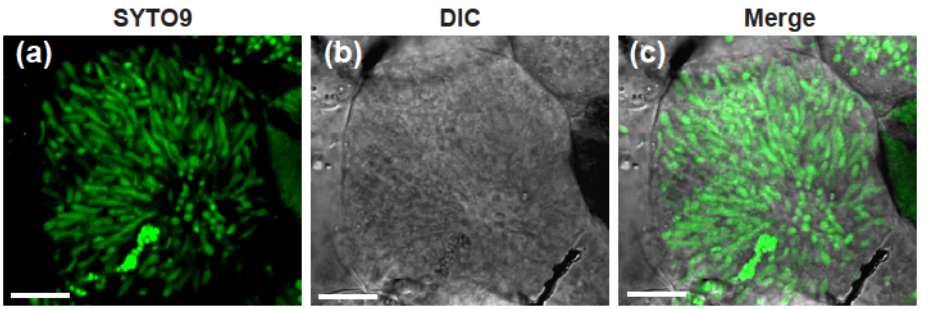


Figure S1: Confocal imaging of bacteroids by DNA counterstaining
(a) Bacteroid morphology visualized by SYTO9 or **(b)** by DIC (Differential Interference of Contrast). **(c)** Merged of SYTO9 and DIC images. Scale bars: 5µm.

Figure S2

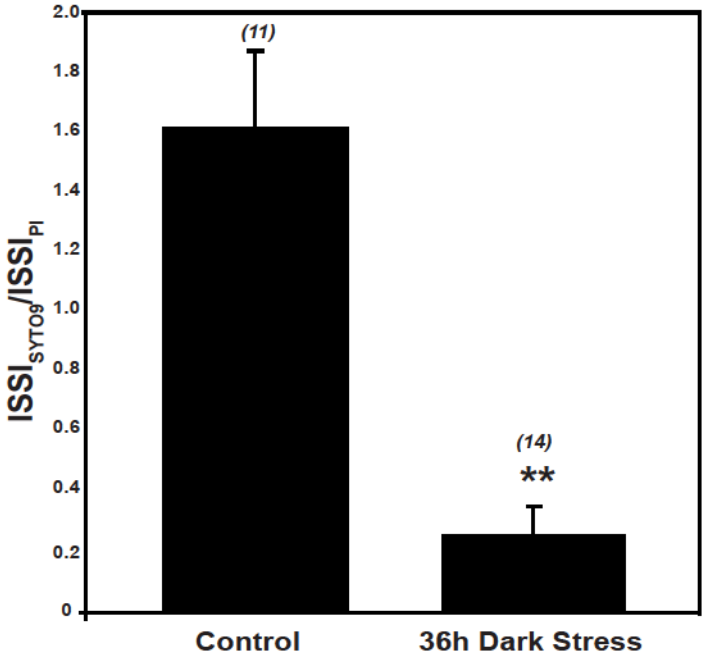


Figure S2: Dark treatment decreases symbiosome viability.

Nodule sections were prepared as previously described in figure 4b. Ratio plot of SYTO9/PI integrated surface signal intensity (ISSI) of control and dark treated (36h) plants. In brackets: number of analysed nodule slices. Statistical analysis: $p<0.001$, Mann-Witney U test. Error bars: Standard deviation.

Figure S3

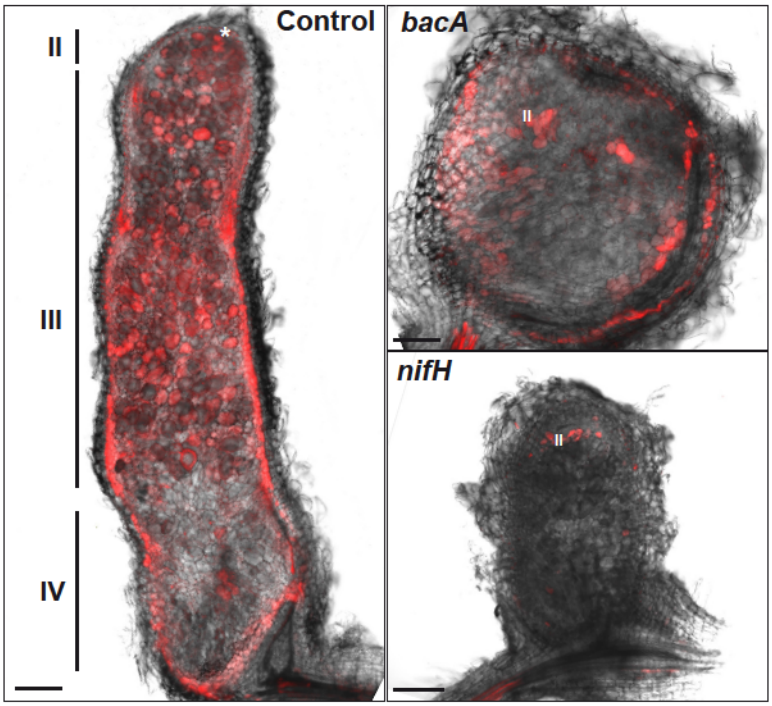


Figure S3: PBS acidification is not maintained after release of bacteroids (zone II) in *bacA* or *nifH* impaired nodules.
S. meliloti bacA or *nifH* strains can both induce nodule organogenesis but cannot promote differentiation of nitrogen fixing bacteroids leading to non-functioning nodules. Six weeks post-inoculation with wild type or mutant *S. meliloti* strains, nodules were harvested, sectioned and stained with DND-99 to investigate PBS acidity. On control nodule are indicated the meristematic zone (*), infection zone (II), N_2 fixation zone (III) and senescent zone (IV). Scale bar: 100 µm.

Figure S4

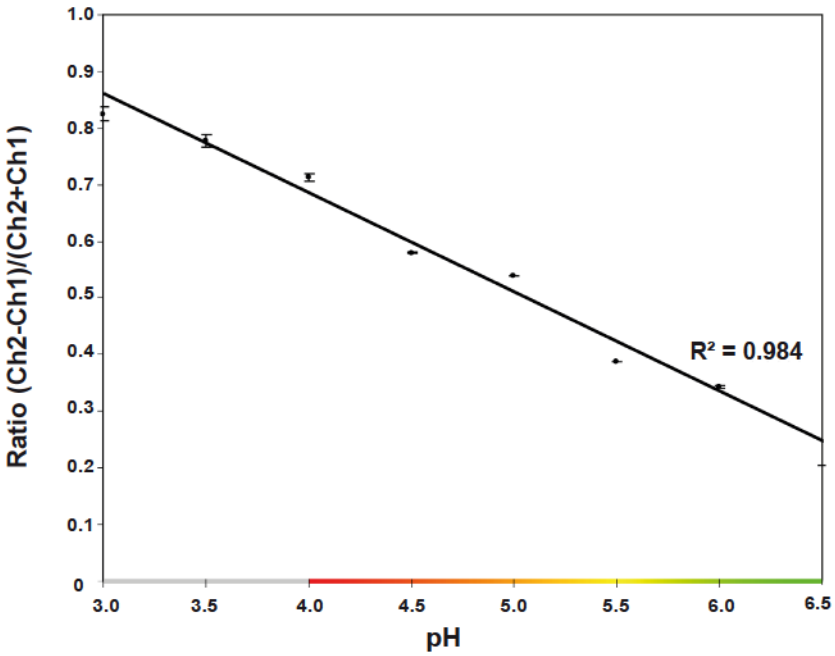


Figure S4: pH calibration curve for fluorescence ratios using ratiometric probe DND-160.
Ratio plot calibration of DND-160 fluorescence for both 427-480nm (Ch1) and 524-577nm (Ch2) emission bandpass filters. Each ratio value, from two independent replicates, was assigned a specific colour to map the pH of symbiosomes in infected cells (Figure 6). Error bars: Standard deviation.

Figure S5

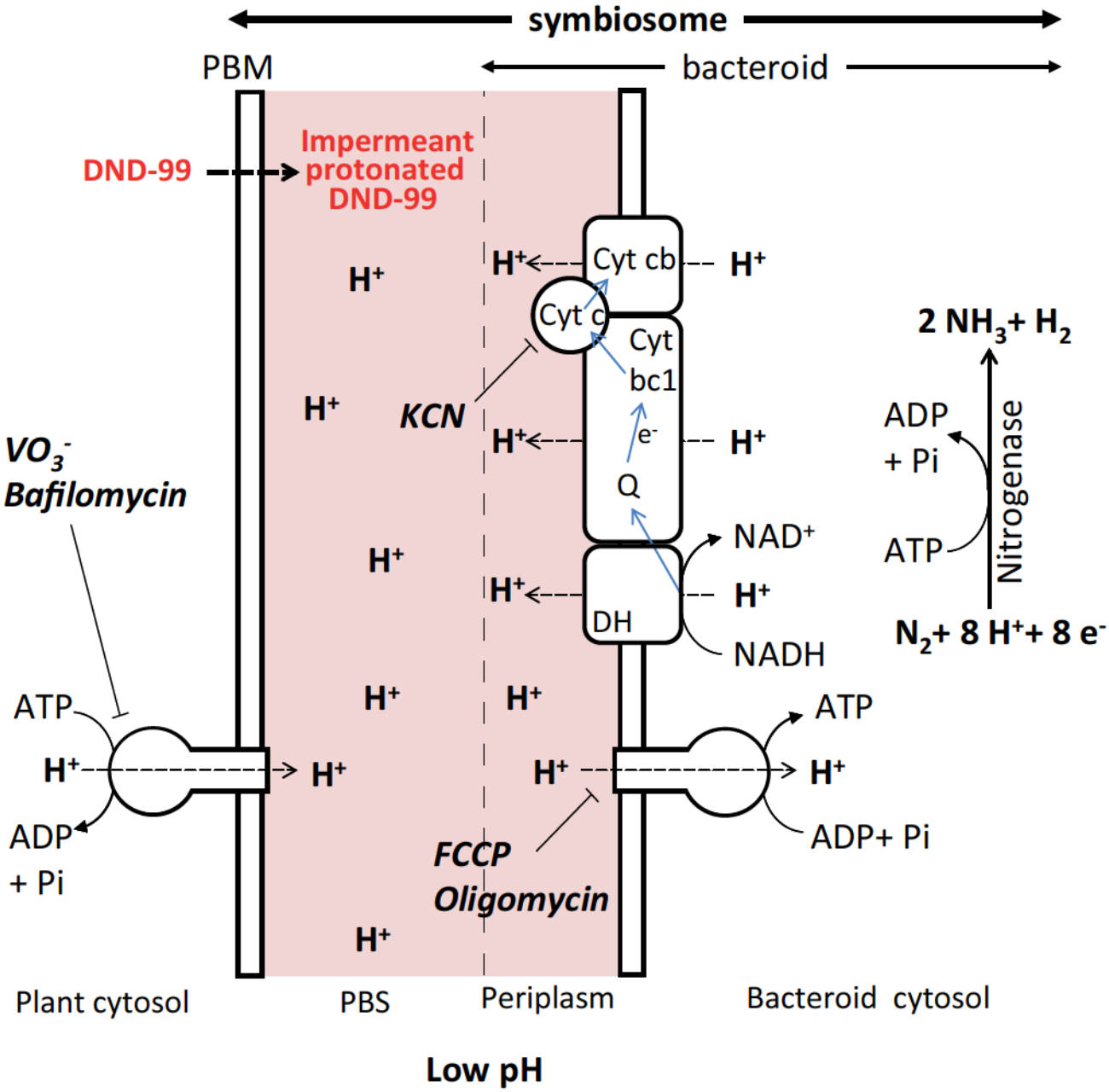


Figure S5: Schematic representation of DND-99 retention in an acidic PBS and inhibitor sites of action in symbiosomes.

DND-99 diffuses freely across membranes but upon its protonation in an acidic environment DND-99 become impermeant and accumulates in the PBS. On the plant side, H^+-ATPase activity on PBM participates in H^+ pumping into the PBS and is specifically inhibited by VO_3^- or bafilomycin. On the bacteroid side, an electrochemical gradient is generated by H^+ pumping at the different sites of the ETC. KCN is a specific inhibitor of cytochrome c oxidase of both mitochondrial and bacteroid ETC. ATP is synthesized due to bacteroid H^+-ATP synthase activity and provides ATP for nitrogenase activity inside bacteroid. Specific inhibition of H^+-ATP synthase is done using oligomycin. FCCP act as an H^+ ionophore uncoupling proton pumping from ATP synthesis. DH, NADH dehydrogenase; Q, ubiquinone; Cyt, cytochrome; PBM, peribacteroid membrane; PBS, peribacteroid space, ETC, electron transfer chain.

Table S1

	Forward Primer	Reverse Primer
MtLb1	ATAGCTCATATGAGGCATTCAA	GAGTTGAGGACTATCTTGTACT
MtNCR001	CACTTCTGACGCTAACTG	TGAACCTTCAATATACCACC
MtCP6	CCTGCTGCTACTATTGCTGGATATG	CACTCGCATCAATGGCTACGG
MtMtc27	TTACTCGAGAGTTGAGACTATG	TCAAACCTGACAACTGACATTC
MtRP40S	TTGTCCAAGTTTGATGCTGCAC	TCCTACCAACTTCAAAACACCG

Table S1: Primer list used to quantify gene expression levels by RT-qPCR.

I.2.B Discussion

Cette étude a permis de mettre en évidence *in planta* l'acidification progressive et transitoire de l'espace péribactéroïdien (PBS) au cours du processus symbiotique, du relargage des bactéroïdes en zone II jusqu'au début de la zone IV, exclue. Le pH du PBS diminue de 5,5-6,0 en zone II, à 4,5-5,0 en zone III. Cette acidification du PBS est toutefois perdue (pH = 6.0-6.5) dès la mise en place de la zone IV. Cette forte acidité en zone III semble être corrélée au fonctionnement de la nodosité. En effet, cette acidité du PBS des bactéroïdes de zone III est altérée dès la mise en place d'une sénescence nodositaire développementale (zone IV) ou induite par un traitement à l'obscurité des plantes nodulées. De même, l'acidification en zone III du PBS de bactéroïdes issus des souches de *S. meliloti* défectives pour la fixation d'azote (*bacA* et *nifH*) n'est pas maintenue. Ainsi, en zone III, l'acidité du PBS peut être considérée comme un marqueur du fonctionnement des bactéroïdes et donc, par extension, de la fixation d'azote.

La détermination de l'origine de l'acidité du PBS en zone III pourrait permettre d'expliquer sa corrélation avec le fonctionnement des bactéroïdes. En effet, si la présence d'H^+-ATPase sur la membrane péribactéroïdienne (PBM) a été démontrée au niveau de la zone II (Fedorova et al., 1999), elle ne l'a pas été sur des symbiosomes de zone III. Cependant, l'activité H^+-ATPase a été démontrée comme essentielle à l'import d'osmoprotectants et d'acides dicarboxiliques (Day et al., 2001; Fougere & Le Rudulier, 1990). L'acidification du PBS

dépendrait également du métabolisme énergétique du bactéroïde et notamment de sa respiration (Bhandari & Nicholas, 1985). L'absence sur le marché d'inhibiteur spécifique de la chaîne respiratoire procaryotique nous a empêché de confirmer ou non cette hypothèse, *in vivo*. L'utilisation de souches mutantes de *S. meliloti* présentant une respiration « atténuée » permettrait de vérifier cette hypothèse. Différentes souches présentant un tel phénotype sont disponibles, dont la souche mutante de *S. meliloti cycH*, présentant un gène invalidé au niveau des étapes terminales de la biosynthèse du cytochrome c impliqué dans la chaine respiratoire (Cinege et al., 2004). *S. meliloti cycH* est capable de noduler *M. sativa*, et génère des bactéroïdes non fixateurs d'azote (Cinege et al., 2004). Reste à déterminer l'évolution de l'acidité du PBS de ces bactéroïdes *cycH*.

Nos données *in planta* concernant l'acidité du PBS, sont en accord avec le modèle de fonctionnement des symbiosomes au sein des cellules hôtes de la nodosité. Différentes analyses *in vitro* menées sur des bactéroïdes fixateurs purifiés (Fougere & Le Rudulier, 1990; Udvardi & Day, 1989) ont mis en évidence l'existence d'une force protomotrice au travers de la PBM. Cette force protomotrice s'avère nécessaire pour l'import d'osmoprotectants (Fougere & Le Rudulier, 1990) et d'acides dicarboxyliques (Day et al., 2001), principalement de malate alimentant directement ou indirectement le cycle de Krebs des bactéroïdes. Ainsi, le rôle crucial de cette force protomotrice dans le fonctionnement des bactéroïdes expliquerait la corrélation entre la forte acidification du PBS observée en zone III et la fixation d'azote des bactéroïdes. Cette corrélation est de plus étayée par la perte d'acidification des bactéroïdes matures invalidés pour l'activité nitrogénase (*nifH*).

Cependant, l'implication de cette forte acidité du PBS des bactéroïdes de zone III pourrait ne pas se limiter uniquement à l'import de malate et d'osmoprotectants (Day et al., 2001; Fougere & Le Rudulier, 1990). En effet, cette acidité du PBS en zone III pourrait participer comme force protomotrice à l'export d'ammonium du bactéroïde vers la plante hôte. L'activité nitrogénase réduit le diazote atmosphérique en ammoniaque qui diffuse passivement au travers des membranes bactéroïdiennes arrivant dans l'environnement acide du PBS où il est réduit en ammonium. L'ammonium étant trop polaire pour diffuser au travers des membranes, celui-ci serait exporté via un transporteur du PBS vers le cytoplasme de la cellule hôte végétale (Oldroyd et al., 2011). Un tel transporteur a été identifié sur les symbiosomes de *Bradyrhizobium japonicum* (Kaiser et al., 1998), mais son mécanisme moléculaire reste encore inconnu et son rôle en tant que transporteur est controversé (Marini et al., 2000).

L'acidification progressive du PBS entre la zone II et la zone III pourrait également moduler l'activité de protéines bactériennes et végétales présentes dans cet espace ou adsorbées du côté du PBS de la PBM (Catalano et al., 2004; Panter et al., 2000; Wienkoop & Saalbach, 2003). Une diminution de deux unités pH, observée entre la zone II et la zone III, conduit à augmenter d'un facteur 100 la concentration en proton dans l'espace péribactéroïdien, ce qui tend à la protonation des protéines présentes. Si la protonation n'a longtemps pas été considérée comme une modification post-traductionnelle, son rôle en tant que régulateur de la conformation, de l'activité, mais également de la localisation de protéines, dites sensibles au pH, est de plus en plus reconnue (Schonichen et al., 2013). Chez les animaux, la protonation à pH acide de certains acides aminés clefs conduits à limiter la formation de la

forme virulente de la protéine à prion PrP responsable de la maladie de Creutzfeld-Jacob. De mêm elle diminue l'affinité du domaine PH de la protéine Dbl pour certains phosphoinositides membranaires, une protéine GEF activatrice de la Rho GTPase cdc42, conduisant à relocaliser Db1 de la membrane plasmique vers le cytoplasme. Enfin, l'activité de la pompe à proton M2 présente sur la membrane du virus *Influenza* est modulée par l'état de protonation de ces monomères M2 (Schonichen et al., 2013). Une telle acidification du PBS entre la zone II et la zone III pourrait ainsi conduire à moduler l'activité de certaines protéines localisées au niveau du PBS ou du feuillet interne de la PBM.

Si l'acidification du PBS est essentielle au maintien de l'interaction symbiotique en permettant l'import de substrats carbonés, cette acidification pourrait indirectement participer à l'induction du processus de sénescence. En effet, au-delà de 5 semaines post-inoculation, un processus de sénescence est initié au niveau proximal de la nodosité (Puppo et al., 2005; Van de Velde et al., 2006). L'analyse transcriptomique menée par cDNA-AFLP par Van de Velde et coll. (2006) a identifié 508 gènes différentiellement exprimés, parmi lesquels des protéases dont des cystéine protéases sont induites. Protéases qui pour certaines (Papain-like protéases) seraient potentiellement adressées à la vacuole, où l'environnement acide permettrait leurs autoactivation (Bosch et al., 2010; Muntz & Shutov, 2002). Lors des étapes précoces de la sénescence, la PBM acquiert des récepteurs vacuolaires (V-SNARE) qui changent l'identité plasmique de la PBM (Catalano et al., 2007) en une identité vacuolaire (Limpens et al., 2009). Cette nouvelle identité permettrait la fusion de vésicules cargos adressées à la vacuole qui délivreraient ainsi, lors de la mise en place de la sénescence nodositaire, des protéases

vacuolaires dans le PBS ; protéases qui trouveraient dans le PBS un pH acide propice à leur activation (Hara-Nishimura & Hatsugai, 2011; Martinez et al., 2012), induisant ainsi la dégradation des symbiosomes.

II. IMPLICATION DES CYSTEINE PROTEASES *MT*CP6 ET *MT*VPE DANS LE PROCESSUS DE SENESCENCE NODOSITAIRE

II. 1 INTRODUCTION

La nodosité développe au niveau de la zone III, un environnement propice à la réduction du diazote atmosphérique par son hôte *S. meliloti*, différentié en bactéroïde fixateur. En effet, la plante met en place un environnement microoxique et fournit aux bactéroïdes des photosynthétats comme source de carbone pour son métabolisme énergétique, assurant ainsi la réduction du diazote atmosphérique chez *S. meliloti* puis son export vers les autres tissus de la plante sous forme d'ammonium puis d'asparagine et de glutamine.

Cependant, cet équilibre symbiotique n'est pas pérenne du fait de la mise place, à partir de la sixième semaine post-inoculation et au niveau de la partie proximale de la nodosité d'un processus de dégradation qui induit la lyse des bactéroïdes et des cellules végétales, conduisant à terme à la mise en place d'une zone IV dite de sénescence au niveau proximal de la nodosité (Puppo et al., 2005; Van de Velde et al., 2006). Actuellement, le processus contrôlant la transition d'une zone III fixatrice vers une zone IV sénescente est encore mal caractérisé.

Cependant, une des caractéristiques du processus de sénescence nodositaire est l'augmentation de l'activité protéolytique au sein de la nodosité (Malik et al., 1981; Pladys & Vance, 1993). Parmi ces activités protéolytiques des activités cystéine protéases ont été

observées dans différents modèles végétaux comme les nodosités de soja (Alesandrini et al., 2003), de pois (Kardailsky & Brewin, 1996), mais aussi de *M. truncatula* (Fedorova et al., 2002). De plus, la diminution ubiquitaire de l'expression des transcrits de la cystéine protéase *AsNodf32* par ARNi dans l'ensemble de la plante, conduit à retarder la sénescence nodositaire de l'astragale, ce qui suggère un rôle crucial de cette cystéine protéase dans le processus de sénescence nodositaire (Li et al, 2008). Pour mieux comprendre la mise en place du processus de sénescence, une analyse par cDNA-AFLP a été entreprise, qui après section transversale des nodosités de *M. truncatula*, a comparé les différentiels d'expression des gènes de la partie apicale fixatrice par rapport à celle de la zone proximale sénescente (Van de Velde et al., 2006). Cette approche a permis d'identifier 508 gènes différentiellement exprimés montrant l'induction de cystéine protéases et mettant en lumière deux cystéine protéases appartenant à deux familles distinctes de protéases, *Mt*CP6 et *Mt*VPE, (Van de Velde et al, 2006). Ces deux cystéine protéases sont également induites lors de la sénescence nodositaire induite par un traitement à l'obscurité (Perez Guerra et al., 2010).

Ainsi, pour déterminer l'implication de ces deux cystéine protéases dans le processus de sénescence, différentes approches histologiques, cytologiques et de génétique inverses à l'aide d'un promoteur spécifique du processus de sénescence ont été conduite. Ces approches nous ont permis de déterminer le rôle de ces protéases, mais également leurs localisations subcellulaires. Enfin, la caractérisation biochimique de ces deux protéases a été réalisée afin de confirmer l'identité cystéine protéase d'MtCP6 et MtVPE.

New Phytologist

Involvement of papain and legumain proteinase in the senescence process of Medicago truncatula nodules.

Journal:	*New Phytologist*
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	MS - Regular Manuscript
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Pierre, Olivier; INRA 1355-CNRS 7254-Université de Nice-Sophia Antipolis (UNS) -400 route des Chappes BP 167, Institut Sophia Agrobiotech Hopkins, Julie; Institut Agrobiotech, UMR IBSV; INRA 1355-CNRS 7254-Université de Nice-Sophia Antipolis (UNS) -400 route des Chappes BP 167, Institut Sophia Agrobiotech Combier, Maud; INRA 1355-CNRS 7254-Université de Nice-Sophia Antipolis (UNS) -400 route des Chappes BP 167, Institut Sophia Agrobiotech Baldacci-Cresp, Fabien; INRA 1301/CNRS 6243/Université de Nice – Sophia Antipolis, Interactions Biotiques et Santé Végétale; INRA 1355-CNRS 7254-Université de Nice-Sophia Antipolis (UNS) -400 route des Chappes BP 167, Institut Sophia Agrobiotech Engler, Gilbert; INRA 1355-CNRS 7254-Université de Nice-Sophia Antipolis (UNS) -400 route des Chappes BP 167, Institut Sophia Agrobiotech Brouquisse, Renaud; INRA 1355-CNRS 7254-Université de Nice-Sophia Antipolis (UNS) -400 route des Chappes BP 167, Institut Sophia Agrobiotech Herouart, Didier; INRA 1355-CNRS 7254-Université de Nice-Sophia Antipolis (UNS) -400 route des Chappes BP 167, Institut Sophia Agrobiotech; Institut Agrobiotech, UMR IPMSV Boncompagni, Eric; INRA 1355-CNRS 7254-Université de Nice-Sophia Antipolis (UNS) -400 route des Chappes BP 167, Institut Sophia Agrobiotech
Key Words:	Medicago truncatula, Sinorhizobium meliloti, nodule, senescence, papain, legumain, nitrogen-fixing symbiosis, confocal microscopy

SCHOLARONE™
Manuscripts

Involvement of papain and legumain proteinase in the senescence process of *Medicago truncatula* nodules.

Running title: Cysteine proteases and root nodule senescence.

Authors

Olivier PIERRE[1,2,3], Julie HOPKINS[1,2,3],Maud COMBIER[1,2,3], Fabien BALDACCI[1,2,3], Gilbert ENGLER[1,2,3], Renaud BROUQUISSE[1,2,3], Didier HÉROUART[1,2,3] and Eric BONCOMPAGNI[1,2,3]

Addresses

[1] UMR INRA 1355, Institut Sophia Agrobiotech (ISA), 400 route des Chappes, BP167, F9 06903 Sophia9Antipolis cedex, France

[2] CNRS 7254, Institut Sophia Agrobiotech (ISA), 400 route des Chappes, BP167, F906903 Sophia9Antipolis cedex, France

[3] Université de Nice9Sophia Antipolis, Institut Sophia Agrobiotech (ISA), 400 route des Chappes, BP167, F906903 Sophia9Antipolis cedex, France

Author for correspondence

Eric BONCOMPAGNI

Tel : +33 492 386 634 ; Fax : +33 492 386 587

Email : boncompa@unice.fr

For Peer Review

Word counts:

6461words (Introduction, 993; Materials and Methods, 1550; Results, 2368; Discussion, 1522; Acknowledgements, 28).

9 Figures. And supporting information: 2 Tables and 3 Figures.

For Peer Review

SUMMARY

- The symbiotic interaction between legumes and Rhizobiaceae leads to the formation of new root organs called nodules. Within the nodule, Rhizobiaceae differentiate into nitrogen-fixing bacteroids. However, this symbiotic interaction is time limited due to the initiation of a senescence process leading to a complete degradation of bacteroids and plant cells. The increase in proteolytic activities is one of the key features of this process. Here, we analyzed the importance of two cysteine proteinases, *Mt*CP6 and *Mt*VPE, in the senescence process of *Medicago truncatula* nodules.
- Spatialtemporal expression of *Mt*CP6 and *Mt*VPE was investigated using promoter-GUS fusions. Corresponding gene inductions were observed during both developmental and stress-induced nodule senescence. Both *Mt*CP6 and *Mt*VPE proteolytic activities were increased during stress-induced senescence.
- Downregulation of both proteinases mediated by RNAi in the senescence zone delayed nodule senescence and increased nitrogen fixation, whilst their early expression promoted nodule senescence.
- Using GFP fusions, *in vivo* confocal imaging showed that both proteinases were delivered into the vacuole of uninfected cells or the symbiosomes of infected cells. These data demonstrate the crucial role of *Mt*CP6 and *Mt*VPE in the onset of nodule senescence.

Keywords: *Medicago truncatula*, *Sinorhizobium meliloti*, nodule, senescence, papain, legumain, nitrogen-fixing symbiosis, confocal microscopy.

For Peer Review

INTRODUCTION

For thousands of years legumes have played a crucial role in sustainable agriculture by establishing a symbiotic interaction with a soil nitrogen (N_2) fixing bacteria of the Rhizobiacea family. This N_2 fixing symbiosis enables an optimal growth of legumes in nitrogen-limited soils. Moreover, symbiotic N_2 fixation enriches soil with around 50 million tons of nitrogen each year sustaining subsequent non legume crops avoiding the need for nitrogen fertiliser (Pislariu *et al.*, 2012). Legumes account for 27% of crop production worldwide (Graham & Vance, 2003), and are an important food source for animal and human consumption, grain legumes contributing 33% of human needs for dietary protein (Vance, 2001).

N_2 fixing symbiosis occurs inside a specialized organ called nodule. Nodules provide a proper microenvironment wherein, inside host cells, the plant partner supplies carbon skeletons from photosynthesis to differentiated N_2 fixing bacteria, called bacteroids. Bacteroids, through nitrogenase, are able to reduce atmospheric nitrogen into ammonia which can subsequently be assimilated by the plant.

In the *Medicago truncatula* / *Sinorhizobium meliloti* symbiosis model, important progress has been achieved toward the characterization of initial recognition between both partners and root nodule development. Elaborated signal exchange between both partners, elicit cell division in root inner cortex, promoting the initiation of nodule meristems and the root hair tips form characteristic shepherd's crook (reviewed in (Oldroyd & Downie, 2008). Bacteria divide inside infection threads, progress toward cortical root cells and finally are released into plant cells cytoplasm via an endocytosis like process, to form a new organelle-like compartment named symbiosome (for review Wang & Dong, 2011). The development of both symbiotic partners leads to the formation of functional nodules. *Medicago truncatula* nodules are indeterminate and highly structured organs. In four week-old nodules, all

For Peer Review

development stages are present, from host cell differentiation and *S. meliloti* infection to symbiosis disruption (Puppo, Alain *et al.*, 2005). Apical meristematic region (zone I) ensures an indeterminate growth of the nodule. Newly formed cells issued from the meristematic zone are infected by *S. meliloti* via infection threads (zone II), and then plant cells host microsymbionts (interzone II9III) initiate a differentiation process to form N_2 fixing symbiotic cells (zone III). In zone III, fully differentiated bacteria 9 the bacteroids 9 express nitrogenase and enable the reduction of atmospheric N_2 into ammonia which is exported to the plant in exchange for carbohydrates (Crespi & Gàlvez, 2000). This symbiotic interaction is time limited and from four weeks post *S. meliloti* inoculation, proximal nodule cells initiate a senescence process which induces a rapid and complete degradation of bacteroids and plant host cells (Zone IV) (Van de Velde *et al.*, 2006). During *M. truncatula* nodule senescence process, both bacteroids and plant host cells undergo sequential degradation. Firstly, bacteroids and peribacteroid membrane (PBM) are degraded with the presence of numerous vesicles in the plant cytoplasm and symbiosomes (Van de Velde *et al.*, 2006). Then, plant host cells start to decay, leading finally to the complete degradation of the proximal part of the nodule (Van de Velde *et al.*, 2006).

One of the key features of the nodule senescence process is the triggering of proteolytic activities inducing wide scale protein degradation in soybean and alfalfa nodules (Malik *et al.*, 1981; Pladys & Vance, 1993). More specifically, cysteine proteinase (Cys9P) genes are highly induced in soybean (Alesandrini *et al.*, 2003a; Alesandrini *et al.*, 2003b), chinese milk vetch (Naito *et al.*, 2000) and *M. truncatula* senescing nodules (Fedorova *et al.*, 2002). Moreover, in *Astragalus* nodules, knock9down analysis of *AsNodF32*, led to a delay in nodule senescence (Li *et al.*, 2008), implying a crucial role for this Cys9P in the nodule senescence process. To unravel the onset of the developmental nodule senescence, cDNA9 AFLP transcriptomic analysis was performed on *M. truncatula* nodule senescence zone,

For Peer Review

compared to the nitrogen fixing zone (Van de Velde *et al.*, 2006). The analysis of the 508 differentially expressed gene tags confirmed the induction of Cys-P during senescence, and highlighted that two distinct protease genes, a papain-like Cys-P, *MtCP6*, and a Vacuolar Processing Enzyme, *MtVPE*, were induced early during nodule senescence.

Sequence homology analysis (Van de Velde *et al.*, 2006) related *MtCP6* to *AtSag12*, a hallmark proteinase of *Arabidopsis* leaf senescence (Lohman *et al.,* 1994). Previous analysis showed that the *MtCP6* gene was induced during either developmental or dark-induced nodule senescence (Perez Guerra *et al.*, 2010), or by defective *S. meliloti hmp* strain (Cam *et al.*, 2012). *MtVPE* is related to the legumain proteinase family. Legumains are caspase-like proteinases involved in the processing of vacuolar-based proteins during seed germination, leaf senescence (Muntz & Shutov, 2002), and in developmental or pathogen mediated programmed cell death (Hatsugai *et al.*, 2004; Rojo *et al.*, 2004). *MtVPE* was shown to be induced during both developmental and stress-induced nodule senescence (Van de Velde *et al.*, 2006; Perez Guerra *et al.*, 2010).

To date, the processes controlling the shift from functional infected cells (zone III) to senescent cells (zone IV), i.e. the breakdown of the plant-bacteria symbiotic relationship, are essentially unknown. A better characterization of the onset of nodule senescence and the identification of early senescence molecular markers would increase our understanding of the senescence process. Hence, potentially permit the selection of legume varieties presenting delayed nodule senescence and a longer nitrogen fixation period. Considering the key role of proteolytic activities in the nodule senescence process, and the early induction of both *MtCP6* and *MtVPE* genes during nodule senescence, we raised the hypothesis that these two genes could be early markers of the symbiotic breakdown. To test this hypothesis, we first investigated their spatiotemporal expression during developmental and stress-induced senescence, and characterized their proteolytic activities. Then, using reverse genetic

For Peer Review

approaches, we analysed the effects of up- and down-regulation of both genes on plant growth, N_2 fixation and nodule senescence. The data reported in this study highlight the role of *MtCP6* and *MtVPE* in the nodule senescence process, and confirms that *MtCP6* may be considered as a specific gene marker for the breakdown of symbiosis at the onset of the senescence.

For Peer Review

RESULTS

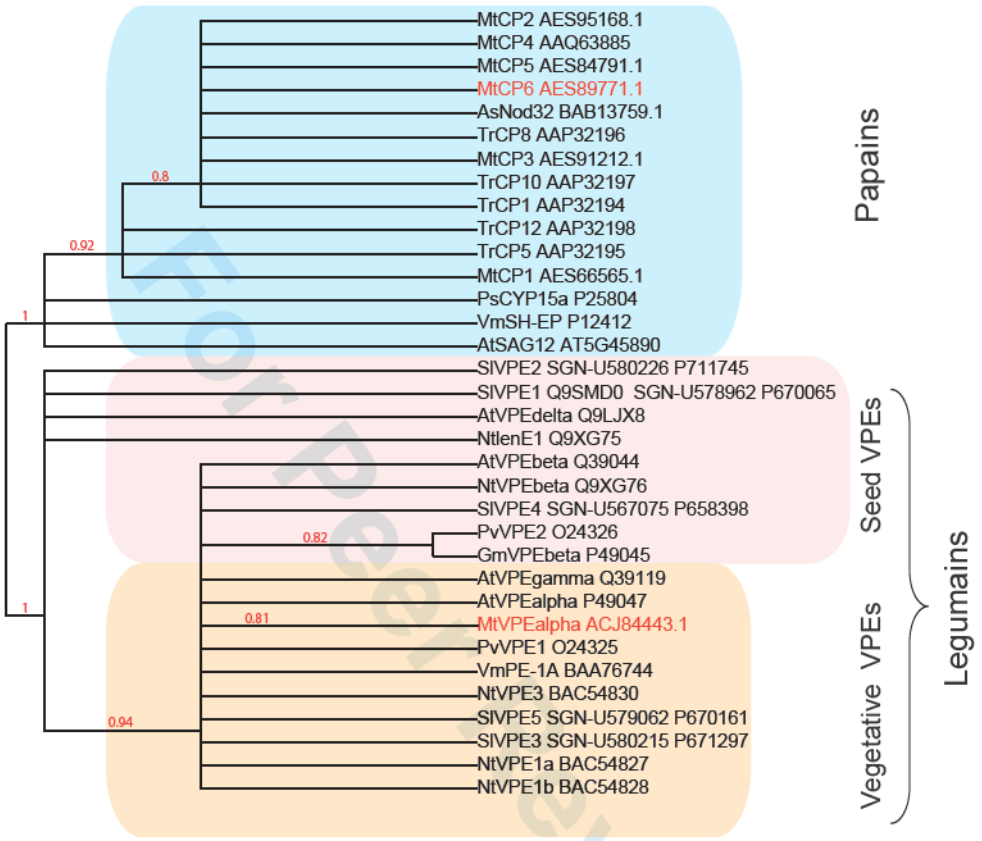
MtCP6 and *MtVPE* are members of two different Cys-P families in *Medicago truncatula*.

To get a first insight of the potential role of *MtCP6* and *MtVPE* in the senescence process, protein sequences sharing similarities with them were analysed via BlastP (Altschul *et al.*, 1997), and a minimum of likelihood phylogenetic tree was generated (Fig.1). *MtCP6* and *MtVPE* clusterized in two distinct phylogenetic groups. The cluster related to *MtCP6* contains several Cys9P which, belong to the papain proteinase family according to the peptidase database MEROPS (Rawlings *et al.*, 2011). In this group, five Cys9P9encoding genes were found in the *M. truncatula* genome, named *MtCP1* to *MtCP6* according to the nomenclature of previous works (Perez Guerra *et al.*, 2010). *M. truncatula MtCP19MtCP6* are putative Cys9 Ps, transcriptionally up9regulated in a cDNA9AFLP analysis of *M. truncatula* nodule senescence (Van de Velde *et al.*, 2006). This transcriptomic analysis enlights that, among these six family members, *MtCP6* was induced during the early stages of nodule senescence (Perez Guerra *et al.*, 2010). In other plant models, Cys9P9encoding genes were also related to senescence. Thus, *AtSAG12* proteinase has been related to *Arabidopsis thaliana* leaf senescence (Otegui *et al.*, 2005), and *TrCP59TrCP12* and *AsNodf32* expressions were also linked to nodule senescence of *Trifolium repens* (Asp *et al.*, 2004) and *Astragalus sinicus* (Naito et al., 2000).

The phylogenetic group related to *MtVPE* is constituted of Cys9Ps belonging to the legumain, or VPE, family (Fig. 1). In plants, tissue specific expression and sequence homologies split legumains into two major groups, seed VPEs and vegetative VPEs. In the seed cluster, βVPE are involved in protein maturation during seed maturation (Kinoshita *et al.*, 1999; Okamoto & Minamikawa, 1999) and δVPE are involved in programmed cell death of inner seed tegument

For Peer Review

Figure 1



For Peer Review

Figure 1: Phylogenetic analysis of *MtCP6* and *MtVPE* related families

Maximum of likelihood tree of papain and legumain amino-acid sequences. For each node maximum of likelihood probabiblity ratio test (aLRT) values are shown in red. Subgroup of proteinases indicated in blue are papain peptidases. Seed and vegetative VPEs related to legumain group are represented in pink and orange boxes, respectively. Each Cys proteinase is followed by the corresponding Genebank accession number.

cells ensuring development of the seed coat (Nakaune *et al.*, 2005). In the same way, vegetative VPEs (α and γVPE) are involved in multiple vacuole mediated cell death processes from developmental cell death such as tracheary differentiation and leave senescence to pathogen induced cell death (Hatsugai *et al.*, 2004; Hara9Nishimura & Hatsugai, 2011). Previous data report that both *MtCP6* and *MtVPE* are induced at the onset of nodule senescence (Van de Velde *et al.*, 2006; Perez Guerra *et al.*, 2010). Thus, to precise the tissue localisation and the timing of their expression, we investigated their spatiotemporal expression in root and root nodules undergoing developmental senescence.

***MtCP6* and *MtVPE* are induced in symbiosome infected cells during the developmental nodule senescence process**.

Both *MtCP6* and *MtVPE* promoters were cloned using the available *M. truncatula* genomic data and fused to β9glucuronidase (GUS). Promoter:GUS fusions were inserted into *M. truncatula* roots by *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation and histochemical analysis of GUS activity were performed in transgenic roots and in nodules at three and six weeks post9inoculation (wpi) with *S. meliloti*. No GUS staining was detected in 3 wpi9old *MtPCP6:GUS* transgenic nodules (Fig. 2A). In contrast, a strong GUS staining was found in the meristematic (zone I) and the infection (zone II) zone, but not in the N_2 fixing zone (zone III), of 3 wpi9old *PMtVPE:GUS* transgenic nodules (Fig. 2D). GUS expression was also observed in vascular bundles of *PMtVPE:GUS* transgenic roots and nodules (Fig. 2C). In 6 wpi9old mature nodules, *PMtCP6:GUS* expression was observed in infected cells at the junction between the N_2 fixing zone (zone III) and senescence zone (zone IV) (Fig. 2B). Contrarily, for *PMtVPE:GUS* a dual expression pattern was observed in 6 wpi9old nodules (Fig; 2E). Indeed, a strong GUS signal was detected in both meristematic and infection zones

For Peer Review

Figure 2

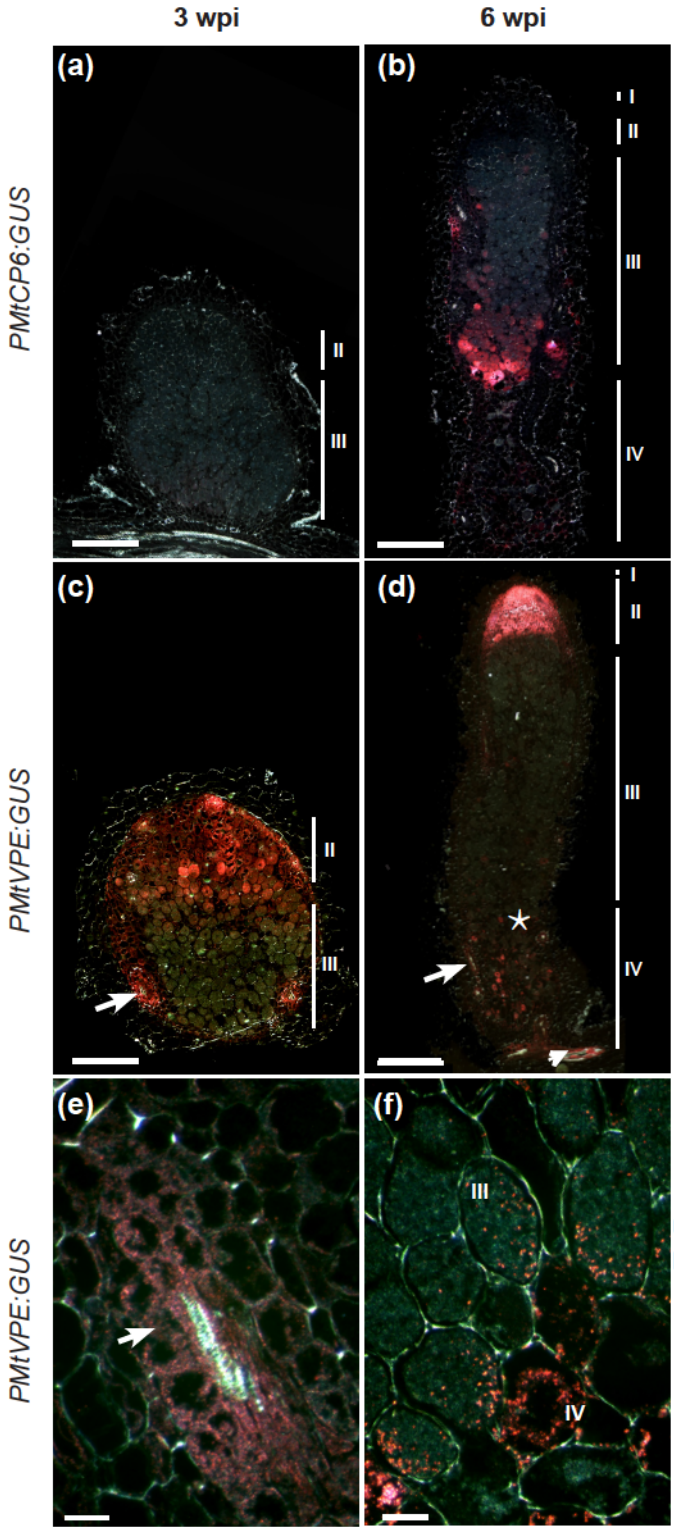


Figure 2: Histochemical analysis of *MtCP6* and *MtVPE* expression throughout nodule development.

Transgenic nodules carrying *MtCP6* (*PMtCP6*) or *MtVPE* (*PMtVPE*) promoter fused with the reporter gene *uidA* (GUS) were harvested after 3 or 6 weeks post-inoculation, GUS stained and sectioned. *MtCP6* expression in 3 wpi-old (a) and 6 wpi-old nodules (b). *MtVPE* expression in 3 wpi-old (d) and 6 wpi-old nodules (e). In panel (e) arrow and arrowhead point out nodule and root vascular bundles respectively. Nodule vascular bundles and interzone III-IV are magnified in panel (e). Star indicates the interzone III-IV magnified in panel (f). The bars indicate the different zones of the nodule: I the meristem; II the infection zone; III the nitrogen fixation zone and IV the senescent zone. Scale bar: 250µm (a, b, c & d); 100µm (e & f).

(Fig. 2E), and a weaker expression was observed in nodule infected cells in the whole senescence zone (Fig. 2E9F). The expression of both *MtCP6* and *MtVPE* in zone IV suggests a potential involvement of both Cys9Ps in the nodule senescence process.

Stressed and defective nodules promote an extended expression of *MtCP6* and *MtVPE* in the whole infected cells of nodule.

We analysed their expression in nodule during stress9induced senescence. Previous works on nodulated *M. truncatula* plants report that a prolonged exposure to darkness or nitrate supply entails a rapid and global senescence of whole nodules, accompanied by an induction of Cys9 P (Puppo, A. *et al.*, 2005; Perez Guerra *et al.*, 2010; de Zelicourt *et al.*, 2012). Both dark and nitrate treatments lead to a decrease in nitrogenase activity and to symbiosome degradation (Matamoros *et al.*, 1999). Hence, using physiological and histological approaches, we assessed the effect of a three9day period of either dark, or nitrogen treatment in 3 wpi9old *M. truncatula* nodules. Measurement of acetylene reducing activity (ARA), showed a 97% and 76% decrease of biological nitrogen fixation three days after dark and nitrate treatments, respectively (Supplemental Fig. S1A). Furthermore, in these conditions, the observation of 5 Rm thin nodule sections stained by toluidine blue revealed an extension of the senescence zone associated with a degradation of bacteroids and nodule host cells (Supplemental Fig. S1B).

To investigate the expression of *MtCP6* and *MtVPE* during nodule induced9senescence, histochemical detection of GUS activity was performed on six wpi9old transgenic nodules carrying *PMtCP6:GUS* or *PMtVPE:GUS* fusions after three days of dark or nitrate treatments (Fig. 3B,C, E and F). On thin longitudinal sections, we observed that after 3 days of either

For Peer Review

Figure 3

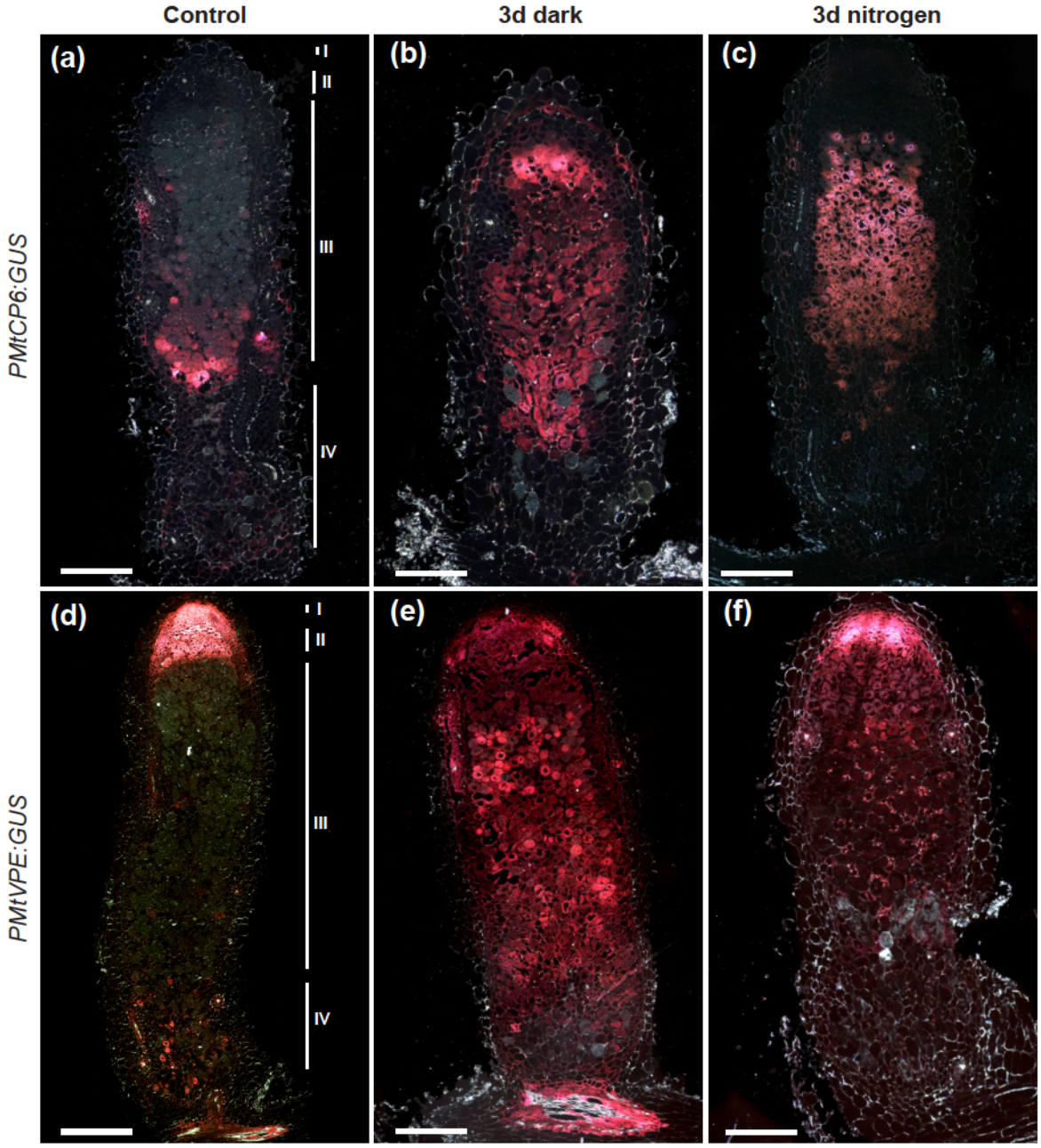

Control
3d dark
3d nitrogen
PMtCP6:GUS
PMtVPE:GUS
(a)
(b)
(c)
(d)
(e)
(f)
I
II
III
IV

Figure 3: Expression of *MtCP6* and *MtVPE* in dark and nitrogen stressed nodules.

6 wpi-old nodules carrying either *PMtCP6:GUS* or *PMtVPE:GUS* fusion were analysed for *MtCP6* (a, b, c) and *MtVPE* (d, e, f) expression in control conditions (a, d), after 3 days of dark (b, e) or nitrogen treatment (10mM Ammo-nitrate) (c, f). The bars indicate the different zones of nodules (I-IV). Scale bar: 250µm.

dark, or nitrate treatment, both *MtCP6* and *MtVPE* were expressed in the whole nodule infected cells (zone II to zone IV).

Furthermore, we investigated their expression in impaired nodules promoted by either defective symbiotic *M. truncatula* line (*Mtdnf1*), or *S. meliloti* mutant strains (*nifH*) (Fig. 4). *Mtdnf1M. truncatula* line is mutated for a subunit of a signal peptidase crucial for bacteroid differentiation. *MtDNF1* gene is highly expressed in nodule and its expression is restricted to the infection and differentiation zone (Wang *et al.*, 2010). *SmnifH* gene encodes for a subunit of the nitrogenise (Ruvkun *et al.*, 1982). *SmnifH* mutant strains defective for nitrogenase activity were found to promote early nodule senescence (Maunoury *et al.*, 2010). This *M. truncatula* line and *S. meliloti* strain exhibited a rapid defection of the symbiotic process as shown by the observation of microsection of toluidine blue stained nodules (Fig.4A). Compared to the control, the expression of *MtCP6* and *MtVPE* was induced early in the infected cells of nodules promoted by *SmnifH* or using the plant mutant *Mtdnf1* (Fig. 4B).

Thus, under either abiotic stress (dark or nitrogen treatments), or symbiotic defective conditions (*Mtdnf1*, *SmnifH*), both *MtCP6* and *MtVPE* were early induced in comparison to control conditions, indicating that the expression of the two proteases is correlated with the nodule senescence process.

