



THÈSE

**En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE
Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier**

**Présentée et soutenue par
Bryan RUIZ-CONQUET**

Le 3 mai 2022

**Synthèse et rôle de l'oxyde nitrique d'origine bactérienne dans la
symbiose fixatrice d'azote *Ensifer meliloti* / *Medicago truncatula***

Ecole doctorale : **SEVAB - Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et
Bioingenieries**

Spécialité : **Developpement des plantes, interactions biotiques et abiotiques**

Unité de recherche :

LIPME - Laboratoire des Interactions Plantes-Microbes-Environnement

Thèse dirigée par
Eliane MEILHOC

Jury

M. Eric GIRAUD, Rapporteur
Mme Feth el Zahar HAICHAR, Rapporteur
M. Jérôme SANTOLINI, Examineur
Mme Åsa FROSTEGÅRD, Examinatrice
Mme Eliane MEILHOC, Directrice de thèse
M. Matthieu ARLAT, Président

RESUME

Auteur : Bryan Ruiz

Titre : Synthèse et rôle de l'oxyde nitrique d'origine bactérienne dans la symbiose fixatrice d'azote *Ensifer meliloti* / *Medicago truncatula*.

Directeur de thèse : Eliane Meilhoc

Le monoxyde d'azote (NO) est une petite molécule gazeuse extrêmement réactive intervenant dans de nombreux processus biologiques. Dans les interactions hôte-pathogènes, le NO peut être produit par les deux partenaires et fait partie de l'arsenal de défense de l'hôte tout comme il fait aussi partie des armes d'attaque du pathogène. Les pathogènes se sont aussi adaptés en mettant en place des systèmes de réponse au NO produit par l'hôte. Dans les interactions symbiotiques plante-microorganismes, du NO a été également détecté. C'est le cas durant la symbiose fixatrice d'azote entre la bactérie *Ensifer meliloti* et la légumineuse *Medicago truncatula*. Dans cette interaction il a été montré que non seulement le NO est important lors de l'infection par le symbionte, mais qu'il peut aussi avoir un rôle à des étapes plus tardives comme lors de la fixation d'azote ou de la senescence nodulaire. Dans les nodules, le NO est produit par les deux partenaires avec une contribution d'environ 30% pour la bactérie. Chez la plante, des travaux récents ont montré que la synthèse de NO reposait en grande partie sur des nitrate réductases couplées à la chaîne mitochondriale de transfert d'électrons. Coté bactérien, seule la voie de dénitrification était connue comme voie de synthèse possible du NO. Ce travail de thèse pose deux questions centrales : Quelles sont les voies de synthèse du NO chez *E. meliloti* ? et quel est le rôle du NO produit par les bactéries dans l'interaction symbiotique ? Nous avons montré que *E. meliloti* ne possède pas de NO synthase capable de produire du NO comme il en existe chez certaines bactéries pathogènes. Seule la voie de dénitrification est responsable de la synthèse du NO chez *E. meliloti* en vie libre et durant la symbiose. Nous avons aussi montré que la bactérie possède une voie assimilatrice du nitrate fonctionnelle, permettant de contribuer à la production de NO en augmentant la quantité de nitrite disponible pour alimenter la voie de dénitrification. La voie assimilatrice est active aussi bien en aérobie qu'en conditions micro-aérobiques mais ne contribuerait pas à la production de NO dans les nodules symbiotiques. Des résultats préliminaires montrent que cette voie serait régulée par un système à deux composants mais aussi, de façon originale, par un ARN non codant. Enfin nous avons montré que le NO produit par la bactérie ne présente pas de rôle essentiel, ni durant les étapes précoces, ni dans les étapes plus tardives de la symbiose. L'ensemble des résultats nous permet de proposer un modèle des voies de production de NO chez *E. meliloti* et suggère que dans les interactions symbiotiques le NO bactérien ne joue pas un rôle aussi déterminant que dans les interactions hôtes-pathogènes.

Laboratoire : Laboratoire des interactions plantes microbes environnement, INRAE/CNRS, Chemin de Borderouge, 31326 Castanet-Tolosan Cedex.