_Mt_CP6 and _Mt_VPE exhibit respectively cathepsin-L and legumain activities

*Mt*CP6 and *Mt*VPE have been identified as putative Cys9Ps (Van de Velde *et al.*, 2006; Perez Guerra *et al.*, 2010), but they were not proven to possess effective proteolytic activity. *MtCP6* and *MtVPE* coding sequences were cloned into pET30a expression system in *E. coli*, and the two proteinases were overexpressed. However, both recombinant proteinases were retrieved in inclusion bodies, and the purification of functional enzymes failed, drawback already

For Peer Review

Figure 4

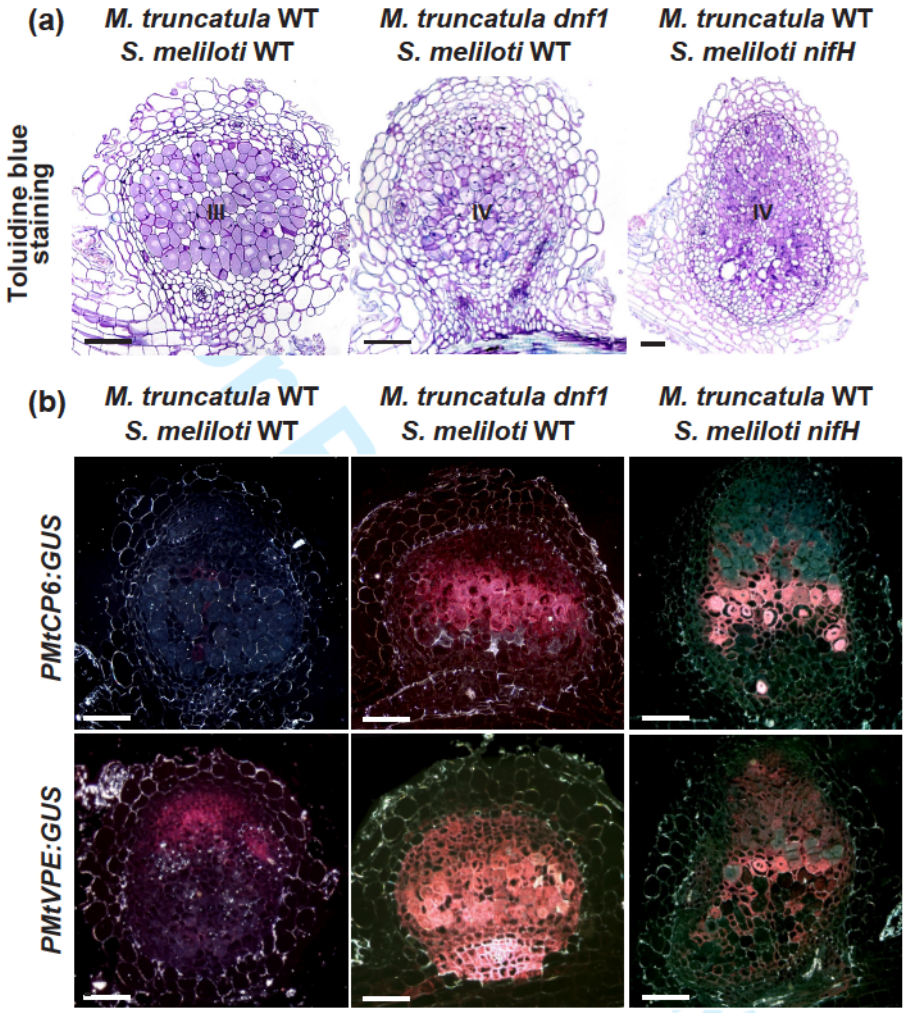

(a)
M. truncatula WT
S. meliloti WT
M. truncatula dnf1
S. meliloti WT
M. truncatula WT
S. meliloti nifH
Toluidine blue staining
III
IV
IV
(b)
M. truncatula WT
S. meliloti WT
M. truncatula dnf1
S. meliloti WT
M. truncatula WT
S. meliloti nifH
PMtCP6:GUS
PMtVPE:GUS

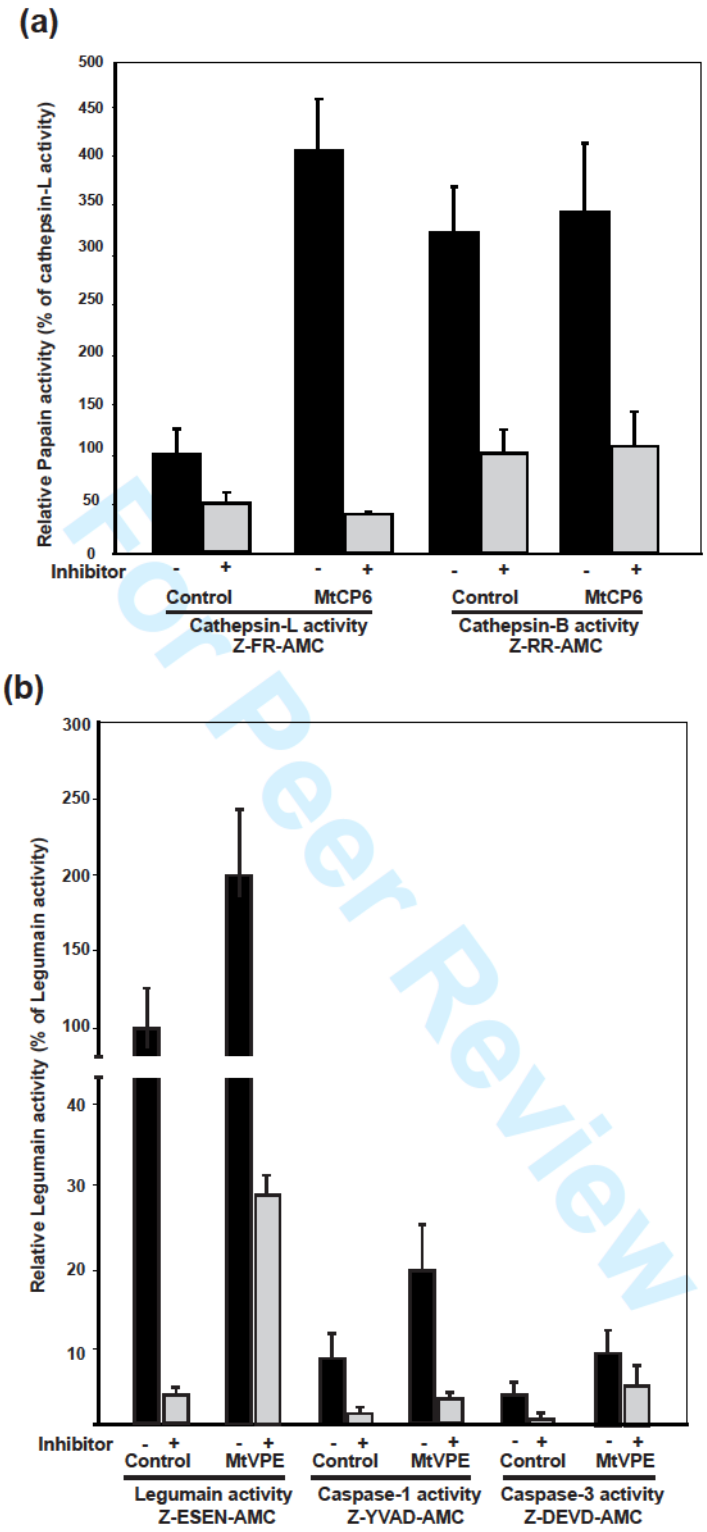
Figure 4: Expression of *MtCP6* and *MtVPE* in defective nodules promoted by *M. truncatula dnf1* mutant line or *S. meliloti nifH*mutant strain.

(a) Morphological observations of toluidine blue stained sections of WT or defective 3 wpi-old nodules promoted by *M. truncatula dnf1* line or *S. meliloti nifH* strain. (B) Expression of *MtCP6* and *MtVPE* in nodules promoted by symbiosis defective line of *M. truncatula* (*dnf1*) and *S. meliloti* strain (*nifH*) in comparison to control. Scale bars: 100µm.

reported in literature (Brönme et al, 2004). To circumvent this obstacle we produced transgenic roots overexpressing either *Mt*CP6, or *Mt*VPE, with *A. rhizogenes* mediated transformation. Overexpression of *MtCP6* and *MtVPE* were driven by the ubiquitous and strong cauliflower mosaic virus CaMV35S promoter (P35S) from the pK7FWG2 binary vector fusing GFP in frame with the proteinases. Transgenic roots were screened for a GFP signal by microscopy. Transgenic root lines carrying a P35S:GUS:GFP construct were used as a control. Effective overexpression of *Mt*CP6:GFP and *Mt*VPE:GFP in transgenic roots was validated by western-blotting (Supplemental Fig S2). According to MEROPS Peptidase Database (Rawlings et al, 2011), *Mt*CP6 is a SPG31-like protease, belonging to papain-like proteinase family. Therefore, two papain substrates, Z-FR-AMC (cathepsin-L activity) and Z-RR-AMC (cathepsin-B activity), were assayed to characterize *Mt*CP6. The specificity of the proteolytic activity was monitored using the known papain inhibitor E-64d (Tamai *et al.*, 1987; McGowan *et al.*, 1989). Compared to control root lines, the overexpression of *Mt*CP6 entailed a 4-fold increase in cathepsin-L activity (Fig. 5A). This activity was 92% inhibited in the presence of E-64d (Fig. 5A). Contrarily, no cathepsin-B activity could be detected in protein extracts from root overexpressing *Mt*CP6 when compared to GUS control (Fig. 5A). A similar approach was used to investigate *Mt*VPE activity. MEROPS database (Rawlings et al., 2011) classifies *Mt*VPE as an Asparagylendopeptidase (legumain activity). Three substrates were tested to characterize the activity: Z-ESEN-AMC, a VPE specific substrate (Hatsugai et al, 2004, Kuroyanagi et al, 2005), Z-YVAD-AMC, a caspase-1 substrate, and Z-DEVD-AMC, a caspase-3 substrate. The activity was subsequently quenched by competition with a corresponding inhibitor to confirm the specific activity. *Mt*VPE overexpressing root lines exhibited a strong ESENase activity and a lower, but relevant, YVADase or DEVDase activities (Fig. 5B). *Mt*VPE featured a legumain activity 10 and 20-fold higher than caspase-1 and 3 activities, respectively. These data confirm that *Mt*CP6 and *Mt*VPE are, respectively, of

For Peer Review

Figure 5



For Peer Review

Figure 5: Characterization of *Mt*CP6 and *Mt*VPEproteolytic activities.

Protein extract of roots overexpressing *MtCP6* or *MtVPE* were used to characterize their respective proteinase activity. As control, proteinase activity was assayed on protein extract from root overexpressing the GUS protein. (a) *Mt*CP6 activity was assayed for cathepsin-L (Z-FR-AMC) and cathepsin-B (Z-RR-AMC) activity. (b) *Mt*VPE activity was investigated for legumain (Z-ESEN-AMC), caspase-1 (Z-YVAD-AMC) and caspase-3 (Z-DEVD-AMC) activities. Specificity of proteolytic activities were ensured using the papain inhibitor E64d, the legumain inhibitor iodoacetamide, the caspase-1 inhibitor Ac-YVAD, and the caspase-3 inhibitor Ac-DEVD; Treated (+) and untreated (-). Three independent biological replicates were used and represented as percentage compared to control cathepsin-L or Legumain activity. Error bars represents the error type.

papain and legumain type and may be followed through their cathepsin9L and legumain activities. To further characterize the two proteinases during the nodule senescence process, we analysed cathepsin9L and legumain activities in nodules of plants submitted to three days of either dark, or nitrate, treatment. As shown in Fig. 6, dark treatment entailed an 80% increase of cathepsin9L and legumain activities. Similarly, nitrogen treatment increased by 125 and 225% both cathepsin9L and legumain activities, respectively. These data strongly argue in favour of the involvement of both *Mt*CP6 and *Mt*VPE in the nodule senescence process.

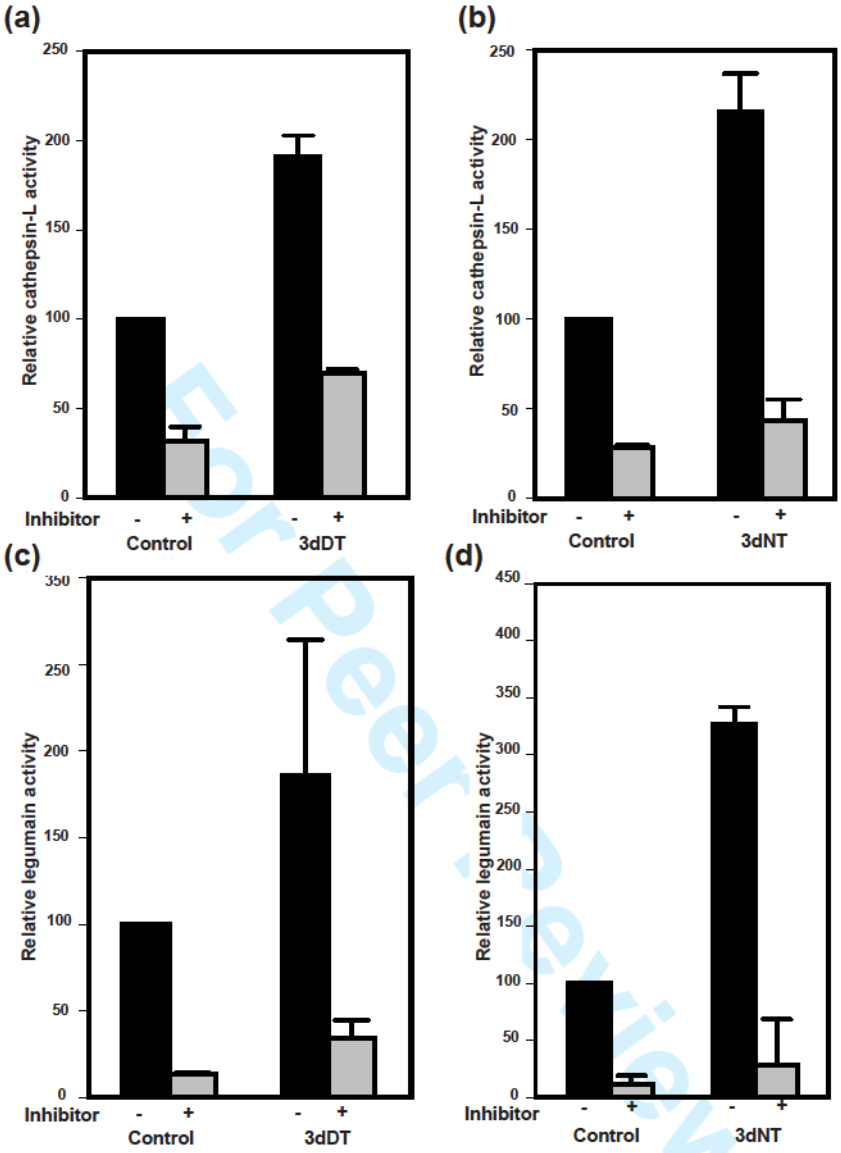
Deregulation of *MtCP6* and *MtVPE* strongly affect the nodule senescence process.

The importance of *MtCP6* and *MtVPE* in the nodule senescence process was assessed through the use of a reverse genetic approach to alter their specific expression. The aim was to decrease the expression of both Cys9P at the interzone between $N_2$9fixing and senescence zones, where the senescence process initiates. To this end, specific RNAi target sequences of 80bp and 270bp, respectively from *MtCP6* and *MtVPE* transcripts, were fused to the promoter of *MtCP6* (P*MtCP6*) which drives a specific expression at the junction between $N_2$9fixing and senescence zones (Fig. 2). Composite transgenic plants were generated by *A. rhizogenes* mediated transformation and nodulated with *S. meliloti*. In six wpi9old nodules, both genes were found to be significantly down9regulated: 25 fold for *MtCP6*, and 4 fold for *MtVPE*, in RNAi*MtCP6* and RNAi *MtVPE* nodules, respectively (Fig. 7A). Control plants expressing an RNAi empty construct showed no change in *Mt*CP6 or *Mt*VPE expression level.

The Biologic Nitrogen Fixation (BNF) of *MtCP6* and *MtVPE*9RNAi six week old nodules was estimated through the measurement of ARA. As compared to control nodules, the depletion of *MtCP6* and *MtVPE* transcripts resulted in a 160% and 60% increase of ARA,

For Peer Review

Figure 6



For Peer Review

Figure 6: Dark and nitrogen treatments promote an increase in cathepsin-L and legumain activities in nodule.

(a-d) Six wpi-old nodules (WT) were harvested after 3 days of either dark (a, c) or nitrogen treatments (10mM ammonitrate) (b, d). Cathepsin-L (Z-FR-AMC) (a-b) and legumain (Z-ESEN-AMC) (c-d) activities were assayed in soluble protein extracts. As control, proteinase activities were assayed on protein extract from unstressed nodules. Specific activities were ensured with the papain inhibitor E64d and the legumain inhibitor iodoacetamide; treated (+) and untreated (-). Proteolytic activities were assayed on two independent biological replicates, represented as percentage compared to corresponding control cathepsin-L or Legumain activity. Error bars represents the error type.

respectively (Fig. 7B). Moreover, decreased *MtCP6* or *MtVPE* expression was found to promote an approximate ~20% increase in nodule size, with an average length of 2.45 mm and 2.55mm, respectively, compared to that of control nodules (2.05mm) (Fig. 7C). Interestingly, the depletion in either *MtCP6* or *MtVPE* transcripts resulted in the extension of the N_2-fixing zone (zone III) of the RNAi nodules compared to control nodules (Fig. 7D). This increase in nodule length, particularly the N_2-fixing zone leading to an improved BNF suggests that the depletion of *MtCP6* or *MtVPE* delays the senescence process in nodules.

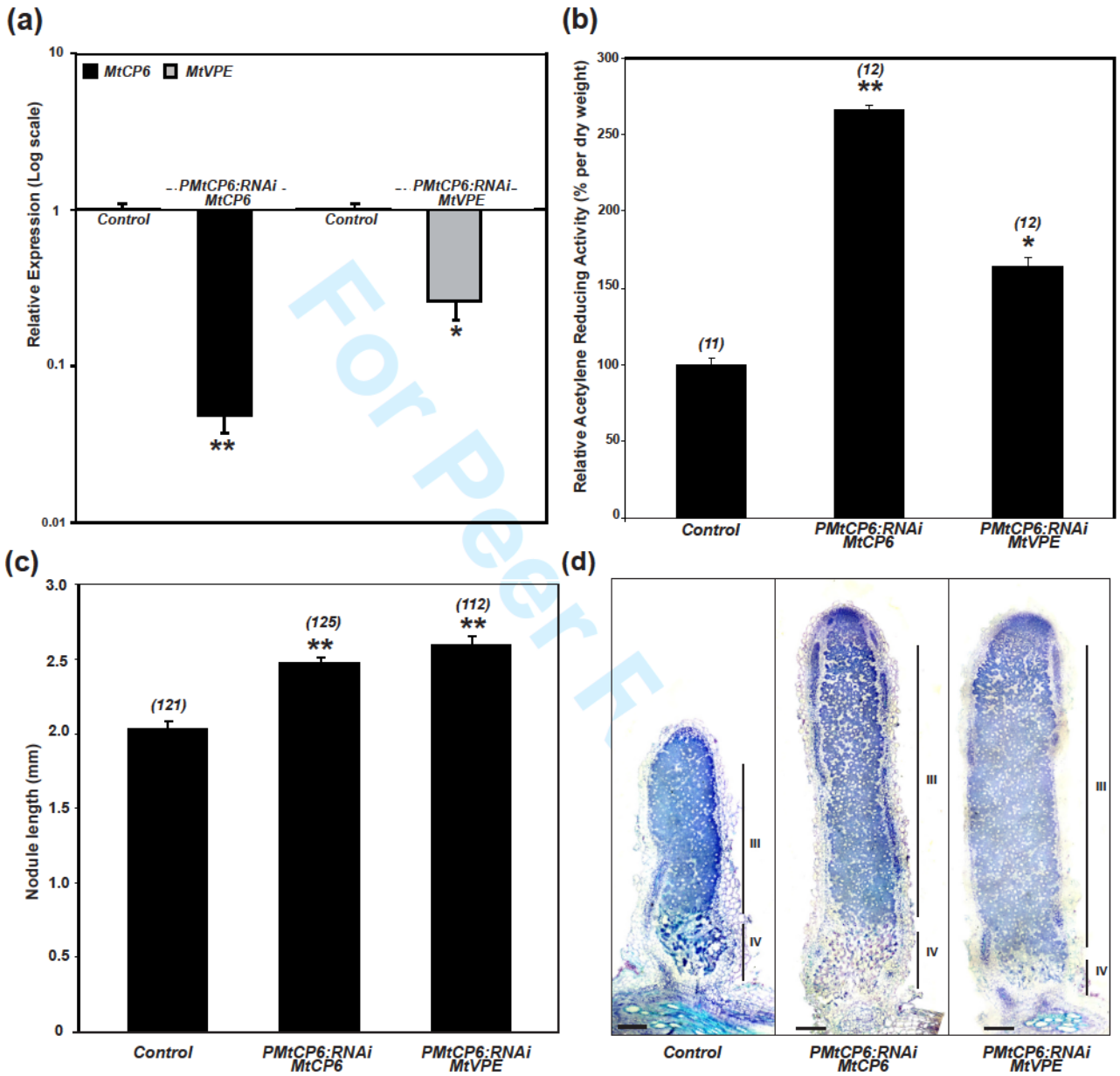
To assess if inducing an early expression of these proteinases in the N_2-fixing zone affected nodule development, the zone III specific promoter P*MtNCR001* (Mergaert et al., 2003) was used to drive the expression of both *MtCP6* and *MtVPE*. Composite transgenic plants were generated and six wpi nodules were collected. Overexpression of both genes was observed in both constructions, with a 2079-fold and 1399-fold overexpression for *MtCP6* and *MtVPE*, respectively, compared to control nodules (Fig. 8A). A 46% and 33% reduction of nodule length related to an increase of the senescence zone were associated with earlier expression of *MtCP6* or *MtVPE*, respectively (Figure 8B-C). Thus, similar to observations in nodule undergoing dark- and nitrate-induced senescence (Fig. 3), an earlier ectopic expression of *MtCP6* and *MtVPE* during nodule development led to accelerate nodule senescence.

_Mt_CP6 and _Mt_VPE proteins are delivered to symbiosomes of infected cells and to the vacuole of uninfected cells.

Previous work on *M. truncatula* reported that symbiosomes are the first targets of the nodule degradation process (Van de Velde et al, 2006). To determine a possible role for *Mt*CP6 and *Mt*VPE in this process, we investigated their subcellular localization in infected and uninfected cells. First, the putative localisation of both Cys-P was determined using various amino-acid sequence-based predictor programs such as TargetP, Epiloc, and Multiloc

For Peer Review

Figure 7



For Peer Review

Figure 7: Depletion of *MtCP6* and *MtVPE* transcripts in the senescence zone (interzone III-IV) promote an increase of N_2 fixation and nodule length.

Expression of *MtCP6* or *MtVPE-RNAi* were driven by the senescence specific promoter *PMtCP6*. **(a)** Quantitative RT-qPCR analysis of *MtCP6* and *MtVPE* expression in *M. truncatula MtCP6 and MtVPE*-RNAi transgenic nodules. The expression fold change was calculated as $2^{-\Delta\Delta CT}$on data from two independent biological replicates analysed in technical triplicates. Statistically significant differences at $p<0.05$ and $p<0.01$ are indicated with * and **, respectively (Sign test). The relative expression in control nodules was set to one. (**b**) Acetylene Reducing Activity of 6 wpi-old *MtCP6* and *MtVPE*RNAi nodules. Kruskall& Wallis test (**: $p<0.01$, **:$p<0.05$). Error bars represent the standard deviation. **(c)** Nodule length and **(d)** morphology (toluidine blue staining) were investigated in 6 wpi-old *MtCP6* or *MtVPE*RNAi nodules. The bars indicate the different zones of nodules (I-IV). Scale bar: 250µm. Error bars represent the error type. All of these data presented here were extracted from two independent biological replicates. Number between brackets represents the total effective.

Figure 8

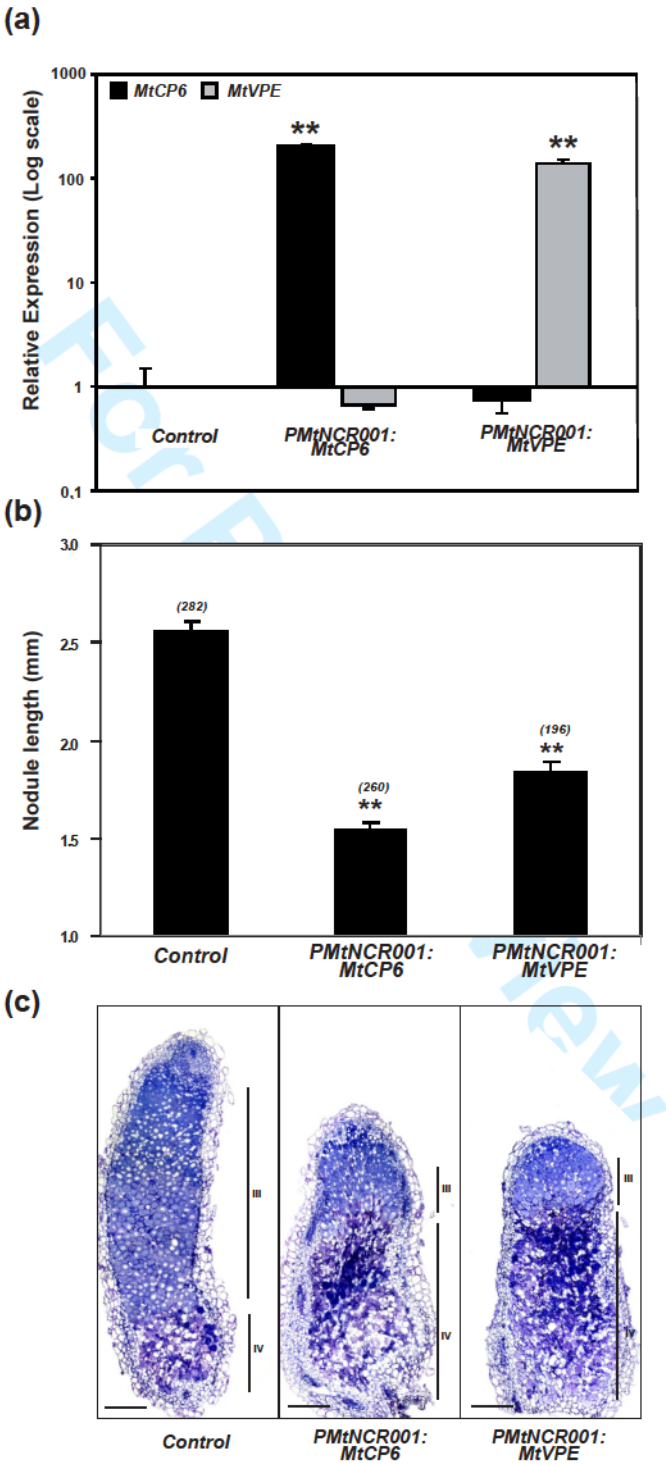

(a)
Relative Expression (Log scale)
1000
100
10
1
0,1
MtCP6
MtVPE
**
**
Control
PMtNCR001: MtCP6
PMtNCR001: MtVPE
(b)
Nodule length (mm)
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
(282)
(260)
**
(196)
**
Control
PMtNCR001: MtCP6
PMtNCR001: MtVPE
(c)
III
IV
Control
PMtNCR001: MtCP6
PMtNCR001: MtVPE

Figure 8: Early expression of MtCP6 and MtVPE in the N_2 fixation zone (zone III) trigger an early nodule senescence

Expression of *MtCP6* or *MtVPE-RNAi* were driven by the zone III specific promoter *PMtNCR001* (Mergaert et al, 2003). **(a)** Quantitative RT-qPCR analysis of *MtCP6* and *MtVPE* expression in *M. truncatula MtCP6 and MtVPE-RNAi* transgenic nodules. The expression fold change was calculated as $2^{-\Delta\Delta CT}$on data from two independent biological replicates analyzed in technical triplicates. Statistically significant differences at $p<0.05$ and $p<0.01$ are indicated with * and **, respectively (Sign test). The relative expression in control nodules was set to one. Error bars represent the standard deviation. **(b)** Nodule length and **(c)** morphology (toluidine blue staining) were investigated in 3 wpi-old nodules expressing *MtCP6* or *MtVPE* in zone III. The bars indicate the different zones of nodules (I-IV). Scale bar: 250µm. Error bars represent the error type. All of these data presented here were extracted from two independent biological replicates. Number between brackets represents the total effective.

(Höglund *et al.*, 2006; Emanuelsson *et al.*, 2007; Brady & Shatkay, 2008). *In silico* analysis predicted a putative localisation of *Mt*CP6 and *Mt*VPE in the secretory pathway, i.e. endoplasmic reticulum, and the vacuole (data not shown). Both Cys9P fused with GFP in the carboxyterminal9end were then used to determine their effective subcellular distributions. Constructs were inserted into *M. truncatula* roots by *A. rhizogenes* mediated transformation (Vieweg *et al.*, 2004), and the roots were inoculated with *S. meliloti*. *In vivo* localisation of *Mt*CP6:GFP and *Mt*VPE:GFP was investigated by confocal laser scanning microscopy (CLSM) in roots, and in six wpi9old nodules. In root cells, the GFP signals from *Mt*CP6 and *Mt*VPE fusions were found to co9localize with the fluorescence signal of monochlorobimane (MCB), a specific vacuolar probe (Fig. 9A) (Fricker & Meyer, 2001). In nodule infected cells, *Mt*CP6:GFP and *Mt*VPE:GFP were found to co9localize with SYTO83, a nucleic acid dye used to visualize symbiosomes (Haynes *et al.*, 2004), indicating that *Mt*CP6 and *Mt*VPE are present in symbiosomes (Fig. 9B). In nodule uninfected cells, *Mt*CP6 and *Mt*VPE accumulated in the vacuoles, as observed in root cells.

To confirm the symbiosome localisation of *Mt*CP6 and *Mt*VPE, symbiosomes from transgenic nodules were purified on a Percoll gradient, and the presence of GFP was examined. GFP signal was observed in purified symbiosomes from transgenic nodules expressing *Mt*CP6 or *Mt*VPE:GFP, whereas no detectable signal was found in control nodules (data not shown). Considered together, these observations show that in root or in nodule uninfected cells, *Mt*CP6 and *Mt*VPE are delivered to vacuole, whereas in bacteroid infected cells they are targeted to symbiosomes. This suggests that at the onset of senescence, vacuolar Cys9P such as *Mt*CP6 and *Mt*VPE are addressed to symbiosomes where they may ensure its degradation.

For Peer Review

Figure 9

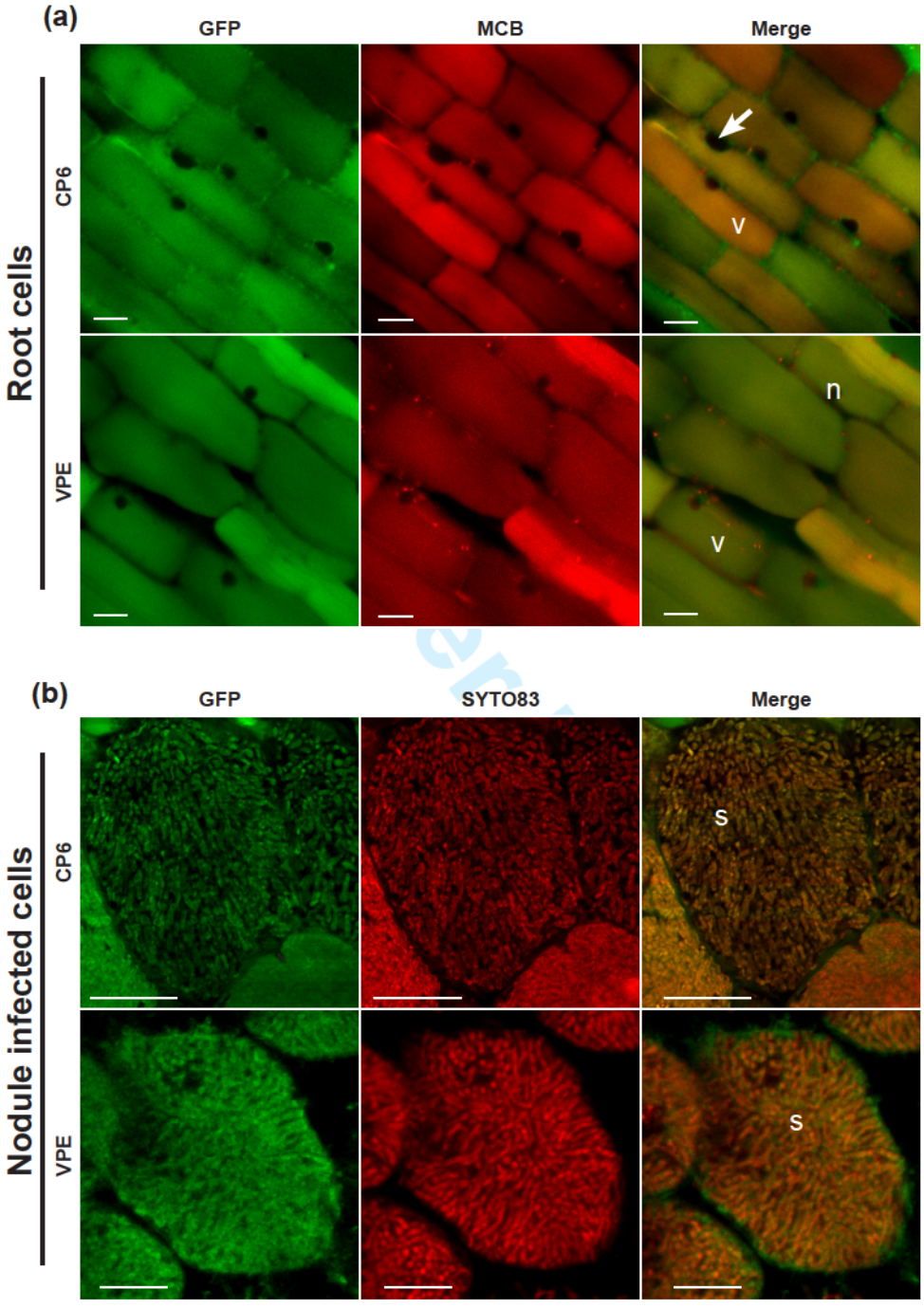

(a)
GFP
MCB
Merge
Root cells
CP6
VPE
v
n
v
(b)
GFP
SYTO83
Merge
Nodule infected cells
CP6
VPE
s
s

Figure 9: *In vivo* confocal imaging of *Mt*CP6 and *Mt*VPE in root and nodule bacteroid infected cells.

(a) Transgenic roots of M. truncatula expressing *Mt*CP6:GFP or *Mt*VPE:GFP were investigated for the GFP subcellular localization. Roots were counterstained with 100µM of monochlorobimane (MCB) (coloured red). (b) Six wpi-old nodules expressing *Mt*CP6:GFP or *Mt*VPE:GFP were harvested, sectioned and investigated for GFP localization. Symbiosomes were counterstained with the nucleic probe SYTO83 (coloured red). MtCP6 and MtVPEcolocalized with SYTO83 in symbiosomes. All pictures were acquired by CLSM. Legends: (v) vacuole; (arrow) nucleus; (s) symbiosome. Scale bars: 10µm.

DISCUSSION

A key feature of legume nodule senescence is the triggering of proteolytic activities, inducing protein degradation and remobilisation (Alesandrini *et al.*, 2003b; Puppo, Alain *et al.*, 2005; Groten *et al.*, 2006; Dupont *et al.*, 2012). Transcriptomic analysis performed to unravel the nodule senescence process in *M. truncatula – S. meliloti* symbiosis emphasized the induction of Cys9P at the onset of nodule senescence (Fedorova *et al.*, 2002; Van de Velde *et al.*, 2006). The induction of two putative Cys9Ps, *Mt*CP6 and *Mt*VPE, has been particularly enlight during both developmental and stress induced *M. truncatula* nodule senescence (Van de Velde *et al.*, 2006; Perez Guerra *et al.*, 2010). The present study aimed at specifying their spatio9 temporal expression pattern, characterizing their enzymatic activity, and clarifying their functional involvement in the senescence process of *M. truncatula* root nodules.

Sequence homology analysis (Fig.1) identified *MtCP6* as a putative papain9like Cys proteinase. Proteinases of the papain family have been shown to be involved in various degradation processes such as developmental mediated senescence and cell death, such as abscission, fruit ripening, seeds germination, but also as environmental and pathogen mediated cell death (Otegui et al., 2005; Shindo & Van der Hoorn, 2008; van der Hoorn, 2008; Martinez *et al.*, 2012). The present phylogenetic analysis demonstrates a close relation of *MtCP6* with *TrCP8* and *AsNod32*, two Cys9Ps encoding genes shown to be specifically expressed at the junction between $N_2$9fixing and senescence zones in *Trifolium repens* and *Astragalus sinicus* mature nodules (Naito *et al.*, 2000; Asp *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2008a). Similarly, the phylogenetic analysis (Fig. 1) shows that *MtVPE* clusterized with genes of the legumain proteinase family (Hara9Nishimura & Hatsugai, 2011). MtVPE presents significant sequence homology with the vegetative VPEs (α and γ VPEs) known to be involved in developmental programmed cell death, such as tracheid differentiation and leaf senescence

For Peer Review

(Hara-Nishimura & Hatsugai, 2011). Vegetative VPE have also been shown to be involved in pathogen mediated cell death in response to bacteria, virus or mycotoxins (Hatsugai *et al.*, 2004; Kuroyanagi *et al.*, 2005; Hara-Nishimura & Hatsugai, 2011).

In the present study, spatiotemporal analysis of *MtCP6* and *MtVPE* expression showed that both genes are up-regulated during developmental senescence (Fig. 2), and are expressed at the junction between the N_2-fixing and senescence zones (Fig. 2 and 3), as already reported for TrPC8 and AsNod32 (Naito *et al.*, 2000; Asp *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2008a). In addition, our data showed that dark- or nitrate-induced senescence (Fig. 3), as well as defective symbiosis interactions-generated with defective *M. truncatula* lines or *S. meliloti* strains (Fig. 4), promoted an early nodule senescence and an extended expression of *MtCP6* and *MtVPE* in the senescent cells. On the contrary, the down regulation of either gene resulted in increased N_2 fixation capacities of the nodules, and delayed nodule senescence (Fig. 7). Taken together, these results sustain the involvement -and a key functional role- of both *MtCP6* and *MtVPE* at the onset and during the nodule senescence process. It may be noted that *MtVPE* was also found to be highly and transitorily expressed in zone II (Fig. 2), indicating an additional role of *MtVPE* in nodules. Sequence similarity analysis (Fig. 1) related *MtVPE* to vegetative VPE's known to play a crucial role in pathogen mediated cell death (Hatsugai *et al.*, 2004; Kuroyanagi *et al.*, 2005; Hara-Nishimura & Hatsugai, 2011), and it may be suggested that, in the infection zone (zone II), *MtVPE* could act as a defence response of the host plant to control and contain *Rhizobia* infection. Similarly, the high expression of *MtVPE* in root and nodule vascular bundles may be compared to the up-regulation of vegetative VPEs during differentiation of tracheary elements (Hara-Nishimura & Hatsugai, 2011), and potentially associated to the formation of vascular elements during nodule growth.

For Peer Review

Although CP6 and VPE were identified as putative Cys-P, a definitive enzymatic characterization was a prerequisite to understand their functional role during nodule senescence. However, as already reported in literature (Bromme *et al.*, 2004), the attempts to overexpress *MtrCP6* and *MtVPE* in *E. coli* were unsuccessful and the two recombinant proteins were retrieved in inclusion bodies. Their overexpression in *M. truncatula* roots was a successful solution to overcome the difficulty. Using various proteinase substrates and inhibitors, we unambiguously demonstrated that *Mt*CP6 and *Mt*VPE possess cathepsin-L and legumain activities, respectively (Fig. 5). The up-regulation of *MtCP6* and *MtVPE* expression in either dark- or nitrate-treated nodules (Fig. 3), associated with the corresponding relevant increase of their respective cathepsin-L and legumain activities (Fig. 6), strongly argues in favour of their involvement in the triggering of proteolytic activities associated with developmental or stress-induced nodule senescence (Puppo, Alain *et al.*, 2005; Groten *et al.*, 2006).

Our data are in agreement with previous work which reported that the silencing of the expression of *AsNodf32* papain proteinase in whole nodule tissues (using the ubiquitous P35S promoter) delayed nodule senescence (Li *et al.*, 2008b). Indeed, *AsNodf32*, was also shown to be highly up-regulated during nodule senescence, in the infection zone at the junction between N_2 fixing zone and senescence zone (zone III – zone IV) (Naito *et al.*, 2000). In addition, as *Mt*CP6, *As*Nodf32 features a putative vacuole targeting consensus signal LQDA on its N-terminal extremity, motif absent from most papain proteinases (Li *et al.*, 2008b).

Despite vacuole based proteinases, like papains and legumains, being demonstrated to be key components of leaf senescence and vegetal cell death (Otegui *et al.*, 2005; Hara-Nishimura & Hatsugai, 2011) their precise role in nodule senescence and particularly degradation of symbiosomes and plant host cells remained mostly unknown. Thus, to untangle how *Mt*CP6 and *Mt*VPE participate in nodule senescence, we investigated the

For Peer Review

distribution of *Mt*CP6:GFP and *Mt*VPE:GFP fusions in *M. truncatula* hairy roots and defined targeted subcellular compartments. In roots, confocal observations of the distribution of either *Mt*CP6:GFP or *Mt*VPE:GFP fusions showed that both Cys9P are delivered to the vacuole (Fig. 9A). Similar localisation was observed in uninfected nodule cells (Fig. S4). The effective vacuolar location of both *Mt*CP6 and *Mt*VPE:GFP fusions is consistent with the *in silico* sequence based analysis, predicting an ER and/or vacuole location. These data are comforted by the presence of the putative LQDA vacuole sorting peptide present in *Mt*CP6 sequence (Perez Guerra *et al.*, 2010), and by previous work demonstrating the vacuolar location of VPE (Hatsugai *et al.*, 2004; Lam, 2005) Vacuolar localization of CP6 and VPE could be related either to cell housekeeping functions, such as amino9acid recycling of misfolded proteins, or to more specific functions in vacuole mediated cell death. In this process, vacuole serves as a lytic reservoir up to the disruption of the tonoplast once plant cell death is initiated (Beers *et al.*, 2000). Seed maturation or germination, differentiation of tracheary elements, and pathogen or insect attacks were reported to promote vacuole mediated cell death involving the participation of papain and/or legumain proteinases activities (Hatsugai *et al.*, 2004; van der Hoorn & Jones, 2004; Lam, 2005; Hara9Nishimura & Hatsugai, 2011),., Thus, CP6 and VPE are potentially involved in the proteolytic process triggered when vacuole collapse at the onset of nodule cell senescence (Van de Velde et al, 2006).

Confocal observations showed that in infected nodule cells, *Mt*CP6 and *Mt*VPE are exclusively sorted out to symbiosomes (Fig. 9). The symbiosome is considered as a form of lytic compartment because of the presence of typical vacuole phosphatase, nuclease and proteinase activities in the peribacteroid space (PBS) (Mellor, 1989; Brewin, 1991). A recent study showed that, the PBM acquires vacuolar receptors (e.g. V9SNARE) during the early steps of senescence, changing it from a plasmic to a vacuolar identity (Limpens *et al.*, 2009). This new identity would allow the docking of vacuolar cargo vesicles to the PBM ensuring

For Peer Review

the delivery of vacuole targeted proteins into the PBS (Limpens *et al.*, 2009). In a recent work, we showed that, at the interface of the N_2-fixing and senescence zones, PBS pH is acidic (Pierre *et al.*, 2013), and may provide an optimal pH for cathepsin-L (MtCP6) and legumain (*Mt*VPE) activation (Li *et al.*, 2008b; Martinez *et al.*, 2012)during nodule senescence. Therefore, *Mt*CP6 and MtVPE once delivered into the PBS, may directly participate in symbiosome degradation leading to disruption of the symbiotic interaction with *S. meliloti*.

The coinduction during nodule senescence and colocalisation of both proteinases in the symbiosome may imply a joint function of *Mt*CP6 and *Mt*VPE. Interestingly, previous works on animal and plant models report that VPE acts as a transactivator of other proteinases, including cathepsin-L, through posttranslational maturation, during seeds maturation (Okamoto & Minamikawa, 1995), leaf senescence (Muntz & Shutov, 2002; Rojo *et al.*, 2004) for review) or *Schisotoma* parasitism of mouse blood cells (Delcroix *et al.*, 2006). *Mt*VPE could play such a regulatory role during nodule senescence by activating a cascade of other proteinases. The precise molecular mechanism whereby *MtCP6* or *MtVPE* potentially interact and ensure nodule senescence is the next challenging question. To answer this question, future works should first focus on the trafficking pathway controlling the delivery of *Mt*CP6 and *Mt*VPE to symbiosome. The identification of target partners and substrates of *Mt*CP6 and *Mt*VPE will be another objective to specify how *Mt*CP6 and *Mt*VPE participate the degradation of symbiosomes within plant host cell.

For Peer Review

MATERIALS and METHODS

Plant materials, growth conditions and root transformation

Medicago truncatula ecotype A17 seeds were surface-sterilized and germinated, as previously described (Boisson-Dernier *et al.*, 2001). Wild-type *M. truncatula* and composite plants with transgenic roots were grown in a phytotron under a 16 h light/8h dark photoperiod associated with 23/21°C thermoperiod, watered with nitrogen-free nutrient medium (Puppo *et al.*, 1982) and inoculated five days after germination with *S. meliloti*. The induction of hairy root has been performed using a modified protocol from (Vieweg *et al.*, 2004) using the *Agrobacterium rhizogenes* strain A4S (Alpizar *et al.*, 2006). Non-transgenic roots were discarded from plantlet by screening for GFP fluorescence of transgenic root expressed from the T-DNA construct. Composite and wild type plants were grown until 6 weeks after inoculation with *S. meliloti* and mature nodules were harvested for analysis. Alternatively, for protein extraction, hairy roots were obtained as described by Boisson-Dernier *et al.,* 2001. *A. rhizogenes* transformed *Medicago* roots were excised (1cm from the tip) and transferred onto SHb10 agar (Ramos & Bisseling, 2003). GFP fluorescence of each root lines of transgenic roots was checked before selection. Transgenic roots were grown for 3-4 weeks, at 20°C, in the obscurity.

Bacterial strains

All the strains were grown on appropriate medium supplemented with selective antibiotics, at 30°C for *Sinorhizobium meliloti*, 28°C for *Agrobacterium rhizogenes* or 37°C for *Escherichia coli* (Supplemental Table 1). The binary vectors were introduced into *A. rhizogenes* A4S by electrotransformation and colonies carrying these vectors were selected by growth on spectinomycin (100 µg ml^{-1}).

For Peer Review

Construction of promoter:*GUS* constructs

Plasmid pENTL4L19*PMtCP6*with a 1.73kb promoter fragment of the *MtCP6* cysteine protease gene was provided by M. Holsters group (Van de Velde *et al.*, 2006). Cloning into pKM43GWD destination vector was previously described by Cam et al. 2012, resulting in *PMtCP6:GUS* construct (Cam *et al.*, 2012). The Mt*VPE* promoter was obtained by polymerase chain reaction (PCR) from genomic DNA with the following primers: PVPE9 F/PVPE9R. The resulting 2kb PCR fragment was inserted into the pDON207 donor vector and then using Gateway Technology (Invitrogen), recombined into pKGWFS7 vector in order to obtain the PVPE:GUS construct (Supplemental Table 2).

Precocious expression and depletion of *MtCP6* and *MtVPE*

The full9length *MtCP6* and *MtVPE* coding sequences were amplified by PCR using primers: CP69F/CP69R and VPE9F/VPE9R, respectively. Resulting amplified fragments were inserted into the pENTR4 donor vector. The corresponding inserts were then inserted in an overexpression plasmid, pKM43GWD (VIB, Ghent, Belgium) using *PMtNCR001* (Mergaert *et al.*, 2003) 5'element and T35S 3'element, with Gateway Technology (Invitrogen) (Resulting in *PMtNCR001:MtCP6 and PMtNCR001:MtVPE*, Supplemental Table 2).

For the RNAi construct, the CaMV 35S promoter (P35S) in pK7GWIWG2D(II),0 vector (VIB, Ghent, Belgium) was replaced by the MtCP6 promoter (Van de Velde *et al.*, 2006). *Sac*I and *Spe*I restriction sites were added to PMtCP6 by a PCR amplification with PMtCP6SacI9F and PMtCP6SpeI9R primers, using pENTL4L19pMtCP6 as template. The resulting 1732bp PCR product was subcloned into pGEM9T vector (Promega). The insertion of this promoter was done in three sequential subcloning steps, first a 2472bp *Sac*I9 P35S:ccdB:intron9*Mlu*I from pK7GWIWG2D(II),0 vector was subcloned into a modified

For Peer Review

497 X*Eag*IpGEM9T vector without *Spe*I site. Secondly, P35S was replaced by PMtCP6 into *Sac*I9
498 *Spe*I sites. Finally, pK7GWIWG6D(II) was obtained by insertion of the *Sac*I9
499 PMtCP6:ccdB:intron9*Mlu*I cassette back into the original pK7GWIWG2D(II),0 vector.
500 The RNAi construct was obtained by amplification of the *CP6* 5'UTR with the 5'UTRCP69F
501 and 5'UTRCP69R primers, to generate a 80bp PCR product (Supplemental Table 2). This
502 PCR product was inserted into a pDONR207 donor vector (Invitrogen). Finally, the CP6
503 5'UTR insert was inserted into pK7GWIWG6D(II),0, with Gateway Technology
504 (*PMtCP6:RNAi MtCP6* and *PMtCP6:RNAi MtVPE* (Supplemental Table 2). Similarly, a
505 270bp PCR product of *Mt*VPE was cloned into pDONR207 donor vector (Invitrogen) and
506 finally inserted into pK7GWIWG6D(II),0, with Gateway Technology. Efficiencies of RNAi
507 and absence of off9target for both RNAi constructs were checked using the RNAiScan tool
508 (Xu *et al.*, 2006).
509
510 **GFP fusion protein constructs**
511 The full9length Mt*CP6* and *MtVPE* sequences from pDONR2079Mt*CP6* or9 Mt*VPE* were
512 inserted into pK7FWG2 (VIB, Ghent, Belgium) with Gateway Technology (Invitrogen)
513 (*P35S:MtCP6:GFP*, *P35S:MtVPE:GFP*(Supplemental Table 2).
514
515 **RNA extraction and real-time quantitative PCR analysis**
516 Total RNA was extracted with Trizol (Invitrogen) and cDNA pools were synthesized from
517 2Rg for RNA using the Omniscript RT kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions.
518 RT9qPCR was performed using a DNA engine Chromo4 (MJ Research, Biorad) with qPCR
519 Master Mix Plus for SYBR green I (Eurogentec). Each reaction were performed with 5Rl of
520 100 fold diluted cDNA template and 300nM of each specific primer set (Supplemental Table
521 2). Primers design and specificity have been tested with Primer9BLAST tools (Sayers *et al.*,

For Peer Review

2011) on non9redundant (nr) database. The primers used (Supplemental Table 2) had a calculated melting temperature between 59°C and 62°C and were unique in the MTGI (TIGR) and *Medicago* EST Navigation System (Journet *et al.*, 2002) databases. After 2min at 50°C followed by 10min at 95°C for initial denaturation, 40 thermal cycles of 15s at 95°C and 1min at 60°C had been performed. The amplification quality was checked by the presence of a single dissociation peak in a melting curve performed in each wells and the end of PCR reaction. Reactions were performed in triplicate and the results averaged. Expression level was calculated and normalized with 2^{XXCT} method (Livak & Schmittgen, 2001). As endogenous controls, the constitutively expressed Mtc27 (Favery *et al.*, 2002) 40S ribosomal protein S8 genes (Fedorova *et al.*, 2002) and A39 (del Giudice *et al.*, 2011) were used. Data and statistical analysis had been performed as described in del Giudice *et al.*, 2011 using RTqPCRBase.

Nitrogen fixing capacity of bacteroids

Nitrogen fixing capacity of bacteroids inside nodules was determined *in vivo* by measuring the reduction of acetylene into ethylene, as previously described as acetylene reducing activity (ARA) (Pierre *et al.*, 2013). Nodulated roots were harvested and incubated at 30°C for 1 h in rubber9capped tubes containing a 10% acetylene atmosphere. Ethylene concentrations were determined with a gas chromatograph (Agilent GC 6890N, Agilent technologies) equipped with a GS9Alumina (30m x 530Rm) separating capillary column.

Histological analysis of transgenic tissues

For light microscopy, nodules were fixed in 1% gluteraldehyde, 4% Formaldehyde in 0.1 M Phosphate buffer at pH 7.2, washed, dehydrated, embedded in Technovit 7100 (KulzerHisto9 Technik), according to the manufacturer's instructions and as described by Cam *et al.* 2012.

Manuscript submitted to New Phytologist for review

For Peer Review

Sections were cut on a microtome (Jung) to yield 5 Rm slices, which were mounted with DPX mountant (VWR International Ltd). GUS activity was localized, in nodule sections, after an overnight incubation with the histochemical substrate 59bromo949chloro939indolyl9399D9 glucuronide, cyclohexylammonium salt (Sigma), as described by Journet *et al.* (1994). Bright field and dark field images were taken using an Axioplan2 microscope (Carl Zeiss). For general overview of nodule structure a staining with toluidine blue was done (Van de Velde *et al.*, 2006).

Confocal microscopy

Mature nodules were harvested and freshly sectioned with a Leica VT1200S vibratome in 70Rm thick tissue slices. Nodule slices were stained with 5RM of SYTO83 according to Pierre *et al,* 2013 or with 100RM of MCB (monochlorobimane) as described in Fricker et al. 2011. In cytoplasm, MCB conjugates with glutathione (GSH) producing a red fluorescent component specifically sequestrated in vacuole (Fricker & Meyer, 2001). Excess of dye was removed by a short wash with 50mM Tris pH=7 buffer then samples were mounted on slides and observed using a Laser Scanning Confocal Microscope LSM780 (Carl Zeiss, Le Pecq, France) equipped with a plan9Apo 63x/1.4 Oil DIC objective. Spectral analysis was performed to ensure about the GFP signal.

Protein extraction and enzymatic activities

Transgenic roots were collected and total protein was extracted in extraction buffer (50mM Tris pH 8, 5mM EDTA, 20mM NaCl and 10% glycerol) at 4°C. After manual disruption of the tissue, the extracts were clarified by centrifugation at 10,000g, 10 min 4°C. Protein concentrations were estimated using standard Bradford protein assay (Bio9Rad) and 5Rg of total protein used to measure activities. The cleavage of substrates was followed by the

For Peer Review

liberation of a fluorescent molecule, coumarin, which has an excitation wavelength of 380nm and an emission wavelength of 460 nm. DEVD, YVAD, ESEN, GGR, FR, RR activities were tested using, N9Acetyl9DEVD79amido949methylcoumarin, N9Acetyl9YVAD79amido949 methylcoumarin, N9Acetyl9ESEN79amido949methylcoumarin, (PEPTIDE INSTITUTE) N9 Acetyl9GGR79amido949methylcoumarin, N9Acetyl9FR79amido949methylcoumarin and N9 Acetyl9RR79amido949methylcoumarin (SIGMA) as substrates. Activities were followed using a Xenius spectrofluorometer (SAFAS MONACO) and a reaction mix of 100mM Sodium acetate buffer, 1mM EDTA, 1mM DTT, 10Rg/ml total protein and 50RM of substrate at 28°C for 20 minutes. Once an activity was established, this was quenched with either a specific inhibiter (DEVD and YVAD) or a type specific inhibitor such as E964d (Sigma) for the papain family of proteases or iodoacetamide for the caspase like protease (ESEN). Activities were measured as a cleavage of substrate over time and values are expressed as delta fluorescence/minute.

Immunoblot analysis

Protein extracts from cultured roots were subjected to SDS9PAGE on a 12% gel, and then transferred to PVDF membrane. The membrane was blocked with 10% milk in PBS then incubated ON in the same buffer with the addition of a polyclonal antibody raised against GFP (PROMEGA). Alkaline phosphatase conjugated goat anti rabbit IgG was used as the secondary antibody (SIGMA) and revealed with BCIP/NCB (SIGMA).

Phylogenetic analysis

Papain and legumain sequences were retrieved via BlastP (Altschul *et al.*, 1997) with *M. truncatula* *Mt*CP6 and *Mt*VPE as query sequences against NCBI non9redundant database (www.ncbi.nlm.nih.gov) and MEROPS peptidase database (Rawlings *et al.*, 2011)

For Peer Review

597 (www.merops.sanger.ac.uk). Analysis was performed using Phylogeny.fr platform (Dereeper
598 *et al.*, 2008).
599

For Peer Review

600 **ACKNOWLEDGEMENTS**

601 This work was supported by PhD fellowships from the 'Ministère de l'Education Nationale,

602 de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche'. UMR ISA is part of the Labex Signalife.

603

For Peer Review

BIBLIOGRAPHY

Alesandrini F, Frendo P, Puppo A, Herouart D. 2003a. Isolation of a molecular marker of soybean nodule senescence. *Plant Physiology and Biochemistry* **41**: 7279732.

Alesandrini F, Mathis R, Van de Sype G, Herouart D, Puppo A. 2003b. Possible roles for a cysteine protease and hydrogen peroxide in soybean nodule development and senescence. *New Phytol* **158**: 1319138.

Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. 1997. Gapped blast and psi9blast: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 338993402.

Asp T, Bowra S, Borg S, Holm PB. 2004. Molecular cloning, functional expression in *Escherichia coli* and enzymatic characterisation of a cysteine protease from white clover (*Trifolium repens*). *Biochim Biophys Acta* **1699**: 1119122.

Beers EP, Woffenden BJ, Zhao C. 2000. Plant proteolytic enzymes: Possible roles during programmed cell death. *Plant Mol Biol* **44**: 3999415.

Boisson-Dernier A, Chabaud M, Garcia F, Becard G, Rosenberg C, Barker DG. 2001. *Agrobacterium rhizogenes*9transformed roots of *Medicago truncatula* for the study of nitrogen9fixing and endomycorrhizal symbiotic associations. *Mol Plant Microbe Interact* **14**: 6959700.

Brady S, Shatkay H. 2008. Epiloc: A (working) text9based system for predicting protein subcellular location. *Pac Symp Biocomput*: 6049615.

Brewin NJ. 1991. Development of the legume root nodule. *Ann. Rev. Cell Biol.* **7**: 1919226.

Bromme D, Nallaseth FS, Turk B. 2004. Production and activation of recombinant papain9 like cysteine proteases. *Methods* **32**: 1999206.

Cam Y, Pierre O, Boncompagni E, Herouart D, Meilhoc E, Bruand C. 2012. Nitric oxide (NO): A key player in the senescence of *Medicago truncatula* root nodules. *New Phytol* **196**: 5489560.

Crespi M, Gàlvez S. 2000. Molecular mechanisms in root nodule development. *Journal of Plant Growth Regulation* **19**: 1559166.

de Zelicourt A, Diet A, Marion J, Laffont C, Ariel F, Moison M, Zahaf O, Crespi M, Gruber V, Frugier F. 2012. Dual involvement of a *Medicago truncatula* NAC transcription factor in root abiotic stress response and symbiotic nodule senescence. *Plant J* **70**: 2209230.

del Giudice J, Cam Y, Damiani I, Fung-Chat F, Meilhoc E, Bruand C, Brouquisse R, Puppo A, Boscari A. 2011. Nitric oxide is required for an optimal establishment of the *Medicago truncatula-Sinorhizobium meliloti* symbiosis. *New Phytol* **191**: 4059417.

Delcroix M, Sajid M, Caffrey CR, Lim KC, Dvorak J, Hsieh I, Bahgat M, Dissous C, McKerrow JH. 2006. A multienzyme network functions in intestinal protein digestion by a platyhelminth parasite. *J Biol Chem* **281**: 39316939329.

Dupont L, Alloing G, Pierre O, El Msehli S, Hopkins J, Hérouart D, Frendo P. 2012. The legume root nodule: From symbiotic nitrogen fixation to senescence. DOI:10.5772/34438.

Emanuelsson O, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. 2007. Locating proteins in the cell using targetp, signalp and related tools. *Nat Protoc* **2**: 9539971.

Fedorova M, van de Mortel J, Matsumoto PA, Cho J, Town CD, VandenBosch KA, Gantt JS, Vance CP. 2002. Genome9wide identification of nodule9specific transcripts in the model legume *Medicago truncatula*. *Plant Physiol* **130**: 5199537.

Fricker MD, Meyer AJ. 2001. Confocal imaging of metabolism in vivo: Pitfalls and possibilities. *J Exp Bot* **52**: 6319640.

Manuscript submitted to New Phytologist for review

653 **Graham PH, Vance CP. 2003.** Legumes: Importance and constraints to greater use. *Plant*
654 *Physiol* **131**: 8729877.
655 **Groten K, Dutilleul C, van Heerden PD, Vanacker H, Bernard S, Finkemeier I, Dietz**
656 **KJ, Foyer CH. 2006.** Redox regulation of peroxiredoxin and proteinases by ascorbate
657 and thiols during pea root nodule senescence. *FEBS Lett* **580**: 126991276.
658 **Hara-Nishimura I, Hatsugai N. 2011.** The role of vacuole in plant cell death. *Cell Death*
659 *Differ* **18**: 129891304.
660 **Hatsugai N, Kuroyanagi M, Yamada K, Meshi T, Tsuda S, Kondo M, Nishimura M,**
661 **Hara-Nishimura I. 2004.** A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus9induced
662 hypersensitive cell death. *Science* **305**: 8559858.
663 **Haynes JG, Czymmek KJ, Carlson CA, Veereshlingam H, Dickstein R, Sherrier DJ.**
664 **2004.** Rapid analysis of legume root nodule development using confocal microscopy.
665 *New Phytol* **163**: 6619668.
666 **Höglund A, Dönnes P, Blum T, Adolph H-W, Kohlbacher O. 2006.** Multiloc: Prediction of
667 protein subcellular localization using n9terminal targeting sequences, sequence motifs,
668 and amino acid composition. *Bioinformatics* **22**: 115891165.
669 **Kardailsky IV, Brewin NJ. 1996.** Expression of cysteine protease genes in pea nodule
670 development and senescence. *Mol Plant Microbe Interact* **9**: 6899695.
671 **Kinoshita T, Yamada K, Hiraiwa N, Kondo M, Nishimura M, Hara-Nishimura I. 1999.**
672 Vacuolar processing enzyme is up9regulated in the lytic vacuoles of vegetative tissues
673 during senescence and under various stressed conditions. *Plant J* **19**: 43953.
674 **Kuroyanagi M, Yamada K, Hatsugai N, Kondo M, Nishimura M, Hara-Nishimura I.**
675 **2005.** Vacuolar processing enzyme is essential for mycotoxin9induced cell death in
676 *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* **280**: 32914932920.
677 **Lam E. 2005.** Vacuolar proteases livening up programmed cell death. *Trends Cell Biol* **15**:
678 1249127.
679 **Li Y, Zhou L, Chen D, Tan X, Lei L, Zhou J. 2008.** A nodule9specific plant cysteine
680 proteinase, ASnodF32, is involved in nodule senescence and nitrogen fixation activity
681 of the green manure legume *Astragalus sinicus*. *New Phytol* **180**: 1859192.
682 **Limpens E, Ivanov S, van Esse W, Voets G, Fedorova E, Bisseling T. 2009.** *Medicago* $N_2$9
683 fixing symbiosomes acquire the endocytic identity marker rab7 but delay the
684 acquisition of vacuolar identity. *Plant Cell* **21**: 281192828.
685 **Lohman KN, Gan S, John MC and Amasino RM 1994**. Molecular analysis of natural leaf
686 senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Physio Planta* **92**: 3229328
687 **Malik NS, Pfeiffer NE, Williams DR, Wagner FW. 1981.** Peptidohydrolases of soybean
688 root nodules : Identification, separation and partial characterisation of enzymes from
689 bacteroid9free extracts. *Plant Physiol* **68**: 3869392.
690 **Martinez M, Cambra I, Gonzalez-Melendi P, Santamaria ME, Diaz I. 2012.** C1a cysteine9
691 proteases and their inhibitors in plants. *Physiol Plantarum* **145**: 85994.
692 **Matamoros MA, Baird LM, Escuredo PR, Dalton DA, Minchin FR, Iturbe-Ormaetxe I,**
693 **Rubio MC, Moran JF, Gordon AJ, Becana M. 1999.** Stress induced legume root
694 nodule senescence. Physiological, biochemical and structural alterations. *Plant*
695 *Physiol.* **121**: 979112.
696 **McGowan EB, Becker E, Detwiler TC. 1989.** Inhibition of calpain in intact platelets by the
697 thiol protease inhibitor E964d. *Biochem Biophys Res Commun* **158**: 4329435.
698 **Mellor RB. 1989.** Bacteroids in the rhizobium9legume symbiosis inhabit a plant internal lytic
699 compartment: Implications for other microbial endosymbioses. *Journal of*
700 *Experimental Botany* **40**: 8319839.
701 **Mergaert P, Nikovics K, Kelemen Z, Maunoury N, Vaubert D, Kondorosi A, Kondorosi**
702 **E. 2003.** A novel family in *Medicago truncatula* consisting of more than 300 nodule9

Manuscript submitted to New Phytologist for review

specific genes coding for small, secreted polypeptides with conserved cysteine motifs. *Plant Physiol* **132**: 1619173.

Muntz K, Shutov AD. 2002. Legumains and their functions in plants. *Trends Plant Sci* **7**: 3409344.

Naito Y, Fujie M, Usami S, Murooka Y, Yamada T. 2000. The involvement of a cysteine proteinase in the nodule development in chinese milk vetch infected with *Mesorhizobium huakuii* subsp. *Rengei*. *Plant Physiol* **124**: 108791096.

Nakaune S, Yamada K, Kondo M, Kato T, Tabata S, Nishimura M, Hara-Nishimura I. 2005. A vacuolar processing enzyme, deltavpe, is involved in seed coat formation at the early stage of seed development. *Plant Cell* **17**: 8769887.

Okamoto T, Minamikawa T. 1995. Purification of a processing enzyme (VmPE91) that is involved in post9translational processing of a plant cysteine endopeptidase (SH9EP). *Eur J Biochem* **231**: 3009305.

Okamoto T, Minamikawa T. 1999. Molecular cloning and characterization of vigna mungo processing enzyme 1 (VmPE91), an asparaginyl endopeptidase possibly involved in post9translational processing of a vacuolar cysteine endopeptidase (SH9EP). *Plant Mol Biol* **39**: 63973.

Oldroyd GE, Downie JA. 2008. Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu Rev Plant Biol* **59**: 5199546.

Otegui MS, Noh YS, Martinez DE, Vila Petroff MG, Staehelin LA, Amasino RM, Guiamet JJ. 2005. Senescence9associated vacuoles with intense proteolytic activity develop in leaves of *Arabidopsis* and soybean. *Plant J* **41**: 8319844.

Perez Guerra JC, Coussens G, De Keyser A, De Rycke R, De Bodt S, Van De Velde W, Goormachtig S, Holsters M. 2010. Comparison of developmental and stress9induced nodule senescence in *Medicago truncatula*. *Plant Physiol* **152**: 157491584.

Pierre O, Engler G, Hopkins J, Brau F, Boncompagni E, Herouart D. 2013. Peribacteriod space acidification: A marker of mature bacteroid functioning in *Medicago truncatula* nodules. *Plant Cell Environ* DOI: 10.11118520/pce.1216.

Pislariu CI, Murray JD, Wen J, Cosson V, Muni RR, Wang M, Benedito VA, Andriankaja A, Cheng X, Jerez IT, Mondy S, Zhang S, Taylor ME, Tadege M, Ratet P, Mysore KS, Chen R, Udvardi MK. 2012. A *Medicago truncatula* tobacco retrotransposon insertion mutant collection with defects in nodule development and symbiotic nitrogen fixation. *Plant Physiol* **159**: 168691699.

Pladys D, Vance CP. 1993. Proteolysis during development and senescence of effective and plant gene9controlled ineffective alfalfa nodules. *Plant Physiol* **103**: 3799384.

Puppo A, Dimitrijevic L, Rigaud J. 1982. Possible involvement of nodule superoxide dismutase and catalase in leghemoglobin protection. *Planta* **156**: 3749379.

Puppo A, Groten K, Bastian F, Carzaniga R, Soussi M, Lucas MM, de Felipe MR, Harrison J, Vanacker H, Foyer CH. 2005. Legume nodule senescence: Roles for redox and hormone signalling in the orchestration of the natural aging process. *New Phytol* **165**: 6839701.

Puppo A, Groten K, Bastian F, Carzaniga R, Soussi M, Lucas MM, de Felipe MR, Harrison J, Vanacker H, Foyer CH. 2005. Legume nodule senescence: Roles for redox and hormone signalling in the orchestration of the natural aging process. *New Phytologist* **165**: 6839701.

Ramos J, Bisseling T. 2003. A method for the isolation of root hairs from the model legume *Medicago truncatula*. *J Exp Bot* **54**: 224592250.

Rawlings ND, Barrett AJ, Bateman A. 2011. Merops: The database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res* **40**: D3439350.

Rojo E, Martin R, Carter C, Zouhar J, Pan S, Plotnikova J, Jin H, Paneque M, Sanchez-Serrano JJ, Baker B, Ausubel FM, Raikhel NV. 2004. VPEgamma exhibits a caspase9like activity that contributes to defense against pathogens. *Curr Biol* **14**: 18979 1906.

Shindo T, Van der Hoorn RA. 2008. Papain9like cysteine proteases: Key players at molecular battlefields employed by both plants and their invaders. *Mol Plant Pathol* **9**: 1199125.

Tamai M, Yokoo C, Murata M, Oguma K, Sota K, Sato E, Kanaoka Y. 1987. Efficient synthetic method for ethyl (+)9(2s,3s)939[(s)939methyl9 19(39 methylbutylcarbamoyl)butylcarbamoyl]929oxiranecarb oxylate (est), a new inhibitor of cysteine proteinases. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **35**: 109891104.

Van de Velde W, Guerra JC, De Keyser A, De Rycke R, Rombauts S, Maunoury N, Mergaert P, Kondorosi E, Holsters M, Goormachtig S. 2006. Aging in legume symbiosis. A molecular view on nodule senescence in *Medicago truncatula*. *Plant Physiol* **141**: 7119720.

van der Hoorn RA. 2008. Plant proteases: From phenotypes to molecular mechanisms. *Annu Rev Plant Biol* **59**: 1919223.

van der Hoorn RAL, Jones JDG. 2004. The plant proteolytic machinery and its role in defence. *Current Opinion in Plant Biology* **7**: 4009407.

Vance CP. 2001. Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition. Plant nutrition in a world of declining renewable resources. *Plant Physiol* **127**: 3909397.

Vieweg MF, Fruhling M, Quandt HJ, Heim U, Baumlein H, Puhler A, Kuster H, Andreas MP. 2004. The promoter of the *Vicia faba* l. Leghemoglobin gene *VfLb29* is specifically activated in the infected cells of root nodules and in the arbuscule9 containing cells of mycorrhizal roots from different legume and nonlegume plants. *Mol Plant Microbe Interact* **17**: 62969.

Wang D, Dong X. 2011. A highway for war and peace: The secretory pathway in plant9 microbe interactions. *Mol Plant* **4**: 5819587.

Wang D, Griffitts J, Starker C, Fedorova E, Limpens E, Ivanov S, Bisseling T, Long S. 2010. A nodule9specific protein secretory pathway required for nitrogen9fixing symbiosis. *Science* **327**: 112691129.

For Peer Review

Control Dark stress 3d Nitrate stress 3d

Figure S1

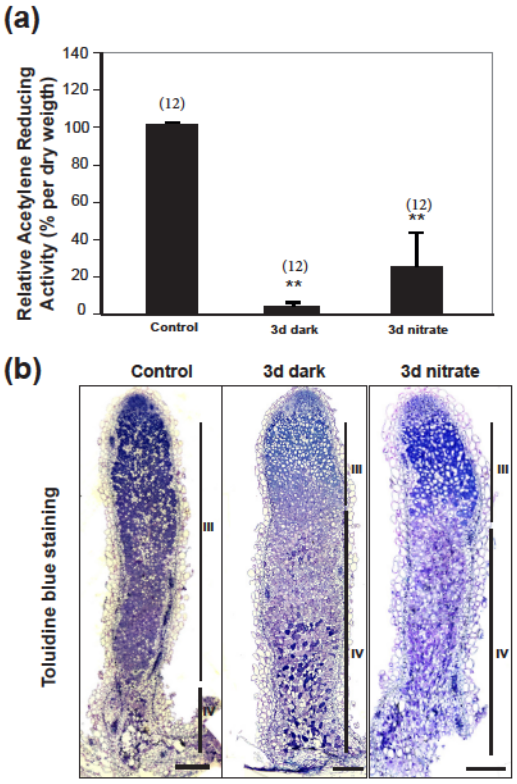


Figure S1: Dark and nitrate treatments decrease N_2 fixation and promote early nodule senescence

Six wpi-old mature nodules were dark or nitrate treated for 3 days, then harvested. (a) After 3 days of dark and nitrate treatments nodule N_2 fixation (ARA) was assayed. (b) Nodule morphology was investigated on nodule 5µm thin section stained by toluidine blue. N_2 fixation of Acetylene reducing activity and nodule morphology were determined on two independent biological replicates. Numbers between brackets represent the effective of independent assays. Error bar represents the standard error. The bars indicate the different zones of nodules (I-IV). Statistical analysis: $p<0.01$, Kruskal-Wallis test. Scale bars: 250µm.

Figure S2

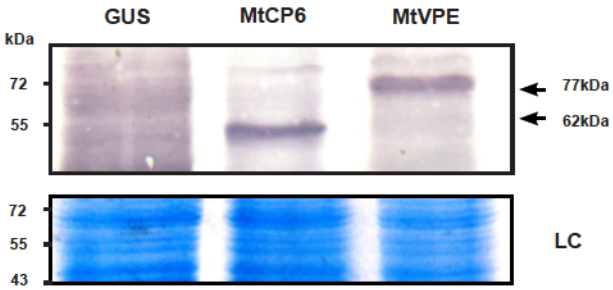


Figure S2: Western-blotting detection of *Mt*CP6 and *Mt*VPE:GFP fusions

Overexpression in transgenic roots of *Mt*CP6 or *Mt*VPE:GFP were ensured by western-blotting using anti-GFP antibody. LC: loading control with coomassie staining (40µg of protein crude extract per lane).

Figure S3

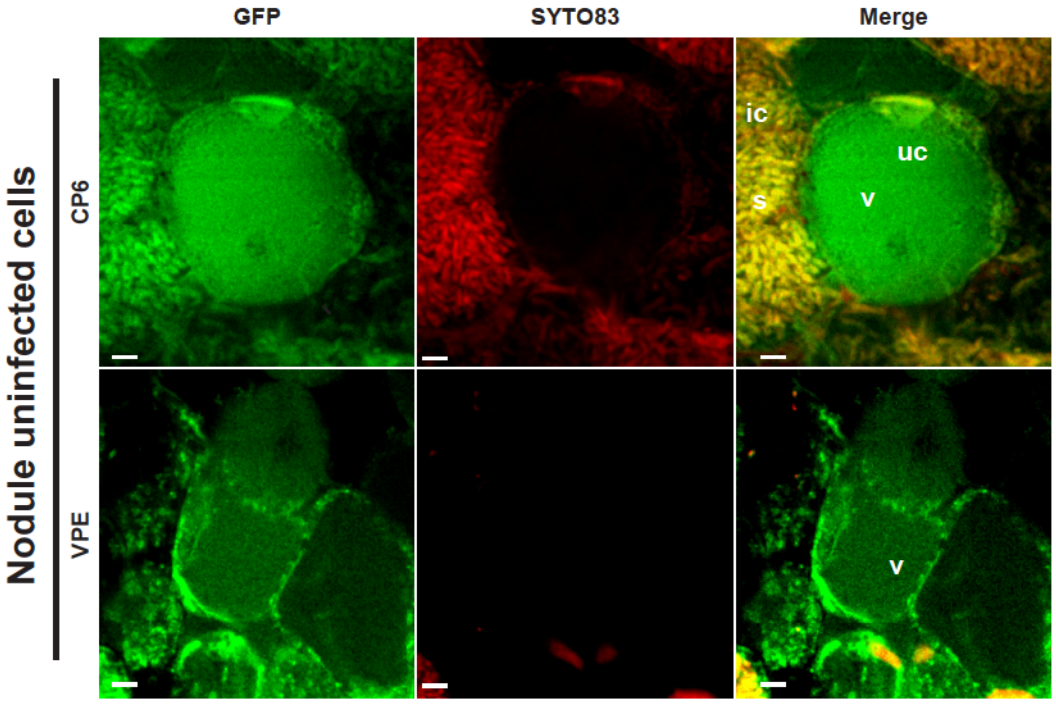


Figure S3: *In vivo* confocal imaging of MtCP6 and MtVPE in nodule uninfected cells.
Six wpi-old nodules expressing MtCP6:GFP or MtVPE:GFP were harvested, sectioned, counterstained with SYTO83 and investigated for GFP localization. MtCP6 and MtVPE localized in vacuole (v) of uninfected cells (UC). Symbiosome (s); Bacteroid infected cells (IC). All pictures were acquired by CLSM. Scale bar:10µm

Figure S3: *In vivo* confocal imaging of *Mt*CP6 and *Mt*VPE in nodule uninfected cells.

Six wpi-old nodules expressing *Mt*CP6:GFP or *Mt*VPE:GFP were harvested, sectioned, counterstained with SYTO83 and investigated for GFP localization. *Mt*CP6 and *Mt*VPE localized in vacuole (v) of uninfected cells (UC). Symbiosome (s); Bacteroid infected cells (IC). All pictures were acquired by CLSM. Scale bar:10µm

Supplemental table 1. Primers used in this study

Annotation	Forward primer (F)	Reverse primer (R)
MtCP6	AAAAAGCAGGCTTCACCATGACTGCCAATAATCAATTA	AGAAAGCTGGGTGTCAAGCAGTGGGATAAGATGC
MtVPE	AAAAAGCAGGCTTCACCATGGACTTTTCTCAATTTTCC	AGAAAGCTGGGTGCTATGCACTGAAACCCCTTTG
RNAi-MtCP6	AAAAAGCAGGCTTCGACTTTGTGGCATTGCAATGATG	AGAAAGCTGGGTGAGCATAATTTACATAGTTTGG
RNAi-MtVPE	AAAAAGCAGGCTTCTCAGCTCTTACAGGTGGGAGTG	AGAAAGCTGGGTGCTGCATTTGAAGCCGTTGTCGC
PMtCP6	GAGAGCTCCGCCATCTATCTTCATTCGTCA	GGGTAAAAGCACAGCACTTCTTTCTAGAACTAGTCC
PMtVPE	AAAAAGCAGGCTTCGAAATTCATGAAATTCACTAACC	AGAAAGCTGGGTGAGTGAAGAGGAAGTGATAGGG
MtCP6-qPCR	CCTGCTGCTACTATTGCTGGATATG	CACTCGCATCAATGGCTACGG
MtVPE-qPCR	CCAGGGGTTCTTGGTATGCCCG	ACTGCCAGATTCACATGCCTCCA
MtCP6trans-qPCR	AGGAGCGTAGATGCTGCTCAAGGA	TTGCGGAAGAAAGCTGGGTGTCA
MtVPEtrans-qPCR	GTGCCAGTATTCCTGCCAACCCTTG	TGATTTTTGCGGAAGAAAGCTGGGTG
Mtc27-qPCR	TGAGGGAGCAACCAAATACC	GCGAAAACCAAGCTACCATC
MtA39-qPCR	CGGCAACTAGATCTTTGACA	CATTTGCTGTTGGTGTGTACG
MtRP40S-qPCR	TTGTCCAAGTTTGATGCTGCAC	TCCTACCAACTTCAAAACACCG

Supplemental table 2. Bacterial strains and plasmids used in this study

Designation	Resistance	Relevant properties	Reference or source
S. meliloti			
Sm 102F34 Rif^R	Rif^R	Spontaneous Rif^r derivative of 102F34	Pocard *et al.*, 1997
Sm 1021	Sm^R	Spontaneous Sm^r derivative of 1021	Meade at al., 1982
Sm 1021NifH	SmR /Neo^R	1021 niH with Tn5 insertion	Ruvkun et al., 1982
A. rhizogenes			
A4S	Rif^R		Alpizar *et al*., 2006
E. coli			
XL1-Blue MRF'	Tet^R	Δ(*mcrA*)*183* Δ(*mcrCB-hsdSMR-mrr*)*173 endA1 supE44 thi-1 recA1* gyrA96 relA1 lac *[F'* proAB $lacI^qZ\Delta M15$ *Tn*10 *(*Tet^r*)]*	Stratagene
DB3.1	Sm^R	F- gyrA462 endA1 glnV44 Δ(sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(r_B^-, m_B^-) ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Sm^r) xyl5 Δleu mtl1	Invitrogen
Plasmids			
pDONR207	Gm^R	Gateway entry vector	Invitrogen
pGEM-T vector	Amp^R	Cloning vector	Promega
pGEM-T ΔEagI	Amp^R	Cloning vector with modified SpeI restriction pattern	This study
pGEM-T ΔEagI PMtCP6	Amp^R	pGEM-T ΔEagI with PMtCP6 replacing P35S	This study
pENTL4L1-PMtCP6	Km^R	pENTR4 vector with 1,7kb MtCP6 promoter	Provided by M. Holster group (VIB, gent)
pKGWFS7	Km^R	Gateway destination vector for promoter GUS:GFP fusion	Invitrogen
pKM43GWD	Sm^R/Sp^R	Triple entry destination vector for ectopic expression, rolD:GFP	Karimi *et al.*, 2002
PNCR001 5'element	Km^R	pDONRP4P1R 5'entry with MtNCR001 promoter	This study
T35S 3'element	Km^R	pDONRP2R-P3 3'entry with 35S terminator	This study
PNCR001:MtCP6:T35S	Sm^R/Sp^R	pKM43GWD with MtCP6 cDNA and T35S terminator	This study
PNCR001:MtVPE:T35S	Sm^R/Sp^R	pKM43GWD with MtVPE cDNA and T35S terminator	This study
pK7FWG2,0	Sm^R/Sp^R	Destination vector for overexpression, P35S promoter, GFP reporter gene	Karimi *et al.*, 2002
P35S:MtCP6:GFP	Sm^R/Sp^R	pK7FWG2,0; 3.7kb cDNA of MtCP6, GFP fusion	This study
P35S:MtVPE:GFP	Sm^R/Sp^R	pK7FWG2,0; 1,0kb cDNA of MtCP6,GFP fusion	This study
pKGWFS7	Sm^R/Sp^R	Destination vector for promoter analysis	Karimi *et al.*, 2002
PMtCP6	Sm^R/Sp^R	pKL43GWD vector with 1,7kb MtCP6 promoter	This study
PMtVPE	Km^R	pKGWFS7 vector with 2,0kb MtVPE promoter	This study
pK7GWIWG2D(II),0	Sm^R/Sp^R	Hairpin RNA expression destination vector, control RNAi empty vector	Karimi *et al*., 2002
pK7GWIWG2D(II),0 PMtCP6	Sm^R/Sp^R	Hairpin RNA expression destination vector, with RNAi under PMtCP6 promoter	This study
PMtCP6:RNAi MtCP6	Sm^R/Sp^R	pK7GWIWG2D(II),0 PMtCP6 destination vestor, with specific 5'UTR MtCP6 insert	This study
PMtCP6:RNAi MtVPE	Sm^R/Sp^R	pK7GWIWG2D(II),0 PMtCP6 destination vestor, with specific VPE insert	This study

II. 2 DISCUSSION

L'ensemble de nos données démontre le rôle clef de deux cystéine protéases, *Mt*CP6 et *Mt*VPE dans le processus de sénescence nodositaire. En termes d'identité de séquence, *Mt*CP6 et *Mt*VPE appartiennent respectivement à la famille des Papaïnes et à celle des Légumaines, également appelées « Vacuolar Processing Enzyme » (VPE). Ces familles sont impliquées dans de nombreux processus de mort cellulaire programmée développementale ou en réponse à un phytopathogène (Hara-Nishimura & Hatsugai, 2011; Martinez et al., 2012). Les études sur la sénescence nodositaire soit développementale (Van de Velde et al., 2006) soit induite par un traitement à l'obscurité (Perez Guerra et al., 2010) montrent l'induction de ces deux gènes, ce qui suggère leurs implications potentielles dans ce processus de rupture symbiotique.

Notre analyse spatio-temporelle d'*MtCP6* et *MtVPE*, par fusion transcriptionnelle de leur promoteur avec le gène rapporteur GUS, montre que les deux gènes sont coexprimés aussi bien lors du processus de sénescence nodositaire développemental que lors d'une sénescence induite par divers traitements abiotiques (traitement à l'obscurité ou supplémentation des plantes en azote). *MtCP6* et *MtVPE* sont également induits au sein de nodosités non fonctionnelles mises en place par des lignées de *M. truncatula* (*Mtdnf1*) (Wang et al., 2010) ou des souches de S. meliloti déficientes pour la symbiose comme le mutant *nifH*, mutant qui conduit à une induction précoce du processus de sénescence (Maunoury et al., 2010). La coinduction de ces deux gènes lors de la rupture symbiotique en réponse à différents facteurs

aussi bien physiologiques qu'abiotiques suggère, en accord avec les précédentes études (Perez Guerra et al., 2010; Van de Velde et al., 2006), que *MtCP6* et *MtVPE* sont impliqués dans le mécanisme de rupture de l'interaction symbiotique.

Cette hypothèse est confirmée par le fait que la diminution de l'expression par ARNi de *MtCP6* et *MtVPE* sur des nodosités de 6 semaines post-inoculation. La diminution de l'expression de ces gènes entraine une augmentation, de la fixation d'azote et, de la taille des nodosités, ainsi qu'à l'extension de la zone III et la réduction de la taille de la zone IV. A l'inverse, l'expression ectopique de ces deux gènes avant la mise en place du processus de sénescence, via leur expression sous le contrôle du promoteur *PMtNCR001* (Mergaert et al., 2003) conduit à une diminution de la taille des nodosités, de la zone III et provoquant une extension de la zone IV. Ainsi, la diminution ou l'expression précoce de *MtCP6* et *MtVPE* est capable, respectivement, de retarder ou de promouvoir la mise en place du processus de sénescence. Ces phénotypes opposés démontrent le rôle clef de ces deux protéases dans l'induction du processus de sénescence nodositaire. Ces résultats sont cohérents avec les résultats obtenus par Li et coll. (2008), travaux au cours desquels le « knock-down » constitutif d'*AsNodf32* chez l'Astragale (Légumineuse), effectué sous contrôle du promoteur P35S, retarde l'induction du processus de sénescence (Li et al., 2008).

Préalablement à ce travail, *MtCP6* et *MtVPE* ont été annotées automatiquement respectivement comme des Papaïnes et Légumaines protéases. Cependant, la confirmation et la caractérisation de leurs activités protéolytiques permettraient de mieux envisager leurs rôles

dans la sénescence nodositaire. La stratégie de production de protéines recombinantes chez *E. coli* ayant échoué à cause d'une production massive de *Mt*CP6 et *Mt*VPE dans des corps d'inclusion. Cet écueil est évoqué dans la littérature scientifique (Bromme et al., 2004). Pour pallier à cette difficulté, nous avons d'abord généré et multiplié en culture *in vitro* des lignées racinaires de *M. truncatula* surexprimant *MtCP6* et *MtVPE.* Nous avons ensuite caractérisé sur les activités de MtCP6 et de MtVPE sur ces extraits protéiques racinaires via l'utilisation de différents substrats peptidiques fluorogéniques. Nous avons ainsi démontré que *Mt*CP6 et *Mt*VPE exercent, respectivement, une activité cathepsine-L et Légumaine ; ce qui nous a permis de confirmer respectivement leur appartenance aux familles des Papaïnes et des Légumaines. Les activités cathepsine-L et Légumaines sont augmentées dans les nodosités traitées par un stress obscurité ou supplémentées en azote. Ces hausses d'activité sont corrélées à une forte augmentation de l'expression de *MtCP6* et *MtVPE*.

Pour mieux comprendre comment *Mt*CP6 et *Mt*VPE peuvent participer à la mise en place du processus de sénescence nodositaire, nous avons cherché à déterminer leur localisation subcellulaire dans des racines et nodosités transgéniques exprimant *MtCP6* et *MtVPE* en fusion carboxyterminale avec la GFP. L'observation par microscopie confocale a mis en évidence le fait que *Mt*CP6 et *Mt*VPE sont adressées aux vacuoles des cellules racinaires, mais aussi à celles des cellules non infectées de la nodosité. Cette localisation vacuolaire est en accord avec le motif d'adressage vacuolaire LQDA présent en N-terminal de *Mt*CP6 (Li et al., 2008; Perez Guerra et al., 2010), ainsi qu'avec les précédents travaux menés sur les VPE (Hara-Nishimura & Hatsugai, 2011). La localisation vacuolaire peut suggérer un rôle de ménage de ces

protéines, assurant l'homéostasie cellulaire via le recyclage des acides aminés en participant à la dégradation des protéines non fonctionnelles (Marty, 1999; Xiang et al., 2012). Cependant, une localisation vacuolaire peut également suggérer une implication de ces protéases dans un processus de mort cellulaire programmée médié par la lyse du tonoplaste. La lyse du tonoplaste provoque la libération dans le cytoplasme de multiples agents lytiques vacuolaires (protéases, nucléase, lipases, glycolases) initiant la mort cellulaire (Beers et al., 2000). Au niveau des cellules hôtes infectées par des bactéroïdes, *Mt*CP6 et *Mt*VPE sont adressées aux symbiosomes et non à la vacuole où aucun signal GFP n'a été observé. Récemment, il y a été montré chez *M. truncatula*, que lors des premières étapes de la sénescence nodositaire la membrane péribactéroïdienne (PBM) acquérait une identité vacuolaire (Limpens et al., 2009). Cette nouvelle identité permettrait la fusion de vésicules cargos adressées à la vacuole avec la PBM, délivrant ainsi dans l'espace péribactéroïdien différentes protéines adressées à la vacuole – dont lors de la sénescence nodositaire de *Mt*CP6 et *Mt*VPE. Ces protéases trouveraient dans l'espace péribactéroïdien (PBS) un environnement acide propice à leur activation (Hara-Nishimura & Hatsugai, 2011; Martinez et al., 2012). La présence de protéases actives conduirait à la dégradation des symbiosomes et donc à l'initiation des premières étapes du processus de sénescence nodositaire (Van de Velde et al., 2006). Il reste cependant à valider ce modèle en déterminant *in vivo*, via des sondes peptidiques fluorogéniques, la présence d'activité cathepsine-L et Légumaines dans le PBS au niveau de l'interzone III-IV.

Si notre étude démontre l'implication de MtCP6 et MtVPE dans la mise en place du processus de sénescence nodositaire et identifie les symbiosomes comme un compartiment

cible, le mécanisme moléculaire par lequel ces protéases agissent reste encore inconnu. Cependant, la concomitance de leur expression lors de la sénescence, et l'adressage de ces deux protéases dans le même compartiment subcellulaire pourrait suggérer que ces deux cystéine protéases ont un rôle complémentaire dans l'induction de la rupture symbiotique. En effet, dans différents modèles animaux et végétaux, différentes VPE ont été caractérisées comme des transactivateurs d'autres protéinases, dont des cathepsines-L comme *Mt*CP6 ; et ce lors de la maturation des graines (Okamoto et al, 1995) ou encore lors du parasitisme des cellules sanguines de souris par *Schistosoma* (Delcroix et al, 2006 ; Hara-Nishimura & Hatsugai, 2011). L'analyse *in vitro* par co-immunoprécipitation ou « pull-down assay » puis *in vivo* par BiFC (« Bimolecular Fluorescence Complementation ») permettrait de confirmer cette interaction potentielle et, *a minima*, d'identifier par spectrométrie de masse les différentes protéines cibles de ces protéases.

CHAPITRE III
DISCUSSION GENERALE & PERSPECTIVES

L'ensemble des données produites au cours de ces travaux de thèses a permis d'ouvrir différentes perspectives sur le processus symbiotique et plus précisément sur le processus de mise en place de la sénescence nodositaire.

I. VERS UNE MEILLEURE CARACTERISATION DU PROCESSUS DE SENESCENCE NODOSITAIRE

Nous avons ainsi pu démontrer le rôle clef des cystéine protéases *Mt*CP6 et *Mt*VPE dans le processus de sénescence nodositaire. Si ces deux gènes sont induits au cours de la sénescence, leurs activités protéasiques pourraient être modulées au niveau post-traductionnel. Ainsi, les protéases sont traduites sous forme de pre-proenzymes inactives ; propeptides inhibiteurs généralement clivés à pH acide, permettant l'activation des protéases dans le compartiment cible, par exemple : les vacuoles, les lysosomes… (Hara-Nishimura & Hatsugai, 2011; Martinez et al., 2012). Grâce à nos analyses ratiométriques du pH de l'espace péribactéroïdien, nous avons pu montrer que celui-ci s'acidifie au cours de l'interaction symbiotique entre les deux partenaires. De plus, nos travaux montrent que *Mt*CP6 et *Mt*VPE sont adressés à l'espace péribactéroïdien (PBS) lors du processus de sénescence nodositaire, et dans lequel se trouve un pH acide propice à leurs activations, conduisant à la mise en place du processus de sénescence de la nodosité.

Actuellement, nous cherchons à valider cette hypothèse d'autoactivation de ces protéases à pH acide au niveau du PBS par le développement de nouvelles approches cytologiques visant à visualiser, *in vivo*, une hausse d'activité cathepsine-L et légumaine dans le PBS au niveau de l'interzone III-IV. Notre approche consiste à incuber des coupes de nodosités matures dans des substrats peptidiques fluorogéniques, spécifiques des activités cathepsine-L et légumaines (substrats utilisés pour caractériser l'activité de MtCP6 et MtVPE) et d'observer leur profil d'activité au niveau du PBS entre la zone III et l'interzone III-IV. Bien que nos premiers résultats soient encourageants, nous cherchons à améliorer la précision de l'analyse via l'utilisation de sondes fluorescentes protéasiques ratiométriques. Ces sondes basées sur le principe de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) sont constituées d'une séquence peptidique de clivage, présentant un motif spécifique de l'activité de la protéase cible flanquée de 2 fluorochromes compatibles pour une analyse par FRET, par exemple, la fluorescéine et TAMRA (Fischer et al., 2006). Après incubation sur des coupes de nodosités, ces sondes permettront de visualiser et de quantifier *in vivo* l'activité protéasique dans l'ensemble des cellules hôtes, et plus particulièrement au niveau du PBS. Des approches similaires ont été récemment mises en place sur des modèles cellulaires pour l'étude *in vivo* de protéase virale (Jin et al., 2011). De telles sondes, spécifiques de l'activité cathepsine-L sont déjà disponibles (Fischer et al., 2006). Toutefois, il reste à faire synthétiser une sonde spécifique d'activité Légumaine avec un motif à base d'ESEN.

A

Lys(εTamra)-APISFFELG-εLys(αFluo)-CONH$_2$

Substrat ratiométrique pour une activité cathepsine-D

B

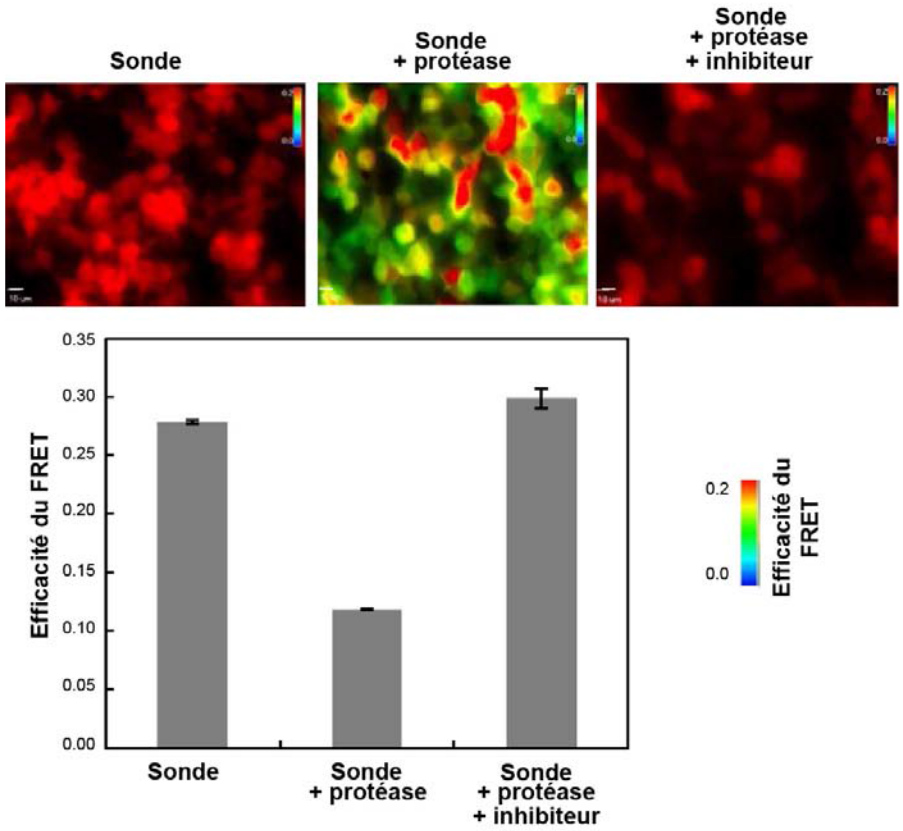


Figure 40 : Etude *in vivo* de l'activité protéolytique et les sondes protéasiques ratiométriques
(A) Structure d'une sonde fluorescente ratiométrique pour l'étude de l'activité cathépsine-D. Basée sur le principe de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer), le site de clivage est flanqué de deux fluorochromes compatibles ici, TAMRA qui fluorescence dans le rouge comme accepteur et la fluorescéine comme fluorochome donneur. (B) Etude d'acidité protéolytique analogue de l'activité protéasique HIV-1. Ce substrat peptidique est ici flanqué de la GFP (donneur FRET) et de la mCHERRY (accepteur FRET). La sonde est ici co-transfectée seule ou avec la protéase HIV-1 ou avec HIV-1 et son inhibiteur le rétonavir. L'activité protéasique est mesurée par la perte d'efficacité du FRET due au clivage du peptide conduisant la séparation des deux fluorochromes.
Une telle approche sur coupe de nodosité permettrait de visualiser et de quantifier les activités cathépsine-L et Légumaines au niveau du PBS entre la zone III et l'interzone III-IV. Echelle : 10µm.

Figures modifiées d'après : Jin et al., 2011 ; Fischer et al., 2006

Une autre approche viserait à étudier une éventuelle régulation post-traductionnelle de MtCP6 et MtVPE. Si l'activation de ces deux cystéine protéases dépendent, comme beaucoup de protéase, d'un pH acide (Martinez et al., 2008), leurs activités pourraient également être régulées de façon post-traductionnelle notamment par le monoxyde d'azote (NO). Effectivement, en collaboration avec l'équipe de Claude Bruand, le NO a été montré comme étant un régulateur clef du processus de sénescence nodositaire (Cam et al., 2012). Le NO agit par S-nitrosylation de certains résidus cystéine en modulant l'activité de différentes protéines cibles, dont certaines protéases végétales (Belenghi et al., 2007; Turk et al., 2012). Nos premières analyses bioinformatiques suggèrent que *Mt*CP6 serait composé de dix cystéines dont deux susceptibles d'être S-nitrosylées. Une première approche visera à valider *in vitro* l'existence de ces sites de S-nitrosylation par une approche de « biotin-switch » (Forrester et al., 2009) couplée à une analyse en spectrométrie de masse (techniques disponibles et maitrisées au sein notre unité). Puis, l'importance *in vivo* de ces S-nitrosylations pourra être déterminée par mutagenèse dirigée, en substituant séquentiellement aux cystéines cibles des sérines – acide aminé présentant une polarité et encombrement stérique proche de la cystéine sans être pour autant sujet à la S-nitrosylation. Toutefois, cette construction devra être insérée dans une lignée de *M. truncatula* invalidée pour le gène *MtCP6*. Une telle lignée invalidée par l'insertion du rétrotransposon *Tnt1* est disponible sur le site de la « Noble Foundation ». Cette lignée *MtCP6:Tnt1 (NF0261)* présente au moins 17 insertions *supplémentaires de Tnt1.* Cette lignée est actuellement mise en culture afin d'initier la succession de rétrocroisement avec une

lignée de fond génétique sauvage pour obtenir une lignée mutante de *M. truncatula* présentant une insertion unique de *MtCP6:Tnt1*.

Outre l'étude de la régulation post-traductionnelle de *MtCP6* et *MtVPE*, l'identification des interactants (protéines régulatrices et protéines cibles) de ces deux protéases permettrait également d'effectuer une avancée majeure dans la caractérisation fine du processus de sénescence nodositaire en déterminant la cascade de signalisation conduisant à son activation. Pour cela, une approche par « pull-down » est en cours de réalisation au sein de mon équipe de recherche ; approche similaire récemment éprouvée avec la méthalloprotéase MMP-2 (Kesanakurti et al., 2012). A cette fin, les protéines *Mt*CP6 ou *Mt*VPE fusionnées avec un tag HIS seront fixées sur une colonne de nickel affine pour l'histidine. Puis, des extraits protéiques seront chargés sur ces colonnes à partir d'extraction protéique de zone enrichie en tissu sénescent (zone IV) ou bien provenant de nodosité préalablement stressée. Pour éviter, tout clivage des interactants dans la colonne nickel, la cystéine du groupement catalytique sera substituée par mutagenèse dirigée par une sérine. Cette substitution au niveau du site catalytique ne devrait pas altérer la liaison avec les substrats, liaisons qui sont assurées par d'autres domaines de la protéase (van der Hoorn, 2008). Les différents interactants ainsi retenus par la colonne seront ensuite identifiés par spectrométrie de masse. Une approche analogue a récemment permis d'identifier les substrats du complexe protéasique ClpP qui participe à la virulence de *Staphylococcus aureus* (Feng et al., 2012). Cependant, un des risques importants d'échec pourrait être un temps d'interaction trop court entre la protéase et ses protéines cibles. Une liaison trop faible pourrait conduire à une absence de protéine retenue

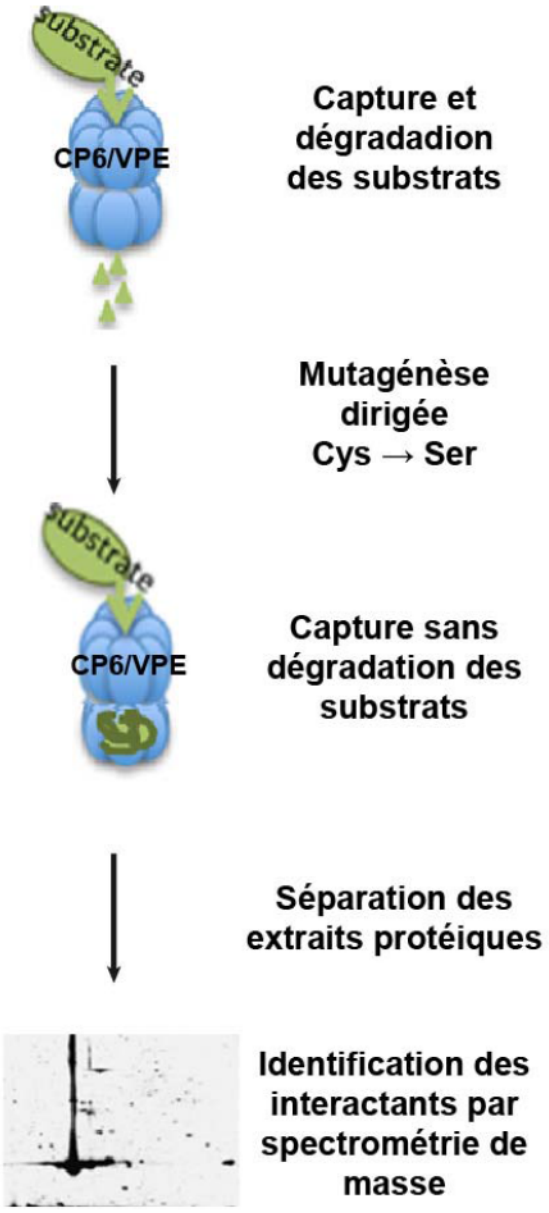


Figure 41 : Stratégie de capture *in vivo* et d'identification des interactants de *Mt*CP6 et *Mt*VPE
Stratégie de capture *in vivo* et d'identification des substrats cellulaires d'MtCP6 et MtVPE. Stratégie analogue à celle menée sur les protéases ClpP par Feng et al, 2013. Pour éviter la dégradation des substrats, la cystéine du site catalytique de *Mt*CP6 et *Mt*VPE est substituée par mutagenèse dirigée par une Sérine – acide aminé de polarité et masse similaire. Cette protéine est ensuite exprimée sous son propre promoteur dans un fond génétique invalidé pour *Mt*CP6. Une fois la sénescence nodositaire initiée (sénescence développementale ou induite), le complexe protéase-substrat est purifié via le tag HIS présent sur la protéase « piège ». Les échantillons sont ensuite séparés par électrophorèse mono- ou bidimensionnelle puis préparés pour une analyse en spectrométrie de masse.
Une telle approche permettrait d'identifier les substrats d'*Mt*CP6 et *Mt*VPE lors de la sénescence nodositaire.

Figures modifiées d'après : Feng et al., 2013

par la colonne nickel. Dans ce cas, la capture de l'interactant pourrait être tentée par une approche plus sensible, par exemple, en utilisant la résonnance plasmonique de surface via le système BiaCore (appareillage opérationnel au sein de l'Institut). Cette approche permettrait de collecter les différents interactants selon leur force de liaison, même si celle-ci reste relativement faible. Les interactants ainsi isolés seraient ensuite identifiés par spectrométrie de masse. Une approche analogue menée au sein de mon équipe est déjà en cours d'expérimentation et vise à purifier et isoler différents facteurs de transcription se liant à une probable « NO box » (Financement INRA AAP SPE 2012).

L'étude de la régulation de ces protéases par le NO et/ou par le pH, ainsi que l'identification de leurs protéines cibles, permettrait une avancée majeure dans la compréhension du mécanisme moléculaire du processus de sénescence nodositaire. Cette caractérisation fine du processus de sénescence permettrait de définir les acteurs clefs de ce processus. Acteurs clefs qui après validation du bienfondé de leur dérégulation (augmentation de la biomasse, augmentation de la teneur globale en azote des graines ou des feuilles selon le modèle) serviront de support génétique pour le développement de programmes d'améliorations variétales des Légumineuses. Cette optimisation pourrait à terme conduire à développer une agriculture plus respectueuse de l'environnement.

II. VERS UNE AGRICULTURE ECOLOGIQUE PLUS RENTABLE ?

Les Légumineuses sont d'une importance agronomique majeure. Elles représentent 27% de la production agricole mondiale (Graham & Vance, 2003) et participent à l'alimentation aussi bien animale (plantes fourragères) qu'humaine (plantes protéagineuses) ; assurant ainsi près de 33% du régime protéique alimentaire de l'homme (Vance et al., 2000). Outre ce rôle alimentaire, les Légumineuses participent via la symbiose rhizobienne à l'enrichissement du sol en azote. Cet enrichissement biologique, de près de 50 millions de tonnes d'azote par an, sert via la rotation culturale, d'engrais azotés pour les cultures suivantes (Plantes à graines, Oléagineuses…) (Pislariu et al., 2012). Cependant, les Légumineuses par la fixation d'azote atmosphérique assurent seulement 20% des besoins en azote des cultures non fixatrices (Herridge & Rose, 2000), obligeant ainsi à la supplémentation des sols en azote, via l'utilisation d'engrais azotés, afin maximiser les rendements. Ces achats et épandages d'intrants azotés, aux vues des cours des années 2000, génèrent un surcoût estimé à plus de $6,5 milliards à l'agriculture mondiale (Herridge & Rose, 2000).

Différents programmes agronomiques tendent à optimiser la fixation biologique de l'azote en améliorant d'une part l'inoculum bactérien selon les spécificités du milieu (pH, température…), mais également en développant par amélioration variétale des lignées présentant une fixation d'azote plus importante et plus pérenne. Pour cela, la compréhension

du processus de sénescence nodositaire et sa régulation sont des traits génétiques porteurs, que des programmes d'amélioration variétale tendent à exploiter depuis maintenant plus de 20 ans (Buttery et al., 1992; Herridge & Rose, 2000). L'émergence depuis 2006 de données moléculaires concernant le processus de sénescence nodositaire (De Michele et al., 2009; Perez Guerra et al., 2010; Van de Velde et al., 2006) et cette étude) pourraient à terme offrir les bases génétiques nécessaires pour l'introgression de caractères conduisant à une induction retardée du processus de sénescence nodositaire. Cette introgression pourrait mener *in fine* à une augmentation de la période de fixation de l'ensemble des nodosités et donc devrait tendre à une augmentation de la teneur en azote des parties aériennes et donc des graines.

Cependant, l'induction du processus de sénescence ne doit pas être complètement abolie, car chez les Légumineuses présentant des nodosités à croissance déterminées, la sénescence nodositaire est initiée pendant le remplissage des graines et participe ainsi à la réallocation des nutriments de la nodosité vers les graines, ce qui *in fine* augmente leur teneur en azote (Pfeiffer et al., 1983). Un retard de sénescence nodositaire, et non pas son abolition permettrait donc une extension de la période de fixation d'azote lors du remplissage des graines qui, suivit par la réallocation des nutriments suite à la sénescence nodositaire tardive pourrait conduire à une augmentation de la teneur des graines en azote, augmentant de ce fait leurs valeurs nutritionnelles.