RESUME

Nitric oxide (NO) is a small, highly reactive gaseous molecule involved in many biological processes. In host-pathogen interactions, NO can be produced by both partners and is part of the host defense arsenal but can also be used by the pathogen as a weapon for a successful infection. In addition, pathogens have evolved responses consisting in adaptation to NO or degradation of this toxic molecule. In symbiotic plant-microorganism interactions, NO has also been detected. Indeed, during the nitrogen-fixing symbiosis between the bacterium *Ensifer meliloti* and the model legume *Medicago truncatula*, it has been shown that not only NO is important during the infection of the plant root by the symbiont, but also that it can play a role at later stages such as during nitrogen fixation or nodule senescence. In nodules, NO is produced by both partners with a contribution of about 30% by the bacteria. In plants, recent work has shown that NO synthesis is essentially based on nitrate reductases coupled to the mitochondrial electron transfer chain. On the bacterial side, only the denitrification pathway was known as a possible NO synthesis pathway. This thesis work focuses on two main questions: Are there different NO synthesis pathways in *E. meliloti*? and what is the role of bacterial NO in the symbiotic interaction? We have shown that *E. meliloti* does not possess a NO synthase capable of producing NO as it can be found in some pathogenic bacteria. Denitrification is the only pathway involved in NO synthesis in *E. meliloti* either in its free life or during symbiosis. We have also shown that the bacterium displays a functional nitrate assimilatory pathway which contributes to NO production by increasing the amount of nitrite available to feed the denitrification pathway. The assimilatory pathway is active under both aerobic and microaerobic conditions, however it does not contribute to NO production in symbiotic root nodules of legumes. Preliminary results show that this pathway is regulated by a two-component system but could also be regulated by a non-coding RNA. Finally, we have shown that NO produced by the bacterium does not play an essential role, neither during the early stages, nor in the later stages of symbiosis. Altogether, these results allow us to propose a model of the NO production pathways in *E. meliloti* and suggest that in symbiotic interactions, bacterial NO does not play such a determining role as observed in host-pathogen interactions.

Remerciements

Tout d'abord, je remercie tous les membres du jury, Feth el Zahar Haichar, Eric Giraud, Asa Frostegard et Jérôme Santolini, qui ont accepté d'évaluer mes travaux de thèses et de participer à la soutenance. Je tiens à remercier particulièrement Matthieu Arlat de faire partie du jury, mais aussi pour ce qu'il m'a enseigné durant mes études de microbiologie à l'université Paul Sabatier et pour sa recommandation qui a participé à mon arrivée au laboratoire LIPME. Je remercie aussi Marie-Pierre Castanie-Cornet, Philippe Rousseau, Claude Guttierrez pour le soutien et pour m'avoir enseigné la microbiologie et la génétique avec plaisir. Je n'aurais jamais pensé arriver jusque-là, mais comme a pu le dire Matthieu « L'université donne une chance à tous. ».

Je remercie infiniment Eliane Meilhoc « ma chef » pour toute l'aide qu'elle m'a apportée durant la thèse. Je tiens à te remercier pour ta bienveillance et ta gentillesse. Tu m'as beaucoup appris et tu m'as fait grandir durant ces 4 années. C'était un plaisir de travailler avec toi et de partager ta bonne humeur. Je te remercie de m'avoir fait confiance et de m'avoir laissé une grande liberté durant cette thèse. Nos discussions et nos rigolades, même dans des moments pas forcément faciles, vont me manquer.

Je remercie Laurent Sauviac qui m'a encadré depuis mon arrivée dans l'équipe. Tu m'as appris énormément techniquement et scientifiquement. Je te remercie aussi pour ton soutien, l'encouragement et pour les moments de convivialités. J'espère avoir été un bon « Padawan » et un jour, être aussi important dans une équipe de recherche que toi tu l'es pour la nôtre.

Je remercie Claude Bruand (Chef d'équipe), pour m'avoir accueilli dans l'équipe et pour le suivi de mon travail. Je te remercie aussi pour ta gentillesse, ton écoute et tes encouragements. Je remercie tous les membres actuels et anciens de l'équipe RLE pour leurs implications de près ou de loin dans mon travail et surtout la bonne humeur. Merci à Benjamin, Frans, Thomas, Erin, Melissa, Anne-Claire, Claire, Antoine, ... (merci à tous). Merci aussi à Robin que j'ai pu encadrer durant un stage et avec qui j'ai partagé de bons moments.

Merci à David, Julien, Thomas pour les conseils, les bons moments au laboratoire et hors laboratoire. Je tiens à remercier plus particulièrement David, qui a été comme un grand

frère pour moi et qui m'a aidé à avancer. Tu as été là dans les bons moments et dans les mauvais moments, mais toujours avec les bons conseils. Merci beaucoup pour tout ce que tu as fait pour moi et tous les moments de partage. Thomas, pour moi tu es celui à qui je donne le relais dans l'équipe RLE, je sais que tu vas très bien réussir et surtout ne perd pas ta joie de vivre.

Je remercie tous les membres du laboratoire LIPME qui ont été d'une grande gentillesse. Merci au service commun et surtout à la laverie. Sans vous, je n'aurais pas fait grand-chose. Je remercie aussi tous les non-perm pour les bons moments et les cafés.

Je remercie mes parents, mes grands-parents, mes frères et ma sœur pour avoir cru en moi et pour m'avoir toujours soutenu dans mes projets. Je remercie aussi mes amis de longue date, Marc, Max, Antoine, Chloé, Bernie et beaucoup d'autres pour m'avoir soutenu et accompagné. Je remercie aussi mon club de sport, le HGC, pour les bons entraînements et les franches rigolades.