Outre l'optimisation variétale de la plante hôte, l'amélioration de l'inoculum est également une stratégie porteuse pour obtenir une extension de la période fixatrice d'azote. En

effet, l'étude au sein de mon équipe de l'altération de système toxine-antitoxine chez *S. meliloti*, systèmes impliqués chez *E.coli* dans son adaptation à différentes niches écologiques comme les systèmes circulatoire et urinaire (Norton & Mulvey, 2012), semble conduire à une extension de la période fixatrice (Communication personnelle : J. Lipuma / L. Dupont Sophia-Antipolis). La diminution du « pool » d'espèces réactives de l'oxygène ou de l'azote par la surexpression chez *S. meliloti* respectivement d'une flavodoxine (Redondo et al., 2009) ou d'une flavohémoglobine (Cam et al., 2012) conduisent à retarder l'induction du processus de sénescence. Ce dernier travail a justement fait l'objet d'un dépôt de brevet dans l'optique de l'augmentation de la productivité des Légumineuses (Brevet DI-RV-10-0028 RS-Bruand).

Enfin, outre l'aspect directement alimentaire, une fixation d'azote accrue médiée par une sénescence nodositaire retardée pourrait également augmenter l'enrichissement du sol en azote. Cette symbiose optimisée en association à la rotation culturale ou association culturale également appelée « intracropping » (pratique culturale en cours de développement qui consiste à cultiver de manière associée Légumineuses et Céréales et qui conduit dans certaines conditions à l'obtention de rendement équivalent à ceux obtenus en monoculture avec les intrants azotés (Pelzer et al., 2012); MH Jeufrroy, INRA Grignon) pourraient, à terme, permettre de limiter les intrants azotés.

Ainsi, l'interaction de Légumineuses et de rhizobia optimisés pour la symbiose fixatrice d'azote, associée à des pratiques culturales novatrices pourrait conduire à l'émergence d'une agriculture écologique plus rentable et donc plus facilement applicable à grande échelle.

BIBLIOGRAPHIE

A

Abascal, F., Zardoya, R., and Posada, D. (2005). ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution. Bioinformatics *21*, 2104-2105.

Alesandrini, F., Mathis, R., Van de Sype, G., Hérouart, D., and Puppo, A. (2003). Possible roles for a cysteine protease and hydrogen peroxide in soybean nodule development and senescence. New Phytologist *158*, 131-138.

Alkhalfioui, F., Renard, M., Frendo, P., Keichinger, C., Meyer, Y., Gelhaye, E., Hirasawa, M., Knaff, D.B., Ritzenthaler, C., and Montrichard, F. (2008). A novel type of thioredoxin dedicated to symbiosis in legumes. Plant physiology *148*, 424-435.

Alpizar, E., Dechamp, E., Espeout, S., Royer, M., Lecouls, A.C., Nicole, M., Bertrand, B., Lashermes, P., and Etienne, H. (2006). Efficient production of *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots and composite plants for studying gene expression in coffee roots. Plant cell reports *25*, 959-967.

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic acids research *25*, 3389-3402.

Ane, J.M., Kiss, G.B., Riely, B.K., Penmetsa, R.V., Oldroyd, G.E., Ayax, C., Levy, J., Debelle, F., Baek, J.M., Kalo, P., *et al.* (2004). *Medicago truncatula* DMI1 required for bacterial and fungal symbioses in legumes. Science *303*, 1364-1367.

Apel, K., and Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annual review of plant biology *55*, 373-399.

Appleby, C.A. (1984). Leghemoglobin and *Rhizobium* respiration. Annual review of plant physiology *35*, 443-478.

Arrighi, J.F., Barre, A., Ben Amor, B., Bersoult, A., Soriano, L.C., Mirabella, R., de Carvalho-Niebel, F., Journet, E.P., Gherardi, M., Huguet, T., *et al.* (2006). The *Medicago truncatula* lysin motif-receptor-like kinase gene family includes NFP and new nodule-expressed genes. Plant physiology *142*, 265-279.

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

B

Balestrini, R., Ott, T., Guther, M., Bonfante, P., Udvardi, M.K., and De Tullio, M.C. (2012). Ascorbate oxidase: the unexpected involvement of a 'wasteful enzyme' in the symbioses with nitrogen-fixing bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi. Plant Physiol Biochem *59*, 71-79.

Batut, J., and Boistard, P. (1994). Oxygen control in *Rhizobium*. Antonie van Leeuwenhoek *66*, 129-150.

Baudouin, E., Pieuchot, L., Engler, G., Pauly, N., and Puppo, A. (2006). Nitric oxide is formed in *Medicago truncatula-Sinorhizobium meliloti* functional nodules. Mol Plant Microbe Interact *19*, 970-975.

Beatty, P.H., and Good, A.G. (2011). Plant science. Future prospects for cereals that fix nitrogen. Science *333*, 416-417.

Becana, M., and Klucas, R.V. (1992). Transition metals in legume root nodules: iron-dependent free radical production increases during nodule senescence. Proc Natl Acad Sci U S A *89*, 8958-8962.

Becana, M., Matamoros, M.A., Udvardi, M., and Dalton, D.A. (2010). Recent insights into antioxidant defenses of legume root nodules. New Phytol *188*, 960-976.

Becker, A., Barnett, M.J., Capela, D., Dondrup, M., Kamp, P.B., Krol, E., Linke, B., Ruberg, S., Runte, K., Schroeder, B.K., *et al.* (2009). A portal for rhizobial genomes: RhizoGATE integrates a *Sinorhizobium meliloti* genome annotation update with postgenome data. Journal of biotechnology *140*, 45-50.

Beers, E.P., Woffenden, B.J., and Zhao, C. (2000). Plant proteolytic enzymes: possible roles during programmed cell death. Plant Mol Biol *44*, 399-415.

Belenghi, B., Romero-Puertas, M.C., Vercammen, D., Brackenier, A., Inze, D., Delledonne, M., and Van Breusegem, F. (2007). Metacaspase activity of *Arabidopsis thaliana* is regulated by S-nitrosylation of a critical cysteine residue. J Biol Chem *282*, 1352-1358.

Benedito, V.A., Torres-Jerez, I., Murray, J.D., Andriankaja, A., Allen, S., Kakar, K., Wandrey, M., Verdier, J., Zuber, H., Ott, T., *et al.* (2008). A gene expression atlas of the model legume *Medicago truncatula*. Plant J *55*, 504-513.

Bhandari, B., and Nicholas, D.J. (1985). Proton motive force in washed cells of *Rhizobium japonicum* and bacteroids from *Glycine max*. J Bacteriol *164*, 1383-1385.

Boisson-Dernier, A., Chabaud, M., Garcia, F., Becard, G., Rosenberg, C., and Barker, D.G. (2001). *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Medicago truncatula* for the study of nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations. Mol Plant Microbe Interact *14*, 695-700.

Boscari, A., Del Giudice, J., Ferrarini, A., Venturini, L., Zaffini, A.L., Delledonne, M., and Puppo, A. (2012). Expression dynamics of the *Medicago truncatula* transcriptome during the symbiotic interaction with *Sinorhizobium meliloti*: which role for nitric oxide? Plant physiology *161*, 425-439.

Bosch, M., Poulter, N.S., Perry, R.M., Wilkins, K.A., and Franklin-Tong, V.E. (2010). Characterization of a legumain/vacuolar processing enzyme and YVADase activity in *Papaver* pollen. Plant Mol Biol *74*, 381-393.

Brewin, N.J. (2004). Plant cell wall remodelling in the *Rhizobium* legume symbiosis. Critical Reviews in Plant Sciences *23*, 293-316.

Bromme, D., Nallaseth, F.S., and Turk, B. (2004). Production and activation of recombinant papain-like cysteine proteases. Methods *32*, 199-206.

Buttery, B.R., Park, S.J., and Hume, D.J. (1992). Potential for increasing nitrogen fixation in grain legumes. Canadian Journal of Plant Science *72*, 323-349.

C

Cam, Y., Pierre, O., Boncompagni, E., Herouart, D., Meilhoc, E., and Bruand, C. (2012). Nitric oxide (NO): a key player in the senescence of *Medicago truncatula* root nodules. New Phytol *196*, 548-560.

Cannon, S.B., Crow, J.A., Heuer, M.L., Wang, X., Cannon, E.K., Dwan, C., Lamblin, A.F., Vasdewani, J., Mudge, J., Cook, A., *et al.* (2005). Databases and information integration for the *Medicago truncatula* genome and transcriptome. Plant physiology *138*, 38-46.

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

Cassab, G.I. (1998). Plant Cell Wall Proteins. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol *49*, 281-309.

Castresana, J. (2000). Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. Mol Biol Evol *17*, 540-552.

Catalano, C.M., Czymmek, K.J., Gann, J.G., Sherrier, D.J., Limpens, E., Ivanov, S., van Esse, W., Voets, G., Fedorova, E., and Bisseling, T. (2007). *Medicago truncatula* syntaxin SYP132 defines the symbiosome membrane and infection droplet membrane in root nodules *Medicago* N2-fixing symbiosomes acquire the endocytic identity marker Rab7 but delay the acquisition of vacuolar identity. Planta *225*, 541-550.

Catalano, C.M., Lane, W.S., and Sherrier, D.J. (2004). Biochemical characterization of symbiosome membrane proteins from Medicago truncatula root nodules. Electrophoresis *25*, 519-531.

Cebolla, A., Vinardell, J.M., Kiss, E., Olah, B., Roudier, F., Kondorosi, A., and Kondorosi, E. (1999). The mitotic inhibitor ccs52 is required for endoreduplication and ploidy-dependent cell enlargement in plants. Embo J *18*, 4476-4484.

Cederlund, A., Gudmundsson, G.H., and Agerberth, B. (2011). Antimicrobial peptides important in innate immunity. Febs J *278*, 3942-3951.

Cerri, M.R., Frances, L., Laloum, T., Auriac, M.C., Niebel, A., Oldroyd, G.E., Barker, D.G., Fournier, J., and de Carvalho-Niebel, F. (2012). *Medicago truncatula* ERN transcription factors: regulatory interplay with NSP1/NSP2 GRAS factors and expression dynamics throughout rhizobial infection. Plant physiology *160*, 2155-2172.

Charpentier, M., Bredemeier, R., Wanner, G., Takeda, N., Schleiff, E., and Parniske, M. (2008). *Lotus japonicus* CASTOR and POLLUX are ion channels essential for perinuclear calcium spiking in legume root endosymbiosis. Plant Cell *20*, 3467-3479.

Chevenet, F., Brun, C., Banuls, A.L., Jacq, B., and Christen, R. (2006). TreeDyn: towards dynamic graphics and annotations for analyses of trees. BMC bioinformatics *7*, 439.

Childs, K.L., Hamilton, J.P., Zhu, W., Ly, E., Cheung, F., Wu, H., Rabinowicz, P.D., Town, C.D., Buell, C.R., and Chan, A.P. (2007). The TIGR Plant Transcript Assemblies database. Nucleic acids research *35*, D846-851.

Cinege, G., Kereszt, A., Kertesz, S., Balogh, G., and Dusha, I. (2004). The roles of different regions of the CycH protein in c-type cytochrome biogenesis in *Sinorhizobium meliloti*. Mol Genet Genomics *271*, 171-179.

Clement, M., Lambert, A., Herouart, D., and Boncompagni, E. (2008). Identification of new up-regulated genes under drought stress in soybean nodules. Gene *426*, 15-22.

Coba de la Pena, T., Carcamo, C.B., Almonacid, L., Zaballos, A., Lucas, M.M., Balomenos, D., and Pueyo, J.J. (2008). A cytokinin receptor homologue is induced during root nodule organogenesis and senescence in Lupinus albus L. Plant Physiol Biochem *46*, 219-225.

Compant, S., Clément, C., and Sessitsch, A. (2010). Plant growth-promoting bacteria in the rhizo-and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. Soil Biology and Biochemistry *42*, 669-678.

Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clement, C., and Barka, E.A. (2005). Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. Appl Environ Microbiol *71*, 4951-4959.

Cook, D.R. (1999). *Medicago truncatula*:a model in the making! Curr Opin Plant Biol *2*, 301-304.

Corzo, J., Santamaria, M., and Gutierrez-Navarro, A.M. (1997). Transient Energy Coupling Between Rhizobia and Legume Cells Mediated by the Peribacteroid Membrane ATPase Proton Pump. 389-400.

Crespi, M., and Frugier, F. (2008). *De novo* organ formation from differentiated cells: root nodule organogenesis. Science signaling *1*, re11.

Crespi, M., and Galvez, S. (2000). Molecular Mechanisms in Root Nodule Development. J Plant Growth Regul *19*, 155-166.

Cronk, Q., Ojeda, I., and Pennington, R.T. (2006). Legume comparative genomics: progress in phylogenetics and phylogenomics. Curr Opin Plant Biol *9*, 99-103.

Cybulski, R.J., Jr., Sanz, P., Alem, F., Stibitz, S., Bull, R.L., and O'Brien, A.D. (2009). Four superoxide dismutases contribute to *Bacillus anthracis* virulence and provide spores with redundant protection from oxidative stress. Infection and immunity *77*, 274-285.

D

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

D'Haeseleer, K., De Keyser, A., Goormachtig, S., and Holsters, M. (2010). Transcription factor MtATB2: about nodulation, sucrose and senescence. Plant & cell physiology *51*, 1416-1424.

Das, P., Lahiri, A., Lahiri, A., and Chakravortty, D. (2010). Modulation of the arginase pathway in the context of microbial pathogenesis: a metabolic enzyme moonlighting as an immune modulator. PLoS Pathog *6*, e1000899.

Day, D.A., Poole, P.S., Tyerman, S.D., and Rosendahl, L. (2001). Ammonia and amino acid transport across symbiotic membranes in nitrogen-fixing legume nodules. Cellular and Molecular Life Sciences *58*, 61-71.

De Michele, R., Formentin, E., and Lo Schiavo, F. (2009). Legume leaf senescence: a transcriptional analysis. Plant signaling & behavior *4*, 319-320.

de Zelicourt, A., Diet, A., Marion, J., Laffont, C., Ariel, F., Moison, M., Zahaf, O., Crespi, M., Gruber, V., and Frugier, F. (2012). Dual involvement of a *Medicago truncatula* NAC transcription factor in root abiotic stress response and symbiotic nodule senescence. Plant J *70*, 220-230.

del Giudice, J., Cam, Y., Damiani, I., Fung-Chat, F., Meilhoc, E., Bruand, C., Brouquisse, R., Puppo, A., and Boscari, A. (2011). Nitric oxide is required for an optimal establishment of the *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium meliloti* symbiosis. New Phytol *191*, 405-417.

DelVecchio, V.G., Kapatral, V., Redkar, R.J., Patra, G., Mujer, C., Los, T., Ivanova, N., Anderson, I., Bhattacharyya, A., Lykidis, A., *et al.* (2002). The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. Proc Natl Acad Sci U S A *99*, 443-448.

Den Herder, G., and Parniske, M. (2009). The unbearable naivety of legumes in symbiosis. Curr Opin Plant Biol *12*, 491-499.

Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., Dufayard, J.F., Guindon, S., Lefort, V., Lescot, M., *et al.* (2008). Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. Nucleic acids research *36*, W465-469.

Di Paolo, G., and De Camilli, P. (2006). Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. Nature *443*, 651-657.

Diatchenko, L., Lukyanov, S., Lau, Y.F., and Siebert, P.D. (1999). Suppression subtractive hybridization: a versatile method for identifying differentially expressed genes. Methods Enzymol *303*, 349-380.

Downie, J.A. (2005). Legume Haemoglobins: Symbiotic Nitrogen Fixation Needs Bloody Nodules. Current Biology *15*, R196-R198.

Duhoux, E., Nicole, M., and Selosse, M.A. (2004). Biologie végétale: associations et interactions chez les plantes: premier cycle, prépas, CAPES, Pharmacie (Dunod).

E

Edgar, R.C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic acids research *32*, 1792-1797.

F

Favey, S., Labesse, G., Vouille, V., and Boccara, M. (1995). Flavohaemoglobin HmpX: a new pathogenicity determinant in *Erwinia chrysanthemi* strain 3937. Microbiology (Reading, England) *141 (Pt 4)*, 863-871.

Fedorova, E., Thomson, R., Whitehead, L.F., Maudoux, O., Udvardi, M.K., and Day, D.A. (1999). Localization of H(+)-ATPases in soybean root nodules. Planta *209*, 25-32.

Fedorova, M., van de Mortel, J., Matsumoto, P.A., Cho, J., Town, C.D., VandenBosch, K.A., Gantt, J.S., and Vance, C.P. (2002). Genome-wide identification of nodule-specific transcripts in the model legume *Medicago truncatula*. Plant physiology *130*, 519-537.

Feng, J., Michalik, S., Varming, A.N., Andersen, J.H., Albrecht, D., Jelsbak, L., Krieger, S., Ohlsen, K., Hecker, M., Gerth, U., *et al.* (2012). Trapping and proteomic identification of cellular substrates of the ClpP protease in *Staphylococcus aureus*. J Proteome Res *12*, 547-558.

Ferguson, G.P., Datta, A., Baumgartner, J., Roop, R.M., 2nd, Carlson, R.W., and Walker, G.C. (2004). Similarity to peroxisomal-membrane protein family reveals that *Sinorhizobium* and *Brucella* BacA affect lipid-A fatty acids. Proc Natl Acad Sci U S A *101*, 5012-5017.

Ferguson, G.P., Jansen, A., Marlow, V.L., and Walker, G.C. (2006). BacA-mediated bleomycin sensitivity in *Sinorhizobium meliloti* is independent of the unusual lipid A modification. J Bacteriol *188*, 3143-3148.

Ferguson, G.P., Roop, R.M., 2nd, and Walker, G.C. (2002). Deficiency of a *Sinorhizobium meliloti* BacA mutant in alfalfa symbiosis correlates with alteration of the cell envelope. J Bacteriol *184*, 5625-5632.

Fernandez-Lopez, M., Goormachtig, S., Gao, M., D'Haeze, W., Van Montagu, M., and Holsters, M. (1998). Ethylene-mediated phenotypic plasticity in root nodule development on *Sesbania rostrata*. Proc Natl Acad Sci U S A *95*, 12724-12728.

Feussner, I., and Wasternack, C. (2002). The lipoxygenase pathway. Annual review of plant biology *53*, 275-297.

Filoche, S.K., Coleman, M.J., Angker, L., and Sissons, C.H. (2007). A fluorescence assay to determine the viable biomass of microcosm dental plaque biofilms. Journal of Microbiological Methods *69*, 489-496.

Finan, T.M., Hirsch, A.M., Leigh, J.A., Johansen, E., Kuldau, G.A., Deegan, S., Walker, G.C., and Signer, E.R. (1985). Symbiotic mutants of *Rhizobium meliloti* that uncouple plant from bacterial differentiation. Cell *40*, 869-877.

Fischer, R., Bachle, D., Fotin-Mleczek, M., Jung, G., Kalbacher, H., and Brock, R. (2006). A targeted protease substrate for a quantitative determination of protease activities in the endolysosomal pathway. Chembiochem *7*, 1428-1434.

Forrester, M.T., Foster, M.W., Benhar, M., and Stamler, J.S. (2009). Detection of protein S-nitrosylation with the biotin-switch technique. Free radical biology & medicine *46*, 119-126.

Fougere, F., and Le Rudulier, D. (1990). Uptake of glycine betaine and its analogues by bacteroids of *Rhizobium meliloti*. Journal of general microbiology *136*, 157-163.

Fraysse, N., Couderc, F., and Poinsot, V. (2003). Surface polysaccharide involvement in establishing the rhizobium-legume symbiosis. Eur J Biochem *270*, 1365-1380.

G

Gage, D.J. (2002). Analysis of infection thread development using Gfp- and DsRed-expressing *Sinorhizobium meliloti*. J Bacteriol *184*, 7042-7046.

Gage, D.J. (2004). Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. Microbiol Mol Biol Rev *68*, 280-300.

Galibert, F., Finan, T.M., Long, S.R., Puhler, A., Abola, P., Ampe, F., Barloy-Hubler, F., Barnett, M.J., Becker, A., Boistard, P., *et al.* (2001). The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. Science *293*, 668-672.

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

Gepts, P., Beavis, W.D., Brummer, E.C., Shoemaker, R.C., Stalker, H.T., Weeden, N.F., and Young, N.D. (2005). Legumes as a model plant family. Genomics for food and feed report of the Cross-Legume Advances Through Genomics Conference. Plant Physiol *137*, 1228-1235.

Geurts, R., Fedorova, E., and Bisseling, T. (2005). Nod factor signaling genes and their function in the early stages of *Rhizobium* infection. Curr Opin Plant Biol *8*, 346-352.

Glazebrook, J., Ichige, A., and Walker, G.C. (1993). A *Rhizobium meliloti* homolog of the *Escherichia coli* peptide-antibiotic transport protein SbmA is essential for bacteroid development. Genes & development *7*, 1485-1497.

Gogorcena, Y., Gordon, A.J., Escuredo, P.R., Minchin, F.R., Witty, J.F., Moran, J.F., and Becana, M. (1997). N_2 fixation, carbon metabolism and oxidative damage in nodules of dark stressed Common Bean plants. Plant Physiol *113*, 1193-1201.

Gogorcena, Y., Iturbe-Ormaetxe, I., Escuredo, P.R., and Becana, M. (1995). Antioxidant defenses against activated oxygen in pea nodules subjected to water stress. Plant physiology *108*, 753-759.

Gonzalez, E.M., Gordon, A.J., James, C.L., and Arrese-Igor, C. (1995). The role of sucrose synthase in the response of soybean nodules to drought. Journal of Experimental Botany *46*, 1515-1523.

Gonzalez, J.E., Reuhs, B.L., and Walker, G.C. (1996a). Low molecular weight EPS II of *Rhizobium meliloti* allows nodule invasion in *Medicago sativa*. Proc Natl Acad Sci U S A *93*, 8636-8641.

Gonzalez, J.E., York, G.M., and Walker, G.C. (1996b). *Rhizobium meliloti* exopolysaccharides: synthesis and symbiotic function. Gene *179*, 141-146.

Good, A.G., and Beatty, P.H. (2011). Fertilizing nature: a tragedy of excess in the commons. PLoS biology *9*, e1001124.

Goormachtig, S., Capoen, W., James, E.K., and Holsters, M. (2004). Switch from intracellular to intercellular invasion during water stress-tolerant legume nodulation. Proc Natl Acad Sci U S A *101*, 6303-6308.

Gordon, A.J., Minchin, F.R., Skot, L., and James, C.L. (1997). Stress-induced declines in soybean N_2 fixation are related to nodule sucrose synthase activity. Plant physiology *114*, 937-946.

Gough, C., and Cullimore, J. (2011). Lipo-chitooligosaccharide signaling in endosymbiotic plant-microbe interactions. Mol Plant Microbe Interact *24*, 867-878.

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

Groten, K., Dutilleul, C., van Heerden, P.D., Vanacker, H., Bernard, S., Finkemeier, I., Dietz, K.J., and Foyer, C.H. (2006). Redox regulation of peroxiredoxin and proteinases by ascorbate and thiols during pea root nodule senescence. FEBS Lett *580*, 1269-1276.

Groth, M., Takeda, N., Perry, J., Uchida, H., Draxl, S., Brachmann, A., Sato, S., Tabata, S., Kawaguchi, M., Wang, T.L., *et al.* (2010). NENA, a Lotus japonicus homolog of Sec13, is required for rhizodermal infection by arbuscular mycorrhiza fungi and rhizobia but dispensable for cortical endosymbiotic development. Plant Cell *22*, 2509-2526.

Guindon, S., and Gascuel, O. (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. Systematic biology *52*, 696-704.

Gunther, C., Schlereth, A., Udvardi, M., and Ott, T. (2007). Metabolism of reactive oxygen species is attenuated in leghemoglobin-deficient nodules of *Lotus japonicus*. Mol Plant Microbe Interact *20*, 1596-1603.

Gyorgyey, J., Vaubert, D., Jimenez-Zurdo, J.I., Charon, C., Troussard, L., Kondorosi, A., and Kondorosi, E. (2000). Analysis of *Medicago truncatula* nodule expressed sequence tags. Mol Plant Microbe Interact *13*, 62-71.

H

Haag, A.F., Baloban, M., Sani, M., Kerscher, B., Pierre, O., Farkas, A., Longhi, R., Boncompagni, E., Herouart, D., Dall'angelo, S., *et al.* (2011). Protection of *Sinorhizobium* against host cysteine-rich antimicrobial peptides is critical for symbiosis. PLoS biology *9*, e1001169.

Haag, A.F., Kerscher, B., Dall'Angelo, S., Sani, M., Longhi, R., Baloban, M., Wilson, H.M., Mergaert, P., Zanda, M., and Ferguson, G.P. (2012). Role of cysteine residues and disulfide bonds in the activity of a legume root nodule-specific, cysteine-rich peptide. J Biol Chem *287*, 10791-10798.

Hara-Nishimura, I., and Hatsugai, N. (2011). The role of vacuole in plant cell death. Cell death and differentiation *18*, 1298-1304.

Harrison, J., Jamet, A., Muglia, C.I., Van de Sype, G., Aguilar, O.M., Puppo, A., and Frendo, P. (2005). Glutathione plays a fundamental role in growth and symbiotic capacity of *Sinorhizobium meliloti*. J Bacteriol *187*, 168-174.

Heller, R., Esnault, R., and Lance, C., eds. (1993). Physiologie végétale. 1. Nutrition (Dunod).

Hernansanz-Agustin, P., Izquierdo-Alvarez, A., Garcia-Ortiz, A., Ibiza, S., Serrador, J.M., and Martinez-Ruiz, A. (2013). Nitrosothiols in the immune system: signaling and protection. Antioxid Redox Signal *18*, 288-308.

Herridge, D., and Rose, I. (2000). Breeding for enhanced nitrogen fixation in crop legumes. Field Crops Research *65*, 229-248.

Hirsch, A.M. (1992). Developmental biology of legume nodulation. New Phytologist *122*, 211-237.

Horchani, F., Prevot, M., Boscari, A., Evangelisti, E., Meilhoc, E., Bruand, C., Raymond, P., Boncompagni, E., Aschi-Smiti, S., Puppo, A., *et al.* (2011). Both plant and bacterial nitrate reductases contribute to nitric oxide production in *Medicago truncatula* nitrogen-fixing nodules. Plant physiology *155*, 1023-1036.

I

Iannetta, P.P.M., De Lorenzo, C., James, E.K., Fernandez-Pascual, M., Sprent, J.I., Lucas, M.M., Witty, J.F., De Felipe, M.R., and Minchin, F.R. (1993). Oxygen Diffusion in Lupin Nodules: I.VISUALIZATION OF DIFFUSION BARRIER OPERATION. Journal of Experimental Botany *44*, 1461-1467.

J

Jacobitz, S., and Bishop, P.E. (1992). Regulation of nitrogenase-2 in *Azotobacter vinelandii* by ammonium, molybdenum, and vanadium. J Bacteriol *174*, 3884-3888.

Jamet, A., Mandon, K., Puppo, A., and Herouart, D. (2007). H_2O_2 is required for optimal establishment of the *Medicago sativa/Sinorhizobium meliloti* symbiosis. J Bacteriol *189*, 8741-8745.

Jamet, A., Sigaud, S., Van de Sype, G., Puppo, A., and Herouart, D. (2003). Expression of the bacterial catalase genes during *Sinorhizobium meliloti-Medicago sativa* symbiosis and their crucial role during the infection process. Mol Plant Microbe Interact *16*, 217-225.

Jin, S., Ellis, E., Veetil, J.V., Yao, H., and Ye, K. (2011). Visualization of human immunodeficiency virus protease inhibition using a novel Forster resonance energy transfer molecular probe. Biotechnology progress *27*, 1107-1114.

Jones, K.M., Kobayashi, H., Davies, B.W., Taga, M.E., and Walker, G.C. (2007). How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model. Nat Rev Microbiol *5*, 619-633.

Journet, E.P., van Tuinen, D., Gouzy, J., Crespeau, H., Carreau, V., Farmer, M.J., Niebel, A., Schiex, T., Jaillon, O., Chatagnier, O., *et al.* (2002). Exploring root symbiotic programs in the model legume *Medicago truncatula* using EST analysis. Nucleic acids research *30*, 5579-5592.

K

Kaiser, B.N., Finnegan, P.M., Tyerman, S.D., Whitehead, L.F., Bergersen, F.J., Day, D.A., and Udvardi, M.K. (1998). Characterization of an ammonium transport protein from the peribacteroid membrane of soybean nodules. Science *281*, 1202-1206.

Kanamori, N., Madsen, L.H., Radutoiu, S., Frantescu, M., Quistgaard, E.M., Miwa, H., Downie, J.A., James, E.K., Felle, H.H., Haaning, L.L., *et al.* (2006). A nucleoporin is required for induction of Ca2+ spiking in legume nodule development and essential for rhizobial and fungal symbiosis. Proc Natl Acad Sci U S A *103*, 359-364.

Kardailsky, I.V., and Brewin, N.J. (1996). Expression of cysteine protease genes in pea nodule development and senescence. Mol Plant Microbe Interact *9*, 689-695.

Kato, K., Kanahama, K., and Kanayama, Y. (2010). Involvement of nitric oxide in the inhibition of nitrogenase activity by nitrate in *Lotus* root nodules. J Plant Physiol *167*, 238-241.

Kesanakurti, D., Chetty, C., Rajasekhar Maddirela, D., Gujrati, M., and Rao, J.S. (2012). Functional cooperativity by direct interaction between PAK4 and MMP-2 in the regulation of anoikis resistance, migration and invasion in glioma. Cell Death Dis *3*, e445.

Kneip, C., Lockhart, P., Voss, C., and Maier, U.G. (2007). Nitrogen fixation in eukaryotes--new models for symbiosis. BMC Evol Biol *7*, 55.

Kondorosi, E., Redondo-Nieto, M., and Kondorosi, A. (2005). Ubiquitin-mediated proteolysis. To be in the right place at the right moment during nodule development. Plant physiology *137*, 1197-1204.

Kroncke, K.D., Haase, H., Beyersmann, D., Kolb-Bachofen, V., and Hayer-Hartl, M.K. (2001). Nitric oxide inhibits the cochaperone activity of the RING finger-like protein DnaJ. Nitric Oxide *5*, 289-295.

Kuster, H., Vieweg, M.F., Manthey, K., Baier, M.C., Hohnjec, N., and Perlick, A.M. (2007). Identification and expression regulation of symbiotically activated legume genes. Phytochemistry *68*, 8-18.

L

Larrainzar, E., Wienkoop, S., Weckwerth, W., Ladrera, R., Arrese-Igor, C., and Gonzalez, E.M. (2007). *Medicago truncatula* root nodule proteome analysis reveals differential plant and bacteroid responses to drought stress. Plant physiology *144*, 1495-1507.

Läuchli, A., and Bieleski, R.L. (1983). Inorganic plant nutrition (Springer-Verlag). ISBN 354012103X.

Laus, M.C., Logman, T.J., Lamers, G.E., Van Brussel, A.A., Carlson, R.W., and Kijne, J.W. (2006). A novel polar surface polysaccharide from *Rhizobium leguminosarum* binds host plant lectin. Molecular microbiology *59*, 1704-1713.

Le Signor, C., Savois, V., Aubert, G., Verdier, J., Nicolas, M., Pagny, G., Moussy, F., Sanchez, M., Baker, D., Clarke, J., *et al.* (2009). Optimizing TILLING populations for reverse genetics in *Medicago truncatula*. Plant Biotechnol J *7*, 430-441.

Leborgne-Castel, N., Adam, T., and Bouhidel, K. (2010). Endocytosis in plant-microbe interactions. Protoplasma *247*, 177-193.

Lehtovaara, P.i., and Perttila, U. (1978). Bile-pigment formation from different leghaemoglobins. Methine-bridge specificity of coupled oxidation. Biochemical Journal *176*, 359.

Lhuissier, F.G.P., De Ruijter, N.C.A., Sieberer, B.J., Esseling, J.J., and Emons, A.M.C. (2001). Time Course of Cell Biological Events Evoked in Legume Root Hairs by *Rhizobium* Nod Factors: State of the Art. Annals of Botany *87*, 289-302.

Li, Y., Zhou, L., Li, Y., Chen, D., Tan, X., Lei, L., and Zhou, J. (2008). A nodule-specific plant cysteine proteinase, AsNODF32, is involved in nodule senescence and nitrogen fixation activity of the green manure legume *Astragalus sinicus*. New Phytol *180*, 185-192.

Limpens, E., Ivanov, S., van Esse, W., Voets, G., Fedorova, E., and Bisseling, T. (2009). *Medicago* N2-fixing symbiosomes acquire the endocytic identity marker Rab7 but delay the acquisition of vacuolar identity. Plant Cell *21*, 2811-2828.

Lopez, M., Herrera-Cervera, J.A., Iribarne, C., Tejera, N.A., and Lluch, C. (2008). Growth and nitrogen fixation in *Lotus japonicus* and *Medicago truncatula* under NaCl stress: Nodule carbon metabolism. J Plant Physiol *165*, 641-650.

Loscos, J., Matamoros, M.A., and Becana, M. (2008). Ascorbate and homoglutathione metabolism in common bean nodules under stress conditions and during natural senescence. Plant physiology *146*, 1282-1292.

M

Malik, N.S., Pfeiffer, N.E., Williams, D.R., and Wagner, F.W. (1981). Peptidohydrolases of Soybean Root Nodules : Identification, separation and partial characterisation of enzymes from bacteroid-free extracts. Plant physiology *68*, 386-392.

Marini, A.M., Springael, J.Y., Frommer, W.B., and Andre, B. (2000). Cross-talk between ammonium transporters in yeast and interference by the soybean SAT1 protein. Molecular microbiology *35*, 378-385.

Marino, D., Andrio, E., Danchin, E.G., Oger, E., Gucciardo, S., Lambert, A., Puppo, A., and Pauly, N. (2011). A Medicago truncatula NADPH oxidase is involved in symbiotic nodule functioning. New Phytol *189*, 580-592.

Marlow, V.L., Haag, A.F., Kobayashi, H., Fletcher, V., Scocchi, M., Walker, G.C., and Ferguson, G.P. (2009). Essential role for the BacA protein in the uptake of a truncated eukaryotic peptide in *Sinorhizobium meliloti*. J Bacteriol *191*, 1519-1527.

Martinez, D.E., Costa, M.L., Gomez, F.M., Otegui, M.S., and Guiamet, J.J. (2008). 'Senescence-associated vacuoles' are involved in the degradation of chloroplast proteins in tobacco leaves. Plant J *56*, 196-206.

Martinez, M., Cambra, I., Gonzalez-Melendi, P., Santamaria, M.E., and Diaz, I. (2012). C1A cysteine-proteases and their inhibitors in plants. Physiologia plantarum *145*, 85-94.

Marty, F. (1999). Plant vacuoles. Plant Cell *11*, 587-600.

Matamoros, M.A., Baird, L.M., Escuredo, P.R., Dalton, D.A., Minchin, F.R., Iturbe-Ormaetxe, I., Rubio, M.C., Moran, J.F., Gordon, A.J., and Becana, M. (1999). Stress induced legume root nodule senescence. Physiological, biochemical and structural alterations. Plant Physiol *121*, 97-112.

Matamoros, M.A., Fernandez-Garcia, N., Wienkoop, S., Loscos, J., Saiz, A., and Becana, M. (2012). Mitochondria are an early target of oxidative modifications in senescing legume nodules. New Phytol *197*, 873-885.

Mattiuzzo, M., Bandiera, A., Gennaro, R., Benincasa, M., Pacor, S., Antcheva, N., and Scocchi, M. (2007). Role of the *Escherichia coli* SbmA in the antimicrobial activity of proline-rich peptides. Molecular microbiology *66*, 151-163.

Maunoury, N., Redondo-Nieto, M., Bourcy, M., Van de Velde, W., Alunni, B., Laporte, P., Durand, P., Agier, N., Marisa, L., Vaubert, D., *et al.* (2010). Differentiation of symbiotic cells and endosymbionts in *Medicago truncatula* nodulation are coupled to two transcriptome-switches. PloS one *5*, e9519.

Meeks, J.C., and Elhai, J. (2002). Regulation of cellular differentiation in filamentous cyanobacteria in free-living and plant-associated symbiotic growth states. Microbiol Mol Biol Rev *66*, 94-121.

Meilhoc, E., Cam, Y., Skapski, A., and Bruand, C. (2010). The response to nitric oxide of the nitrogen-fixing symbiont *Sinorhizobium meliloti.* Mol Plant Microbe Interact *23*, 748-759.

Mellor, R.B. (1989). Bacteroids in the Rhizobium-Legume Symbiosis Inhabit a Plant Internal Lytic Compartment: Implications for other Microbial Endosymbioses. Journal of Experimental Botany *40*, 831-839.

Melo, P.M., Silva, L.S., Ribeiro, I., Seabra, A.R., and Carvalho, H.G. (2011). Glutamine synthetase is a molecular target of nitric oxide in root nodules of *Medicago truncatula* and is regulated by tyrosine nitration. Plant physiology *157*, 1505-1517.

Mergaert, P., Nikovics, K., Kelemen, Z., Maunoury, N., Vaubert, D., Kondorosi, A., and Kondorosi, E. (2003). A novel family in *Medicago truncatula* consisting of more than 300 nodule-specific genes coding for small, secreted polypeptides with conserved cysteine motifs. Plant physiology *132*, 161-173.

Mergaert, P., Uchiumi, T., Alunni, B., Evanno, G., Cheron, A., Catrice, O., Mausset, A.E., Barloy-Hubler, F., Galibert, F., Kondorosi, A., *et al.* (2006). Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the *Rhizobium*-legume symbiosis. Proc Natl Acad Sci U S A *103*, 5230-5235.

Minchin, F.R. (1997). Regulation of oxygen diffusion in legume nodules. Soil Biology and Biochemistry *29*, 881-888.

Mitra, R.M., Gleason, C.A., Edwards, A., Hadfield, J., Downie, J.A., Oldroyd, G.E., and Long, S.R. (2004). A Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase required for symbiotic nodule development: Gene identification by transcript-based cloning. Proc Natl Acad Sci U S A *101*, 4701-4705.

Mitsui, H., Sato, T., Sato, Y., Ito, N., and Minamisawa, K. (2004). *Sinorhizobium meliloti* RpoH1 is required for effective nitrogen-fixing symbiosis with alfalfa. Mol Genet Genomics *271*, 416-425.

Monahan-Giovanelli, H., Pinedo, C.A., and Gage, D.J. (2006). Architecture of infection thread networks in developing root nodules induced by the symbiotic bacterium *Sinorhizobium meliloti* on *Medicago truncatula*. Plant physiology *140*, 661-670.

Muntz, K., and Shutov, A.D. (2002). Legumains and their functions in plants. Trends Plant Sci *7*, 340-344.

Mur, L.A., Carver, T.L., and Prats, E. (2006). NO way to live; the various roles of nitric oxide in plant-pathogen interactions. J Exp Bot *57*, 489-505.

N

Naito, Y., Fujie, M., Usami, S., Murooka, Y., and Yamada, T. (2000). The involvement of a cysteine proteinase in the nodule development in Chinese milk vetch infected with *Mesorhizobium huakuii* subsp. rengei. Plant physiology *124*, 1087-1096.

Nash, D.T., and Schulman, H.M. (1976). The absence of oxidized leghemoglobin in soybean root nodules during nodule development. Biochemical and biophysical research communications *68*, 781-785.

Navascues, J., Perez-Rontome, C., Sanchez, D.H., Staudinger, C., Wienkoop, S., Rellan-Alvarez, R., and Becana, M. (2011). Oxidative stress is a consequence, not a cause, of aluminum toxicity in the forage legume *Lotus corniculatus*. New Phytol *193*, 625-636.

Naya, L., Ladrera, R., Ramos, J., Gonzalez, E.M., Arrese-Igor, C., Minchin, F.R., and Becana, M. (2007). The response of carbon metabolism and antioxidant defenses of alfalfa nodules to drought stress and to the subsequent recovery of plants. Plant physiology *144*, 1104-1114.

Norton, J.P., and Mulvey, M.A. (2012). Toxin-antitoxin systems are important for niche-specific colonization and stress resistance of uropathogenic *Escherichia coli*. PLoS Pathog *8*, e1002954.

O

Oke, V., and Long, S.R. (1999). Bacteroid formation in the *Rhizobium*-legume symbiosis. Curr Opin Microbiol *2*, 641-646.

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

Oldroyd, G.E., and Downie, J.A. (2008). Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. Annual review of plant biology *59*, 519-546.

Oldroyd, G.E., Murray, J.D., Poole, P.S., and Downie, J.A. (2011). The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. Annu Rev Genet *45*, 119-144.

Ott, T., Sullivan, J., James, E.K., Flemetakis, E., Günther, C., Gibon, Y., Ronson, C., and Udvardi, M. (2009). Absence of Symbiotic Leghemoglobins Alters Bacteroid and Plant Cell Differentiation During Development of Lotus japonicus Root Nodules. Molecular Plant-Microbe Interactions *22*, 800-808.

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

P

Panter, S., Thomson, R., de Bruxelles, G., Laver, D., Trevaskis, B., and Udvardi, M. (2000). Identification with proteomics of novel proteins associated with the peribacteroid membrane of soybean root nodules. Mol Plant Microbe Interact *13*, 325-333.

Patriarca, E.J., Tate, R., and Iaccarino, M. (2002). Key role of bacterial NH(4)(+) metabolism in *Rhizobium*-plant symbiosis. Microbiol Mol Biol Rev *66*, 203-222.

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

Pellock, B.J., Cheng, H.P., and Walker, G.C. (2000). Alfalfa root nodule invasion efficiency is dependent on *Sinorhizobium meliloti* polysaccharides. J Bacteriol *182*, 4310-4318.

Pelzer, E., Bazot, M., Makowski, D., Corre-Hellou, G., Naudin, C., Al Rifaï, M., Baranger, E., Bedoussac, L., Biarnès, V., and Boucheny, P. (2012). Pea–wheat intercrops in low-input conditions combine high economic performances and low environmental impacts. European Journal of Agronomy *40*, 39-53.

Perez Guerra, J.C., Coussens, G., De Keyser, A., De Rycke, R., De Bodt, S., Van De Velde, W., Goormachtig, S., and Holsters, M. (2010). Comparison of developmental and stress-induced nodule senescence in *Medicago truncatula*. Plant physiology *152*, 1574-1584.

Perret, X., Staehelin, C., and Broughton, W.J. (2000). Molecular basis of symbiotic promiscuity. Microbiol Mol Biol Rev *64*, 180-201.

Pfeiffer, N.E., Torres, C.M., and Wagner, F.W. (1983). Proteolytic Activity in Soybean Root Nodules : Activity in Host Cell Cytosol and Bacteroids throughout Physiological Development and Senescence. Plant physiology *71*, 797-802.

Pierre, O., Engler, G., Hopkins, J., Brau, F., Boncompagni, E., and Herouart, D. (2013). Peribacteroid space acidification: a marker of mature bacteroid functioning in *Medicago truncatula* nodules. Plant Cell Environ.doi:10.1111/pce.12116

Pislariu, C.I., Murray, J.D., Wen, J., Cosson, V., Muni, R.R., Wang, M., Benedito, V.A., Andriankaja, A., Cheng, X., Jerez, I.T., *et al.* (2012). A *Medicago truncatula* tobacco retrotransposon insertion mutant collection with defects in nodule development and symbiotic nitrogen fixation. Plant physiology *159*, 1686-1699.

Pladys, D., and Vance, C.P. (1993). Proteolysis during Development and Senescence of Effective and Plant Gene-Controlled Ineffective Alfalfa Nodules. Plant physiology *103*, 379-384.

Popp, C., and Ott, T. (2011). Regulation of signal transduction and bacterial infection during root nodule symbiosis. Curr Opin Plant Biol *14*, 458-467.

Prell, J., and Poole, P. (2006). Metabolic changes of rhizobia in legume nodules. Trends in microbiology *14*, 161-168.

Puppo, A., Groten, K., Bastian, F., Carzaniga, R., Soussi, M., Lucas, M.M., de Felipe, M.R., Harrison, J., Vanacker, H., and Foyer, C.H. (2005). Legume nodule senescence: roles for redox and hormone signalling in the orchestration of the natural aging process. New Phytol *165*, 683-701.

Puppo, A., Pauly, N., Boscari, A., Mandon, K., and Brouquisse, R. (2013). Hydrogen peroxide and nitric oxide: key regulators of the Legume-*Rhizobium* and mycorrhizal symbioses. Antioxid Redox Signal *18*, 2202-2219.

R

Rae, A.L., Bonfante-Fasolo, P., and Brewin, N.J. (1992). Structure and growth of infection threads in the legume symbiosis with *Rhizobium leguminosarum*. The Plant Journal *2*, 385-395.

Rae, A.L., and Perotto, S. (1991). Expression of extracellular glycoproteins in the uninfected cells of developing pea nodule tissue. Mol Plant-Microbe Interact *4*, 563-570.

Rakocevic, A., Mondy, S., Tirichine, L., Cosson, V., Brocard, L., Iantcheva, A., Cayrel, A., Devier, B., Abu El-Heba, G.A., and Ratet, P. (2009). MERE1, a low-copy-number copia-type retroelement in *Medicago truncatula* active during tissue culture. Plant physiology *151*, 1250-1263.

Ramos, J., and Bisseling, T. (2003). A method for the isolation of root hairs from the model legume *Medicago truncatula*. J Exp Bot *54*, 2245-2250.

Rawlings, N.D., Barrett, A.J., and Bateman, A. (2011). MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. Nucleic Acids Res *40*, D343-350.

Redondo, F.J., de la Pena, T.C., Morcillo, C.N., Lucas, M.M., and Pueyo, J.J. (2009). Overexpression of flavodoxin in bacteroids induces changes in antioxidant metabolism leading to delayed senescence and starch accumulation in alfalfa root nodules. Plant physiology *149*, 1166-1178.

Richardson, A.R., Dunman, P.M., and Fang, F.C. (2006). The nitrosative stress response of Staphylococcus aureus is required for resistance to innate immunity. Molecular microbiology *61*, 927-939.

Richardson, A.R., Payne, E.C., Younger, N., Karlinsey, J.E., Thomas, V.C., Becker, L.A., Navarre, W.W., Castor, M.E., Libby, S.J., and Fang, F.C. (2011). Multiple targets of nitric oxide in the tricarboxylic acid cycle of *Salmonella enterica* serovar typhimurium. Cell Host Microbe *10*, 33-43.

Ricklefs, R.E., and Miller, G.L. (2005). Ecologie (De Boeck Supérieur).

Rodriguez-Navarro, D.N., Dardanelli, M.S., and Ruiz-Sainz, J.E. (2007). Attachment of bacteria to the roots of higher plants. FEMS Microbiol Lett *272*, 127-136.

Roth, M.G. (2004). Phosphoinositides in constitutive membrane traffic. Physiol Rev *84*, 699-730.

Ruberg, S., Tian, Z.X., Krol, E., Linke, B., Meyer, F., Wang, Y., Puhler, A., Weidner, S., and Becker, A. (2003). Construction and validation of a *Sinorhizobium meliloti* whole genome DNA microarray: genome-wide profiling of osmoadaptive gene expression. Journal of biotechnology *106*, 255-268.

Rubio, M.C., James, E.K., Clemente, M.R., Bucciarelli, B., Fedorova, M., Vance, C.P., and Becana, M. (2004). Localization of superoxide dismutases and hydrogen peroxide in legume root nodules. Mol Plant Microbe Interact *17*, 1294-1305.

S

Sagan, M., Morandi, D., Tarenghi, E., and Duc, G.r. (1995). Selection of nodulation and mycorrhizal mutants in the model plant *Medicago truncatula* (Gaertn.) after Î³-ray mutagenesis. Plant Science *111*, 63-71.

Saito, K., Yoshikawa, M., Yano, K., Miwa, H., Uchida, H., Asamizu, E., Sato, S., Tabata, S., Imaizumi-Anraku, H., Umehara, Y., *et al.* (2007). NUCLEOPORIN85 is required for calcium spiking, fungal and bacterial symbioses, and seed production in *Lotus japonicus*. Plant Cell *19*, 610-624.

Santos, R., Hérouart, D., Sigaud, S., Touati, D., and Puppo, A. (2001). Oxidative Burst in Alfalfa-*Sinorhizobium meliloti* Symbiotic Interaction. Molecular Plant-Microbe Interactions *14*, 86-89.

Sawada, H., Kuykendall, L.D., and Young, J.M. (2003). Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. J Gen Appl Microbiol *49*, 155-179.

Schmidt, H.H., and Walter, U. (1994). NO at work. Cell *78*, 919-925.

Schonichen, A., Webb, B.A., Jacobson, M.P., and Barber, D.L. (2013). Considering protonation as a posttranslational modification regulating protein structure and function. Annu Rev Biophys *42*, 289-314.

Seefeldt, L.C., Hoffman, B.M., and Dean, D.R. (2009). Mechanism of Mo-dependent nitrogenase. Annu Rev Biochem *78*, 701-722.

Shatalin, K., Gusarov, I., Avetissova, E., Shatalina, Y., McQuade, L.E., Lippard, S.J., and Nudler, E. (2008). *Bacillus anthracis*-derived nitric oxide is essential for pathogen virulence and survival in macrophages. Proc Natl Acad Sci U S A *105*, 1009-1013.

Shi, H.T., Li, R.J., Cai, W., Liu, W., Fu, Z.W., and Lu, Y.T. (2012). *In vivo* role of nitric oxide in plant response to abiotic and biotic stress. Plant signaling & behavior *7*, 437-439.

Sieberer, B.r., and Emons, A. (2000). Cytoarchitecture and pattern of cytoplasmic streaming in root hairs of *Medicago truncatula* during development and deformation by nodulation factors. Protoplasma *214*, 118-127.

Soussi, M., Ocana, A., and Lluch, C. (1998). Effects of salt stress on growth, photosynthesis and nitrogen fixation in chick-pea (Cicer arietinum L.) Journal of Experimental Botany *49*, 1329-1337.

Sprent, J.I., and James, E.K. (2007). Legume evolution: where do nodules and mycorrhizas fit in? Plant physiology *144*, 575-581.

Starker, C.G., Parra-Colmenares, A.L., Smith, L., Mitra, R.M., and Long, S.R. (2006). Nitrogen fixation mutants of *Medicago truncatula* fail to support plant and bacterial symbiotic gene expression. Plant physiology *140*, 671-680.

Stevanin, T.M., Ioannidis, N., Mills, C.E., Kim, S.O., Hughes, M.N., and Poole, R.K. (2000). Flavohemoglobin Hmp affords inducible protection for *Escherichia coli* respiration, catalyzed by cytochromes bo' or bd, from nitric oxide. J Biol Chem *275*, 35868-35875.

T

Tadege, M., Wen, J., He, J., Tu, H., Kwak, Y., Eschstruth, A., Cayrel, A., Endre, G., Zhao, P.X., Chabaud, M., *et al.* (2008). Large-scale insertional mutagenesis using the *Tnt1* retrotransposon in the model legume *Medicago truncatula*. Plant J *54*, 335-347.

Thomas, S.G., Phillips, A.L., and Hedden, P. (1999). Molecular cloning and functional expression of gibberellin 2- oxidases, multifunctional enzymes involved in gibberellin deactivation. Proc Natl Acad Sci U S A *96*, 4698-4703.

Timmers, A.C., Auriac, M.C., de Billy, F., and Truchet, G. (1998). Nod factor internalization and microtubular cytoskeleton changes occur concomitantly during nodule differentiation in alfalfa. Development *125*, 339-349.

Timmers, A.C., Auriac, M.C., and Truchet, G. (1999). Refined analysis of early symbiotic steps of the *Rhizobium-Medicago* interaction in relationship with microtubular cytoskeleton rearrangements. Development *126*, 3617-3628.

Timmers, A.C., Soupene, E., Auriac, M.C., de Billy, F., Vasse, J., Boistard, P., and Truchet, G. (2000). Saprophytic intracellular rhizobia in alfalfa nodules. Mol Plant Microbe Interact *13*, 1204-1213.

Todesco, S., Campagna, D., Levorin, F., D'Angelo, M., Schiavon, R., Valle, G., and Vezzi, A. (2008). PABS: an online platform to assist BAC-by-BAC sequencing projects. Biotechniques *44*, 60, 62, 64.

Torres-Quesada, O., Oruezabal, R.I., Peregrina, A., Jofre, E., Lloret, J., Rivilla, R., Toro, N., and Jimenez-Zurdo, J.I. (2010). The *Sinorhizobium meliloti* RNA chaperone Hfq influences central carbon metabolism and the symbiotic interaction with alfalfa. BMC microbiology *10*, 71.

Trinchant, J.C., and Rigaud, J. (1982). Nitrite and nitric oxide as inhibitors of nitrogenase from soybean bacteroids. Appl Environ Microbiol *44*, 1385-1388.

Tripathi, P. (2007). Nitric oxide and immune response. Indian J Biochem Biophys *44*, 310-319.

Truchet, G., and Coulomb, P. (1973). Evidence for the evolution of a phytolysosomal system in various parts of the cells of the radical nodules of the pea (*Pisum sativum* L.). Elementary heterophagy. Journal of ultrastructure research *43*, 36-57.

Tsien, H.C., Dreyfus, B.L., and Schmidt, E.L. (1983). Initial stages in the morphogenesis of nitrogen-fixing stem nodules of *Sesbania rostrata*. J Bacteriol *156*, 888-897.

Turk, V., Stoka, V., Vasiljeva, O., Renko, M., Sun, T., Turk, B., and Turk, D. (2012). Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers. Biochim Biophys Acta *1824*, 68-88.

U

Udvardi, M.K., and Day, D.A. (1989). Electrogenic ATPase Activity on the Peribacteroid Membrane of Soybean (*Glycine max* L.) Root Nodules. Plant physiology *90*, 982-987.

Urzainqui, A., and Walker, G.C. (1992). Exogenous suppression of the symbiotic deficiencies of *Rhizobium meliloti exo* mutants. J Bacteriol *174*, 3403-3406.

V

Van de Velde, W., Guerra, J.C., De Keyser, A., De Rycke, R., Rombauts, S., Maunoury, N., Mergaert, P., Kondorosi, E., Holsters, M., and Goormachtig, S. (2006). Aging in legume symbiosis. A molecular view on nodule senescence in *Medicago truncatula*. Plant physiology *141*, 711-720.

Van de Velde, W., Zehirov, G., Szatmari, A., Debreczeny, M., Ishihara, H., Kevei, Z., Farkas, A., Mikulass, K., Nagy, A., Tiricz, H., *et al.* (2010). Plant peptides govern terminal differentiation of bacteria in symbiosis. Science *327*, 1122-1126.

van der Hoorn, R.A. (2008). Plant proteases: from phenotypes to molecular mechanisms. Annual review of plant biology *59*, 191-223.

van Heerden, P.D., Kiddle, G., Pellny, T.K., Mokwala, P.W., Jordaan, A., Strauss, A.J., de Beer, M., Schluter, U., Kunert, K.J., and Foyer, C.H. (2008). Roles for the regulation of respiration and the oxygen diffusion barrier in soybean in the protection of symbiotic nitrogen fixation from chilling -induced inhibition and shoots from premature senescence. Plant physiology *148*, 316-327.

Vance (2002). Root–bacteria interactions: symbiotic nitrogen fixation (New York, NY, USA, Marcel Dekker Publisher).pp 839-967.

Vance, C.P., Graham, P.H., and Allan, D.L. (2000). Biological Nitrogen Fixation: Phosphorus-A Critical Future Need? In Nitrogen fixation: From molecules to crop productivity (Springer), pp. 509-514.

Vasse, J., de Billy, F., Camut, S., and Truchet, G. (1990). Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules. J Bacteriol *172*, 4295-4306.

Vieweg, M.F., Fruhling, M., Quandt, H.J., Heim, U., Baumlein, H., Puhler, A., Kuster, H., and Andreas, M.P. (2004). The promoter of the *Vicia faba* L. leghemoglobin gene VfLb29 is specifically activated in the infected cells of root nodules and in the arbuscule-containing cells of mycorrhizal roots from different legume and nonlegume plants. Mol Plant Microbe Interact *17*, 62-69.

Vinardell, J.M., Fedorova, E., Cebolla, A., Kevei, Z., Horvath, G., Kelemen, Z., Tarayre, S., Roudier, F., Mergaert, P., Kondorosi, A., *et al.* (2003). Endoreduplication mediated by the anaphase-promoting complex

activator CCS52A is required for symbiotic cell differentiation in *Medicago truncatula* nodules. Plant Cell *15*, 2093-2105.

Virta, M., Lineri, S., Kankaanpaa, P., Karp, M., Peltonen, K., Nuutila, J., and Lilius, E.M. (1998). Determination of complement-mediated killing of bacteria by viability staining and bioluminescence. Appl Environ Microbiol *64*, 515-519.

Vriezen, J.A., de Bruijn, F.J., and Nusslein, K.R. (2012). Desiccation induces viable but Non-Culturable cells in *Sinorhizobium meliloti* 1021. AMB Express *2*, 6.

W

Walker, T.S., Bais, H.P., Grotewold, E., and Vivanco, J.M. (2003). Root exudation and rhizosphere biology. Plant physiology *132*, 44-51.

Wall, L.G. (2000). The Actinorhizal Symbiosis. Journal of Plant Growth Regulation *19*, 167-182.

Wang, D., Griffitts, J., Starker, C., Fedorova, E., Limpens, E., Ivanov, S., Bisseling, T., and Long, S. (2010). A nodule-specific protein secretory pathway required for nitrogen-fixing symbiosis. Science *327*, 1126-1129.

Wienkoop, S., and Saalbach, G. (2003). Proteome analysis. Novel proteins identified at the peribacteroid membrane from *Lotus japonicus* root nodules. Plant physiology *131*, 1080-1090.

Wilmes, M., Cammue, B.P.A., Sahl, H.-G., and Thevissen, K. (2011). Antibiotic activities of host defense peptides: more to it than lipid bilayer perturbation. Natural Product Reports *28*, 1350-1358.

Wojciechowski, M.F., Lavin, M., and Sanderson, M.J. (2004). A phylogeny of legumes (*Leguminosae*) based on analysis of the plastid *matK* gene resolves many well-supported subclades within the family. Am J Bot *91*, 1846-1862.

X

Xiang, L., Etxeberria, E., and den Ende, W. (2012). Vacuolar protein sorting mechanisms in plants. FEBS Journal. 280, 979-993.

Xu, P., Zhang, Y., Kang, L., Roossinck, M.J., and Mysore, K.S. (2006). Computational estimation and experimental verification of off-target silencing during posttranscriptional gene silencing in plants. Plant physiology *142*, 429-440.

Xue, Y., Liu, Z., Cao, J., and Ren, J. (2010). Computational Prediction of Post-Translational Modification Sites in Proteins (Ning-Sun Yang). 105-124.

Y

Yang, C., Signer, E.R., and Hirsch, A.M. (1992). Nodules Initiated by *Rhizobium meliloti* Exopolysaccharide Mutants Lack a Discrete, Persistent Nodule Meristem. Plant physiology *98*, 143-151.

Yano, K., Yoshida, S., Muller, J., Singh, S., Banba, M., Vickers, K., Markmann, K., White, C., Schuller, B., Sato, S., *et al.* (2008). CYCLOPS, a mediator of symbiotic intracellular accommodation. Proc Natl Acad Sci U S A *105*, 20540-20545.

Young, N.D., Debelle, F., Oldroyd, G.E., Geurts, R., Cannon, S.B., Udvardi, M.K., Benedito, V.A., Mayer, K.F., Gouzy, J., Schoof, H., *et al.* (2011). The *Medicago* genome provides insight into the evolution of rhizobial symbioses. Nature *480*, 520-524.

Z

Zaninotto, F., La Camera, S., Polverari, A., and Delledonne, M. (2006). Cross talk between reactive nitrogen and oxygen species during the hypersensitive disease resistance response. Plant physiology *141*, 379-383.

Zhu, H., Choi, H.K., Cook, D.R., and Shoemaker, R.C. (2005). Bridging model and crop legumes through comparative genomics. Plant physiology *137*, 1189-1196.

Zottich, U., Da Cunha, M., Carvalho, A.O., Dias, G.B., Casarin, N., Vasconcelos, I.M., and Gomes, V.M. (2013). An antifungal peptide from *Coffea canephora* seeds with sequence homology to glycine-rich proteins exerts membrane permeabilization and nuclear localization in fungi. Biochim Biophys Acta *1830*, 3509-3516.

ANNEXES

Plant, Cell & Environment

MtZR1, A PRAF PROTEIN, IS INVOLVED IN THE DEVELOPMENT OF ROOTS AND SYMBIOTIC ROOT-NODULES IN MEDICAGO TRUNCATULA

Journal:	*Plant, Cell & Environment*
Manuscript ID:	PCE-13-0335
Wiley - Manuscript type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	30-May-2013
Complete List of Authors:	PIERRE, olivier; INRA 1355-CNRS 7254-Université de Nice-Sophia Antipolis (UNS), Centre INRA Agrobiotech - Symbiose Hopkins, Julie; INRA 1355-CNRS 7254-Université de Nice-Sophia Antipolis (UNS), Centre INRA Agrobiotech - Symbiose KAZMIERCZAK, Théophile; Institut des Sciences du Végétal (ISV), Centre National de la Recherche Scientif que, 91198 GRUBER, Véronique; Université Paris Diderot Paris 7, Les Grands Moulins, 16 rue Marguerite Duras, 75205 Frugier, Florian; Institut des Sciences du Végétal (ISV), Centre National de la Recherche Scientif que, 91198 Clément, Mathilde; INRA 1355-CNRS 7254-Université de Nice-Sophia Antipolis (UNS), Centre INRA Agrobiotech - Symbiose Frendo, Pierre; INRA 1355-CNRS 7254-Université de Nice-Sophia Antipolis (UNS), Centre INRA Agrobiotech - Symbiose Herouart, Didier; Institut Sophia AGROBIOTECH , Boncompagni, Eric; Institut Agrobiotech, UMR ISA Symbiose
Environment Keywords:	nutrients/nitrogen, symbiosis
Physiology Keywords:	development, hormones
Other Keywords:	
Abstract:	PRAF proteins are present in all plants, but their functions remain unclear. We investigated the role of one member of the PRAF family, MtZR1, on the development of roots and nitrogen-fixing nodules in Medicago truncatula. We found that MtZR1 was expressed in all M. truncatula organs. Spatiotemporal analysis showed that MtZR1 expression in M. truncatula roots was mostly limited to the root meristem and the vascular bundles of mature nodules. MtZR1 expression in root nodules was down-regulated in response to various abiotic stresses known to affect nitrogen fixation efficiency. The down-regulation of MtZR1 expression by RNA interference in transgenic roots decreased root growth and impaired nodule development and function. MtZR1 overexpression resulted in longer roots and significant changes to nodule development. Our data thus indicate that MtZR1 is involved in the development of roots and nodules. To our knowledge, this work provides the first in vivo experimental evidence of a biological role for a typical PRAF protein in plants.

SCHOLARONE™
Manuscripts

Title of article: *Mt*ZR1, A PRAF PROTEIN, IS INVOLVED IN THE DEVELOPMENT OF ROOTS AND SYMBIOTIC ROOT-NODULES IN *MEDICAGO TRUNCATULA*

Short running title: Role of *MtZR1* in root and nodule development

Authors

Julie HOPKINS[1,2,3§], Olivier PIERRE[1,2,3§], Théophile KAZMIERCZAK[4], Véronique GRUBER[4,5], Florian FRUGIER[4], Mathilde CLEMENT[1,2,3], Pierre FRENDO[1,2,3],Didier HEROUART[1,2,3] and Eric BONCOMPAGNI[1,2,3*]

§ Julie Hopkins and Olivier Pierre contributed equally to this work

Addresses

[1] UMR "Institut Sophia Agrobiotech" INRA 1355 - 400 routes des Chappes- SOPHIA-ANTIPOLIS Cedex - F-06903, France

[2] UMR "Institut Sophia Agrobiotech" CNRS 7254 - 400 routes des Chappes- SOPHIA-ANTIPOLIS Cedex - F-06903, France

[3] UMR "Institut Sophia Agrobiotech" Université de Nice-Sophia Antipolis (UNS) - 400 routes des Chappes- SOPHIA-ANTIPOLIS Cedex - F-06903, France revoir l'adresse en 3 morceaux (INRA, CNRS, Université)

[4] Institut des Sciences du Végétal (ISV), Centre National de la Recherche Scientif que, 91198 GIF SUR YVETTE Cedex, France

[5] Université Paris Diderot Paris 7, Les Grands Moulins, 16 rue Marguerite Duras, 75205 PARIS Cedex 13, France

*Corresponding author: Eric BONCOMPAGNI

E-mail address: boncompa@unice.fr

Tel: 33(0) 492 386 634

Fax: 33 (0) 492 386 587

Word counts:

4961 words (Introduction, 503; Materials and Methods, 1604; Results, 1434; Discussion, 1335; Acknowledgements, 85).

7 Figures. And supporting information: 3 Tables and 6 Figures.

ABSTRACT

PRAF proteins are present in all plants, but their functions remain unclear. We investigated the role of one member of the PRAF family, *Mt*ZR1, on the development of roots and nitrogen-fixing nodules in *Medicago truncatula*. We found that *MtZR1* was expressed in all *M. truncatula* organs. Spatiotemporal analysis showed that *MtZR1* expression in *M. truncatula* roots was mostly limited to the root meristem and the vascular bundles of mature nodules. *MtZR1* expression in root nodules was down-regulated in response to various abiotic stresses known to affect nitrogen fixation efficiency. The down-regulation of *MtZR1* expression by RNA interference in transgenic roots decreased root growth and impaired nodule development and function. *MtZR1* overexpression resulted in longer roots and significant changes to nodule development. Our data thus indicate that *MtZR1* is involved in the development of roots and nodules. To our knowledge, this work provides the first *in vivo* experimental evidence of a biological role for a typical PRAF protein in plants.

Keywords: *Medicago truncatula*, *Sinorhizobium meliloti*, PRAF protein, plant microbe interaction, nitrogen-fixing symbiosis.

INTRODUCTION

Plants often establish symbiotic relationships with specific fungi and bacteria, to enable them to acquire nutrients to support growth and development. Leguminous plants interact with soil bacteria, known as rhizobia, to produce a particular root organ, the nodule, in which the rhizobia reduce atmospheric N_2 to ammonia (NH_3), which is then exported to and assimilated by the plant. In the model legume *Medicago truncatula*, the nodule primordium is initiated from root cortical cells during the initial infection process. The persistent activity of this meristem results in the development of elongated indeterminate nodules. These nodules consist of four main zones (from the tip to the base of the nodule): zone I, the apical meristematic zone responsible for the continuous growth of the nodule over many weeks; zone II, the infection zone, in which bacteria from infection threads are released into plant cells; zone III, the fixation zone, in which bacteria that have differentiated into nitrogen-fixing bacteroids reduce atmospheric N_2 to NH_3, and zone IV, the senescence zone, in which both symbionts degenerate (Timmers *et al*. 2000). Exchanges between the root nodule and other plant organs are mediated by well-developed vascular tissues at the periphery of the nodule. Intensive research has focused on the molecular dialogue between the two partners in the establishment of this symbiotic association, including dissection of the Nod factor signalling pathway (Gibson *et al*. 2008; Jones *et al*. 2007; Oldroyd *et al*. 2011).

Many environmental stresses affect nodule functioning, potentially leading to nitrogen fixation defects and slowing the development of the plant. We previously identified a gene, *GmG93*, that is specifically expressed in functioning nodules and transiently repressed under drought stress in soybean (Clement *et al*. 2006). The deduced amino-acid sequence of the protein encoded by

GmG93 is similar to those of proteins of the *Arabidopsis* PRAF family (Heras & Drobak 2002; Jensen *et al*. 2001; van Leeuwen *et al*. 2004). The PRAF (PH, RCC1 and FYVE) protein family is a family of proteins specific to plants, with a distinctive domain architecture and various unique sequence traits (Wywial & Singh, 2010), but with no known physiological function. PRAF proteins typically have four characteristic domains: two lipid-binding domains: the PH domain (pleckstrin homology) and the FYVE (Fab 1, YOTB, Vac 1 and EEA1) zinc-finger domain, in the N-terminal and central regions, respectively, seven repeats of the RCC1 (regulator of chromatin condensation) motif, which is also known as the ATS1 (alpha-tubulin suppressor) domain, and, finally, a C-terminal BRX/DZC (*brevis radix*/disease resistance, zinc finger, chromosome condensation) domain (Briggs *et al*. 2006; Heras & Drobak 2002; Jensen *et al*. 2001; Wywial & Singh 2010). In *Arabidopsis thaliana*, the PRAF family has nine members, all with a similar protein structure (van Leeuwen *et al*. 2004). However, no particular change in phenotype has ever been observed for any *Arabidopsis* PRAF mutant line (http://www.arabidopsis.org/).

We assessed the importance of the *GmG93* homologue *MtZR1* for root growth and the symbiotic process in *Medicago truncatula*. Using genetic approaches, we showed that *Mt*ZR1 was involved in root and nodule development.

MATERIALS AND METHODS

Plant materials, growth procedures and nodulation assays

Medicago truncatula cv. Jemalong A17 seeds were surface-sterilised and germinated, as previously described (Boisson-Dernier *et al.* 2001). Wild-type *Medicago* and composite plants with transgenic roots were grown in a phytotron, watered with nitrogen-free nutrient medium (Puppo *et al*. 1982) and inoculated five days after germination with *Sinorhizobium meliloti* strain 102F34 (Osteras *et al.* 1998). Plants were maintained under a 16 h light/8 h dark regime, at temperatures of 23°C during the light phase and 21°C during the dark phase. The following chemical treatments were applied to six-week-old nodulated plants for five days: NaCl (250 mM), CdCl (100 µM), NO_3NH_4 (10 mM). Alternatively, plants were subjected to drought stress for three days. Abiotic stress conditions were defined on the basis of previous studies (Clement *et al.* 2006; Matamoros *et al*. 1999; Staudinger *et al*. 2012). Nodulated plants were harvested for physiological experiments. Nodules were fixed for histochemical experiments or frozen in liquid N_2 and stored at -80°C for further molecular analysis. For hormonal treatments, 15 germinated seedlings (*Medicago truncatula* cv. Jemalong A17) were placed on a grid in a Magenta box with 30 ml of low-nitrogen "i" medium. They were grown for five days in an incubator, with shaking (125 rpm), at 24°C, under long-day conditions (16 h light / 8 h dark), as described by Gonzalez-Rizzo *et al*. (2006). They were then treated with 10^{-7} M indole-3-acetic acid (IAA), 10^{-7} M 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC), 10^{-7} M benzylaminopurine (BAP) or 10^{-7} M abscisic acid (ABA) (all obtained from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA), and incubated under the same growth conditions for various times (0, 1 and 3 h). Bioactive hormonal conditions

were defined on the basis of previous studies (Ariel *et al*. 2010; Gonzalez-Rizzo *et al*. 2006; Plet *et al*. 2011).

Bacterial strains

All the strains used in this study were grown on Luria-Bertani medium supplemented with appropriate selective antibiotics, at 28°C (*Sinorhizobium* and *Agrobacterium* strains) or 37°C (*Escherichia coli*) (Supplemental Table 2). *Agrobacterium rhizogenes* strain A4S was used to transform *M. truncatula*. The binary vectors were introduced into A4S by electrotransformation, and colonies carrying these vectors were selected by growth on spectinomycin (100 µg ml^{-1}) for two days.

N_2 fixation

An acetylene reduction assay (ARA) was carried out six weeks after inoculation, on biological triplicates, with at least 12 nodulated roots per replicate (about 20 nodules per root), by assessing acetylene reduction to ethylene *in vivo*, as previously described (El Msehli *et al*. 2011)(El Msehli et al. 2011).

***ZR1*promoter::*GUS* construct**

The *MtZR1* gene is located on the fully sequenced BAC mth2-32h21 (GenBank accession AC151822), and on *M. truncatula* chromosome 3. The complete *MtZR1* mRNA sequence was determined by aligning the Chr3 sequence with the *MsZR1*cDNA, using the NCBI Spidey program (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Ostell/Spidey/spideyweb.cgi). The *MtZR1* promoter was obtained by polymerase chain reaction (PCR) amplification from genomic DNA with the primers PMtZR1-F and PMtZR1-R (Supplemental Table 3). These primers amplify a

2130 bp DNA fragment located upstream from the translational start codon of *MtZR1*. This PCR-amplified DNA fragment was cloned, verified by sequencing and inserted into the pDON207 donor vector and then into pKGWFS7 (VIB, Ghent, Belgium), with Gateway Technology (Invitrogen, France).

ZR1 overexpression and RNAi constructs

The full-length *MsZR1* coding sequence from pBluescriptSK$^{(-)}$-*MsZR1* (AJ409163, kindly provided by K. Zwerger, Vienna, Austria), digested with *Sac*I and *Xho*I, was inserted into the pENTR4 donor vector. The corresponding 3.7 kb insert was then inserted into an overexpression vector, pK7WG2D (VIB, Ghent, Belgium), with Gateway Technology (Invitrogen, France) (*P35S::ZR1*, Supplemental Table 2). A control plasmid was constructed in a similar manner, by insertion of the GUS cassette from a pENTR-GUS donor vector (Invitrogen) (*P35S::GUS*, Supplemental Table 2). The RNAi construct was obtained by amplifying the *MtZR1* 5'UTR with the 5'UTRZR1-F and 5'UTRZR1-R primers, to generate a 256 bp PCR product (Supplemental Table 3). This PCR product was inserted into a pGEM-T® vector (Promega, France), from which it was released by digestion with *Nco*I and *Not*I and inserted into a pENTR4 donor vector (Invitrogen). Finally, the *ZR1* 5'UTR insert was inserted into pK7GWIWG2D(II),0 (VIB, Ghent, Belgium), with Gateway Technology (*P35S::RNAiZR1*, Supplemental Table 2). As a control, the empty vector pK7GWIWG2D(II),0 was used for RNAi experiments.

ZR1 fusion protein constructs

The full-length *MsZR1* ORF from pENTR4-*MsZR1* was inserted into pK7FWG2 (VIB, Ghent, Belgium) with Gateway Technology (Invitrogen) (*P35S::ZR1::GFP*, Supplemental Table 2).

RNA extraction and RT-qPCR analysis

Total RNA was isolated from plant material by the single-step method, with acid guanidinium thiocyanate (Chomczynski & Sacchi, 1987). Reverse transcription was performed on 2 µg of total RNA, with the Omniscript II reverse transcriptase (Invitrogen, France). Quantitative PCR with SyberGreen (Eurogentec, France) was followed on an Opticon Monitor 3 (Bio-Rad, CA, USA), in a 15 µl reaction mixture containing 300 nM of each primer (Supplemental data Table 2). We performed qPCR on a DNA Engine OPTICON 2 cycler (MJ Research, MA, USA), with the following parameters: 2 min at 50°C, 10 min at 95°C, and then 39 cycles of 15 s at 95°C, 1 min at 60°C. Reactions were performed in triplicate and the results averaged. The primers used (Supplemental Table 3) had a calculated melting temperature of 59°C to 62°C and were unique in the MTGI (TIGR) and Medicago EST Navigation System (Journet *et al.* 2002) databases. Relative expression level was calculated as a normalized gene expression ratio with respect to the constitutively expressed *Mtc27* (El Msehli *et al.* 2011) and *MtRP40S* (40S ribosomal protein S8 genes (Fedorova *et al.* 2002)) or *MtACT* (actin 11) and *MtRBP1* (RNA binding protein 1) (Plet *et al.* 2011) genes, according to the $2^{2\Delta\Delta}$CT method (Livak & Schmittgen 2001). The stability of the reference genes in transgenic conditions was checked with GeNorm software (Vandesompele *et al.* 2002). The significance of differences in expression was assessed with REST 2009 software

(Pfaffl *et al*. 2002). Comparison with experimental control conditions was carried out to determine fold-changesin expression.

Transient expression of a recombinant fusion protein construct in tobacco leaves

Nicotiana tabacum plants were grown under continuous light for 1 month at 26°C. Tobacco leaves were infiltrated with *A. tumefaciens* AGL1 (Lazo *et al*. 1991), as previously described (Voinnet *et al*. 2003), and plants were analyzed two days after agroinfiltration. GFP fluorescence was monitored by confocal microscopy (Zeiss LSM500 microscope). In cases of treatment with a protease inhibitor to decrease protein degradation, the agroinfiltrated leaves were treated with 2 mM E64d (Sigma) for three hours before observation (Caillaud *et al*. 2009; Hatsugai *et al*. 2004; Takase *et al*. 2003).

Root transformation and hairy root growth measurement

Roots were transformed with *A. rhizogenes* A4S (Alpizar *et al*. 2006), by a modified version of method previously described (Vieweg *et al*. 2004). In brief, seeds were allowed to germinate for 24 h at 20°C and were then transferred to 4°C for seven days. Agrotransformation was achieved by injecting a mixture of 1% peptone-sucrose and *A. rhizogenes* into plant hypocotyls. Transgenic roots were allowed to develop for 7 days at 20°C and were then incubated for 21 days at 25°C in a phytotron with a 16 h light/8 h dark photoperiod, under a light flux of 360 µmole.m^{-2}.s^{-1}. The tap root was then removed, leaving only the lateral transgenic roots to develop. A nitrogen-free mineral solution (Puppo *et al.*, 1982) was supplied and the roots were then inoculated with 0.05 OD_{600} units of *S. meliloti* 102F34 (Osteras *et al*. 1998). Transgenic roots were screened by GFP epifluorescence when possible. Nodules were harvested four to seven weeks after inoculation and fixed for histochemical analysis experiments or ground in liquid

nitrogen and stored at -80°C for further molecular analyses. Alternatively, hairy roots were obtained as described by Boisson-Dernier *et al.* (Boisson-Dernier *et al.*, 2001). *A. rhizogenes*-transformed *Medicago* roots were excised (1 cm from the tip) and transferred onto SHb10 agar (Ramos & Bisseling, 2003). The GFP fluorescence of each transgenic root was checked before selection. Transgenic roots were grown for 3 weeks, at 25°C, in the dark, and root growth was then evaluated by photographing all plates with a digital camera to produce image files suitable for quantitative analysis with NIH Image J software [v1.42] (http://rsb.info.nih.gov/). ANOVA was carried out for statistical assessments of root and nodule growth.

Histological analysis of transgenic tissues

For light microscopy, nodules were fixed in 1% gluteraldehyde, 4% formaldehyde in 0.1 M phosphate buffer at pH 7.2, washed, dehydrated and embedded in Technovit 7100 (Kulzer Histo-Technik, Wehrheim, Germany), according to the manufacturer's instructions. Sections were cut on a microtome (Jung) to yield 5 µm slices, which were mounted in DPX mounting solution (VWR International Ltd, Lille, France). GUS activity was localized, in nodule sections, after overnight incubation with the histochemical substrate 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide, cyclohexylammonium salt (Sigma), as described by Journet *et al.* (1994) (Journet *et al.* 1994). Dark-field images were taken with an Axioplan2 microscope (Carl Zeiss). A general overview of nodule structure was obtained by staining with toluidine blue (Van de Velde *et al.* 2006). For epifluorescence microscopy, 80 µm root sections were cut with a vibratome (HM 650V, Microm International GmbH, Germany), mounted on slides in water and observed directly with an upright microscope. Observations were made and images were recorded with a Zeiss Axioplan2 microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). Analyses were carried out with Axiovision4 software or the Zeiss confocal system (Zeiss LSM 510 META microscope).

Bioinformatic analyses

The phylogenic analysis was performed on the phylogeny.fr platform (Dereeper *et al*. 2008) in advanced mode, with all the default parameters. The phylogenic tree was reconstructed by the maximum likelihood method, with the protein WAG substitution matrix. The reliability of internal branches was assessed by bootstrapping, with 500 bootstrap replicates. Protein sequence analysis was carried out with Supermatcher (*http://emboss.sourceforge.net/*).

RESULTS

*Mt*ZR1 is a member of the small plant-specific PRAF protein family

We previously identified the *GmG93* gene, which encodes a nodule-specific PRAF protein in *Glycine max,* as a late nodulin gene expressed in nodule-infected cells (Clement *et al.*, 2006). A Blast analysis of protein databases identified proteins with high levels of sequence identity to *Gm*G93 (*Gm*G93: Glyma11g33200.1), not only in other leguminous plants, such as *M. sativa* (*Ms*ZR1: AJ409163), but also in non-leguminous plants, such as *A. thaliana* (*At*PRAF1: AT1G76950) (Fig. 1a). Blast analysis of the *M. truncatula* genomic sequence with the *MsZR1* nucleic acid sequence identified five genes on chromosomes 1, 3 and 5 (Fig. 1B, Supplemental Table 1). The putative proteins encoded by these five genes had similar molecular weights, between 114 and 119 kDa. The PH, RCC1/ATS1, FYVE and BRX/DZC domains were present in all the deduced protein sequences and the encoded proteins were 47 % to 69 % similar (Fig. 1a). The phylogenic tree of PRAF protein sequences from *A. thaliana, O. sativa, G. max, M. sativa* and *M. truncatula* contained four clusters (Fig. 1b). In *M. truncatula*, *Mt*ZR1 (AC151822_29.5, Supplemental Table 1) was the protein most similar (98.4%) to *Ms*ZR1 (Supplemental Fig. 1). We carried out molecular, biochemical and cellular analyses of *Mt*ZR1, with the aim of determining the role of a member of the PRAF protein family in roots and understanding its relevance to the symbiotic process.

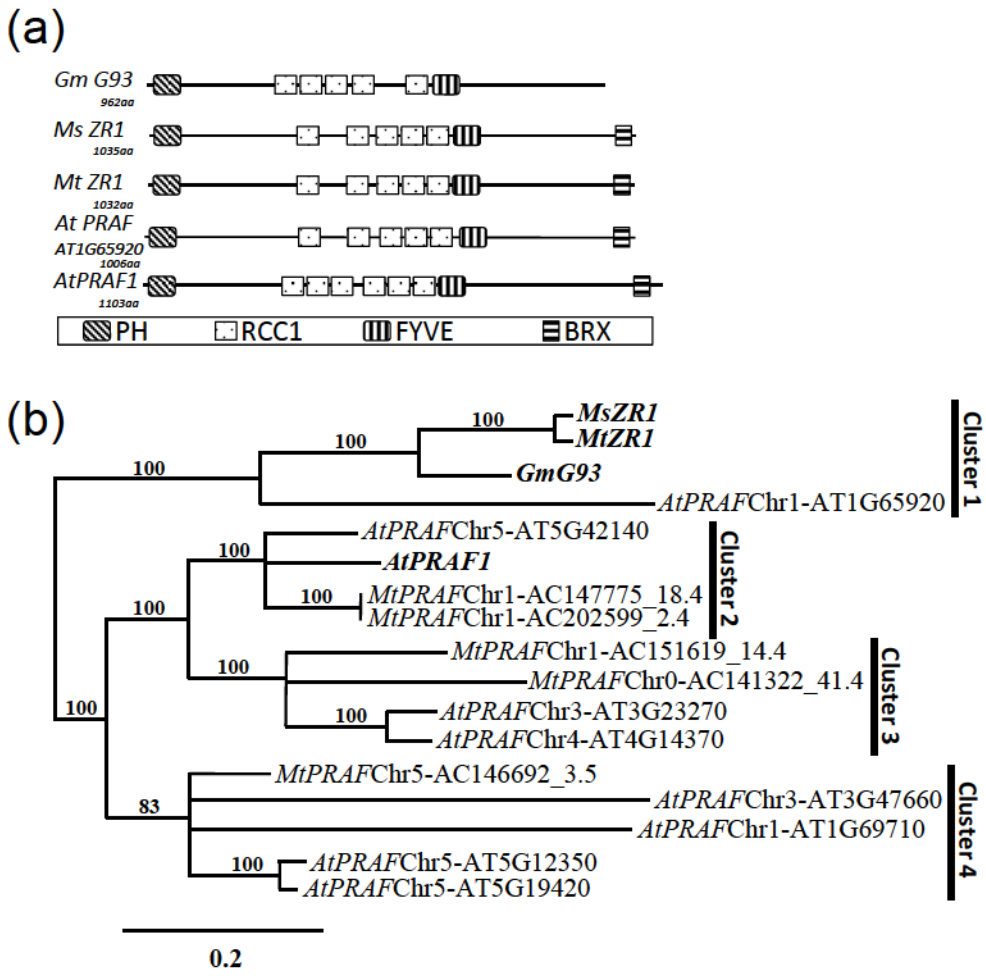


Figure 1: Outline of the structure of selected PRAF/ZR1 proteins and phylogenic tree

Figure 1: Outline of the structure of selected PRAF/ZR1 proteins and phylogenic tree.

(a) The domains of the *Gm*G93 (Glyma11g33200.1), *Ms*ZR1 (AJ409163), *Mt*ZR1 (AC151822_29.5), AtPRAF-AT1G65920 and *At*PRAF1 (AT1G76950) proteins: PH, pleckstrin homology; RCC1, regulator of chromosome condensation; FYVE, zinc-finger protein domains named according to the parental proteins Fab1, YGL023, VSP27 and EEA1; BRX, BREVIS RADIX. **(b)** Phylogenic tree of nine PRAF proteins from *A. thaliana*, five PRAF proteins from *M. truncatula* and PRAF proteins from *G. max*, *O. sativa* and *M. sativa* available from the GenBank database. This analysis was carried out on the phylogeny.fr platform (Dereeper *et al*. 2008) in advanced mode, with all the default parameters). The phylogenic tree was reconstructed by the maximum likelihood method, with the protein WAG substitution matrix. The reliability of internal branches was assessed by bootstrapping, with 500 bootstrap replicates, and values are shown in percentages, with a branching cut-off at 80%.

The *ZR1* gene is expressed in various organs in *M. truncatula* and is regulated at the transcriptional level by various abiotic stresses

We analysed *MtZR1* expression in leaves, roots and six-week-old nodules, by RT-qPCR. Levels of *MtZR1* expression were similar in leaves, roots and root nodules (Fig. 2a). Unlike *GmG93*, *MtZR1* was not specifically expressed in root nodules. Nevertheless, the expression of *MtZR1* in nodules was significantly down-regulated in response to various abiotic stresses affecting biological nitrogen fixation (BNF) efficiency. *MtZR1* expression levels were more than halved following the exposure of plants to salt, cadmium, ammonium nitrate and drought stresses (Fig. 2b). These results indicate that *MtZR1* is expressed in nitrogen-fixing nodules but is not a nodule-specific gene. Despite its clear down-regulation in response to various abiotic stresses, the expression profile of *MtZR1* in *M. truncatula* differs from that of *GmG93* in soybean.

***ZR1* is expressed in roots, the nodule meristem and the vascular bundles of mature nodules**

We analysed the pattern of *MtZR1* expression during nitrogen-fixing symbiosis, by isolating a 2,130-bp *MtZR1* promoter fragment from *M. truncatula* genomic DNA by PCR amplification and constructing a chimeric *PZR1::GUS* promoter-reporter gene fusion (Supplemental Table 2 and Table 3) and carrying out histochemical analyses of GUS activity in roots and nodules transgenic for this fusion. GUS staining was detected mostly towards the root tip and in the meristem of emerging lateral roots (Fig. 3a-b). In two-week-old transgenic nodules, GUS staining indicated that *MtZR1* was expressed in the infected zone containing symbiosomes (Fig. 3c-d). In six-week-old transgenic nodules, strong GUS staining was detected in vascular bundles (Fig. 3e-f, Supplemental Figure 3). However, weaker GUS staining was also detected in the meristem, the infection zone and the nitrogen-fixing zone of the six-week-old nodule (Fig. 3e-f). These results

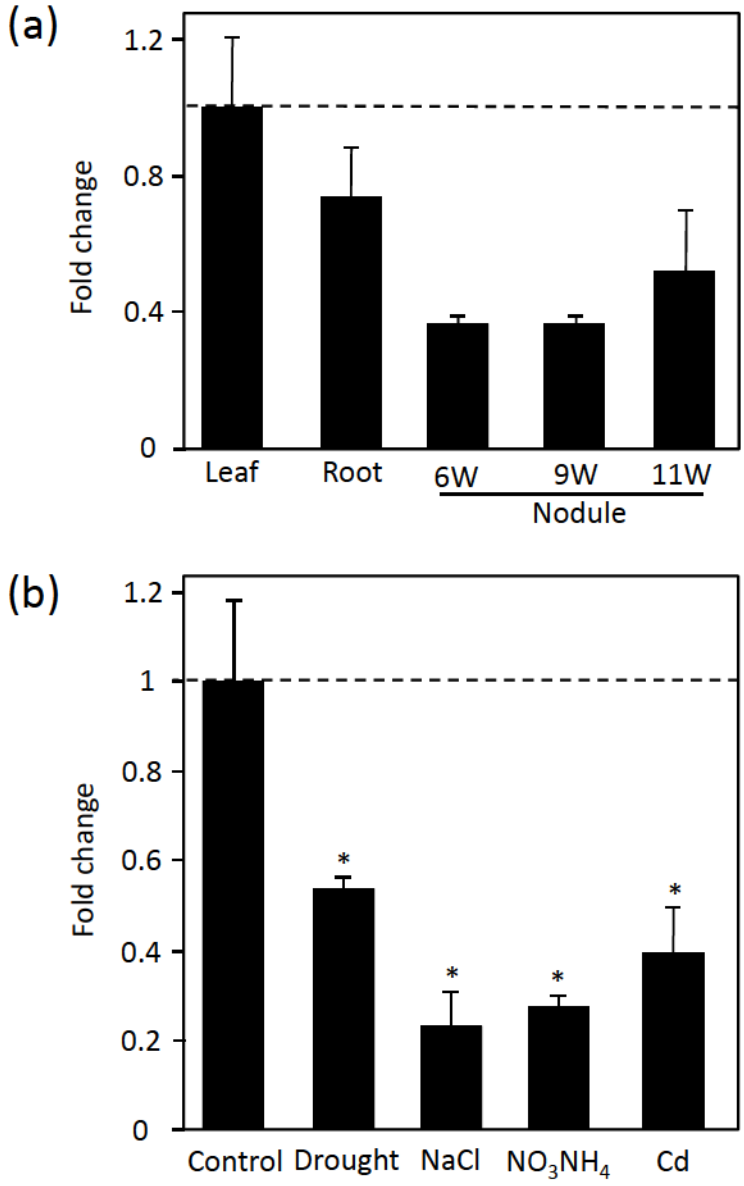


Figure 2: Regulation of *MtZR1* expression in various organs and symbiotic nodules under abiotic stresses.

Figure 2: Regulation of *MtZR1* expression in various organs and symbiotic nodules in conditions of abiotic stress

(a) Relative real-time quantitative PCR analysis of *MtZR1* expression (black boxes) in various plant organs (nodules, leaves and roots) at 6 weeks PI. Fold-changes relative to expression in flowers are indicated by a dashed line. (**b)** Relative RT-qPCR analysis of *MtZR1* expression at 6 weeks PI, in plants subjected to various abiotic stresses for one week. The constitutively expressed reference gene is *Mtc27* (Favery *et al*. 2002). Fold-changes relative to non-treated conditions are indicated by a dashed line. For both experiments, means of three biological experiments are shown and error bars indicate the standard error of the mean.

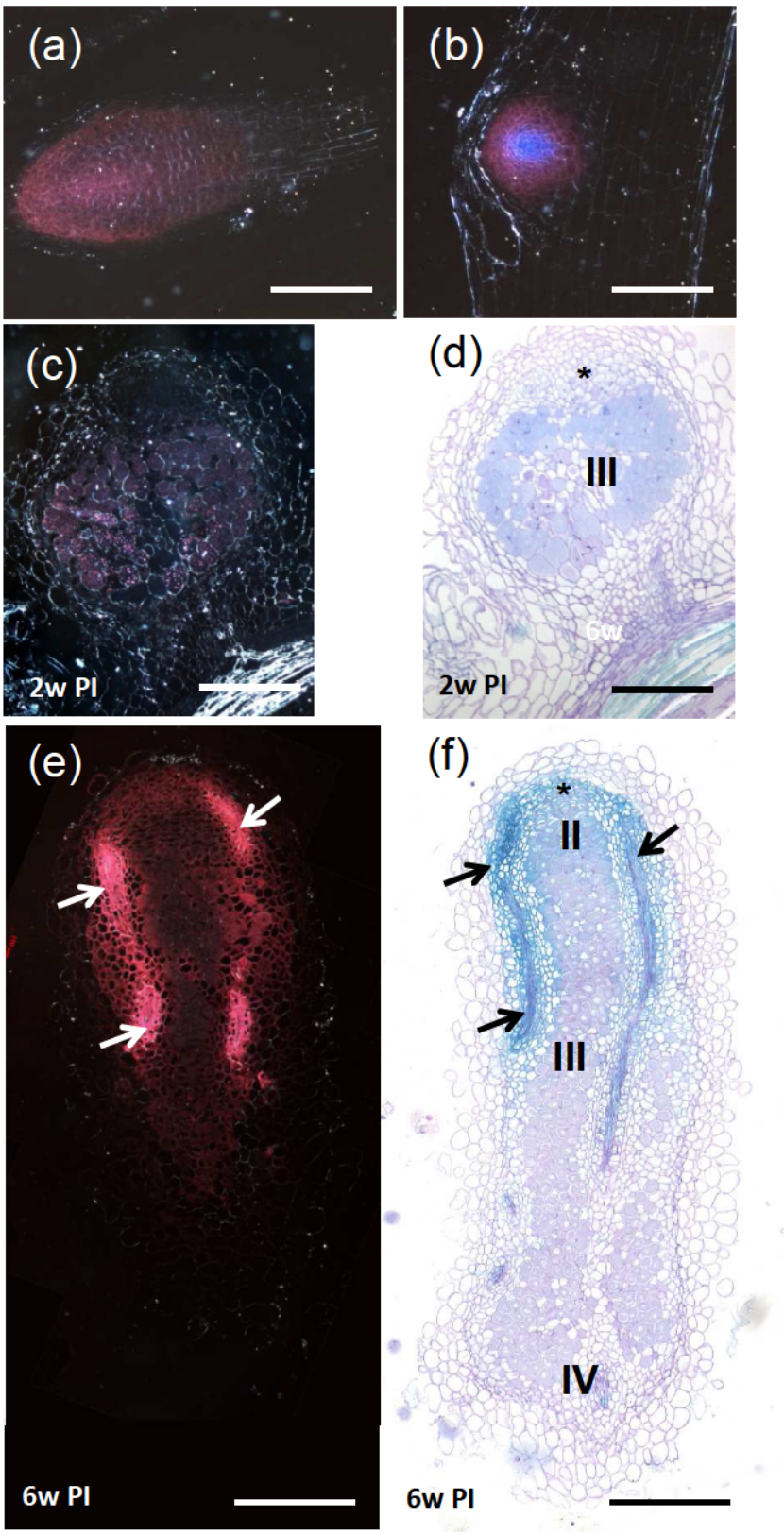


Figure 3: Regulation of spatiotemporal expression of *MtZR1* in root and in symbiotic nodules.

Figure 3: Spatiotemporal regulation of *MtZR1* expression in roots and symbiotic nodules

(a-c) *PMtZR1*::*GFP*::*GUS*; dark-field observation of GUS staining on 5 µm-thick sections of root tissues. Root-tip region (**a**), lateral root (**b**) expression. **(c-f)** Dark-field observation (c and e) or bright(field observation (d and f) of toluidine-*o*-blue staining in transgenic *PMtZR1*::*GFP*::*GUS* root nodules. Sections (5 µm thick) of *PMtZR1*::*GFP*::*GUS* transgenic root nodules from two- to six-week-old PI nodules, showing *GUS* expression in infected cells of the root nodule (2 weeks PI, zone III, **c-d**) and in the nodule vascular bundles (6 weeks PI, white/dark arrows, **e-f**). Zones I to IV: Functional zones in an indeterminate nitrogen-fixing nodule. Scale bars: 800 µm **(a to b)**, 400 µm **(c to f)**.

indicate that *MtZR1* is expressed principally in the meristematic zones of roots. In nodules, *MtZR1* is expressed not only in the meristem, but also in the infection and nitrogen-fixing zones and in the vascular bundles of six-week-old nodules.

The ZR1 protein is located in the cytosol and nucleus

We investigated the distribution of the ZR1 protein *in vivo*, by fusing the ORF of *ZR1* (3.7 kb) to the enhanced green fluorescent protein gene downstream from the CaMV 35S promoter (*P35S*) (Supplemental Table 2; *P35S::ZR1::GFP*). Accumulation of the resulting protein was poor in transgenic *M. truncatula* roots, so transient expression of the genetic construct was instead achieved by the agroinfiltration of *Nicotiana tabacum* leaves. Accumulation of the ZR1::GFP protein was observed by confocal microscopy after treatment with a cysteine protease inhibitor, E64-d, for three hours. In localization experiments, we used BUBR1::GFP as a positive control for an exclusively nuclear distribution and BUB3.1::GFP as a positive control for a nuclear and cytosolic distribution (Caillaud et al. 2009); Fig. 4). The ZR1::GFP fusion protein was detected in the cytosol and in the nucleus (Fig. 4a). A similar distribution was observed for BUB3.1::GFP (Fig. 4d), whereas BUBR1::GFP was detected only in the nucleus, as expected. This distribution suggests that ZR1 may be transported to the nucleus.

***ZR1* deregulation modifies root and nodule development and nodule functioning**

In roots, *ZR1* is expressed mostly in the meristematic zones. We investigated the importance of *ZR1* expression for root development, by analysing the growth rate of transgenic root lines with various levels of *ZR1* expression. We analysed the growth rates of *ZR1*-overexpressing root lines and root lines in which *ZR1* was silenced by RNAi. The efficacy with which genetic constructs modified *ZR1* mRNA levels was checked by RT-qPCR analysis. As expected, *ZR1* expression

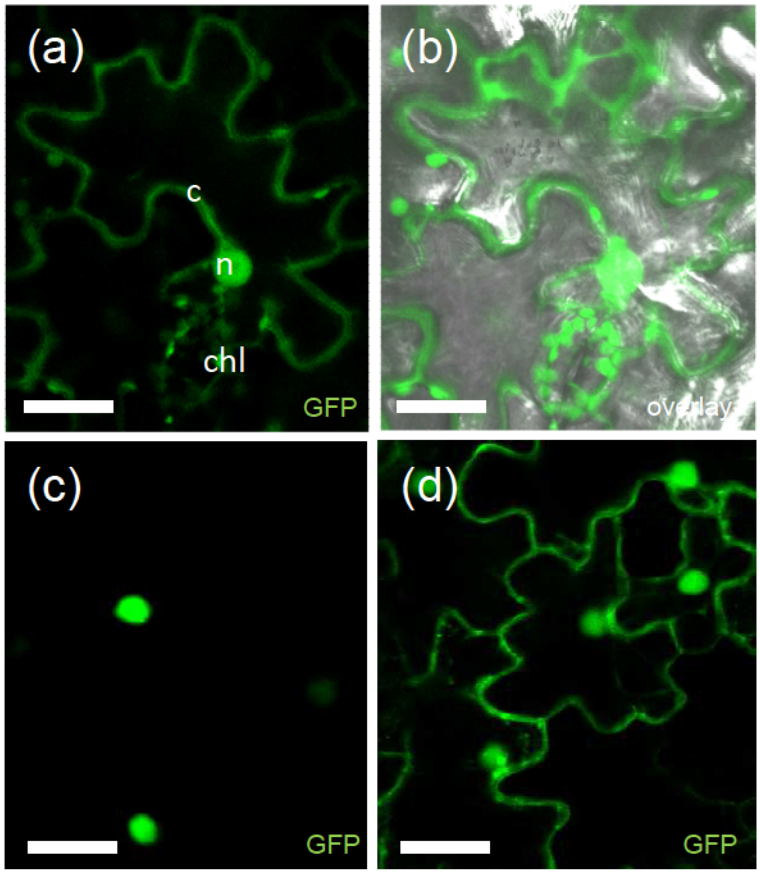


Figure 4: Subcellular localization of the recombinant ZR1:GFP protein in tobacco leave.

Figure 4: Subcellular localization of the recombinant ZR1::GFP protein in tobacco leaves.

(a-b) Confocal images of tobacco epidermal leaf cells infiltrated with *A. tumefaciens* expressing the *P35S*::*ZR1*::*GFP* construct. **(a)** GFP fluorescence associated with the *P35S*::*ZR1*::*GFP* construct three hours after treatment with 2 mM E64d. **(b)** Overlay of the transmission image and GFP fluorescence of tobacco epidermal cells. **(c)** Nuclear GFP fluorescence associated with the expression of BUBR1::GFP. **(d)** Cytosolic and nuclear GFP fluorescence associated with BUB3.1::GFP. Legend: c, cytoplasm; chl, chloroplast and n, nucleus. Bar scales: 20 µm.

levels were significantly higher in roots and nodules expressing the *P35S::ZR1* construct than in control tissues carrying the *P35S::GUS* construct, and significantly lower in roots or nodules expressing the RNAi*ZR1*-construct than in control tissues carrying the control RNAi empty vector (Supplemental Fig. 4). The expression of other *MtPRAF* genes was not significantly modified in the transgenic lines (Supplemental Fig. 5). As the production of composite plants resulted in a large range of *ZR1* expression levels, root growth analysis was performed on multiple root tips from four independent transgenic root lines selected on the basis of *ZR1* expression level and grown on SHb10 medium containing 1.3% agar for two weeks. The overexpression of *ZR1* (*P35S::ZR1*) was associated with significantly higher levels of root growth, resulting in longer roots (23% longer) than for the *P35S::GUS* control (Fig. 5a). Moreover, the number of lateral roots (57%) was significantly greater in root lines overexpressing *ZR1* than in *P35S::GUS* control lines (Fig. 5b). By contrast, RNAi*ZR1*-silenced transgenic roots were significantly shorter (31 %) than control roots (Fig. 5a), with no difference in the number of lateral roots (Fig. 5b). As phytohormones play an important role in determining root architecture, we investigated their effects on *ZR1* expression in *Medicago* roots (Fig. 5c). *ZR1* expression in roots was rapidly and significantly repressed by cytokinins, within 1 h or 3 h of treatment. By contrast, *ZR1* expression appeared to be slightly inducedby auxin. The expression of this gene was not significantly regulated by ethylene in either set of conditions, after 1 or 3 h of treatment, but it was significantly induced by treatment with ABA for 1 h. As we found that *ZR1* was also expressed in root nodules, we investigated the importance of *ZR1* expression for nodule development and functioning. We analysed various physiological parameters of six-week-old nodules from transgenic composite plants of *M. truncatula* (Vieweg *et al.*, 2004). No significant difference in nodule number was found between controls and deregulated plants for ZR1 (Supplemental Fig. 6). *ZR1*-overexpressing nodules were significantly

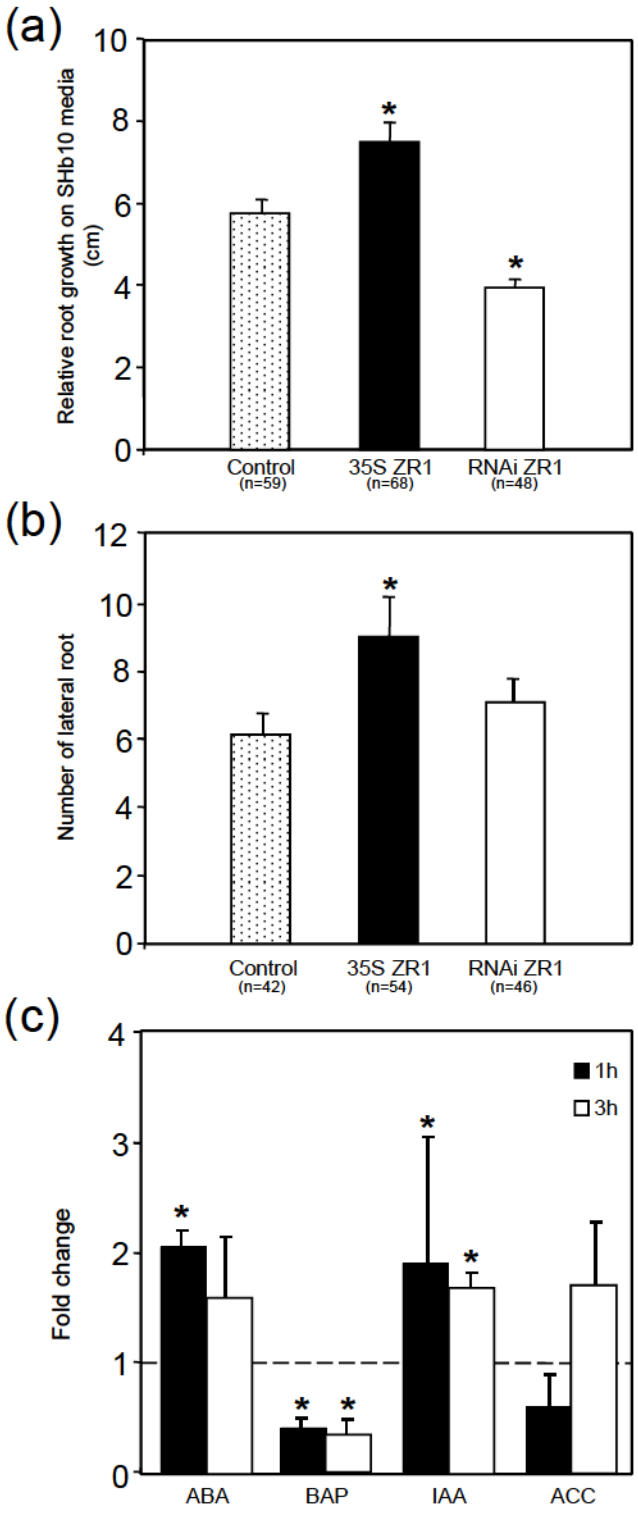


Figure 5: Changes in root development in transgenic roots after *MtZR1* deregulation and regulation of *MtZR1* expression by phytohormones

Figure 5: Changes in root development in transgenic roots after the modification of *MtZR1 MtZR1* expression by phytohormones

(a and b) Root growth and number of lateral roots from P35S::*GUS* (control, dotted box), *P35S*:*ZR1* (black box) and RNAi *MtZR1* (white box) after two weeks on SH10b agar medium. At least 48 root sections (each 1 cm long) were aligned on an agar plate, and final root growth was measured after two weeks. Statistical analysis was carried out by ANOVA, with $P<0.05$ considered significant. The corresponding number of root samples is indicated in brackets (>4 independent transgenic root lines for each construct). **(c)** *MtZR1* expression in roots after 3 h of hormone treatment: auxin (10^{-7} M IAA), cytokinin (10^{-7} M BAP), ethylene (10^{-7} M ACC) or abscisic acid (10^{-7} M ABA). Bars show the quantification of specific PCR amplification products for each gene, normalized against two constitutive genes (as described in Experimental procedures). Fold-changes relative to the non-treated conditions are indicated by the dashed line. The mean of two biological replicates is shown, and error bars represent the standard deviation. Asterisks indicate values significantly different from those for non-treated conditions (*; $P<0.05$) based on REST 2009.

longer than control nodules (Fig. 6a-b) and their weight was correlated with their size. By contrast, nodules in which *ZR1* was silenced by RNAi were significantly smaller than those from control plants (Fig 6c-d) and this lower fresh weight was associated with a smaller size (Fig. 6e-f). Biological nitrogen fixation (BNF) by bacteroids is a good physiological marker of nodule fitness. We performed an acetylene reduction assay (ARA) to analyse the BNF efficiency of the transgenic nodules (Fig. 7a). Transgenic nodules overexpressing *ZR1* had a significantly higher BNF efficiency than control transgenic nodules (Fig. 7a). In this assay, we evaluated the amount of ethylene formed per hour and per nodule. By contrast, nodules in which *ZR1* was silenced by RNAi had a lower BNF efficiency than control transgenic nodules. We investigated the correlation between the BNF efficiency of transgenic nodules and the expression of genes induced during the functioning and senescence of nodules, by analysing the expression of the leghaemoglobin *Lb1* (Ott et al. 2005), *NCR001* (Mergaert *et al*. 2003), *ENOD 8* (Coque *et al.* 2008), *CP6* and *VPE* (Van de Velde *et al.* 2006) genes by RT-qPCR. The leghaemoglobin *Lb1*, *NCR001* and *ENOD8* genes are expressed in the nitrogen-fixing zone (III), whereas *CP6* and *VPE* encode proteases induced during nodule senescence (IV). The levels of leghaemoglobin, *NCR001, ENOD 8, CP6* and *VPE* transcripts were similar in *ZR1*-overexpressing and control plants (Fig. 7b). By contrast, transcripts for these genes were significantly less abundant in nodules in which *ZR1* was silenced by RNAi than in control nodules (Fig. 7c). Thus, ZR1 can be considered to play an important role in the development of roots and nodules in *M. truncatula*.

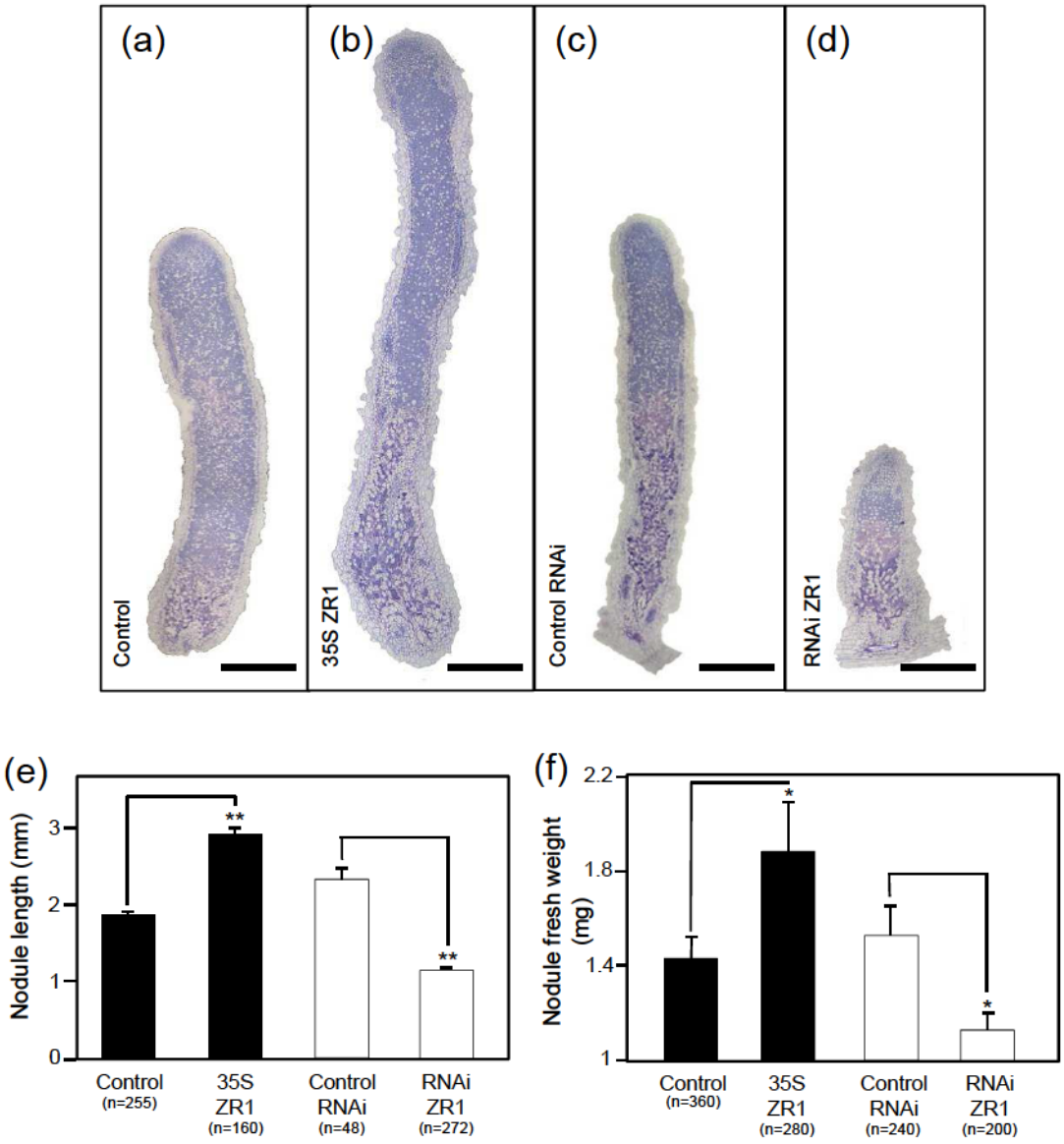


Figure 6: Comparison of the structural organization of symbiotic nodules after deregulation of *MtZR1* expression.

Figure 6: Comparison of the structural organisation of symbiotic nodules after the deregulation of *MtZR1* expression

(a to d). Longitudinal section of transgenic root nodules from *M.truncatula* 6 weeks PI. Toluidine-*o*-blue-stained 5 µm sections from *P35S::GUS* (control, **a**) and *P35S::ZR1* (35S ZR1, **b**), empty RNAi vector (control RNAi, **c**) and RNAi *MtZR1* (RNAi ZR1, **d**) roots. Scale bars: 400 µm. **(e)** Nodule length and **(f)** nodule wet weight in composite plants in which *MtZR1* was overexpressed or silenced (control plants are *P35S::GUS* and RNAi *MtZR1*, respectively). In both cases, the mean of three biological replicates is shown (n>48). Error bars represent the standard error of the mean and asterisks indicate significant differences relative to controls in a Mann-Whitney test (*, P<0.05; **, P<0.01).

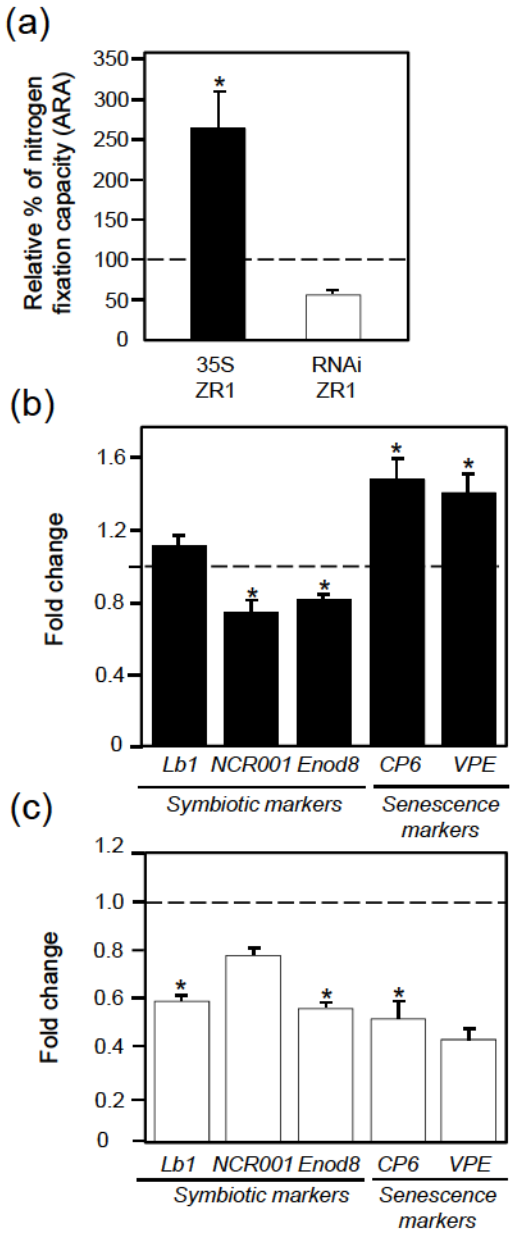


Figure 7: Biological nitrogen fixation and relative expression of symbiotic or senescence markers in transgenic nodules.

Figure 7: Biological nitrogen fixation and relative expression of symbiotic or senescence markers in transgenic nodules

(a) Nitrogen fixation (ARA) by root nodules in *P35S*::*ZR1* (black boxes) and RNAi *MtZR1* (white boxes), (normalised relative to *P35S*::*GUS* or empty RNAi vector control constructs, respectively, as indicated by the dashed line). Each bar indicates the standard error of the mean for five independent assays from three biological replicates. Statistical differences were assessed with the Kruskal-Wallis test, taking $P<0.05$ to be significant (*). **(b-c)** Relative RT-qPCR analysis of symbiotic (*MtLb1*, *MtNCR001* and *MtEnod8*) and senescence (*MtCP6* and *MtVPE*) marker genes in transgenic root nodules overexpressing *MsZR1* (blackboxes) or silenced for *MtZR1* (white boxes). The expression of each marker in control nodules was used to define fold-changes (indicated by the dashed line). Error bars show the standard error of 3 experimental replicates from 3 biological experiments. PCR amplification was normalised against the mean value for two constitutive genes, *Mtc27* and *RP40S*. The stability of expression of the *Mtc27* and *RP40S* reference genes was checked with GeNorm software. The significance of differences was assessed with REST 2009, taking $P<0.05$ to be significant (*).

DISCUSSION

ZR1 and *PRAF* genes in the *M. truncatula* genome

The goal of our study was to determine the importance of the ZR1 protein for the symbiotic interaction between *M. truncatula* and *S. meliloti*. We previously showed that *GmG93* is expressed only in infected cells of functional nodules, as the expression of this gene was not detected in other organs or in non-functional nodules (Clement *et al.*, 2006). *GmG93* was shown to encode a protein of the PRAF family. This family contains proteins with multiple domains, suggesting roles in multiple functions in plants (Heras & Drobak, 2002). The affinity of one of these domains, the FYVE domain of *A. thaliana,* for various phospholipids, including phosphatidylinositol-3-phosphate (PtdIns(3)P), has been studied *in vitro* (Jensen *et al*. 2001). We investigated the biological role of PRAF proteins in nodulation, by searching for sequences encoding PRAF proteins in the *M. truncatula* genome. We identified at least five members of the PRAF family, on the basis of predicted amino-acid sequences, in *M. truncatula*. The gene most similar to *GmG93,* the nodule-specific PRAF gene, was *MtZR1,* which encoded a protein with an amino-acid sequence 67% identical to that of the protein encoded by *GmG93*. *MtZR1* is also similar to *MsZR1,* which has been cloned from *M. sativa* and encodes a protein with a sequence 96% identical to that of *MtZR1*, suggesting that these genes are orthologous. We investigated the importance of *ZR1* in the leguminous model plant *M. truncatula*. *In silico* analysis of the expression profile of this gene carried out with Affymetrix *Medicago* Genome array data (Benedito *et al*. 2008) showed that *ZR1* was weakly expressed in various plant organs (Supplemental Fig. 2). RT-qPCR analysis confirmed the low-level expression of *ZR1* in roots, leaves and nodules. These findings strongly suggest that *ZR1* and *GmG93* are not orthologues, as *GmG93 expression* was detected only in nodules. However, steady-state *ZR1* transcript levels

were significantly downregulated in nodules subjected to abiotic stresses affecting nitrogen fixation efficiency, suggesting that the level of nodule *MtZR1* expression is associated with the nitrogen-fixing function of the nodule. An analysis of *MtZR1* promoter activity with the *PMtZR1::GUS* fusion in transgenic *M. truncatula* plants showed that *ZR1* was expressed in vascular bundles and, to a lesser extent, in the meristematic, infection and nitrogen-fixing zones of mature nodules. *ZR1* was also expressed in the infected zones of two-week-old root nodules. The differing spatiotemporal patterns of *ZR1* expression suggest that this gene has different functions during nodule formation and functioning. Moreover, the expression of *ZR1* in the root meristem and during nodule development suggests a potential role in the development of these organs. As stated above, ZR1 is a multidomain protein with phospholipid-interacting (PH and FYVE), guanine exchange activity (ATS1/RCC1) and protein-protein interaction (BRX/DZC) domains (Heras & Drobak 2002; Jensen *et al*. 2001; Wywial & Singh 2010). Interactions between these different protein domains might mediate multiple cellular roles for ZR1 in root or nodule development and functioning.

_ZR1_ is involved in root and nodule development

We assessed the importanceof ZR1 for root and nodule development, by implementing a genetic approach in *M. truncatula*. The overexpression of *ZR1* and the knockdown of the expression of this gene by RNAi of *ZR1* had significant, opposite effects on the development of both roots and symbiotic nodules. *ZR1* overexpression promoted root growth and the formation of lateral roots, whereas the RNAi-mediated knockdown of *ZR1* expression significantly decreased root growth. These results indicate a role for ZR1 in the regulation of root growth and architecture. An analysis of *ZR1* expression under hormonal treatment showed a potential role of cytokinins and auxins in ZR1 regulation, as the expression of this gene was significantly modified by treatment

with these two hormones. By contrast, treatment with the ethylene precursor ACC had no significant effect on *ZR1* expression, whereas abscisic acid increased the expression of this gene after 1 h treatment. *ZR1* expression is, thus, regulated by phytohormones. Crosstalk has been demonstrated between the auxin and cytokinin pathways, in the control of root development. Auxin is involved in the establishment and maintenance of the root apical meristem, whereas cytokinins decrease root apical meristem size and affect the rate of meristematic cell differentiation (reviewed by (Garay-Arroyo et al. 2012). Thus, the repression of *ZR1* expression in roots by cytokinins may affect meristem development. The detection of *ZR1* expression in the root tip and the meristemsof lateral roots, and the larger number of lateral roots in *ZR1*-overexpressing root systems provide support for the notion that *ZR1* plays a role in meristematic cells. However, the number of nodules was not significantly affected in the transgenic roots, suggesting that ZR1 plays no significant role in nodule meristem formation. The opposite pattern of regulation by ABA provides support for the notion that *ZR1* and *GmG93* are not orthologues, as *GmG93* is down-regulated by ABA treatment (Clement *et al*. 2006). Nodule development and functioning were also modified by changes to *ZR1* expression. *ZR1* overexpression resulted in a larger nodule size and greater N_2 fixation capacity, whereas RNAi knockdown of *ZR1* expression resulted in significantly smaller nodules and lower nitrogen fixation efficiency. The significant differences observed in the expression of nodule gene markers for the nitrogen-fixing zone (*Lb1*, *NCR001* and *Enod 8*) and for senescence onset (*CP6* and *VPE*) revealed differences in nodule functioning with respect to control nodules. The higher levels of *CP6* and *VPE* expression, together with the lower levels of *NCR001* and *Enod 8* expression, in *ZR1*-overexpressing nodules may reflect a more advanced stage of nodule development, as suggested by the greater length of the nodule. The lower levels of expression of all the gene markers in RNAi-ZR1 nodules were also indicative of changes in the functioning of the nodule. Thus, *ZR1* plays a significant role, at

least during nodule development. The observed changes in root and nodule development may reflect the regulatory role of the PH, FYVE, RCC1 and BRX protein domains. Indeed, a PH domain-containing protein (VAN3 ARF-GAP) has been shown to play a key role in plant vascular development, through the regulation of plant venation continuity in *A. thaliana* (Naramoto *et al.* 2009). The PH domain is found in diverse proteins involved in cellular signalling, cytoskeleton organisation, membrane trafficking and/or phospholipid modification (Lemmon 2004; Lindmo & Stenmark 2006). Boththe PH and FYVE domains interact with phospholipids identified as regulatory lipids controlling various physiological processes in plants, such as root growth, pollen and vascular development (Ischebeck *et al.*, 2008, Lee *et al.*, 2008). Finally, the cellular function of the multidomain ZR1 protein in *M. truncatula* could be investigated more completely by characterising the other domains involved in protein-protein interactions: ATS1/RCC1 and BRX/DZC (Jensen *et al*. 2001; Mouchel *et al*. 2004; Wywial & Singh 2010). In *A. thaliana*, the activity of *AtPRAF1*RCC1 domains as guanine exchange factors has been investigated in interactions with small GTPase proteins (Arf, Rab and Ran), *in vitro*. Guanine exchange was found to be significantly catalysed on specific Rab proteins (Jensen *et al.*, 2001). Such RCC1 domains can bind to the nucleosome in various organisms, from humans to plants, but we are only just beginning to understand the precise function of these domains (Hadjebi *et al*. 2008; Meier *et al.* 2008; Tan 2012). Finally, in *A. thaliana*, the BRX protein carrying a tandem repeat of the DZC domain has been shown to be produced in small amounts and to modulate root growth strongly (Mouchel, Briggs & Hardtke, 2004). It would be interesting to investigate the potential interaction between BRX and ZR1 in *M. truncatula,* as an interaction between BRX and *At*PRAF1 has been demonstrated in *A. thaliana* (Briggs, Mouchel & Hardtke, 2006), and to investigate the effect of changes in BRX gene expression in transgenic roots and nodules.

In conclusion, this work provides the first evidence that ZR1, a member of the PRAF family, is involved in the regulation of root and nodule development in *M. truncatula*. Future studies will investigate the involvement of other *Mt*PRAF proteins in plant development and the symbiotic process.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by PhD fellowships from the 'Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche'. We would like to thank Dr. K. Zwerger for providing the full-length cDNA of *MsZR1* (AJ409163) from *M. sativa*. We would like to thank C. Mura for providing tobacco plants. We thank L. Paganelli for providing us with BUBR1:GFP and BUB3.1:GFP. This manuscript was proofread and rewritten by Alex Edelman & Associates and by Gloria Berrocal (BIOLUX). UMR ISA is part of the Labex Signalife.

REFERENCES

Alpizar E., Dechamp E., Espeout S., Royer M., Lecouls A.C., Nicole M., Bertrand B., Lashermes P. & Etienne H. (2006) Efficient production of *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots and composite plants for studying gene expression in coffee roots. *Plant Cell Reports*, **25**, 959-967.

Ariel F., Diet A., Verdenaud M., Gruber V., Frugier F., Chan R. & Crespi M. (2010) Environmental regulation of lateral root emergence in *Medicago truncatula* requires the HD-Zip I transcription factor HB1. *The Plant Cell*, **22**, 2171-2183.

Benedito V.A., Torres-Jerez I., Murray J.D., Andriankaja A., Allen S., Kakar K., Wandrey M., Verdier J., Zuber H., Ott T., Moreau S., Niebel A., Frickey T., Weiller G., He J., Dai X., Zhao P.X., Tang Y. & Udvardi M. K. (2008) A gene expression atlas of the model legume *Medicago truncatula*. *The Plant Journal*, **55**, 504-513.

Boisson-Dernier A., Chabaud M., Garcia F., Becard G., Rosenberg C. & Barker D.G. (2001) *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Medicago truncatula* for the study of nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, **14**, 695-700.

Briggs G.C., Mouchel C.F.& Hardtke C.S. (2006) Characterization of the plant-specific BREVIS RADIX gene family reveals limited genetic redundancy despite high sequence conservation. *Plant Physiology*, **140**, 1306-1316.

Caillaud M.C., Paganelli L., Lecomte P., Deslandes L., Quentin M., Pecrix Y., Le Bris M., Marfaing N., Abad P. & Favery B. (2009) Spindle assembly checkpoint protein dynamics reveal conserved and unsuspected roles in plant cell division. *PLoS One*, **4**, e6757.

Clement M., Boncompagni E., de Almeida-Engler J. & Herouart D. (2006) Isolation of a novel nodulin: a molecular marker of osmotic stress in *Glycine max/Bradyrhizobium japonicum* nodule. *Plant, Cell and Environment*, **29**, 1841-1852.

Coque L., Neogi P., Pislariu C., Wilson K.A., Catalano C., Avadhani M., Sherrier D.J. & Dickstein R. (2008) Transcription of ENOD8 in *Medicago truncatula* nodules directs ENOD8 esterase to developing and mature symbiosomes. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, **21**, 404-410.

Dereeper A., Guignon V., Blanc G., Audic S., Buffet S., Chevenet F., Dufayard J.F., Guindon S., Lefort V., Lescot M., Claverie J.M. & Gascuel O. (2008) Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Research*, **36**, W465-469.

El Msehli S., Lambert A., Baldacci-Cresp F., Hopkins J., Boncompagni E., Smiti S.A., Herouart D. & Frendo P. (2011) Crucial role of (homo)glutathione in nitrogen fixation in *Medicago truncatula* nodules. *New Phytologist*, **192**, 496-506.

Favery B., Complainville A., Vinardell J.M., Lecomte P., Vaubert D., Mergaert P., Kondorosi A., Kondorosi E., Crespi M. & Abad P. (2002) The endosymbiosis-induced genes ENOD40 and CCS52a are involved in endoparasitic-nematode interactions in Medicago truncatula. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, **15**, 1008-1013.

Fedorova M., van de Mortel J., Matsumoto P.A., Cho J., Town C.D., VandenBosch K.A., Gantt J.S. & Vance C.P. (2002) Genome-wide identification of nodule-specific transcripts in the model legume *Medicago truncatula*. *Plant Physiology*, **130**, 519-537.

Garay-Arroyo A., De La Paz Sanchez M., Garcia-Ponce B., Azpeitia E. & Alvarez-Buylla E.R. (2012) Hormone symphony during root growth and development. *Developmental Dynamics*, **241**, 1867-1885.

Gibson K.E., Kobayashi H. & Walker G.C. (2008) Molecular determinants of a symbiotic chronic infection. *Annual Review of Genetics*, **42**, 413-441.

Gonzalez-Rizzo S., Crespi M. & Frugier F. (2006) The *Medicago truncatula* CRE1 cytokinin receptor regulates lateral root development and early symbiotic interaction with *Sinorhizobium meliloti*. *The Plant Cell*, **18**, 2680-2693.

Hadjebi O., Casas-Terradellas E., Garcia-Gonzalo F.R. & Rosa J.L. (2008) The RCC1 superfamily: from genes, to function, to disease. *Biochimica et Biophysica ACTA*, **1783**, 1467-1479.

Hatsugai N., Kuroyanagi M., Yamada K., Meshi T., Tsuda S., Kondo M., Nishimura M. & Hara-Nishimura I. (2004) A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus-induced hypersensitive cell death. *Science*, **305**, 855-858.

Heras B. & Drobak B.K. (2002) PARF-1: an *Arabidopsis thaliana* FYVE-domain protein displaying a novel eukaryotic domain structure and phosphoinositide affinity. *Journal of Experimental Botany*, **53**, 565-567.

Ischebeck T., Stenzel I. & Heilmann I. (2008) Type B phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinases mediate *Arabidopsis* and *Nicotiana tabacum* pollen tube growth by regulating apical pectin secretion. *The Plant Cell*, **20**, 3312-3330.

Jensen R.B., La Cour T., Albrethsen J., Nielsen M. & Skriver K. (2001) FYVE zinc-finger proteins in the plant model *Arabidopsis thaliana*: identification of PtdIns3P-binding residues by comparison of classic and variant FYVE domains. *Biochemical Journal*, **359**, 165-173.

Jones K.M., Kobayashi H., Davies B.W., Taga M.E. & Walker G.C. (2007) How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model. *Nature Reviews Microbiology*, **5**, 619-633.

Journet E.P., Pichon M., Dedieu A., de Billy F., Truchet G. & Barker D.G. (1994) *Rhizobium meliloti* Nod factors elicit cell-specific transcription of the ENOD12 gene in transgenic alfalfa. *The Plant Journal*, **6**, 241-249.

Journet E.P., van Tuinen D., Gouzy J., Crespeau H., Carreau V., Farmer M.J., Niebel A., Schiex T., Jaillon O., Chatagnier O., Godiard L., Micheli F., Kahn D., Gianinazzi-Pearson V. & Gamas P. (2002) Exploring root symbiotic programs in the model legume *Medicago truncatula* using EST analysis. *Nucleic Acids Research*, **30**, 5579-5592.

Lazo G.R., Stein P.A. & Ludwig R.A. (1991) A DNA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in Agrobacterium. *Biotechnology (N Y)*, **9**, 963-967.

Lee Y., Bak G., Choi Y., Chuang W.I., Cho H.T. & Lee Y. (2008) Roles of Phosphatidylinositol 3-kinase in root hair growth. *Plant Physiology*, **147**, 624-635.

Lemmon M.A. (2004) Pleckstrin homology domains: not just for phosphoinositides. *Biochemical Society Transactions*, **32**, 707-711.

Lindmo K. & Stenmark H. (2006) Regulation of membrane traffic by phosphoinositide 3-kinases. *Journal of Cell Science*, **119**, 605-614.

Livak K.J. & Schmittgen T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, **25**, 402-408.

Matamoros M.A., Baird L.M., Escuredo P.R., Dalton D.A., Minchin F.R., Iturbe-Ormaetxe I., Rubio M.C., Moran J.F., Gordon A.J. & Becana M. (1999) Stress-induced legume root nodule senescence. Physiological, biochemical, and structural alterations. *Plant Physiology*, **121**, 97-112.

Meier I., Xu X.M., Brkljacic J., Zhao Q. & Wang H.J. (2008) Going green: plants' alternative way to position the Ran gradient. *Journal of Microscopy*, **231**, 225-233.

Mergaert P., Nikovics K., Kelemen Z., Maunoury N., Vaubert D., Kondorosi A. & Kondorosi E. (2003) A novel family in *Medicago truncatula* consisting of more than 300 nodule-specific genes coding for small, secreted polypeptides with conserved cysteine motifs. *Plant Physiology*, **132**, 161-173.

Mouchel C.F., Briggs G.C.& Hardtke C.S. (2004) Natural genetic variation in *Arabidopsis* identifies BREVIS RADIX, a novel regulator of cell proliferation and elongation in the root. *Genes and Development*, **18**, 700-714.

Naramoto S., Sawa S., Koizumi K., Uemura T., Ueda T., Friml J., Nakano A. & Fukuda H. (2009) Phosphoinositide-dependent regulation of VAN3 ARF-GAP localization and activity essential for vascular tissue continuity in plants. *Development*, **136**, 1529-1538.

Oldroyd G.E., Murray J.D., Poole P.S. & Downie J.A. (2011) The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annual Review of Genetics*, **45**, 119-144.

Osteras M., Boncompagni E., Vincent N., Poggi M.C. & Le Rudulier D. (1998) Presence of a gene encoding choline sulfatase in *Sinorhizobium meliloti bet* operon: choline-O-sulfate is metabolized into glycine betaine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 11394-11399.

Ott T., van Dongen J.T., Gunther C., Krusell L., Desbrosses G., Vigeolas H., Bock V., Czechowski T., Geigenberger P. & Udvardi M.K. (2005) Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. *Current Biology*, **15**, 531-535.

Pfaffl M.W., Horgan G.W. & Dempfle L. (2002) Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, **30**, e36.

Plet J., Wasson A., Ariel F., Le Signor C., Baker D., Mathesius U., Crespi M. & Frugier F. (2011) MtCRE1-dependent cytokinin signaling integrates bacterial and plant cues to coordinate symbiotic nodule organogenesis in *Medicago truncatula*. *The Plant Journal*, **65**, 622-633.

Puppo A., L. Dimitrijevic & J. Rigaud (1982) Possible involvement of nodule superoxide dismutase and catalase in leghemoglobin protection. *Planta*, **156**, 374-379.

Ramos J. & Bisseling T. (2003) A method for the isolation of root hairs from the model legume *Medicago truncatula*. *Journal of Experimental Botany*, **54**, 2245-2250.

Staudinger C., Mehmeti V., Turetschek R., Lyon D., Egelhofer V. & Wienkoop S. (2012) Possible role of nutritional priming for early salt and drought stress responses in *Medicago truncatula*. *Frontiers in Plant Science*, **3**, 285.

Takase T., Yanagawa Y., Komatsu S., Nakagawa H. & Hashimoto J. (2003) Cell-cycle-related variation in proteins in suspension-cultured rice cells. *Plant Disease Research*, **116**, 469-475.

Tan S. (2012) Deciphering how the chromatin factor RCC1 recognizes the nucleosome: the importance of individuals in the scientific discovery process. *Biochemical Society Transactions*, **40**, 351-356.

Timmers A.C., Soupene E., Auriac M.C., de Billy F., Vasse J., Boistard P. & Truchet G. (2000) Saprophytic intracellular rhizobia in alfalfa nodules. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **13**, 1204-1213.

Van de Velde W., Guerra J.C., De Keyser A., De Rycke R., Rombauts S., Maunoury N., Mergaert P., Kondorosi E., Holsters M. & Goormachtig S. (2006) Aging in legume symbiosis. A molecular view on nodule senescence in *Medicago truncatula*. *Plant Physiology*,**141**, 711-720.

van Leeuwen W., Okresz L., Bogre L. & Munnik T. (2004) Learning the lipid language of plant signalling. *Trends in Plant Science*, **9**, 378-384.

Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A. & Speleman F. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, **3**, research0034.0031-research0034.0011.

Vieweg M.F., Fruhling M., Quandt H.J., Heim U., Baumlein H., Puhler A., Kuster H. & Andreas M.P. (2004) The promoter of the *Vicia faba* L. leghemoglobin gene *VfLb29* is specifically activated in the infected cells of root nodules and in the arbuscule-containing cells of mycorrhizal roots from different legume and nonlegume plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **17**, 62-69.

Voinnet O., Rivas S., Mestre P. & Baulcombe D. (2003) An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *The Plant Journal*, **33**, 949-956.

Wywial E. & Singh S.M. (2010) Identification and structural characterization of FYVE domain-containing proteins of *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology*, **10**, 157.

Supplemental table 1. *Medicago* PRAF Gene ID and Probeset ID.

Medicago PRAF Gene	*Medicago* Gene ID[a]	Affymetrix Probeset ID[b]	Closest PRAF *Arabidopsis* Homolog(s)	Closest PRAF Homolog(s), Other Plants
MtZR1	Medtr3g086740.1	Msa.965.1.S1_at	AT1G65920	AJ409163 (Alfalfa), Glyma11g33200.1 (Soybean)
MtPRAFChr0-AC141322_41.4	Medtr4g031550.1	Mtr.14364.1.S1_at	AT3G23270, AT4G14370	
MtPRAFChr1-AC151619_14.4	Medtr1g043020.1	Mtr.47635.1.S1_at	AT3G23270, AT4G14370	
MtPRAFChr1-AC147775_18.4	Medtr1g125660.1	Mtr.35761.1.S1_at	AT1G76950, AT5G42140	
MtPRAFChr5-AC146692_3.5	Medtr5g096940.1	Mtr.20584.1.S1_at	AT3G47660, AT5G12350, AT5G19420, AT1G69710	P0431G06.5 (Rice)

[a] The International Medicago Genome Annotation Group (http://www.medicago.org)

[b] Affymetrix probeset (http://bioinfo.noble.org/gene-atlas/v2/)

Supplemental table 2. Bacterial strains and plasmids used in this study

Designation	Resistance[a]	Relevant properties[b]	Reference or source
S. meliloti			
Sm 102F34 Rif^R	Rif^R	Spontaneous Rif^r derivative of 102F34	Pocard *et al.*, 1997
A. rhizogenes			
A4S	Rif^R		Alpizar *et al*., 2006
A. tumefaciens			
AGL1	Rif^R		Lazo *et al*., 1991
E. coli			
XL1-Blue MRF'	Tet^R	Δ(*mcrA*)*183* Δ(*mcrCB-hsdSMR-mrr*)*173 endA1 supE44 thi-1 recA1* gyrA96 relA1 lac *[F'* proAB $lacI^qZ\Delta$ M15 *Tn*10 *(Tet^r)]*	Stratagene
DB3.1	Sm^R	F- gyrA462 endA1 glnV44 Δ(sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(r_B^-, m_B^-) ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Sm^r) xyl5 Δleu mtl1	Invitrogen
Plasmids			
pBluescriptSK(-)	Amp^R	Derivative of pUC19 with f1(-) oriR, Amp^R	Stratagene
pBluescriptSK(-) Ms ZR1	Amp^R	Full length cDNA of Ms *ZR1*	K. Zweger, AJ409163
pDON207	Gm^R	Gateway entry vector	Invitrogen
pENTR4	Km^R	Gateway entry vector	Invitrogen
pGEM-T vector	Amp^R	Cloning vector	Promega
pK7WG2D,1	Sm^R/Sp^R	Destination vector for overexpression, P35S promoter, rolD:GFP	Karimi *et al.*, 2002
P35S::ZR1	Sm^R/Sp^R	pK7WG2D,1; 3.7kb cDNA of MsZR1	This study
P35S::GUS	Sm^R/Sp^R	pK7WG2D,1; GUS cassette from pENTR-GUS	This study
BUBR1::GFP	Sm^R/Sp^R	pK7WG2D; BUBR1 cassette from *A. thaliana*	Caillaud et al. 2009
BUB3.1::GFP	Sm^R/Sp^R	pK7WG2D; BUB3.1 cassette from *A. thaliana*	Caillaud et al. 2009
pK7FWG2,0	Sm^R/Sp^R	Destination vector for overexpression, P35S promoter, GFP reporter gene	Karimi *et al.*, 2002
P35S::ZR1::GFP	Sm^R/Sp^R	pK7FWG2,0; 3.7kb cDNA of Ms*ZR1*, GFP fusion	This study
pKGWFS7	Sm^R/Sp^R	Destination vector for promoter analysis	Karimi *et al.*, 2002
PMtZR1::GFP::GUS	Sm^R/Sp^R	pKGWFS7, 2.13kb Mt ZR1 promoter, GFP:GUS reporter genes	This study
pK7GWIWG2D(II),0	Sm^R/Sp^R	Hairpin RNA expression destination vector, control RNAi empty vector	Karimi *et al*., 2002
P35S::RNAiZR1	Sm^R/Sp^R	pK7GWIWG2D(II),0, 256bp Ms ZR1 5'UTR insert	This study

Supplemental table 3. Cloning and RT-qPCR primers

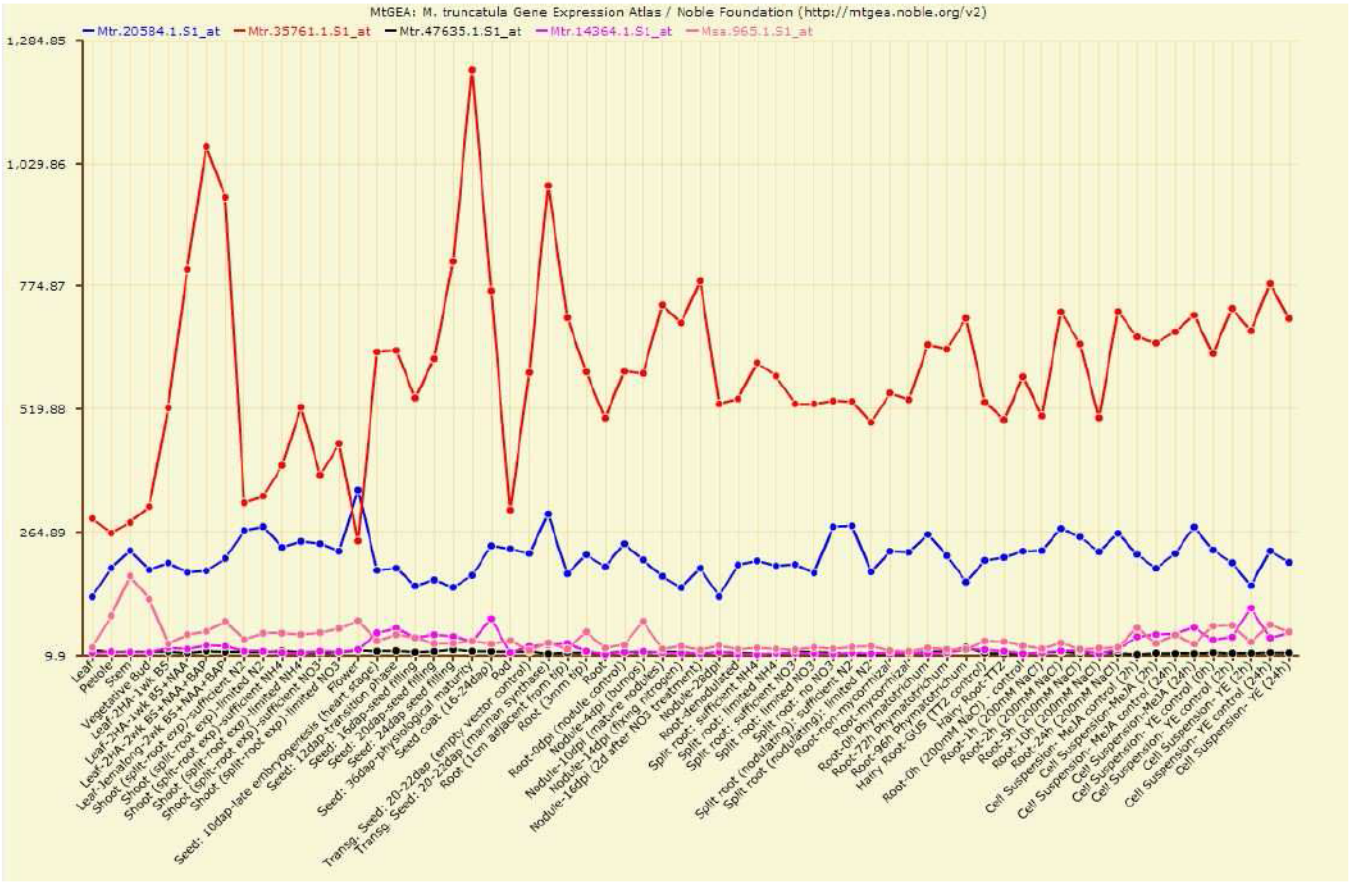
Annotation	TC No. Acc. Number	Forward primer (**F**)	Reverse primer (**R**)
PMtZR1	AC151822	ATTATGGTCCATGGGGAATTGG	AGACCTGTTCAAGAGCTCTATC
5'UTRZR1	AJ409163	GCAAAATGCACAACCTACGA	CGGAAGAAGGAGGTTCATTG
MtZR1	AC151822	AGTTGCGGTCGGTTATTCAC	CGTATGCCATGTTCCACAAG
MsZR1	AJ409163	ACTCTCATTCTCATTCTCAATA	GAACTCGGTTCATTGTTTTGTT
MtPRAF_AC151619_14.4	Medtr1g043020.1	CTGTCTCCCCTGGATTTTCA	GCATGTCACCCTTTTGCTTT
MtPRAF_AC147775_18.4	Medtr1g125660.1	CGCAGTAGAGGATGGTGGAG	ATGTGACGGTCTGCATTCCT
MtPRAF_AC141322_41.4	Medtr4g031550.1	CATCGCTGGACAGTTCAAGA	GTAGCGTGAGCAACGCATAA
MtPRAF_AC146692_3.5	Medtr5g096940.1	CATTCTCCGATCGCTTCATT	CGCAACACTGAAACAACGAC
MtLb1	X57732	ATAGCTCATATGAGGCATTCAA	GAGTTGAGGACTATCTTGTACT
MtNCR001	TC35566	CACTTCTGACGCTAACTG	TGAACCTTCAATATACCACC
MtEnod8	L18899	GGCTGTGCAAAGCAATACAA	ATAGCCACAACATGCCACAA
MtCP6	TC100437	CCTGCTGCTACTATTGCTGGATATG	CACTCGCATCAATGGCTACGG
MtVPE	TC106338	CCAGGGGTTCTTGGTATGCCCG	ACTGCCAGATTCACATGCCTCCA
Mtc27	TC106535	TGAGGGAGCAACCAAATACC	GCGAAAACCAAGCTACCATC
MtRP40S	TC100533	TTGTCCAAGTTTGATGCTGCAC	TCCTACCAACTTCAAAACACCG
MtACTIN11	TC106786	ACCCAAAGCATCAAATAATAAGTCAACC	TGGCATCACTCAGTACCTTTCAACTG
MtRBP1	TC101980	AGGGGCAAGTTCCTTCATTT	GGTAGAAGTGCTGGCTCAGG

Supplemental Figure 1 :



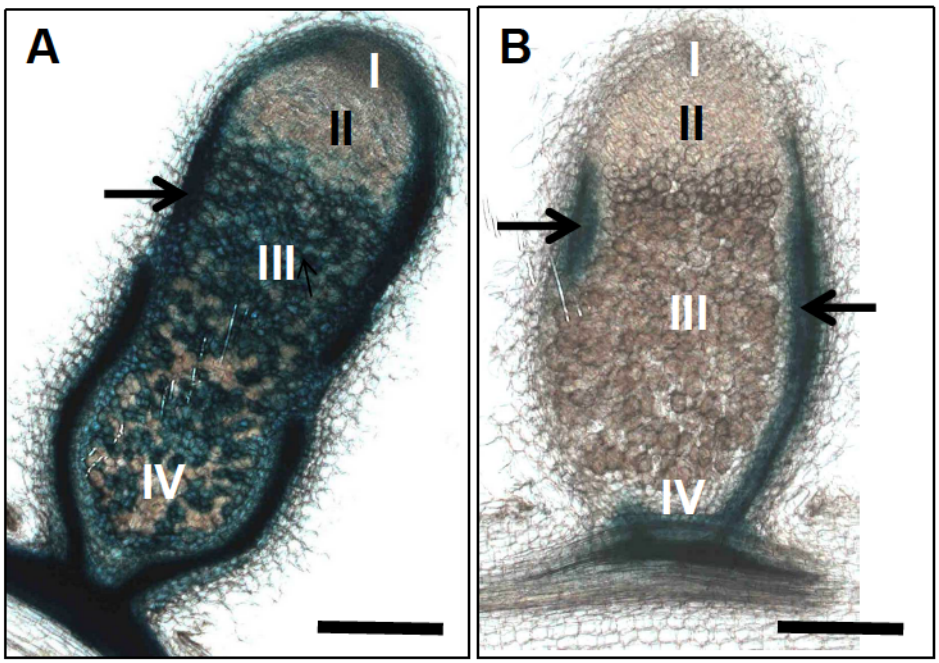
Supplemental Figure 1: ClustalW alignment of the *Mt*ZR1 and *Ms*ZR1 protein sequences. The consensus sequences are marked with a star.

Supplemental Figure 2 :



Supplemental Figure 2: Gene atlas profile of Affymetrix Probeset ID of *M. truncatula* PRAF genes (Mtr.35761.1.S1_at, in red (MtPRAFChr1); Mtr.20584.1.S1_at, in blue (MtPRAFChr5), Msa.965.1.S1_at, in pink (MtZR1); Mtr.14364.1.S1_at, in purple (MtPRAFChr0) and Mtr.47635.1.S1_at, in black (MtPRAFChr1).

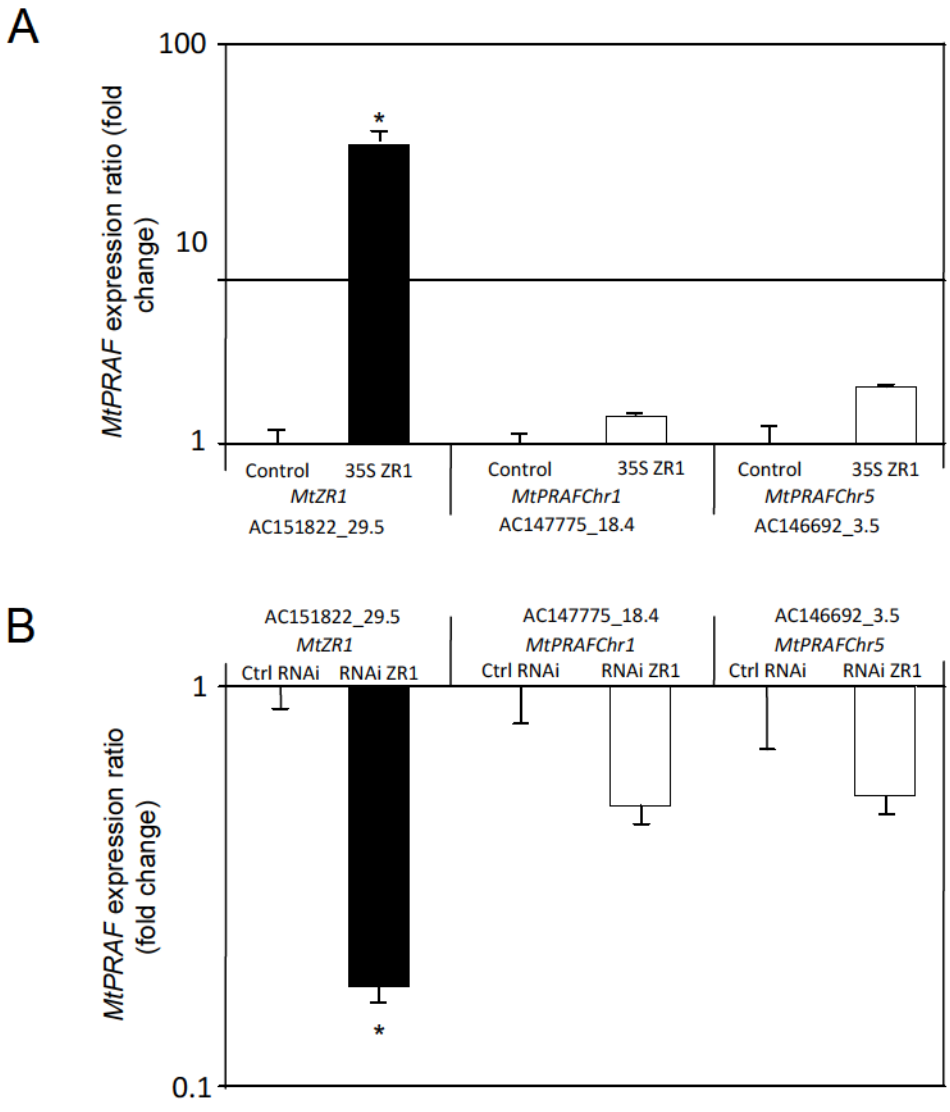
Supplemental Figure 3:



Supplemental Figure 3: GUS staining of *P35S*::*GUS* and *PMtZR1*::*GFP*::*GUS* transgenic root nodules.

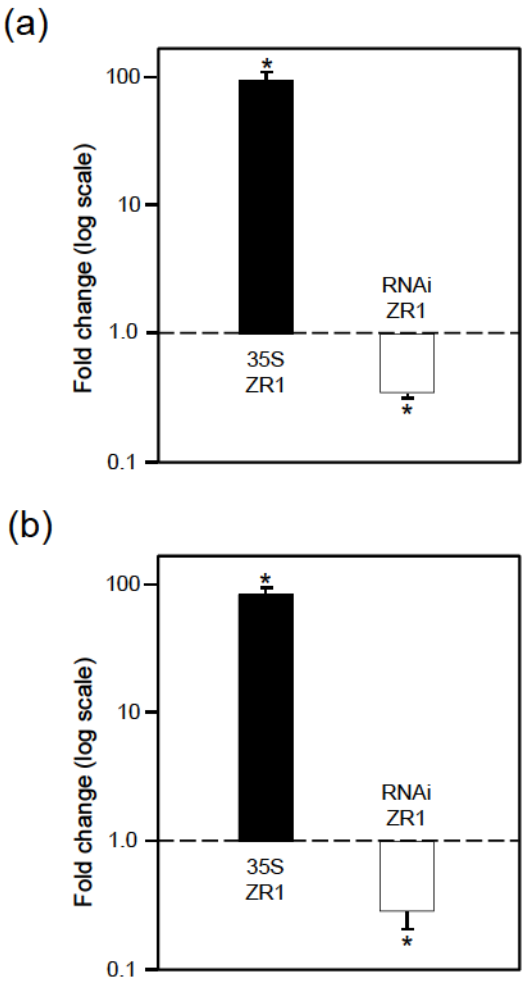
(a to b). Insets show the overall GUS staining of the uncut root nodule. A. *P35S*::*GUS*, GUS staining of a 70 µm-thick section of a six-week-old nodule showing *GUS* expression in all root tissues and in the nodule vascular bundles (black arrow). Staining within the nodule is essentially restricted to uninfected cells (III). Zones I to IV: Functional zones in the mature nodule. B. *PMtZR1*::*GFP*::*GUS*, six-week-old nodule showing the overall expression pattern for *GUS* under the control of the *MtZR1* promoter. GUS staining is restricted to the nodule vascular bundle (black arrows) and the junction between the root and the nodule. Scale bars: 400 µm (a and b).

Supplemental Figure 4:



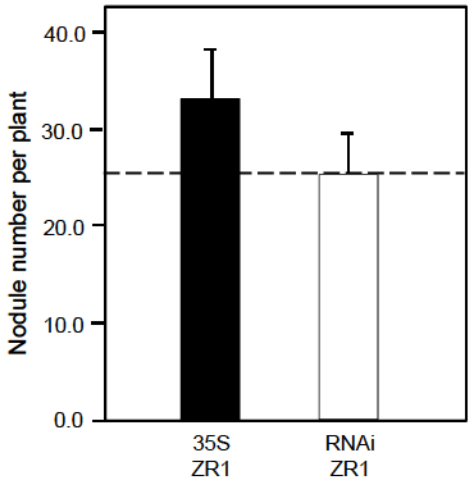
Supplemental Figure 4: Analysis of *MtZR1* expression in transgenic roots or nodules in which *MtZR1* was overexpressed or silenced. (a) Analysis of *MtZR1* expression in roots overexpressing *ZR1* (35S ZR1) or *MtZR1* RNAi (RNAi ZR1). (b) Analysis of *MtZR1* expression in nodules overexpressing *ZR1* (35S ZR1) or *MtZR1* RNAi (RNAi ZR1). The respective controls, P35S::GUS and RNAi empty vector, were used as calibrators to define fold-changes (indicated by the broken line). RT-qPCR values were normalised against the mean value for two constitutively expressed genes (*Mtc27* and *RP40S*). Error bars show the standard error of 3 experimental replicates from 3 biological experiments. The significance of differences was assessed with REST 2009, taking $P<0.05$ to be significant (*).

Supplemental Figure 5:



Supplemental Figure 5: Relative RT-qPCR analysis of *MtPRAF* expression in transgenic root nodules overexpressing *MsZR1* (a) or subject to RNAi-mediated *MtZR1* silencing (b). Values are representative of three independent biological replicates. Gene expression values were normalised against *Mtc27*. No PCR amplification was detectable for *MtPRAF* genes AC1413228_41.4 and AC151619_14.4.

Supplemental Figure 6:



Supplemental Figure 6: Nodule number in composite plants in which *MtZR1* was overexpressed or silenced. Relative numbers of nodules on roots overexpressing *ZR1* (35S ZR1, black box) or *MtZR1* RNAi (RNAi ZR1, white box). The number of nodules in control plants is indicated by the dashed line. Error bars show the standard error of at least 12 experimental replicates from 2 biological experiments.

Supplemental Data references :

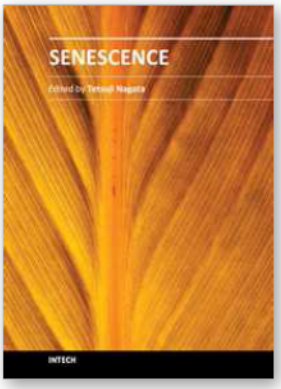
Alpizar, E., Dechamp, E., Espeout, S., Royer, M., Lecouls, A.C., Nicole, M., Bertrand, B., Lashermes, P., and Etienne, H. 2006. Efficient production of *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots and composite plants for studying gene expression in coffee roots. Plant Cell Rep 25:959-967.

Dupont, L., Garcia, I., Poggi, M.C., Alloing, G., Mandon, K., and Le Rudulier, D. 2004. The Sinorhizobium meliloti ABC transporter Cho is highly specific for choline and expressed in bacteroids from *Medicago sativa* nodules. Journal of bacteriology 186:5988-5996.

Karimi, M., Inze, D., and Depicker, A. 2002. GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. Trends in plant science 7:193-195.

Lazo, G.R., Stein, P.A., and Ludwig, R.A. 1991. A DNA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in Agrobacterium. Biotechnology (N Y) 9:963-967.

Pocard, J.A., Vincent, N., Boncompagni, E., Smith, L.T., Poggi, M.C., and Le Rudulier, D. 1997. Molecular characterization of the bet genes encoding glycine betaine synthesis in *Sinorhizobium meliloti* 102F34. Microbiology 143:1369-1379.



Senescence

Edited by Dr. Tetsuji Nagata

ISBN 978-953-51-0144-4
Hard cover, 850 pages
Publisher InTech
Published online 29, February, 2012
Published in print edition February, 2012

The book "Senescence" is aimed to describe all the phenomena related to aging and senescence of all forms of life on Earth, i.e. plants, animals and the human beings. The book contains 36 carefully reviewed chapters written by different authors, aiming to describe the aging and senescent changes of living creatures, i.e. plants and animals.

How to reference

In order to correctly reference this scholarly work, feel free to copy and paste the following:

Laurence Dupont, Geneviève Alloing, Olivier Pierre, Sarra El Msehli, Julie Hopkins, Didier Hérouart and Pierre Frendo (2012). The Legume Root Nodule: From Symbiotic Nitrogen Fixation to Senescence, Senescence, Dr. Tetsuji Nagata (Ed.), ISBN: 978-953-51-0144-4, InTech, Available from: http://www.intechopen.com/books/senescence/the-legume-root-nodule-from-symbiotic-nitrogen-fixation-to-senescence

INTECH
open science | open minds

InTech Europe
University Campus STeP Ri
Slavka Krautzeka 83/A
51000 Rijeka, Croatia
Phone: +385 (51) 770 447
Fax: +385 (51) 686 166
www.intechopen.com

InTech China
Unit 405, Office Block, Hotel Equatorial Shanghai
No.65, Yan An Road (West), Shanghai, 200040, China
中国上海市延安西路65号上海国际贵都大饭店办公楼405单元
Phone: +86-21-62489820
Fax: +86-21-62489821

8

The Legume Root Nodule: From Symbiotic Nitrogen Fixation to Senescence

Laurence Dupont, Geneviève Alloing, Olivier Pierre,
Sarra El Msehli, Julie Hopkins, Didier Hérouart and Pierre Frendo
[1]*UMR "Biotic Interactions and Plant Health" INRA 1301-CNRS 6243*
University of Nice-Sophia Antipolis, F-06903 Sophia-Antipolis Cedex,
[2]*Laboratory of Plant Physiology, Science University, Tunis,*
[1]*France*
[2]*Tunisia*

1. Introduction

Biological nitrogen fixation (BNF) is the biological process by which the atmospheric nitrogen (N_2) is converted to ammonia by an enzyme called nitrogenase. It is the major source of the biosphere nitrogen and as such has an important ecological and agronomical role, accounting for 65 % of the nitrogen used in agriculture worldwide. The most important source of fixed nitrogen is the symbiotic association between rhizobia and legumes. The nitrogen fixation is achieved by bacteria inside the cells of *de novo* formed organs, the nodules, which usually develop on roots, and more occasionally on stems. This mutualistic relationship is beneficial for both partners, the plant supplying dicarboxylic acids as a carbon source to bacteria and receiving, in return, ammonium. Legume symbioses have an important role in environment-friendly agriculture. They allow plants to grow on nitrogen poor soils and reduce the need for nitrogen inputs for leguminous crops, and thus soil pollution. Nitrogen-fixing legumes also contribute to nitrogen enrichment of the soil and have been used from Antiquity as crop-rotation species to improve soil fertility. They produce high protein-containing leaves and seeds, and legumes such as soybeans, groundnuts, peas, beans, lentils, alfalfa and clover are a major source of protein for human and animal consumption. Most research concentrates on the two legume-rhizobium model systems *Lotus-Mesorhizobium loti* and *Medicago-Sinorhizobium meliloti,* with another focus on the economically-important *Glycine max* (soybean) -*Bradyrhizobium japonicum* association. The legume genetic models *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus* have a small genome size of *ca.* 450 Mbp while *Glycine max* has a genome size of 1,115 Mbp, and all are currently targets of large-scale *genome sequencing* projects (He et al., 2009; Sato et al., 2008; Schmutz et al., 2010). The complete genome sequence of their bacterial partners has been established (Galibert et al., 2001; Kaneko et al., 2000; Kaneko et al., 2002; Schneiker-Bekel et al., 2011).

1.1 Early interaction and nodule development

Symbiotic interaction begins with the infection process, which is initiated by a reciprocal exchange of signals between plant and the compatible bacteria. Aromatic compounds -

mostly flavonoids - are secreted by the plants into the rhizosphere and activate the bacterial NodD proteins that are members of the LysR family of transcriptional activators, which in turn induce the expression of the *nod* genes (Long, 2001). This results in the secretion by the bacteria of lipo-chitin oligosaccharide molecules called Nod factors, which are recognized by epidermal cells via specific receptor kinases containing extracellular LysM domains. The spectrum of flavonoids exuded by a legume, as well as the strain-specific chemical structures of the Nod factors, are primary determinants of host specificity (Broughton et al., 2000). Additional bacterial components such as exopolysaccharides, type III and type IV secretion systems are also required for an effective infection (Perret et al., 2000; Saeki, 2011).

Nod factor perception initiates a complex signalling pathway essential for bacterial invasion of the host plant and formation of the nodule. Nod factor signal transduction requires a calcium signalling pathway, which includes the activation of a calcium and calmodulin dependent protein kinase in response to nuclear calcium oscillations. The ensuing induction of gene expression results in rearrangements of the root hair cytoskeleton and initiation of bacterial infection at the epidermis. The root hairs curl and trap the rhizobia which enter the root hair through tubular structures called infection threads. Simultaneously Nod factors induce root cortex cells dedifferentiation and division, leading to the formation of nodule primordia which then differentiate into N_2-fixing nodules (Crespi & Frugier, 2008; Oldroyd et al. 2011). The growing infection threads traverse the root epidermis and cortex, penetrate primordial cells, and then invading bacteria are released into the host cells by an endocytosis-like mechanism (Ivanov et al., 2010). Each bacterium is surrounded by a plant cell membrane, the peribacteroid membrane (PBM), the whole forming an organelle-like structure called the symbiosome where bacteria differentiate into nitrogen-fixing bacteroids. These symbiosomes ultimately completely fill the cytoplasm of infected cells. As the bacteria differentiate, infected cells undergo enlargement coupled to repeated endoreduplication cycles - genomic DNA replication without mitosis or cytokinesis - and become large polyploid cells housing thousands of bacteroids (Jones et al., 2007; Kondorosi et al., 2000). Mature nodules actively fix nitrogen until they enter senescence upon aging or stress.

Nodule organogenesis is accompanied by major changes in plant gene expression. Several hundred of genes were found to be strongly and specifically up- or -down regulated during the nodulation process (Benedito et al., 2008; El Yahyaoui et al., 2004). In *M. truncatula*, two distinct waves of gene expression reprogramming accompany the differentiation of both the plant infected cell and bacteroids (Maunoury et al., 2010). Genes exclusively expressed or strongly up-regulated in nodules have been termed "nodulins". The early nodulins are involved in signal transduction and nodule development and the late nodulins are induced when N_2 fixation begins. Different expression profiling tools relying on genome and high-throughput EST-sequencing have been developed to identify nodulin genes on a large scale (Kuster et al., 2007; Schauser et al., 2008).

Nodules can be classified into two main groups according to their mode of development (Franssen et al., 1992; Maunoury et al., 2008) (Figure 1). Legumes such as *Phaseolus vulgaris* (bean), *Lotus japonicus* or *Glycine max* (soybean) form determinate nodules that have no permanent meristem and adopt a globular shape. The mature nodules contain a homogenous central tissue composed of infected cells fully packed with nitrogen-fixing bacteroids and some uninfected cells. Senescence in these nodules occurs radially, beginning at the center and extending to the periphery. Decaying nodules release bacteroids most of

which are able to revert to a free-living lifestyle. Conversely, legumes such as *Medicago truncatula*, *Pisum sativum* (pea) or *Trifolium* (clover) form indeterminate nodules that possess a permanent meristem and elongate, to become cylindrical. In mature nodule of this type, several histological zones of consecutive developmental states can be distinguished (Vasse et al., 1990). The apical meristem, free of bacteria, is the zone I. Zone II is the infection zone in which post-mitotic cells enter the nodule differentiation programme and where infection threads penetrate the plant cells and release rhizobia. In zone III, the bacteroids are able to fix N_2. A root proximal senescence zone (zone IV) can be observed in older nodules, where the bacteroids, together with the plant cells, are degraded. Upon aging this zone gradually extends to reach the apical part and the nodule degenerates. Proximal to the zone IV is a region (zone V) containing undifferentiated bacteria, which appear to proliferate in the decaying plant tissue (Timmers et al., 2000). In contrast to bacteroids housed in determinate nodules, those from undeterminate nodules have lost their capacity to reproduce. Thus at the end of symbiosis, essentially bacteria that are released from infection threads can return to a free-living lifestyle and recolonize the rhizosphere (Mergaert et al., 2006).

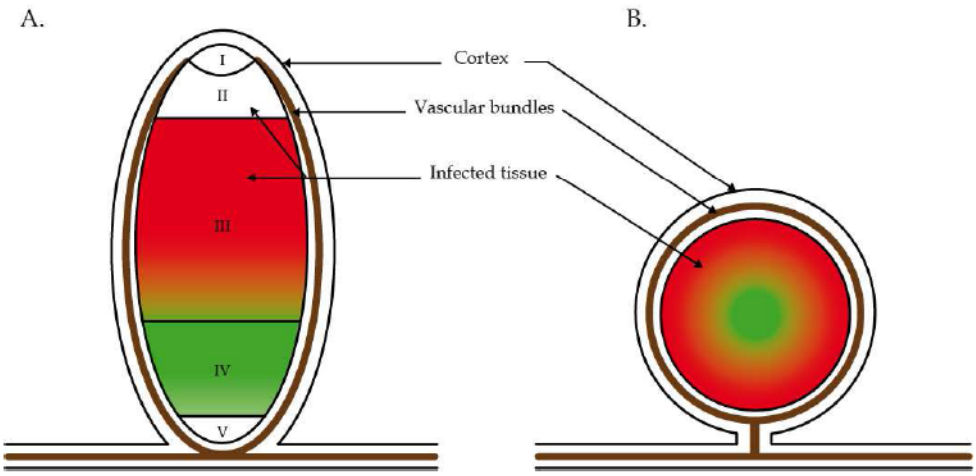


Fig. 1. Schematic representation of indeterminate (A) and determinate mature nodules (B) I, meristemic zone ; II, infection zone ; III, nitrogen fixing zone ; IV, senescence zone ; V, saprophytic zone.

Nitrogen fixing bacteroids in determinate and indeterminate nodules originate from distinct differentiation processes. Bacteroids in legume species forming determinate type nodules present the same cell size, genomic DNA content and reproductive capacity as the free-living bacteria. Conversely, differentiation of bacteroids in indeterminate nodules is linked to drastic morphological and cytological changes, such as cell elongation coupled to genome amplification, membrane permeabilisation and loss of reproductive capacity (Mergaert et al., 2006). This terminal differentiation is mediated by plant-host factors identified as the nodule-specific cysteine-rich (NCR) peptides (Kereszt et al., 2011; Van de Velde et al., 2010). In *M. truncatula* the NCR gene family encodes more than 300 different peptides, which resemble defensine-type antimicrobial peptides (AMPs) (Mergaert et al., 2003).

1.2 Nodule functioning

Bacteria that have completed the bacteroid differentiation program express the enzymes of the nitrogenase complex and begin to fix nitrogen. The reduction by nitrogenase of 1 molecule of N_2 to 2 molecules of NH_4^+ requires 16 molecules of ATP and 8 electrons (Jones et al., 2007). Thus, bacteroids require high rate flux of O_2 to enable high rates of ATP synthesis, but this must be achieved whilst maintaining a very low concentration of free O_2 to avoid inactivation of O_2-labile nitrogenase. These conditions exist due to the presence of an O_2 diffusion barrier and the synthesis of nodule-specific leghemoglobins, which accumulate to millimolar concentrations in the cytoplasm of infected cells prior to nitrogen fixation and buffer the free O_2 concentration at around 7-11 nM, while maintaining high O_2 flux for respiration (Appleby, 1984; Downie, 2005; Ott et al., 2005). The unique low-O_2 environment provided for the bacteroid is a key signal in bacteroid metabolism, inducing a regulatory cascade controlling gene expression of the nitrogenase complex and the microaerobic respiratory enzymes of the bacteroid. The O_2-sensing two-component regulatory system FixL-FixJ activates the transcription of the two intermediate regulators *nifA* and *fixK* genes, which induce the expression of *nif* and *fix* genes involved in nitrogen fixation and respiration (Reyrat et al., 1993). More generally, bacteroid differentiation is accompanied by a global change in gene expression compared with free-living bacteria. There is down-regulation of many genes such as most housekeeping genes and genes involved in synthesis of membrane proteins and peptidoglycan in favour of symbiosis specific processes (Becker et al., 2004; Bobik et al., 2006; Capela et al., 2006; Karunakaran et al., 2009; Pessi et al., 2007).

The reduction of N_2 to ammonium is accompanied, in bacteroids, by the switching-off of ammonium assimilation into amino acids. Ammonium is secreted to the plant cytosol, for assimilation into the amides glutamine and asparagine or into ureides. In return, the plant provides carbon and energy sources to bacteroids in the form of dicarboxylic acids, particularly malate and succinate, which are produced from sucrose via sucrose synthase and glycolytic enzymes. Their metabolization by the TCA cycle provides bacteroids with reducing equivalents, ATP and metabolites for amino acid synthesis and other biosynthetic pathways (White et al., 2007; Lodwig & Poole, 2003). Pea bacteroids also depend on plant for branched-chain amino-acid (LIV) supply, as the bacteroids become symbiotic auxotrophs for these amino-acids (Prell et al., 2009).

The nodule functioning has many peculiarities, involving a plant-microbe crosstalk associated to a metabolism which needs a high energy level under micro-oxic conditions. Nodule development and senescence also have specific features. Whereas multiple review articles have described the early steps of nodule formation and functioning, the rupture of the interaction has not been reviewed recently. In this context, this review focuses on the different characteristics of root nodule senescence.

2. Developmental senescence

For many years, the majority of the research concerning N-fixing symbioses focused on understanding the mechanisms leading to the establishment of this symbiotic relationship, from the invasion of plant cells to the N-fixing bacteroid state. In all nodule types, the N_2-fixation period is optimal between 4 and 5 weeks after infection. Beyond this period, first

reductions of N_2-fixing bacteroid capacity are detectable and a senescence process occurs in the N -fixing nodule zone. This phenomena is related to the onset of pod filling in grain legumes like soybean, pea and common bean (Bethlenfalvay & Phillips, 1977; Lawn & Brun, 1977). Thus, the lifespan of the rhizobia-plant symbiotic relationship is relatively short and the disruption of this symbiosis affects the yield of the culture.

2.1 Structural analysis of developmental senescence

The spatial dynamics of the senescence process in nodules is nodule type dependent. The pink N_2-fixing tissues of the zone III become green in color in zone IV due to leghemoglobin breakdown (Lehtovaara & Perttila, 1978). In determinate nodules, histological analyses of cross-sections using this simple visible change revealed that senescence develops radially, starting from the center and gradually spreading toward the outside (Puppo et al., 2005). In contrast, in undeterminate nodules, histological analyses of longitudinal sections of nodules based on pink-to-green color changes or based on the expression pattern of bacteroid genes involved in the N_2-fixing process using promoter-lacZ fusions (i.e. NifH) have led many authors to consider the front of senescence as a planar structure (Puppo et al., 2005). Recently, using toluidine blue staining to discriminate senescent from healthy cells and studying the gene expression pattern of a small family of plant cysteine proteases as early markers of nodule senescence on serial transversal sections of *M. truncatula* nodules, Pérez Guerra and collaborators proposed a conical organization of the developmental senescence zone: the earliest signs of senescence in a few infected cells in the center of the N-fixing zone occurred similar to determined nodules, and this phenomena progressively extended toward the nodule periphery in subsequent proximal cell layers of the nodule (Pérez Guerra et al., 2010).

Comparison between N_2-fixing and senescent cells in soybean nodule showed a decrease of density of plant cytoplasm, the apparition of vesicles associated with the deterioration of symbiosomes and modifications in organelles like peroxisomes, mitochondria and plastids (Lucas et al., 1998; Puppo et al., 2005). Ultrastructural analysis of *M. truncatula* mature nodule cells has revealed at least two stages during the developmental senescence of N_2-fixing cells: first, a disintegration of bacteroids and symbiosomes revealed by the presence of numerous membranes in the plant cytoplasm associated with the formation of lytic symbiosome compartments probably involved in reabsorption processes and second, the decay of plant infected cells associated with collapse phenomena and that of the plant uninfected cells (Perez Guerra et al., 2010; Timmers et al., 2000; Van de Velde et al., 2006; Vasse et al., 1990). The fusion of symbiosomes to form lytic compartments resembles vacuole formation. Analysis of the relation between the symbiosome formation and the endocytic pathway showed that the lifespan of bacteria in individual symbiosomes compartments during the N_2-fixing stage is achieved by delaying the acquisition of vacuolar identity such as vacuolar SYP22 and VTI11 SNAREs (Limpens et al., 2009). The acquisition of vacuolar identity by symbiosomes upon senescence likely allows the delivery of newly formed proteases to facilitate nutrient remobilization and a sink-to-source transition. Indeed, nodule senescence is accompanied by increased plant proteolytic activities that might cause large-scale protein degradation in soybean (Malik et al., 1981), French bean (Pladys et al., 1991) and alfalfa (Pladys & Vance, 1993).

2.2 Physiological and biochemical modifications during developmental senescence

Developmental nodule senescence is a complex and programmed process which induces a decrease of N_2-fixing activity and leghemoglobin content, modifications in the nodule redox state components and an increase of proteolytic activity, ultimately leading to the death of infected cells.

Leghemoglobin (Lb), which has a fundamental role in nodule functioning, is an important physiological marker for following the progression of nodule senescence (Figure 2). Lb content progressively decreases with the onset of senescence. This diminution of Lb impacts not only general metabolism of nodule by decreasing the O_2 availability to bacteroids with a low free O_2 content but also by potentially releasing free iron to produce reactive oxygen species (ROS) via the Fenton reaction. Indeed, the auto-oxidation of the active form of Lb, ferro-Lb-O_2 (Lb-Fe^{2+}-O_2), is associated with superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) production (Fridovich, 1986; Puppo et al., 1981) and the degradation of the heme group of Lb by H_2O_2 likely allows the release of the catalytic Fe which enhances the production of OH• through the Fenton and the Haberweiss reactions (Becana & Klucas, 1992; Puppo & Halliwell, 1988). The importance of Lb in nodule ROS production has been shown in a transgenic *Lotus japonicus* line in which diminution of the Lb content is correlated with diminution of the H_2O_2 production (Gunther et al., 2007).

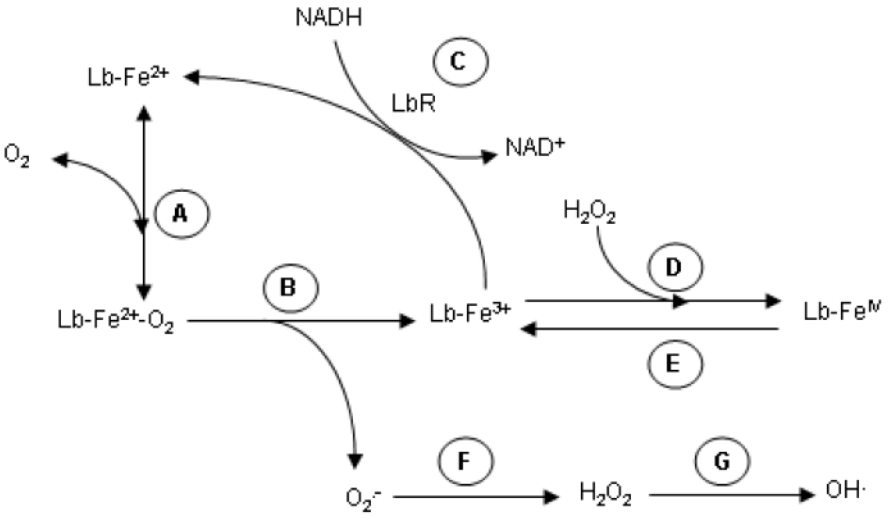


Fig. 2. Metabolic pathways involving Lb and formation of ROS.
A, Reversible oxygenation of Lb-Fe^{2+}; B, Autoxidation of Lb-Fe^{2+}-O_2 to Lb-Fe^{3+} with release of $O_2^{\cdot-}$; C, Lb-Fe^{3+} reduction by ferric Lb reductase (LbR); D, H_2O_2 reaction with Lb-Fe^{3+} to generate the inactive Lb-Fe^{IV} (ferryl) form; E, Lb-Fe^{IV} reduction to Lb-Fe^{3+} by ascorbate or thiols; other ROS can also be generated from $O_2^{\cdot-}$, by its dismutation to H_2O_2; F, and by H_2O_2 reduction to OH · through Fenton reaction (G).

Large modifications of the redox balance occur upon natural nodule senescence. Redox balance is defined by the equilibrium between the production of ROS and their degradation by the antioxidant defence system (Apel & Hirt, 2004). Ascorbate (Asc), homoglutathione (hGSH) and glutathione (GSH) are major antioxidants and redox buffers in plant nodule cells (Becana et al., 2010). The regulation of Asc and hGSH biosynthesis has been studied in common bean (*Phaseolus vulgaris*) nodules during aging (Loscos et al., 2008). The expression of five genes of the major Asc biosynthetic pathway was analyzed in nodules, and evidence was found that L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase (GalLDH) , the last committed step of the pathway, is post-transcriptionally regulated. Large differences of Asc concentrations and redox states were observed in *P. vulgaris* nodules at different senescence stages suggesting that the lifespan of nodules is in part controlled by endogenous factors like Asc. Biochemical assays on alfalfa dissected nodules revealed that the senescent zone had lower GalLDH activity and ascorbate concentration compared to the infected zone (Matamoros et al., 2006). A strong positive correlation between N_2-fixing activity and nodule Asc and GSH contents was also observed during pea nodule development and senescence (Groten et al., 2005). Peroxiredoxins (Prx) have also been described in N_2-fixing nodules (Groten et al., 2006). Pea nodules contain at least two isoforms of Prx, located potentially in the cytosol (PrxIIB / C) and mitochondria (PrxIIF). The levels of PrxIIB /C declined with nodule senescence, but those of PrxIIF remained unaffected (Groten et al., 2006). The progressive decrease of antioxidant content during pea nodule senescence is not accompanied by an increase in ROS such as $O_2^{\cdot-}$ and H_2O_2 (Groten et al., 2005). In contrast, in aging soybean nodules, an oxidative stress has been detected including an increase of ROS, oxidized hGSH, catalytic Fe and oxidatively modified proteins and DNA bases, but no changes in Asc or tocopherol (Evans et al., 1999). The imbalance in redox state leading to oxidative stress induces the oxidation of lipids and proteins and the degradation of membranes. Lipid peroxidation was found to be elevated in senescent nodules of pigeon pea (*Cajanus cajan*) and bean (Loscos et al., 2008; Swaraj et al., 1995). In senescent soybean nodules, the presence of large amounts of H_2O_2 in the cytoplasmic and apoplastic compartments of the central infected tissue was detected and associated with a widespread expression of a cysteine protease gene (Alesandrini et al., 2003), suggesting a link between oxidative stress and proteolitic activities detected upon nodule senescence.

Various proteases, including those of the acid, serine, aspartic and cysteine types, have been isolated from senescing nodule tissue of soybean, alfalfa, French bean, and pea (Kardailsky & Brewin, 1996; Malik et al., 1981; Pfeiffer et al., 1983; Pladys & Vance, 1993; Pladys & Rigaud, 1985). The induction of cysteine protease genes during nodule senescence has been shown in soybean (Alesandrini et al., 2003), Chinese milk vetch (Naito et al., 2000), pea (Kardailsky & Brewin, 1996) and *M. truncatula* (Fedorova et al., 2002). The general transcriptomic analysis of senescent nodules in *M. truncatula* using cDNA-AFLP (Van de Velde et al., 2006) confirmed the predominant presence of genes encoding representatives of cysteine proteases that are highly homologous to one of the prominent markers of leaf senescence, *Sag12* (Lohman et al., 1994), indicating that these proteinases play an important role in the regulation of developmental nodule senescence. This hypothesis was confirmed in *Astragalus sinicus* since the silencing by RNA interference of the Asnodf32 gene, encoding a nodule-specific cysteine proteinase delayed root nodule senescence with a significant extention of the period of bacteroid active nitrogen fixation. Interestingly, elongated nodules were also observed on Asnodf32-silenced hairy roots (Li et al., 2008).

2.3 Transcriptomic analysis of developmental senescence

The onset of senescence involves the expression of genes whose products are required to carry out senescence-related processes (Gepstein, 2004). In order to isolate genes up- or down-regulated during nodule senescence, several genetic analyses including cDNA libraries and differential screening, mRNA differential display or cDNA-AFLP, have been performed in soybean (Alesandrini et al., 2003; Webb et al., 2008), and *M. truncatula* (Fedorova et al., 2002; Van de Velde et al., 2006). Using a mixture of effective nodules from 7 week-old plants, the first database specific to *M. truncatula* nodule senescence was obtained by isolating 140 000 Expressed Sequence Tags which are available in the J. Craig Venter Institute (http://www.jcvi.org/cms/research/groups/plant-genomics/resources/). To enrich plant material in senescent tissue, recent analyses in *M. truncatula* were performed from cross sections of nodules of 5 and 9 weeks by isolating the zones I, II and III from zones IV and V based on pink-to-green color changes (Van de Velde et al., 2006). This analysis using a modified cDNA-AFLP protocol has resulted in a collection of 508 gene tags that were expressed differentially. Functional clustering of these data has revealed a clear transition from carbon sink to nutriment source for the nodule by up-regulation of genes representative of several different proteases, genes involved in proteasome pathway and degradation of nucleic acids, membrane-derived lipids, and sugars. Moreover, this analysis suggests that three major hormones, ethylene, jasmonic acid and gibberellin, play an important role in nodule senescence (Van de Velde et al., 2006). From a more general point of view, it was been found that a significant overlap exists between genes expressed during leaf senescence in *Arabidopsis thaliana* and nodule senescence in *M. truncatula* (Van de Velde et al., 2006). However, more recent transcriptomic analysis of *M. truncatula* leaf senescence showed that only a minority of common genes are regulated during leaf and nodule senescence (De Michele et al., 2009).

2.4 Hormonal regulation of developmental senescence

Abscisic acid has been proposed to be an important signal in nodule senescence (Puppo et al., 2005), but no direct abscisic acid-responsive genes were present in the cDNA-AFLP dataset from *M. truncatula* nodules (Van de Velde et al., 2006). This analysis revealed that ethylene and jasmonic acid may play a positive role in nodule senescence, just as they do in the senescence of other plant tissues. The positive role of ethylene is illustrated by the up-regulation of ERF transcription factors and ethylene biosynthetic genes, such as S-adenosyl-Met (SAM) synthetase and 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase. Involvement of jasmonic acid is suggested by the induction of lipoxygenase genes during different stages of nodule senescence. Moreover, a strong induction of a gene coding for the GA 2-oxidase, that converts active gibberellins to inactive forms (Thomas et al., 1999), was observed in senescent nodule suggesting that gibberellins might repress the senescence process. Finally, the induction of genes encoding a SAM synthase and a spermidine synthethase suggests the involvement of polyamine biosynthetic pathways in nodule senescence. Concerning the potential implication of the two major hormones, auxin and cytokinin, in nodule senescence, only a small amount of data is available. In lupin (*Lupinus albus*), an elevated accumulation of the LaHK1 transcripts, encoding a cytokinin receptor homologue, was detected during nodule developmental senescence suggesting a putative role for this cytokinin receptor homologue in nodule senescence (Coba de la Pena et al., 2008).

3. Stress-induced senescence in legume root nodule

Legume BNF is particularly sensitive and perturbed by environmental stress conditions such as drought, salt stress, defoliation, continuous darkness and cold stress. Adverse environmental conditions affect nodule structure, impair nodule functioning and induce drastic metabolic and molecular modifications leading ultimately to a stress-induced senescence (SIS).

3.1 Stress induced senescence has typical features when compared to developmental senescence

As stated earlier, developmental induced senescence occurs typically in 5 to 11 week old nodules with a slow diminution of BNF during this time period (Evans et al., 1999; Puppo et al., 2005). In contrast, BNF declines drastically and quickly under environmental stress conditions. In less than a week, drought (Gonzalez et al., 1995; Larrainzar et al., 2007; Serraj et al., 1999), salt stress (Soussi et al., 1998; Swaraj and Bishnoi, 1999), dark stress (Matamoros et al., 1999; Gogorcena et al., 1997) and cold stress (van Heerden et al., 2008) decrease dramatically BNF. Thus, SIS is a much faster process than developmental senescence. Moreover, whereas developmental senescence is associated with the establishment of the nodule senescent zone which increases over time, SIS induces the degeneration of the whole nodule in a short time period (Matamoros et al., 1999; Perez Guerra et al., 2010; Vauclare et al., 2010). At the structural level, microscopic analyses also show that developmental senescence and dark stress-induced senescence present different features in *M. truncatula*. Dark-induced senescence leads to the condensation of the bacteroid content whereas the PBM remains intact even though most of the bacteroid content had disappeared (Perez Guerra et al., 2010). In contrast, developmental senescence induces a pronounced vesicle mobilisation in the host cytoplasm which is correlated with the degeneration of the PBM and the mixing of the symbiosome content with the cytoplasm (Perez Guerra et al., 2010; Van de Velde et al., 2006). However, structural analyses of the SIS have not been extensively performed on different nodule types for all the different environmental stress. Thus, it is possible that the different SIS do not develop similarly. Moreover, as for developmental senescence, SIS may process differently in determinate and indeterminate nodules. Indeed, nitrate induced senescence has been shown to induce bacteroid degradation in pea (indeterminate nodule) after two days of treatment in contrast to bean (determinate nodule), in which nitrate has little effect on the shape of bacteroids even after four days of 10mM nitrate treatment (Matamoros et al., 1999).

3.2 Stress induced senescence is characterized by modifications in nodule carbon metabolism and respiration

SIS is characterized by multiple early modifications of nodule physiology (Figure 2). Amongst them, modifications in carbon metabolism play a major role. As stated before, BNF is a highly energetic process which requires a constant energy supply. Modification of nodule sucrose content has been observed during drought stress (Galvez et al., 2005; Gordon et al., 1997), salt stress (Gordon et al., 1997; Lopez et al., 2008; Sanchez et al., 2011; Lopez et al., 2009; Ben Salah et al., 2009), dark stress (Gogorcena et al., 1997; Matamoros et al., 1999; Vauclare et al., 2010) and cold stress (Walsh & Layzell, 1986; van Heerden et al., 2008). However, whereas dark stress induces a diminution of sucrose concentration,

drought stress, salt stress and cold stress lead in general to its accumulation in nodules. The diminution of sucrose concentration linked to a shortage in photosynthate feeding result in a deficiency in energy production. In contrast, the accumulation of sucrose during stress suggests that nodule glycolytic enzymes are affected. Sucrose synthase, which is involved in the degradation of sucrose into glucose and fructose in the root nodule, is inhibited during drought stress and salt stress (Ben Salah et al., 2009; Gordon et al., 1997) and malate content, which is one of the preferred substrates for bacteroid respiration (Prell and Poole, 2006), decreases under these two stress conditions (Marino et al., 2007; Galvez et al., 2005; Ben Salah et al., 2009). A fine-tuning of O_2 concentration is also important for nodule functioning, since a good supply of O_2 is determinant for nodule respiration and energy requirement while a low O_2 pressure must be maintained in the nitrogen fixing zone to prevent nitrogenase inhibition. The availability of O_2 through the nodule diffusion barrier and the rate of nodule respiration are thus important parameters of the nodule fitness and they have been shown to be modified during various SIS such as drought stress (Del Castillo et al., 1994; Guerin et al., 1990; Naya et al., 2007; Serraj & Sinclair, 1996; Vessey et al., 1988), salt stress (Bekki et al., 1987; Serraj et al., 1994; Aydi et al., 2004; L'Taief et al., 2007), dark stress (Gogorcena et al., 1997) and cold stress (van Heerden et al., 2008; Kuzma et al., 1995).

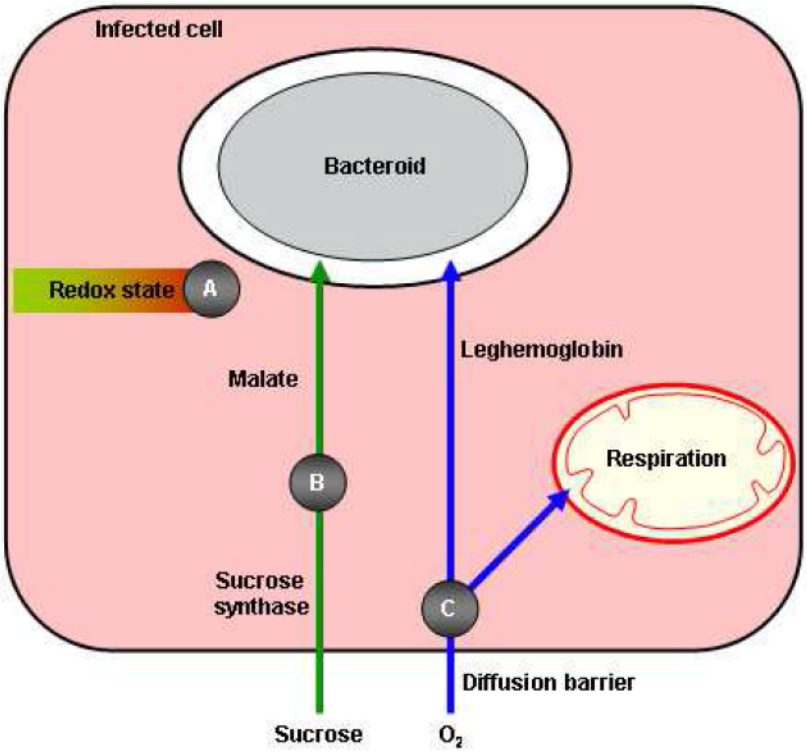


Fig. 3. Scheme showing the major processes modified during stress induced senescence. A, modification of the redox balance; B, alteration of the bacteroid nutrition; C, alteration of O_2 homeostasis.

However, nodule O_2 metabolic modifications are not always similar. Some types of stress decrease nodule permeability to O_2, lowering the O_2 availability to bacteroids, which in turn inhibits nitrogenase activity through a lower nodule respiration rate and lower energetic supply. In this context, a nitrate-nitric oxide respiration process has been identified in nodule which may play a role in the maintenance of energetic status under low oxygen conditions (Horchani et al., 2011). In contrast to stress which reduces oxygen availability, some stress increase nodule O_2 concentration (increased nodule permeability and/or lower respiration rate) which inhibits nitrogenase activity through a direct O_2-induced inactivation.

Leghemoglobin (Lb) is also a general physiological marker of SIS. As mentioned before, Lb has a crucial role in nodule functioning (Ott et al., 2009; Ott et al., 2005). Decrease of Lb content has been shown during drought stress (Gogorcena et al., 1995; Gordon et al., 1997; Guerin et al., 1990), salt stress (Gordon et al., 1997; Mhadhbi et al., 2011) and dark stress (Gogorcena et al., 1997; Matamoros et al., 1999). This diminution of Lb will impact the general metabolism of nodule by decreasing the O_2 availability to bacteroid and by potentially releasing free iron which may be a co-factor of the Fenton reaction to produce reactive oxygen species.

In conclusion, the general production of the high energy level needed for the efficient nitrogen fixation is generally altered at the onset of SIS.

3.3 Stress induced senescence is characterized by modifications in the nodule redox state components

As during developmental senescence, modifications of the redox balance are involved in nodule SIS. As discussed above, the high respiration rates, the important Lb concentration and the release of the catalytic Fe may be major ROS production systems. The accumulation of catalytic Fe has been detected during dark stress (Gogorcena et al., 1997; Becana & Klucas, 1992) and drought stress (Gogorcena et al., 1995) and participates in $OH^{\bullet}$ production during dark stress (Becana & Klucas, 1992). The modification of iron metabolism during SIS is also noticeable through the up regulation of ferritin and metallothionein during drought stress (Clement et al., 2008) and dark stress (Perez Guerra et al., 2010). These proteins sequester free Fe to decrease the Fenton reaction and protect the cellular primary components.

ROS accumulation is also regulated by antioxidant defence which participates in their degradation (Figure 4). Nodule antioxidant defence and the importance of the regulation of the redox balance has been extensively studied in root nodule (for review: Becana et al., 2010; Chang et al., 2009; Marino et al., 2009). Modifications of the antioxidant defence parameters have been used extensively as a marker for nodule SIS. Content and redox state of GSH and Asc, two antioxidant molecules, are modified during drought stress (Gogorcena et al., 1995; Marino et al., 2007), salt stress (Swaraj and Bishnoi, 1999) and dark stress (Matamoros et al., 1999; Gogorcena et al., 1997). Superoxide dismutase and catalase, two enzyme families involved in ROS degradation, are down regulated during dark stress (Matamoros et al., 1999; Gogorcena et al., 1997), salt stress (Jebara et al., 2005) and drought stress (Gogorcena et al., 1995; Rubio et al., 2002). Similarly, enzymes of the Asc-GSH cycle are modulated during nodule SIS (Gogorcena et al., 1995; Jebara et al., 2005; Matamoros et al., 1999; Mhadhbi et al., 2011). Nevertheless, whereas the majority of the reports suggest that SIS is associated with a decrease of the antioxidant defence, other articles have shown

that some elements of the antioxidant defence are stable or even up regulated during stress. This discrepancy may be linked to the stress intensity, the plant adaptation to the treatment and to the growth conditions which modify the responses of plant to stress.

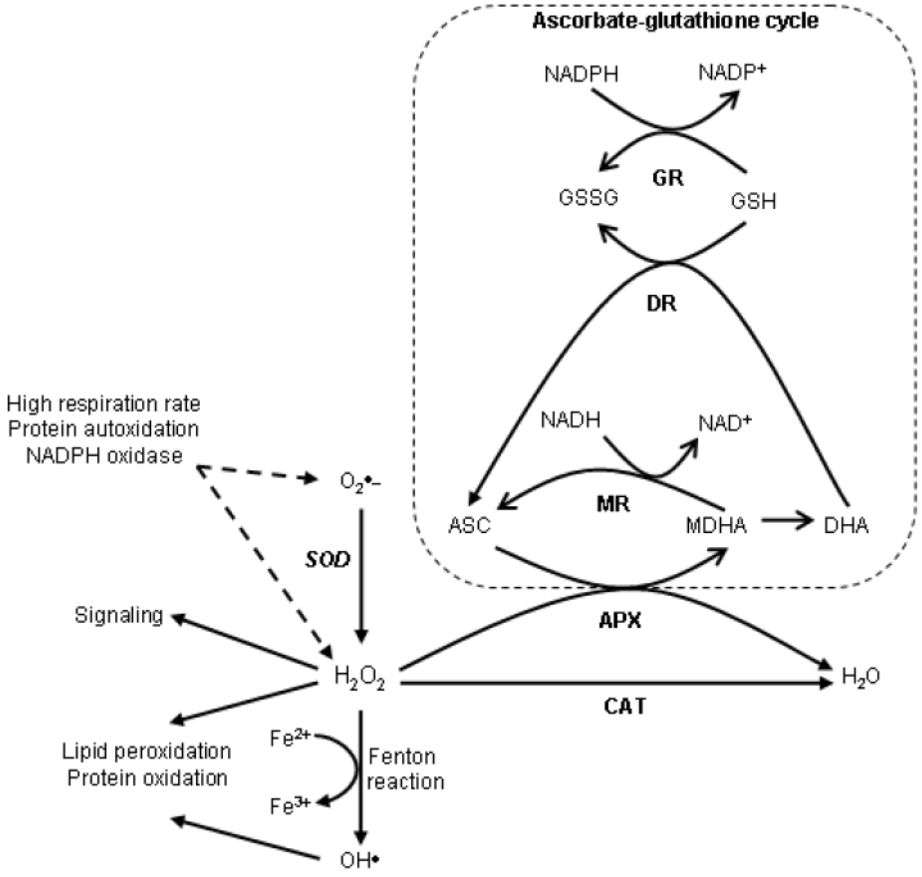


Fig. 4. Scheme showing processes for production and removal of Reactive Oxygen Species. CAT, catalase; SOD, superoxide dismutase; APX, ascorbate peroxidase; MR, monodehydroascorbate reductase; DR, dihydroascorbate reductase; GR, glutathione reductase; GSH, reduced glutathione; GSSG, oxidized glutathione; ASC, reduced ascorbate; MDHA, monodehydroascorbate; DHA, dehydroascorbate.

The imbalance in redox state leading to oxidative stress is characterized by the oxidation of major cellular components such as lipids and proteins. One of the major targets is the membrane. Lipid peroxidation, measured as the reaction of thiobarbituric acid with malondialdehyde, is significantly attenuated during dark stress (Matamoros et al., 1999; Gogorcena et al., 1997) in contrast to drought stress and salt stress during which lipid peroxidation increases (Gogorcena et al., 1995; Mhadhbi et al., 2011). Protein oxidation is

increased during dark stress (Matamoros et al., 1999; Gogorcena et al., 1997) and drought stress (Gogorcena et al., 1995). The differential regulation in lipid peroxidation suggests that different degradation mechanisms may partially occur during SIS. This raises the question of SIS regulation and the specificity of the plant response to the different stress.

3.4 Nodule senescence induced by nitrate

One of the specificities of root nodule is the rapid onset of senescence occurring under nitrate treatment. Nitrate concentrations above 2 to 3 mM have strong detrimental effects on the NFS as there is inhibition of several developmental steps ranging from the infection process to the nitrogen fixation in mature nodule (Mortier et al., 2011; Streeter & Wong, 1988). As for other SIS, the inhibition of nitrogenase is correlated with an increase in O_2 diffusion and supply (Escuredo et al., 1996; Matamoros et al., 1999; Minchin et al., 1986; Minchin et al., 1989). Nitrate application also reduces carbon supply from leaves to nodules as measured by plant treatment with ^{11}C and ^{14}C-labelled CO_2 (Fujikake et al., 2003). This reduction in carbon supply is sometimes correlated with the diminution of the sucrose pool (Matamoros et al., 1999) and the down expression of sucrose synthase (Gordon et al., 2002). Nitrate treatment also decreases the antioxidant defence of the nodule with a diminution of the ascorbate pool and of the activities of ascorbate peroxidases and catalases (Escuredo et al., 1996; Matamoros et al., 1999). At the ultrastructural level, the symbiosome membrane seems to be affected by the senescence process before the bacteroid (Matamoros et al., 1999).

Nitrate effect results in both local and systemic regulation of the nodulation process (Jeudy et al., 2009). Systemic regulation has been described in numerous leguminous plants. Indeed, shoot-determined supernodulators with a nitrate-tolerant nodulation process have been described in soybean (Searle et al., 2003), pea (Duc & Messager, 1989), *L. japonicus* (Krusell et al., 2002) and *M. truncatula* (Penmetsa et al., 2003). Gene analyses have led to the identification of orthologous Leucine Rich Repeat-Receptor Like Kinases (LRR-RLKs) which play a crucial role in the autoregulation of nodulation. The systemic regulation may occur via the induction of specific CLV3/ESR (CLE) peptides produced after nitrate treatment (Okamoto et al., 2009; Reid et al., 2011). In this context, NOD3 is involved in the production or in the transport of the root signal molecule involved in the systemic regulation (Novak, 2010).

Finally, nitrogen limitation regulates nodule growth and stimulates BNF activity via a LRR-RLKs independent response suggesting that a local nodule adaptation may also be involved in the nitrate regulation of the BNF (Jeudy et al., 2009).

3.5 Molecular modifications occurring during stress induced senescence

The last review analyzing root nodule senescence presented oxidative stress and hormones as potential key players of the senescence process (Puppo et al., 2005). The concentration of abscissic acid (ABA), a hormone involved in plant response to abiotic and biotic stress (Cutler et al., 2010; Raghavendra et al., 2010), is strongly increased in soybean nodules under drought stress (Clement et al., 2008). The five-fold accumulation of ABA in stressed nodules compared to stressed roots shows that ABA accumulation is much higher in nodules than in roots. The effect of ABA on nodule functioning has been shown by exogenous treatment of pea nodules (Gonzalez et al., 2001). ABA treatment decreases the BNF and Lb content

declines in parallel with the BNF. However, sucrose synthase activity, another parameter of drought stress effect, is not affected by this treatment suggesting that ABA is not the only player of nodule response to stress. Jasmonic acid (JA), another hormone involved in plant stress response (Reinbothe et al., 2009), has also been shown to be involved in the regulation of nodule functioning (Hause & Schaarschmidt, 2009). Exogenous JA treatment induces an accumulation of lipid peroxides and modifies ascorbate metabolism suggesting that JA could influence nodule senescence (Loscos et al., 2008).

Redox state modifications seem to be a regulatory element of the nodule SIS (Marino et al., 2006). Exogenous treatment with paraquat, which generates ROS, induces the alteration of the GSH and ASC pools toward a more oxidized state. This alteration of the redox state is associated with a diminution of BNF and decrease in Lb content. Moreover, an early decrease in sucrose synthase activity is also detected during the treatment. These results suggest that oxidative stress is involved in the signalling pathway leading to nodule SIS. Interestingly, sucrose synthase seems to be regulated at both the transcriptional and post-translational levels by oxidizing agents such as paraquat (Marino et al., 2008). Finally, genetic modifications allowing decrease and increase of GSH content in the nitrogen fixing zone has shown that BNF and Lb expression level are correlated with GSH content (El Msehli et al., 2011). These results strengthen the idea that cellular redox state plays a crucial role in the regulation of nodule functioning.

Developmental senescence and SIS present different structural and temporal features. At the transcriptomic level, analysis of the expression of 58 genes up regulated during developmental senescence has been performed during dark stress (Perez Guerra et al., 2010). 21 genes are induced during both types of senescence. Amongst these genes, some serine/threonine kinase and some genes involved in metal metabolism (metal transporters and metallothionein) have similar profiles of induction. Nine are up-regulated during both senescence types with different induction levels or transient induction during dark stress. Amongst these genes, cysteine and aspartic proteases are well represented. Finally, 28 genes are up regulated during developmental senescence and not by dark stress. Amongst these genes, proteins associated to proteasome function and vesicular trafficking are not induced during dark stress suggesting partial different regulatory processes between the two types of senescence. In soybean, a screen for genes involved in root nodule senescence has led to the isolation of the senescence-associated nodulin 1 (SAN1) multigene family showing a high homology with plant 2-oxoglutarate-dependent dioxygenases and including two functional genes *SAN1A* and *SAN1B* and a pseudogene *SAN1C* (Webb et al., 2008). Analyses of the steady-state mRNA levels of *SAN1A* and *SAN1B* during developmental senescence showed no significant differences for both genes. In contrast, during induced senescence by treatment with nitrate or darkness, *SAN1A* is down-regulated and *SAN1B* is up-regulated by both treatments.

Nevertheless, dark stress, drought stress and salt stress may induce specific senescence cascades and transcriptomic analyses will have to be realized to define the similarities and the differences in gene expression patterns in nodules subjected to the different stress.

4. Bacterial mutants and nodule senescence

The microsymbiont, differentiated into bacteroids inside the symbiosome, is not only dependent on "senescent" signals coming from the cytosolic environment of its host plant.

Mutations in some bacteroid genes have an incidence on its lifespan *in planta* and thus on the nodule integrity. However, it is difficult to assess the role of bacteroid genes on nodule senescence due to a lack of genetic tools to investigate this question.

Gene affected	Species	Function	Symbiotic phenotype	Reference
nifH, fixA, fixJ and fixK	*S. meliloti*	Nitrogen fixation	fix-, elongated differentiated bacteroids	Maunoury et al., (2010)
lspB	*S. meliloti*	Lipopolysaccharide biosynthesis		
rpoH1	*S. meliloti*	σ^{23}-like protein , bacterial protection against environmental stresses	fix-, reduced number of intracellular bacteria, mixture of normal elongated and abnormal bacteroids	Mitsui, (2004)
gltA	*S. meliloti*	Citrate synthase	$fix^{+/-}$ (20%/WT)	Grzemski et al., (2005)
aap bra	*R. leguminosarum*	Branched-chain amino acids transporters	$fix^{+/-}$ (30%/WT), fewer smaller bacteroids with a lower DNA content	Prell et al., (2009)
relA	*R. etli*	Stringent response	$fix^{+/-}$ (25%/WT), abnormal bacteroids, with an increased size	Moris et al., (2005)
sitA	*S. meliloti*	Manganese uptake	$fix^{+/-}$ (25%/WT), mixture of white, slightly pink and pink nodules	Davies et al., (2007)
katA katC	*S. meliloti*	Catalases	$fix^{+/-}$ (30%/WT), differentiated bacteroids irregular in shape	Jamet et al., (2003)
gshB	*S. meliloti*	Glutathione synthetase	$fix^{+/-}$ (25%/WT), senescence before or after differentiation into bacteroid	Harrison et al., (2005)
gshB	*R. tropici*	Glutathione synthetase	$fix^{+/-}$	Muglia et al., (2008)
lsrB1	*S. meliloti*	LysR-type transcriptional regulator	$fix^{+/-}$ (30%/WT), mixture of pink and white nodules	Luo et al., (2005)
hfq	*S. meliloti*	RNA chaperone	$fix^{+/-}$ (50%/WT), mixture of pink and white nodules	Torres-Quesada et al., (2010)

Table 1. Bacterial genes in which mutations cause early nodule senescence

Until now, there is no global transcriptomic study which could give information on the bacteroid gene expression profile when nitrogen fixing bacteroids turn off to become senescent. Moreover, due to the difficulty in finding a reliable and efficient screen to isolate bacteroid senescent mutants *in planta*, a library of such mutants is still not available. The data described below mostly come from the analysis of the symbiotic phenotype of rhizobial

strains affected in one specific gene. The characteristics associated to these analyses include: plant yield, nodule morphology, nitrogen fixation efficiency, and sometimes, ultrastructure of the nodule and of the bacteroid. More recently, some symbiotic phenotype studies also include bacterial genome endoreduplication and transcriptome analyses. This section will mainly focus on the impact of a mutation in the bacterial genome on early nodule senescence and on delayed nodule senescence (Table 1).

4.1 Bacterial mutants and early nodule senescence

The rhizobial mutants that present a symbiotic phenotype are divided into four groups: the nodule deficient mutants impaired in the first steps of infection (nod- fix-), the bacterial mutants which induce nodules that present an early nodule senescence phenotype i) blocked in their bacteroid differentiation process (nod$^+$ fix-), ii) fully differentiated but unable to reduce N_2 (nod$^+$ fix-) and iii) differentiated into bacteroids less efficient in N_2 fixation compared to the wild-type strain (nod$^+$ fix$^{+/-}$). Bacterial mutants leading to nodule development abortion due to a defect in bacteroid differentiation such as *bacA* (Saeki, 2011) or *parA* (Liu et al., 2011) mutants will not be presented here. The rhizobial nod$^+$ fix- mutants that could differentiate into bacteroids and pass the two transcriptome switch-points encountered during the differentiation of the wild-type bacteroids have been described recently (Maunoury et al., 2010). They are affected in genes encoding for symbiotic function and nitrogen fixation machinery (*nifH*, *fixA*, *fixJ* and *fixK*) or in lipopolysaccharide biosynthesis (*lspB*). The *rpoH1* mutant of *S. meliloti*, impaired in the synthesis of the σ^{32}-like protein, involved in bacterial protection against environmental stresses has also a nod$^+$ fix- symbiotic phenotype in interaction with alfalfa (Mitsui et al., 2004). The bacterial *rpoH1* mutant is still able to elicit nodule formation, efficient plant cell invasion and differentiation into bacteroids. But, the degeneration of bacteroids rapidly occurred in the proximal zone, adjacent to the infection zone, leading to ineffective white nodules associated to an early nodule senescence phenotype. Only the latter group of early nodule senescence mutants (nod$^+$ fix$^{+/-}$) will be described below. The genes affected in these mutants fall mainly into two categories: genes encoding function involved in carbon and nitrogen metabolism, and genes important for stress adaptation. Genes with other function will also be presented.

4.1.1 Genes encoding function involved in carbon and nitrogen metabolism of the bacteroid and in the nutriment stress response

The host plant supplies bacteroids with metabolites, including dicarboxylic and amino acids, used by the bacteroids to support the reduction of N_2 into ammonia in amounts sufficient for plant growth. To better understand the role of the decarboxylating part of the *S. meliloti* TCA cycle in a nitrogen fixing nodule, Gremski and collaborators (2005) have used an elegant approach (Grzemski et al., 2005). In *S. meliloti*, a mutant in the TCA cycle *gltA* gene encoding citrate synthase forms empty nodules devoid of intracellular bacteria. The *gltA* mutants are clearly unsuitable for experiments to determine whether citrate synthase (CS) is essential during nitrogen fixation in a mature nodule because they have a defect in development that prevents them from forming normal bacteroids. So, the authors constructed temperature-sensitive (ts) mutants in the *S. meliloti* citrate synthase (*gltA*) gene. This allows the formation of nitrogen-fixing nodules at the permissive temperature but, once nodule development was complete, an elevation of root temperature prevents CS

expression. When alfalfa plants infected with the ts mutants were transferred to 30°C, the nodules lost the ability to fix nitrogen. Microscopic examination of the nodules revealed the loss of bacteroids in infected cells and morphological changes that resembled changes seen during nodule senescence.

These experiments with CS ts mutants showed that CS activity is needed in mature nodules to maintain bacteroid integrity and that removing CS activity via a temperature shift converts an effective nodule into an empty nodule. This implies that CS is essential for nodule maintenance as well as in the early stages of plant cell invasion.

Another example of early nodule senescence associated to a nutrient defect in *Rhizobium* has been described recently. Prell and collaborators (2009) have shown that *Rhizobium leguminosarum*, the bacterial partner of peas and broad beans (biovar *viciae*), becomes symbiotic auxotroph for the branched-chain amino acids Leucine, Isoleucine, Valine (LIV) when differentiated into bacteroids in root nodules (Prell et al., 2009). While these bacteria are prototrophs for LIV amino acids as free-living bacteria, they become dependent on the plant as nitrogen-fixing bacteroids, due to a major reduction in gene expression and activity of LIV biosynthetic enzymes. Peas inoculated with bacterial mutants impaired in their capacity to transport LIV, have an early senescent phenotype (nod^+, $fix^{+/-}$). Peas are yellow, have small, pale pink nodules and a dry weight similar to un-inoculated plants. This is correlated with a 70% decrease of the nitrogen fixation capacity for plants inoculated with these mutants compared to the plants inoculated with the *R. leguminosarum* wild-type strain. Thus, plants not only provide a carbon source (dicarboxylic acids) to the bacteroid but also precursors of proteins. The authors have shown that a defect in bacteroid LIV nutrition leads to a reduction in its persistence in plant infected cells, which in turn induces senescence. This means that the plant cell might receive information from the bacteroid in order to sense the fitness of the microsymbiont to maintain or interrupt the symbiotic interaction.

Concerning nutriment stress perceived by the bacteria *in planta*, a mutation in the *relA* gene of *Rhizobium etli*, induces symbiotic defects at the intermediate and/or late stages of the interaction with *Phaseolus vulgaris* (Moris et al., 2005). RelA allows the production of the alarmone (p)ppGpp, which mediates the stringent response in bacteria. This response results in transcriptional down regulation of ribosomal and tRNA genes, upon conditions of amino acid starvation. Despite this role, RelA has been reported to be important for biofilm formation and for interaction of bacteria, pathogenic or beneficial, with their eukaryotic host. Interaction of a *relA* mutant with common bean plants strongly reduces the nitrogen fixation efficiency by 75% and the plant yield. Microscopic studies showed that bacteria differentiated into bacteroids in the symbiosomes were larger in size than the wild-type ones. Thus, in the *R. etli* bacteroids, *relA* plays a role in physiology adaptation and regulation of gene expression. However, the step impaired in the nitrogen fixation defect of a *relA* mutant has not been investigated.

4.1.2 Genes encoding function involved in oxidative stress response

It is generally accepted that symbiotic bacteria are submitted to an oxidative burst released by the host plant during the first steps of infection (Pauly et al., 2006). In addition to this role as a general plant defence mechanism against bacterial invasion, oxidative burst might also

play a role in the lifespan of the bacteroid. The high rate of bacteroid respiration necessary to supply energy required for the nitrogen reduction process generates high levels of ROS in the nodule. In legume root nodules, a large amount of H_2O_2 surrounding disintegrating bacteroids in senescent zone IV is detected (Rubio et al, 2004). This reflects the close relationship between oxidative stress and nodule senescence. Indeed, most of the bacterial mutant strains that show a symbiotic nod$^+$ fix$^{+/-}$ phenotype (early senescence) are affected in their antioxidant defence. To escape the stress generated by H_2O_2 and $O_2^{\cdot-}$, bacteria encode a set of enzymes such as superoxide dismutases, catalases and alkylhydroperoxidases, and also antioxidant molecules such as GSH.

In *S. meliloti*, disruption of the *sitA* gene induces a decrease in Mn/Fe SodB activity and a higher sensitivity to ROS (Davies and Walker, 2007). The *sitA* gene encodes a periplasmic protein involved in manganese uptake. During alfalfa interaction, a *sitA* mutant is either affected in its infection efficiency leading to small white nodules or is possibly altered in the survival of the differentiated form leading to intermediate nodules, with a slight pink fixing zone, smaller in size than the wild-type nodules. As a consequence, the nitrogenase activity and the plant yield are greatly reduced in these mutant infected plants compared to the plants inoculated with the wild-type bacteria. It is difficult to assess the role of the other superoxide dismutase of *S. meliloti* (SodA) in the natural senescence process since a *sodA* mutant failed to differentiate into bacteroids after release into plant cells (Santos et al., 2000).

To cope with H_2O_2 production, *S. meliloti* possesses three catalases. In free living bacteria, KatA and KatC are encoded by genes mainly transcribed in oxidative stress conditions while the *katB* gene is constitutively expressed. In 6 week-old nodules of *Medicago sativa*, KatA is the predominant catalase present in the bacteroids. The *katB* gene is also expressed in the nitrogen fixation zone III while *katC* is only transcribed in the infection zone II (Jamet et al., 2003). Single mutant strains of *katA*, *katB* or *katC* genes have no significant impact on nitrogen fixation efficiency of alfalfa nodules containing these mutants compared to those infected with wild-type bacteria. However a *katA katC* double mutant presents a dramatic decrease of nitrogen fixation capacity (Sigaud et al., 1999), associated with an early senescence of the nodule. These nodules were devoid of a clear zone III, instead the senescent zone IV was adjacent to interzone II-III (Jamet et al., 2003). In most plant cells, bacteria were correctly released from infection threads and were able to differentiate into bacteroids. This shows that efficient detoxification of H_2O_2 by the microsymbiont is essential in the latter steps of bacteroid differentiation leading to nitrogen fixing bacteria.

The antioxidant GSH plays an important role during symbiosis and nodule senescence. This tripeptide is synthesized by a two-step process. In bacteria, GshA catalyses the conjugation of glutamate and cysteine to form γEC and, in a second enzymatic step, GshB completes GSH synthesis by addition of glycine. In *S. meliloti*, while a *gshA* mutant is unable to form nodules (nod$^-$ fix$^-$ phenotype), a *gshB* mutant has a nod$^+$ phenotype coupled to a 75% reduction in the nitrogen fixation capacity (Harrison et al., 2005). In these nodules, bacteria are correctly released from the infection thread into host plant cells and enter into early senescence after differentiation into bacteroids. These data show that, in *S. meliloti*, GSH is important to maintain bacteroid during symbiotic interaction with alfalfa. This is also true in some determinate-type nodules as the survival of the common bean (*P. vulgaris)* microsymbiont, *Rhizobium tropicii*, is dependent on GSH production (Muglia et al., 2008). A *gshB* mutant has an early senescent pattern associated with increased levels of superoxide

accumulation. Expression of this gene in a wild-type background is enhanced at late stage of nodule development, suggesting its antioxidant role against ROS accumulation during nodule senescence. In these species, GSH is important to keep nodules functional over time. In contrast, this does not hold true for *Bradyrhizobium* sp. where disruption of the *gshA* gene does not affect the ability to form effective nodules (Sobrevals et al., 2006). In this latter case, it is possible that the defect in intracellular GSH was compensated for by other compounds acting as antioxidants.

4.1.3 Genes encoding bacterial function involved in the regulation of gene expression

Ninety putative genes encoding LysR-type transcriptional regulators were identified in the *S. meliloti* genome. These regulators are typically 300 amino acids long with an N-terminal DNA binding domain and a C-terminal sensing domain for signal molecules and function as activators or repressors. LysR regulated genes have promoters which contain at least one TN11A motif and are usually divergently transcribed from the LysR regulator (Schell, 1993). To determine the role of LysR regulators in symbiosis, a mutagenesis analysis of all 90 putative *lysR* genes was realized (Luo et al., 2005). This allowed the isolation of the *lsrB1* mutant that presents a symbiotic phenotype. An *lsrB1* mutant was deficient in symbiosis and elicited a mixture of pink (45%) and white (55%) nodules on alfalfa plants. These plants exhibited lower overall nitrogenase activity (30%) than plants inoculated with the wild-type strain. This is consistent with the fact that most of the alfalfa plants inoculated with the *lsrB1* mutant were short (50 to 80% shorter than the plants inoculated with the WT strain) and light green. Cells of the *lsrB1* mutant were recovered from both pink and white nodules, suggesting that *lsrB1* mutants could be blocked either early or late during nodulation. Similar numbers of bacterial cells were recovered from the pink nodules of plants inoculated with the wild-type strain Rm1021 and pink and white nodules from the plants inoculated with the mutants. These findings suggest that the *lsrB1* mutants were able to invade plant cells. The *lsrB* gene is located downstream from the *trxB* gene for thioredoxin reductase, which also participates in the bacterial antioxidant defence. The *trxB* gene is transcribed from its own promoter in the same direction as the *lsrB* gene. The *trxB* promoter contains a nearly perfect recognition site (TN11A) for a LysR regulator so it is possible that LsrB regulates the expression of both the *trxB* and *lsrB* genes. The authors suggest that the early senescence phenotype observed *in planta* could be linked to a defect in detoxification of ROS in *S. meliloti*. However, this has not been demonstrated.

It has been shown recently that the *S. meliloti* RNA chaperone Hfq plays a role in the survival of the microsymbiont within the alfalfa nodule cells (Torres-Quesada et al., 2010). Hfq is considered to act as a global post-transcriptional regulator of gene expression since it interacts with diverse RNA molecules and small non-coding RNAs (sRNA). In free living bacteria, an *hfq* mutant down-regulates 91 genes mostly involved in central carbon metabolism (uptake and utilization of carbon substrates) and up-regulates genes involved in the uptake and catabolism of diverse N compounds. During late interaction with alfalfa (30 days post-infection), plants inoculated with the *hfq* mutant strain are composed of 60% of white non fixing nodules and 40% of pink fixing nodules. Thus, the plant yield was 64% of that of the wild-type-inoculated plants. Histological analysis of the white nodules revealed that the bacteroid differentiation was efficient but the bacteroid-infected tissues were restricted to the interzone II-III since the zone III was replaced by a large senescent zone IV. Indeed, an Hfq impaired mutant showed a premature senescent phenotype. The authors

proposed that this phenotype could be linked to a defect in intracellular survival under prolonged stress present in the plant cell environment.

4.2 Bacterial mutants and delayed senescence

The delayed senescent bacterial mutants might have a nod$^+$ phenotype associated with a fix$^+$ phenotype for a period longer than the natural fixing period associated with the wild type bacteria in interaction with its host plant. Thus, such mutants are obligate differentiated bacteroids.

Compared to the data connected with the consequences of bacterial gene inactivation on early nodule senescence, little information on the role of bacterial mutants on delayed nodule senescence are available. Knowing that most of the mutations that induce an acceleration of senescence affect genes involved in ROS detoxification, in bacterial fitness, in import and/or processing of carbon skeletons, amino acids and antioxidants, we might suspect that a delayed senescence bacterial mutant should have a gain of function rather than an invalidated one. In that sense, it is possible that an increase in synthesis and/or activity of molecules involved in stress resistance, especially to ROS, should improve the bacteroid lifetime in the symbiosome and thus should enhance the nitrogen fixing period. This aspect of the role of bacterial genes in the functional life of symbiotic fixing nodules remains to be explored. However, one encouraging study sustains this postulate (Redondo et al., 2009). In fact, the authors of this work have overexpressed a cyanobacteria *Anabaena variabilis* gene encoding flavodoxin in *S. meliloti*. Knowing that natural senescence-inducing signals from the plant leads to a decrease in antioxidant content and thus an increase in ROS accumulation in an irreversible manner, they analyse the consequences of the over-expression of this flavodoxin protein involved in the response to oxidative stress. They have shown that the decline of nitrogenase activity was delayed and that the structural and ultrastructural modifications associated with nodule senescence had a later onset in flavodoxin-expressing nodules. Lipid peroxidation, a marker of senescence, was significantly reduced and the oxidative balance was improved in comparison to the control nodules. In conclusion, flavodoxin over-expression had an impact on bacteroid antioxidant metabolism, leading to delayed senescence.

In conclusion, we can propose that bacteroids inside the nodule infected cells are not only tributary from the plant to initiate nodule senescence. Genes encoding proteins implicated in bacterial nutrition and stress response are also essential since mutations in these genes alter the fitness of the differentiated bacteroids. In turn, this leads to the death of the microsymbiont followed by the senescence of the plant cells and nodule. Future aspects on the role of bacteroid genes on senescence should include the development of bacteroid genetic tools. The over-expression of pertinent genes specifically in the bacteroid or the conditional invalidation of rhizobial genes after bacteroid differentiation will be important to define senescence-related genes.

5. Perspectives

The data summarized in this review indicate that one of the general physiological features of nodule senescence is the decrease in nitrogen fixation efficiency. This diminution may be related to plant and/or bacterial-dependent factors. However whereas this diminution of the nitrogen fixation efficiency is observed during both developmental and stress induced-

nodule senescence, the progression of senescence symptoms seems to be differentially controlled. Indeed, even if common general features have been described during nodule senescence, the few available microscopic and transcriptomic analyses show that nodule senescence may occur differently in developmental senescence and SIS. Moreover, the senescence occurring under different environmental stress conditions such as dark stress, drought stress or nitrate treatment may also involve different genetic and physiological programs. In this context, more detailed spatiotemporal analysis of the multiple senescence processes will have to be performed to determine the similarities and the differences between the various senescence processes. Microarray analysis or "Whole Transcriptome Shotgun Sequencing" will be valuable tools to analyse the transcriptome modifications occurring under the different senescence processes (Lister et al., 2009). In conditions in which the senescence process does not appear to be a homogenous process such as in developmental senescence, laser capture microdissection (Barcala et al., 2009) will allow the analysis of transcriptomic patterns of senescent infected cells. The development of two legume model systems, *M. truncatula* (http://www.medicago.org/) and *L. japonicus* (http://www.lotusjaponicus.org/) will facilitate an efficient analysis of the senescence process by developing tools dedicated to cell biology, genetic and transcriptomic analyses.

The role of the bacterial partner needs also to be clarified. Indeed, whereas senescence phenotypes are observed in nodules obtained with bacterial mutants affected in their nitrogen fixation efficiency, the regulation of this bacterial-induced senescence has not yet been studied. The abortion of nodule development when using such bacterial mutants suggests that the interaction may switch from a compatible to an incompatible interaction. In this context, the molecular events which trigger this switch still need to be defined. Nevertheless, the work with the flavodoxin overexpressing-bacterial strain showed that the symbiotic interaction may also be improved to resist to the various endogenous and environmental stress conditions. The construction of plant and bacteria with higher resistance to environmental stress (Zurbriggen et al., 2008) may be an interesting opportunity to increase the benefit from an efficient BNF in agronomy.

6. References

Alesandrini, F., Mathis, R., Van de Sype, G., Herouart, D. & Puppo, A. (2003). Possible roles for a cysteine protease and hydrogen peroxide in soybean nodule development and senescence. *New Phytol,* Vol. 158, No. 1, pp. 131-138

Apel, K. & Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol,* Vol. 55, pp. 373-399

Appleby, C. A. (1984). Leghemoglobin and Rhizobium respiration. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.,* Vol. 35, pp. 443-478

Aydi, S., Drevon, J. J. & Abdelly, C. (2004). Effect of salinity on root-nodule conductance to the oxygen diffusion in the *Medicago truncatula-Sinorhizobium meliloti* symbiosis. *Plant Physiol Biochem,* Vol. 42, No. 10, pp. 833-840

Barcala, M., Garcia, A., Cabrera, J., Casson, S., Lindsey, K., Favery, B., Garcia-Casado, G., Solano, R., Fenoll, C. & Escobar, C. (2009). Early transcriptomic events in microdissected Arabidopsis nematode-induced giant cells. *Plant J,* Vol. 61, No. 4, pp. 698-712

Becana, M. & Klucas, R. V. (1992). Transition metals in legume root nodules: iron-dependent free radical production increases during nodule senescence. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 89, No. 19, pp. 8958-8962

Becana, M., Matamoros, M. A., Udvardi, M. & Dalton, D. A. (2010). Recent insights into antioxidant defenses of legume root nodules. *New Phytol*, Vol. 188, No. 4, pp. 960-976

Becker, A., Berges, H., Krol, E., Bruand, C., Ruberg, S., Capela, D., Lauber, E., Meilhoc, E., Ampe, F., de Bruijn, F. J., Fourment, J., Francez-Charlot, A., Kahn, D., Kuster, H., Liebe, C., Puhler, A., Weidner, S. & Batut, J. (2004). Global changes in gene expression in Sinorhizobium meliloti 1021 under microoxic and symbiotic conditions. *Mol Plant Microbe Interact*, Vol. 17, No. 3, pp. 292-303

Bekki, A., Trinchant, J.-C. & Rigaud, J. (1987). Nitrogen fixation (C_2H_2 reduction) by Medicago nodules and bacteroids under sodium chloride stress. *Physiologia Plantarum*, Vol. 71, No. 1, pp. 61-67

Ben Salah, I., Albacete, A., Martinez Andujar, C., Haouala, R., Labidi, N., Zribi, F., Martinez, V., Perez-Alfocea, F. & Abdelly, C. (2009). Response of nitrogen fixation in relation to nodule carbohydrate metabolism in Medicago ciliaris lines subjected to salt stress. *J Plant Physiol*, Vol. 166, No. 5, pp. 477-488

Benedito, V. A., Torres-Jerez, I., Murray, J. D., Andriankaja, A., Allen, S., Kakar, K., Wandrey, M., Verdier, J., Zuber, H., Ott, T., Moreau, S., Niebel, A., Frickey, T., Weiller, G., He, J., Dai, X., Zhao, P. X., Tang, Y. & Udvardi, M. K. (2008). A gene expression atlas of the model legume Medicago truncatula. *Plant J*, Vol. 55, No. 3, pp. 504-513

Bethlenfalvay, G. J. & Phillips, D. A. (1977). Ontogenetic Interactions between Photosynthesis and Symbiotic Nitrogen Fixation in Legumes. *Plant Physiol*, Vol. 60, No. 3, pp. 419-421

Bobik, C., Meilhoc, E. & Batut, J. (2006). FixJ: a major regulator of the oxygen limitation response and late symbiotic functions of Sinorhizobium meliloti. *J Bacteriol*, Vol. 188, No. 13, pp. 4890-4902

Broughton, W. J., Jabbouri, S. & Perret, X. (2000). Keys to symbiotic harmony. *J Bacteriol* Vol. 182, No. 20, pp. 5641-5652

Capela, D., Filipe, C., Bobik, C., Batut, J. & Bruand, C. (2006). Sinorhizobium meliloti differentiation during symbiosis with alfalfa: a transcriptomic dissection. *Mol Plant Microbe Interact*, Vol. 19, No. 4, pp. 363-372

Chang, C., Damiani, I., Puppo, A. & Frendo, P. (2009). Redox changes during the legume-rhizobium symbiosis. *Mol Plant*, Vol. 2, No. 3, pp. 370-377

Clement, M., Lambert, A., Herouart, D. & Boncompagni, E. (2008). Identification of new up-regulated genes under drought stress in soybean nodules. *Gene*, Vol. 426, No. 1, pp. 15-22

Coba de la Pena, T., Carcamo, C. B., Almonacid, L., Zaballos, A., Lucas, M. M., Balomenos, D. & Pueyo, J. J. (2008). A cytokinin receptor homologue is induced during root nodule organogenesis and senescence in Lupinus albus L. *Plant Physiol Biochem*, Vol. 46, No. 2, pp. 219-225

Crespi, M. & Frugier, F. (2008). De novo organ formation from differentiated cells: root nodule organogenesis. *Sci Signal*, Vol. 1, No. 49, pp. re11

Cutler, S. R., Rodriguez, P. L., Finkelstein, R. R. & Abrams, S. R. (2010). Abscisic acid: emergence of a core signaling network. *Annu Rev Plant Biol,* Vol. 61, pp. 651-679

Davies, B. W. & Walker, G. C. (2007). Disruption of sitA compromises Sinorhizobium meliloti for manganese uptake required for protection against oxidative stress. *J Bacteriol,* Vol. 189, No. 5, pp. 2101-2109

De Michele, R., Formentin, E., Todesco, M., Toppo, S., Carimi, F., Zottini, M., Barizza, E., Ferrarini, A., Delledonne, M., Fontana, P. & Lo Schiavo, F. (2009). Transcriptome analysis of Medicago truncatula leaf senescence: similarities and differences in metabolic and transcriptional regulations as compared with Arabidopsis, nodule senescence and nitric oxide signalling. *New Phytol,* Vol. 181, No. 3, pp. 563-575

Del Castillo, L. D., Hunt, S. & Layzell, D. B. (1994). The role of oxygen in the regulation of nitrogenase activity in drought-stressed soybean nodules. *Plant Physiol,* Vol. 106, No. 3, pp. 949-955

Downie, J. A. (2005). Legume haemoglobins: symbiotic nitrogen fixation needs bloody nodules. *Curr Biol,* Vol. 15, No. 6, pp. R196-198

Duc, G. & Messager, A. (1989). Mutagenesis of pea (Pisum sativum L.) and the isolation of mutants for nodulation and nitrogen fixation. *Plant Science,* Vol. 60, No. 2, pp. 207-213

El Msehli, S., Lambert, A., Baldacci-Cresp, F., Hopkins, J., Boncompagni, E., Smiti, S. A., Herouart, D. & Frendo, P. (2011). Crucial role of (homo)glutathione in nitrogen fixation in Medicago truncatula nodules. *New Phytol,* in press

El Yahyaoui, F., Kuster, H., Ben Amor, B., Hohnjec, N., Puhler, A., Becker, A., Gouzy, J., Vernie, T., Gough, C., Niebel, A., Godiard, L. & Gamas, P. (2004). Expression profiling in Medicago truncatula identifies more than 750 genes differentially expressed during nodulation, including many potential regulators of the symbiotic program. *Plant Physiol,* Vol. 136, No. 2, pp. 3159-3176

Escuredo, P. R., Minchin, F. R., Gogorcena, Y., Iturbe-Ormaetxe, I., Klucas, R. V. & Becana, M. (1996). Involvement of Activated Oxygen in Nitrate-Induced Senescence of Pea Root Nodules. *Plant Physiol,* Vol. 110, No. 4, pp. 1187-1195

Evans, P. J., Gallesi, D., Mathieu, C., Hernandez, M. J., de Felipe, M., Halliwell, B. & Puppo, A. (1999). Oxidative stress occurs during soybean nodule senescence. *Planta,* Vol. 208, No.1, pp. 73-79

Fedorova, M., van de Mortel, J., Matsumoto, P. A., Cho, J., Town, C. D., VandenBosch, K. A., Gantt, J. S. & Vance, C. P. (2002). Genome-wide identification of nodule-specific transcripts in the model legume Medicago truncatula. *Plant Physiol,* Vol. 130, No. 2, pp. 519-537

Franssen, H. J., Vijn, I., Yang, W. C. & Bisseling, T. (1992). Developmental aspects of the Rhizobium-legume symbiosis. *Plant Mol Biol,* Vol. 19, No. 1, pp. 89-107

Fridovich, I. (1986). Biological effects of the superoxide radical. *Arch Biochem Biophys,* Vol. 247, No. 1, pp. 1-11

Fujikake, H. - Yamazaki, A., Ohtake, N., Sueyoshi, K., Matsuhashi, S., Ito, T., Mizuniwa, C., Kume, T., Hashimoto, S., Ishioka, N.-S., Watanabe, S., Osa, A., Sekine, T., Uchida, H., Tsuji, A. & Ohyama, T. (2003). Quick and reversible inhibition of soybean root nodule growth by nitrate involves a decrease in sucrose supply to nodules. *J Exp Bot,* Vol. 54, No. 386, pp. 1379-1388

Galibert, F., Finan, T. M., Long, S. R., Puhler, A., Abola, P., Ampe, F., Barloy-Hubler, F., Barnett, M. J., Becker, A., Boistard, P., Bothe, G., Boutry, M., Bowser, L., Buhrmester, J., Cadieu, E., Capela, D., Chain, P., Cowie, A., Davis, R. W., Dreano, S., Federspiel, N. A., Fisher, R. F., Gloux, S., Godrie, T., Goffeau, A., Golding, B., Gouzy, J., Gurjal, M., Hernandez-Lucas, I., Hong, A., Huizar, L., Hyman, R. W., Jones, T., Kahn, D., Kahn, M. L., Kalman, S., Keating, D. H., Kiss, E., Komp, C., Lelaure, V., Masuy, D., Palm, C., Peck, M. C., Pohl, T. M., Portetelle, D., Purnelle, B., Ramsperger, U., Surzycki, R., Thebault, P., Vandenbol, M., Vorholter, F. J., Weidner, S., Wells, D. H., Wong, K., Yeh, K. C. & Batut, J. (2001). The composite genome of the legume symbiont Sinorhizobium meliloti. *Science,* Vol. 293, No. 5530, pp. 668-672

Galvez, L., Gonzalez, E. M. & Arrese-Igor, C. (2005). Evidence for carbon flux shortage and strong carbon/nitrogen interactions in pea nodules at early stages of water stress. *J Exp Bot,* Vol. 56, No. 419, pp. 2551-2561

Gepstein, S. (2004). Leaf senescence--not just a 'wear and tear' phenomenon. *Genome Biol,* Vol. 5, No. 3, pp. 212

Gogorcena, Y., Iturbe-Ormaetxe, I., Escuredo, P. R. & Becana, M. (1995). Antioxidant defenses against activated oxygen in pea nodules subjected to water stress. *Plant Physiol,* Vol. 108, No. 2, pp. 753-759

Gogorcena, Y., Gordon, A. J., Escuredo, P. R., Minchin, F. R., Witty, J. F., Moran, J. F. & Becana, M. (1997). N_2 fixation, carbon metabolism and oxidative damage in nodules of dark stressed Common Bean plants. *Plant Physiol,* Vol. 113, No.4, pp. 1193-1201

Gonzalez, E. M., Gordon, A. J., James, C. L. & Arrese-Igor, C. (1995). The role of sucrose synthase in the response of soybean nodules to drought. *J Ex Bot,* Vol. 46, No. 10, pp. 1515-1523

Gonzalez, E. M., Galvez, L. & Arrese-Igor, C. (2001). Abscisic acid induces a decline in nitrogen fixation that involves leghaemoglobin, but is independent of sucrose synthase activity. *J Exp Bot,* Vol. 52, No. 355, pp. 285-293

Gordon, A. J., Minchin, F. R., Skot, L. & James, C. L. (1997). Stress-induced declines in soybean N_2 fixation are related to nodule sucrose synthase activity. *Plant Physiol,* Vol. 114, No. 3, pp. 937-946

Gordon, A. J., Skot, L., James, C. L. & Minchin, F. R. (2002). Short-term metabolic responses of soybean root nodules to nitrate. *J Exp Bot,* Vol. 53, No. 368, pp. 423-428

Groten, K., Vanacker, H., Dutilleul, C., Bastian, F., Bernard, S., Carzaniga, R. & Foyer, C. H. (2005). The roles of redox processes in pea nodule development and senescence. *Plant, Cell & Environment,* Vol. 28, No. 10, pp. 1293-1304

Groten, K., Dutilleul, C., van Heerden, P. D., Vanacker, H., Bernard, S., Finkemeier, I., Dietz, K. J. & Foyer, C. H. (2006). Redox regulation of peroxiredoxin and proteinases by ascorbate and thiols during pea root nodule senescence. *FEBS Lett,* Vol. 580, No. 5, pp. 1269-1276

Grzemski, W., Akowski, J. P. & Kahn, M. L. (2005). Probing the Sinorhizobium meliloti-alfalfa symbiosis using temperature-sensitive and impaired-function citrate synthase mutants. *Mol Plant Microbe Interact,* Vol. 18, No. 2, pp. 134-141

Guerin, V., Trinchant, J. C. & Rigaud, J. (1990). Nitrogen Fixation (C(2)H(2) Reduction) by Broad Bean (Vicia faba L.) Nodules and Bacteroids under Water-Restricted Conditions. *Plant Physiol,* Vol. 92, No. 3, pp. 595-601

Gunther, C., Schlereth, A., Udvardi, M. & Ott, T. (2007). Metabolism of reactive oxygen species is attenuated in leghemoglobin-deficient nodules of Lotus japonicus. *Mol Plant Microbe Interact,* Vol. 20, No. 12, pp. 1596-1603

Harrison, J., Jamet, A., Muglia, C. I., Van de Sype, G., Aguilar, O. M., Puppo, A. & Frendo, P. (2005). Glutathione plays a fundamental role in growth and symbiotic capacity of Sinorhizobium meliloti. *J Bacteriol,* Vol. 187, No. 1, pp. 168-174

Hause, B. & Schaarschmidt, S. (2009). The role of jasmonates in mutualistic symbioses between plants and soil-born microorganisms. *Phytochemistry,* Vol. 70, No. 13-14, pp. 1589-1599

He, J., Benedito, V. A., Wang, M., Murray, J. D., Zhao, P. X., Tang, Y. & Udvardi, M. K. (2009). The Medicago truncatula gene expression atlas web server. *BMC Bioinformatics,* Vol. 10, pp. 441

Horchani, F., Prevot, M., Boscari, A., Evangelisti, E., Meilhoc, E., Bruand, C., Raymond, P., Boncompagni, E., Aschi-Smiti, S., Puppo, A. & Brouquisse, R. (2011). Both plant and bacterial nitrate reductases contribute to nitric oxide production in Medicago truncatula nitrogen-fixing nodules. *Plant Physiol,* Vol. 155, No. 2, pp. 1023-1036

Ivanov, S., Fedorova, E. & Bisseling, T. (2010). Intracellular plant microbe associations: secretory pathways and the formation of perimicrobial compartments. *Curr Opin Plant Biol,* Vol. 13, No. 4, pp. 372-377

Jamet, A., Sigaud, S., Van de Sype, G., Puppo, A. & Herouart, D. (2003). Expression of the bacterial catalase genes during Sinorhizobium meliloti-Medicago sativa symbiosis and their crucial role during the infection process. *Mol Plant Microbe Interact,* Vol. 16, No. 3, pp. 217-225

Jebara, S., Jebara, M., Limam, F. & Aouani, M. E. (2005). Changes in ascorbate peroxidase, catalase, guaiacol peroxidase and superoxide dismutase activities in common bean (*Phaseolus vulgaris*) nodules under salt stress. *J Plant Physiol,* Vol. 162, No. 8, pp. 929-936

Jeudy, C., Ruffel, S., Freixes, S., Tillard, P., Santoni, A. L., Morel, S., Journet, E. P., Duc, G., Gojon, A., Lepetit, M. & Salon, C. (2009). Adaptation of Medicago truncatula to nitrogen limitation is modulated via local and systemic nodule developmental responses. *New Phytol,* Vol. 185, No. 3, pp. 817-828

Jones, K. M., Kobayashi, H., Davies, B. W., Taga, M. E. & Walker, G. C. (2007). How rhizobial symbionts invade plants: the Sinorhizobium-Medicago model. *Nat Rev Microbiol,* Vol. 5, No. 8, pp. 619-633

Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Asamizu, E., Kato, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Idesawa, K., Ishikawa, A., Kawashima, K., Kimura, T., Kishida, Y., Kiyokawa, C., Kohara, M., Matsumoto, M., Matsuno, A., Mochizuki, Y., Nakayama, S., Nakazaki, N., Shimpo, S., Sugimoto, M., Takeuchi, C., Yamada, M. & Tabata, S. (2000). Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium Mesorhizobium loti. *DNA Res,* Vol. 7, No. 6, pp. 331-338

Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Minamisawa, K., Uchiumi, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Idesawa, K., Iriguchi, M., Kawashima, K., Kohara, M., Matsumoto, M., Shimpo, S., Tsuruoka, H., Wada, T., Yamada, M. & Tabata, S. (2002). Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium Bradyrhizobium japonicum USDA110. *DNA Res,* Vol. 9, No. 6, pp. 189-197

Kardailsky, I. V. & Brewin, N. J. (1996). Expression of cysteine protease genes in pea nodule development and senescence. *Mol Plant Microbe Interact,* Vol. 9, No. 8, pp. 689-695

Karunakaran, R., Ramachandran, V. K., Seaman, J. C., East, A. K., Mouhsine, B., Mauchline, T. H., Prell, J., Skeffington, A. & Poole, P. S. (2009). Transcriptomic analysis of Rhizobium leguminosarum biovar viciae in symbiosis with host plants Pisum sativum and Vicia cracca. *J Bacteriol,* Vol. 191, No. 12, pp. 4002-4014

Kereszt, A., Mergaert, P., Maroti, G. & Kondorosi, E. (2011). Innate immunity effectors and virulence factors in symbiosis. *Current opinion in microbiology,* Vol. 14, No. 1, pp. 76-81

Kondorosi, E., Roudier, F. & Gendreau, E. (2000). Plant cell-size control: growing by ploidy? *Curr Opin Plant Biol,* Vol. 3, No. 6, pp. 488-492

Krusell, L., Madsen, L. H., Sato, S., Aubert, G., Genua, A., Szczyglowski, K., Duc, G., Kaneko, T., Tabata, S., de Bruijn, F., Pajuelo, E., Sandal, N. & Stougaard, J. (2002). Shoot control of root development and nodulation is mediated by a receptor-like kinase. *Nature,* Vol. 420, No. 6914, pp. 422-426

Kuster, H., Vieweg, M. F., Manthey, K., Baier, M. C., Hohnjec, N. & Perlick, A. M. (2007). Identification and expression regulation of symbiotically activated legume genes. *Phytochemistry,* Vol. 68, No. 1, pp. 8-18

Kuzma, M. M., Topunov, A. F. & Layzell, D. B. (1995). Effects of Temperature on Infected Cell O2 Concentration and Adenylate Levels in Attached Soybean Nodules. *Plant Physiol,* Vol. 107, No. 4, pp. 1209-1216

Larrainzar, E., Wienkoop, S., Weckwerth, W., Ladrera, R., Arrese-Igor, C. & Gonzalez, E. M. (2007). *Medicago truncatula* root nodule proteome analysis reveals differential plant and bacteroid responses to drought stress. *Plant Physiol,* Vol. 144, No. 3, pp. 1495-1507

Lawn, R. J. & Brun, W. A. (1977). Symbiotic Nitrogen Fixation in Soybeans. I. Effect of Photosynthetic Source-Sink Manipulations1. *Crop Sci.,* Vol. 14, No. 1, pp. 11

Lehtovaara, P. & Perttila, U. (1978). Bile-pigment formation from different leghaemoglobins. Methine-bridge specificity of coupled oxidation. *Biochem J,* Vol. 176, No. 2, pp. 359-364

Li, Y., Zhou, L., Li, Y., Chen, D., Tan, X., Lei, L. & Zhou, J. (2008). A nodule-specific plant cysteine proteinase, AsNODF32, is involved in nodule senescence and nitrogen fixation activity of the green manure legume Astragalus sinicus. *New Phytol,* Vol. 180, No. 1, pp. 185-192

Limpens, E., Ivanov, S., van Esse, W., Voets, G., Fedorova, E. & Bisseling, T. (2009). Medicago N2-fixing symbiosomes acquire the endocytic identity marker Rab7 but delay the acquisition of vacuolar identity. *Plant Cell,* Vol. 21, No. 9, pp. 2811-2828

Lister, R., Gregory, B. D. & Ecker, J. R. (2009). Next is now: new technologies for sequencing of genomes, transcriptomes, and beyond. *Curr Opin Plant Biol,* Vol. 12, No. 2, pp. 107-118

Liu, C. T., Lee, K. B., Wang, Y. S., Peng, M. H., Lee, K. T., Suzuki, S., Suzuki, T. & Oyaizu, H. (2011). Involvement of the azorhizobial chromosome partition gene (parA) in the onset of bacteroid differentiation during Sesbania rostrata stem nodule development. *Applied and environmental microbiology,* Vol. 77, No. 13, pp. 4371-4382

Lodwig, E. & Poole, P. S. (2003). Metabolism of Rhizobium bacteroids. *Crit Rev Plant Sci,* Vol. 22, No.1, pp. 37-78

Lohman, K. N., Gan, S., John, M. C. & Amasino, R. M. (1994). Molecular analysis of natural leaf senescence in Arabidopsis thaliana. *Physiologia Plantarum,* Vol. 92, No. 2, pp. 322

Long, S. R. (2001). Genes and signals in the rhizobium-legume symbiosis. *Plant Physiol,* Vol. 125, No. 1, pp. 69-72

Lopez, M., Herrera-Cervera, J. A., Iribarne, C., Tejera, N. A. & Lluch, C. (2008). Growth and nitrogen fixation in *Lotus japonicus* and *Medicago truncatula* under NaCl stress: Nodule carbon metabolism. *J Plant Physiol,* Vol. 165, No. 6, pp. 641-650

Lopez, M., Tejera, N. A. & Lluch, C. (2009). Validamycin A improves the response of Medicago truncatula plants to salt stress by inducing trehalose accumulation in the root nodules. *J Plant Physiol,* Vol. 166, No. 11, pp. 1218-1222

Loscos, J., Matamoros, M. A. & Becana, M. (2008). Ascorbate and homoglutathione metabolism in common bean nodules under stress conditions and during natural senescence. *Plant Physiol,* Vol. 146, No. 3, pp. 1282-1292

Lucas, M. M., Van de Sype, G., Hérouart, D., Hernandez, M. J., Puppo, A. & de Felipe, M. R. (1998). Immunolocalization of ferritin in determinate and indeterminate legume root nodules. *Protoplasma,* Vol. 204, No. 1, pp. 61-70

Luo, L., Yao, S. Y., Becker, A., Ruberg, S., Yu, G. Q., Zhu, J. B. & Cheng, H. P. (2005). Two new Sinorhizobium meliloti LysR-type transcriptional regulators required for nodulation. *J Bacteriol,* Vol. 187, No. 13, pp. 4562-4572

L'Taief, B., Sifi, B., Zaman-Allah, M., Drevon, J. J. & Lachaal, M. (2007). Effect of salinity on root-nodule conductance to the oxygen diffusion in the *Cicer arietinum-Mesorhizobium ciceri* symbiosis. *J Plant Physiol,* Vol. 164, No. 8, pp. 1028-1036

Malik, N. S., Pfeiffer, N. E., Williams, D. R. & Wagner, F. W. (1981). Peptidohydrolases of Soybean Root Nodules: Identification, separation and partial characterisation of enzymes from bacteroid-free extracts. *Plant Physiol,* Vol. 68, No. 2, pp. 386-392

Marino, D., Gonzalez, E. M. & Arrese-Igor, C. (2006). Drought effects on carbon and nitrogen metabolism of pea nodules can be mimicked by paraquat: evidence for the occurrence of two regulation pathways under oxidative stresses. *J Exp Bot,* Vol. 57, No. 3, pp. 665-673

Marino, D., Frendo, P., Ladrera, R., Zabalza, A., Puppo, A., Arrese-Igor, C. & Gonzalez, E. M. (2007). Nitrogen fixation control under drought stress. Localized or systemic? *Plant Physiol,* Vol. 143, No. 4, pp. 1968-1974

Marino, D., Hohnjec, N., Kuster, H., Moran, J. F., Gonzalez, E. M. & Arrese-Igor, C. (2008). Evidence for transcriptional and post-translational regulation of sucrose synthase in pea nodules by the cellular redox state. *Mol Plant Microbe Interact,* Vol. 21, No. 5, pp. 622-630

Marino, D., Pucciariello, C., Puppo, A. & Frendo, P. (2009).The Redox State, a Referee of the Legume-Rhizobia Symbiotic Game. In *Advances in Botanical Research: Oxidative Stress and Redox Regulation in Plants,* J. P. Jacquot, pp. 115-151, Burlington: Academic Press

Matamoros, M. A., Baird, L. M., Escuredo, P. R., Dalton, D. A., Minchin, F. R., Iturbe-Ormaetxe, I., Rubio, M. C., Moran, J. F., Gordon, A. J. & Becana, M. (1999). Stress induced legume root nodule senescence. Physiological, biochemical and structural alterations. *Plant Physiol,* Vol. 121, No.1, pp. 97-112

Maunoury, N., Kondorosi, A., Kondorosi, E. & Mergaert, P. (2008).Cell biology of nodule infection and development. In *Nitrogen-fixing Leguminous Symbioses* E. K. James, J. I. Sprent, W. E. Dilworth and N. W.E., pp. 153–189, Springer, the Netherlands

Maunoury, N., Redondo-Nieto, M., Bourcy, M., Van de Velde, W., Alunni, B., Laporte, P., Durand, P., Agier, N., Marisa, L., Vaubert, D., Delacroix, H., Duc, G., Ratet, P., Aggerbeck, L., Kondorosi, E. & Mergaert, P. (2010). Differentiation of symbiotic cells and endosymbionts in Medicago truncatula nodulation are coupled to two transcriptome-switches. *PLoS One,* Vol. 5, No. 3, pp. e9519

Mergaert, P., Nikovics, K., Kelemen, Z., Maunoury, N., Vaubert, D., Kondorosi, A. & Kondorosi, E. (2003). A novel family in Medicago truncatula consisting of more than 300 nodule-specific genes coding for small, secreted polypeptides with conserved cysteine motifs. *Plant Physiol,* Vol. 132, No. 1, pp. 161-173

Mergaert, P., Uchiumi, T., Alunni, B., Evanno, G., Cheron, A., Catrice, O., Mausset, A. E., Barloy-Hubler, F., Galibert, F., Kondorosi, A. & Kondorosi, E. (2006). Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the Rhizobium-legume symbiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A,* Vol. 103, No. 13, pp. 5230-5235

Mhadhbi, H., Fotopoulos, V., Mylona, P. V., Jebara, M., Elarbi Aouani, M. & Polidoros, A. N. (2011). Antioxidant gene-enzyme responses in Medicago truncatula genotypes with different degree of sensitivity to salinity. *Physiol Plant,* Vol. 141, No. 3, pp. 201-214

Minchin, F. R., Minguez, M. I., Sheehy, J. E., Witty, J. F. & SkÃ˜T, L. (1986). Relationships Between Nitrate and Oxygen Supply in Symbiotic Nitrogen Fixation by White Clover. *J Ex Bot,* Vol. 37, No. 8, pp. 1103-1113

Minchin, F. R., Becana, M. & Sprent, J. I. (1989). Short-term inhibition of legume N_2 fixation by nitrate. II. Nitrate effects on nodule oxygen diffusion. *Planta,* Vol. 180, No.1, pp. 46-52

Mitsui, H., Sato, T., Sato, Y., Ito, N. & Minamisawa, K. (2004). Sinorhizobium meliloti RpoH1 is required for effective nitrogen-fixing symbiosis with alfalfa. *Mol Genet Genomics,* Vol. 271, No. 4, pp. 416-425

Moris, M., Braeken, K., Schoeters, E., Verreth, C., Beullens, S., Vanderleyden, J. & Michiels, J. (2005). Effective symbiosis between Rhizobium etli and Phaseolus vulgaris requires the alarmone ppGpp. *J Bacteriol,* Vol. 187, No. 15, pp. 5460-5469

Mortier, V., Holsters, M. & Goormachtig, S. (2011). Never too many? How legumes control nodule numbers. *Plant Cell Environ,* in press

Muglia, C., Comai, G., Spegazzini, E., Riccillo, P. M. & Aguilar, O. M. (2008). Glutathione produced by Rhizobium tropici is important to prevent early senescence in common bean nodules. *FEMS microbiology letters,* Vol. 286, No. 2, pp. 191-198

Naito, Y., Fujie, M., Usami, S., Murooka, Y. & Yamada, T. (2000). The involvement of a cysteine proteinase in the nodule development in Chinese milk vetch infected with Mesorhizobium huakuii subsp. rengei. *Plant Physiol,* Vol. 124, No. 3, pp. 1087-1096

Naya, L., Ladrera, R., Ramos, J., Gonzalez, E. M., Arrese-Igor, C., Minchin, F. R. & Becana, M. (2007). The response of carbon metabolism and antioxidant defenses of alfalfa nodules to drought stress and to the subsequent recovery of plants. *Plant Physiol,* Vol. 144, No. 2, pp. 1104-1114

Novak, K. (2010). Early action of pea symbiotic gene NOD3 is confirmed by adventitious root phenotype. *Plant Sci,* Vol. 179, No. 5, pp. 472-478

Oldroyd, G. E., Murray, J. D., Poole, P. S. & Downie, J. A. (2011). The Rules of Engagement in the Legume-Rhizobial Symbiosis. *Annu Rev Genet,* Vol.45, in press

Ott, T., van Dongen, J. T., Gunther, C., Krusell, L., Desbrosses, G., Vigeolas, H., Bock, V., Czechowski, T., Geigenberger, P. & Udvardi, M. K. (2005). Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. *Curr Biol,*Vol. 15, No. 6, pp. 531-535

Ott, T., Sullivan, J., James, E. K., Flemetakis, E., Gunther, C., Gibon, Y., Ronson, C. & Udvardi, M. (2009). Absence of symbiotic leghemoglobins alters bacteroid and plant cell differentiation during development of Lotus japonicus root nodules. *Mol Plant Microbe Interact,* Vol. 22, No. 7, pp. 800-808

Pauly, N., Pucciariello, C., Mandon, K., Innocenti, G., Jamet, A., Baudouin, E., Herouart, D., Frendo, P. & Puppo, A. (2006). Reactive oxygen and nitrogen species and glutathione: key players in the legume-Rhizobium symbiosis. *J Exp Bot,* Vol. 57, No. 8, pp. 1769-1776

Penmetsa, R. V., Frugoli, J. A., Smith, L. S., Long, S. R. & Cook, D. R. (2003). Dual genetic pathways controlling nodule number in Medicago truncatula. *Plant Physiol,* Vol. 131, No. 3, pp. 998-1008

Perez Guerra, J. C., Coussens, G., De Keyser, A., De Rycke, R., De Bodt, S., Van De Velde, W., Goormachtig, S. & Holsters, M. (2010). Comparison of developmental and stress-induced nodule senescence in Medicago truncatula. *Plant Physiol,* Vol. 152, No. 3, pp. 1574-1584

Perret, X., Staehelin, C. & Broughton, W. J. (2000). Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol Mol Biol Rev,* Vol. 64, No. 1, pp. 180-201

Pessi, G., Ahrens, C. H., Rehrauer, H., Lindemann, A., Hauser, F., Fischer, H. M. & Hennecke, H. (2007). Genome-wide transcript analysis of Bradyrhizobium japonicum bacteroids in soybean root nodules. *Mol Plant Microbe Interact,* Vol. 20, No. 11, pp. 1353-1363

Pfeiffer, N. E., Torres, C. M. & Wagner, F. W. (1983). Proteolytic Activity in Soybean Root Nodules : Activity in Host Cell Cytosol and Bacteroids throughout Physiological Development and Senescence. *Plant Physiol,* Vol. 71, No. 4, pp. 797-802

Pladys, D. & Rigaud, J. (1985). Senescence in French-bean nodules: Occurrence of different proteolytic activities. *Physiologia Plantarum,* Vol. 63, No. 1, pp. 43

Pladys, D., Dimitrijevic, L. & Rigaud, J. (1991). Localization of a protease in protoplast preparations in infected cells of French bean nodules. *Plant Physiol,* Vol. 97, No. 3, pp. 1174-1180

Pladys, D. & Vance, C. P. (1993). Proteolysis during Development and Senescence of Effective and Plant Gene-Controlled Ineffective Alfalfa Nodules. *Plant Physiol,* Vol. 103, No. 2, pp. 379-384

Prell, J. & Poole, P. (2006). Metabolic changes of rhizobia in legume nodules. *Trends Microbiol* Vol. 14, No. 4, pp. 161-168

Prell, J., White, J. P., Bourdes, A., Bunnewell, S., Bongaerts, R. J. & Poole, P. S. (2009). Legumes regulate Rhizobium bacteroid development and persistence by the supply of branched-chain amino acids. *Proc Natl Acad Sci USA,*Vol. 106, No. 30, pp. 12477-12482

Puppo, A., Rigaud, J. & Job, D. (1981). Role of superoxide anion in leghemoglobin autoxidation. *Plant Science Letters,* Vol. 22, No. 4, pp. 353

Puppo, A. & Halliwell, B. (1988). Formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide in the presence of iron. Is haemoglobin a biological Fenton reagent? *Biochem J*, Vol. 249, No. 1, pp. 185-190

Puppo, A., Groten, K., Bastian, F., Carzaniga, R., Soussi, M., Lucas, M. M., de Felipe, M. R., Harrison, J., Vanacker, H. & Foyer, C. H. (2005). Legume nodule senescence: roles for redox and hormone signalling in the orchestration of the natural aging process. *New Phytol*, Vol. 165, No. 3, pp. 683-701

Raghavendra, A. S., Gonugunta, V. K., Christmann, A. & Grill, E. (2010). ABA perception and signalling. *Trends Plant Sci*, Vol. 15, No. 7, pp. 395-401

Redondo, F. J., de la Pena, T. C., Morcillo, C. N., Lucas, M. M. & Pueyo, J. J. (2009). Overexpression of flavodoxin in bacteroids induces changes in antioxidant metabolism leading to delayed senescence and starch accumulation in alfalfa root nodules. *Plant Physiol*,Vol. 149, No. 2, pp. 1166-1178

Reinbothe, C., Springer, A., Samol, I. & Reinbothe, S. (2009). Plant oxylipins: role of jasmonic acid during programmed cell death, defence and leaf senescence. *Febs J*, Vol. 276, No. 17, pp. 4666-4681

Reyrat, J. M., David, M., Blonski, C., Boistard, P. & Batut, J. (1993). Oxygen-regulated in vitro transcription of Rhizobium meliloti nifA and fixK genes. *J Bacteriol*, Vol. 175, No. 21, pp. 6867-6872

Rubio, M. C., Gonzalez, E. M., Minchin, F. R., Webb, K. J., Arrese-Igor, C., Ramos, J. & Becana, M. (2002). Effects of water stress on antioxidant enzymes of leaves and nodules of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutases. *Physiol Plant*, Vol. 115, No. 4, pp. 531-540

Saeki, K. (2011). Rhizobial measures to evade host defense strategies and endogenous threats to persistent symbiotic nitrogen fixation: a focus on two legume-rhizobium model systems. *Cell Mol Life Sci*, Vol. 68, No. 8, pp. 1327-1339

Sanchez, D. H., Pieckenstain, F. L., Escaray, F., Erban, A., Kraemer, U., Udvardi, M. K. & Kopka, J. (2011). Comparative ionomics and metabolomics in extremophile and glycophytic Lotus species under salt stress challenge the metabolic pre-adaptation hypothesis. *Plant Cell Environ*, Vol. 34, No. 4, pp. 605-617

Santos, R., Herouart, D., Puppo, A. & Touati, D. (2000). Critical protective role of bacterial superoxide dismutase in rhizobium-legume symbiosis. *Molecular microbiology*, Vol. 38, No. 4, pp. 750-759

Sato, S., Nakamura, Y., Kaneko, T., Asamizu, E., Kato, T., Nakao, M., Sasamoto, S., Watanabe, A., Ono, A., Kawashima, K., Fujishiro, T., Katoh, M., Kohara, M., Kishida, Y., Minami, C., Nakayama, S., Nakazaki, N., Shimizu, Y., Shinpo, S., Takahashi, C., Wada, T., Yamada, M., Ohmido, N., Hayashi, M., Fukui, K., Baba, T., Nakamichi, T., Mori, H. & Tabata, S. (2008). Genome structure of the legume, Lotus japonicus. *DNA Res*,Vol. 15, No. 4, pp. 227-239

Schauser, L., Udvardi, M., Tabata, S. & Stougaard, J. (2008).Legume genomics relevant to N_2 fixation. In *Nitrogen-fixing Leguminous Symbioses*, S. J. James EK, Dilworth WE, Newton WE, pp. 211–233, Springer, the Netherlands

Schell, M. A. (1993). Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. *Annu Rev Microbiol*, Vol. 47, pp. 597-626

Schmutz, J., Cannon, S. B., Schlueter, J., Ma, J., Mitros, T., Nelson, W., Hyten, D. L., Song, Q., Thelen, J. J., Cheng, J., Xu, D., Hellsten, U., May, G. D., Yu, Y., Sakurai, T.,

Umezawa, T., Bhattacharyya, M. K., Sandhu, D., Valliyodan, B., Lindquist, E., Peto, M., Grant, D., Shu, S., Goodstein, D., Barry, K., Futrell-Griggs, M., Abernathy, B., Du, J., Tian, Z., Zhu, L., Gill, N., Joshi, T., Libault, M., Sethuraman, A., Zhang, X. C., Shinozaki, K., Nguyen, H. T., Wing, R. A., Cregan, P., Specht, J., Grimwood, J., Rokhsar, D., Stacey, G., Shoemaker, R. C. & Jackson, S. A. (2010). Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature,* Vol. 463, No. 7278, pp. 178-183

Schneiker-Bekel, S., Wibberg, D., Bekel, T., Blom, J., Linke, B., Neuweger, H., Stiens, M., Vorholter, F. J., Weidner, S., Goesmann, A., Puhler, A. & Schluter, A. (2011). The complete genome sequence of the dominant Sinorhizobium meliloti field isolate SM11 extends the S. meliloti pan-genome. *J Biotechnol,* Vol. 155, No. 1, pp. 20-33

Searle, I. R., Men, A. E., Laniya, T. S., Buzas, D. M., Iturbe-Ormaetxe, I., Carroll, B. J. & Gresshoff, P. M. (2003). Long-distance signaling in nodulation directed by a CLAVATA1-like receptor kinase. *Science,* Vol. 299, No. 5603, pp. 109-112

Serraj, R. & Sinclair, T. R. (1996). Inhibition of nitrogenase activity and oxygen permeability by water deficit. *J Exp Bot,* Vol. 47, No., pp. 1067-1073

Serraj, R., Vadez, V. V., Denison, R. F. & Sinclair, T. R. (1999). Involvement of ureides in nitrogen fixation inhibition in soybean. *Plant Physiol,* Vol. 119, No. 1, pp. 289-296

Sigaud, S., Becquet, V., Frendo, P., Puppo, A. & Herouart, D. (1999). Differential regulation of two divergent Sinorhizobium meliloti genes for HPII-like catalases during free-living growth and protective role of both catalases during symbiosis. *J Bacteriol,* Vol. 181, No. 8, pp. 2634-2639

Sobrevals, L., Muller, P., Fabra, A. & Castro, S. (2006). Role of glutathione in the growth of Bradyrhizobium sp. (peanut microsymbiont) under different environmental stresses and in symbiosis with the host plant. *Canadian journal of microbiology,* Vol. 52, No. 7, pp. 609-616

Soussi, M., Ocana, A. & Lluch, C. (1998). Effects of salt stress on growth, photosynthesis and nitrogen fixation in chick-pea (Cicer arietinum L.). *J Ex Bot,* Vol. 49, No. 325, pp. 1329-1337

Streeter, J. & Wong, P. P. (1988). Inhibition of legume nodule formation and N2 fixation by nitrate. *Critical Reviews in Plant Sciences,* Vol. 7, No. 1, pp. 1-23

Swaraj, K., Dhandi, S. & Sheokand, S. (1995). Relationship between defense mechanism against activated oxygen species and nodule functioning with progress in plant and nodule development in Cajanus cajan L. Millsp. *Plant Sci,* Vol. 112, No. 1, pp. 65

Swaraj, K. & Bishnoi, N. R. (1999). Effect of salt stress on nodulation and nitrogen fixation in legumes. *Indian J Exp Biol,* Vol. 37, No. 9, pp. 843-848

Thomas, S. G., Phillips, A. L. & Hedden, P. (1999). Molecular cloning and functional expression of gibberellin 2- oxidases, multifunctional enzymes involved in gibberellin deactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A,*Vol. 96, No. 8, pp. 4698-4703

Timmers, A. C., Soupene, E., Auriac, M. C., de Billy, F., Vasse, J., Boistard, P. & Truchet, G. (2000). Saprophytic intracellular rhizobia in alfalfa nodules. *Mol Plant Microbe Interact,* Vol. 13, No. 11, pp. 1204-1213

Torres-Quesada, O., Oruezabal, R. I., Peregrina, A., Jofre, E., Lloret, J., Rivilla, R., Toro, N. & Jimenez-Zurdo, J. I. (2010). The Sinorhizobium meliloti RNA chaperone Hfq influences central carbon metabolism and the symbiotic interaction with alfalfa. *BMC microbiology,* Vol. 10, pp. 71

Van de Velde, W., Guerra, J. C., De Keyser, A., De Rycke, R., Rombauts, S., Maunoury, N., Mergaert, P., Kondorosi, E., Holsters, M. & Goormachtig, S. (2006). Aging in legume symbiosis. A molecular view on nodule senescence in Medicago truncatula. *Plant Physiol,* Vol. 141, No. 2, pp. 711-720

Van de Velde, W., Zehirov, G., Szatmari, A., Debreczeny, M., Ishihara, H., Kevei, Z., Farkas, A., Mikulass, K., Nagy, A., Tiricz, H., Satiat-Jeunemaitre, B., Alunni, B., Bourge, M., Kucho, K., Abe, M., Kereszt, A., Maroti, G., Uchiumi, T., Kondorosi, E. & Mergaert, P. (2010). Plant peptides govern terminal differentiation of bacteria in symbiosis. *Science,* Vol. 327, No. 5969, pp. 1122-1126

van Heerden, P. D., Kiddle, G., Pellny, T. K., Mokwala, P. W., Jordaan, A., Strauss, A. J., de Beer, M., Schluter, U., Kunert, K. J. & Foyer, C. H. (2008). Roles for the regulation of respiration and the oxygen diffusion barrier in soybean in the protection of symbiotic nitrogen fixation from chilling -induced inhibition and shoots from premature senescence. *Plant Physiol,* Vol. 148, No. 1, pp. 316-327

Vasse, J., de Billy, F., Camut, S. & Truchet, G. (1990). Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules. *J Bacteriol,* Vol. 172, No. 8, pp. 4295-4306

Vauclare, P., Bligny, R., Gout, E., De Meuron, V. & Widmer, F. (2010). Metabolic and structural rearrangement during dark-induced autophagy in soybean (Glycine max L.) nodules: an electron microscopy and 31P and 13C nuclear magnetic resonance study. *Planta,* Vol. 231, No. 6, pp. 1495-1504

Vessey, J. K., Walsh, K. B. & Layzell, D. B. (1988). Oxygen limitation of nitrogen fixation in stem-girdled and nitrate-treated soybean. *Physiol Plant,* Vol. 73, No., pp. 113-121

Walsh, K. B. & Layzell, D. B. (1986). Carbon and nitrogen assimilation and partitioning in soybeans exposed to low root temperatures. *Plant Physiol,* Vol. 80, No. 1, pp. 249-255

Webb, C. J., Chan-Weiher, C. & Johnson, D. A. (2008). Isolation of a novel family of genes related to 2-oxoglutarate-dependent dioxygenases from soybean and analysis of their expression during root nodule senescence. *J Plant Physiol,* Vol. 165, No. 16, pp. 1736-1744

White, J., Prell, J., James, E. K. & Poole, P. (2007). Nutrient sharing between symbionts. *Plant Physiol,* Vol. 144, No. 2, pp. 604-614

Zurbriggen, M. D., Tognetti, V. B., Fillat, M. F., Hajirezaei, M. R., Valle, E. M. & Carrillo, N. (2008). Combating stress with flavodoxin: a promising route for crop improvement. *Trends Biotechnol,* Vol. 26, No. 10, pp. 531-537