Enfin, je termine en remerciant la personne avec qui je partage ma vie depuis maintenant 10 ans, Fanny. Merci de m'avoir accompagné dans cette expérience particulière et donc d'avoir été là dans les bons moments comme dans les pires. Tu as su me supporter et m'aider à réaliser cette étape de ma vie et je sais que tu seras toujours là pour les prochaines.

Odi panem quid meliora.

Ça veut rien dire, mais je trouve que ça boucle bien.

Le Roi Loth, Kaamelott

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
I. L'AZOTE ET LE METABOLISME BACTERIEN	3
1. <i>Le cycle de l'azote</i>	3
2. <i>L'assimilation du nitrate</i>	6
a. Nitrate réductase assimilatrice	7
b. Nitrite réductase assimilatrice	8
c. Le transport de nitrate et de nitrite	9
d. La régulation de l'assimilation du nitrate.....	10
e. L'assimilation du nitrate chez <i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i>	12
3. <i>La dénitrification</i>	13
a. Nitrate réductase membranaire et périplasmique	14
b. Nitrite réductase périplasmique	15
c. NO réductase	16
d. N ₂ O réductase	17
e. La régulation de la dénitrification	19
II. LA SYMBIOSE RHIZOBIUM / LEGUMINEUSE	21
1. <i>Les modèles d'études</i>	23
a. Les rhizobia	23
b. Les légumineuses	24
2. <i>L'interaction symbiotique entre Medicago truncatula et Ensifer meliloti</i>	25
a. Le dialogue moléculaire	25
b. Infection de la plante par la bactérie	26
c. Maturation de la nodosité	26
d. La fixation d'azote	28
e. La sénescence nodulaire	29
III. L'OXYDE NITRIQUE (NO)	31
1. <i>Caractéristiques et propriétés chimiques du NO</i>	31
2. <i>Les modes d'action du NO</i>	32
a. Effet du NO sur l'ADN et les lipides.....	32
b. Effet du NO sur les protéines	33
3. <i>La réponse bactérienne au NO</i>	35
4. <i>La synthèse du NO</i>	36
a. La synthèse du NO chez les bactéries	37
b. La synthèse du NO chez les plantes	38

5.	<i>La dégradation du NO</i>	39
a.	La dégradation du NO chez les bactéries	40
b.	La dégradation du NO chez les plantes	43
IV.	LE NO DANS LES INTERACTIONS PLANTES-BACTERIES	45
1.	<i>Le NO dans les interactions plantes-pathogènes</i>	45
2.	<i>Le NO dans les interactions symbiotiques</i>	47
3.	<i>Le NO dans la symbiose entre <i>Ensifer meliloti</i> et <i>Medicago truncatula</i></i>	49
V.	PRESENTATION DU SUJET DE THESE	53
MATERIELS ET METHODES		54
I.	CULTURE DE SOUCHES BACTERIENNES.....	55
II.	SUIVI DE LA CROISSANCE BACTERIENNE EN CULTURE LIQUIDE	55
III.	CONSTRUCTION DE PLASMIDES ET DE SOUCHES MUTANTES	56
1.	<i>Surexpression de l'ARN non-codant anti-sens SMb23331</i>	56
2.	<i>Construction de plasmides portant des fusions transcriptionnelles avec le gène lacZ</i>	57
3.	<i>Construction de mutants de délétion</i>	58
IV.	DOSAGE DU NO ET DU NO ₂ ⁻ DANS DES CULTURES BACTERIENNES EN MILIEU LIQUIDES.....	59
1.	<i>Dosage de la production de NO et de NO₂⁻ en culture</i>	59
2.	<i>Mesure de la dégradation de NO</i>	60
V.	TEST DE SENSIBILITE AU NO	60
VI.	DOSAGE DE L'ACTIVITE B-GALACTOSIDASE	60
VII.	QRT-PCR.....	61
VIII.	ANALYSE DES ARN PAR NORTHERN BLOTTING.....	62
IX.	CULTURE DE PLANTES.....	63
1.	<i>Préparation et inoculation des graines en tube</i>	63
2.	<i>Préparation et inoculation de plantules pour les expériences de compétition</i>	63
3.	<i>Suivi macroscopique de la nodulation</i>	64
4.	<i>Mesure de la fixation d'azote (test ARA)</i>	64
5.	<i>Mesure du poids sec</i>	65
RESULTATS		66
I.	METABOLISME DU NO CHEZ LA BACTERIE <i>E. MELILOTI</i>	67
1.	<i>Implication de la voie assimilatrice du nitrate dans la synthèse du NO chez E. meliloti</i>	69
a.	Etude du transport de nitrate/nitrite.....	71
b.	Etude de la régulation de l'assimilation du nitrate	73

2.	<i>Une NO synthase est-elle impliquée dans la synthèse du NO chez E. meliloti ?</i>	80
3.	<i>Identification de nouveaux gènes impliqués dans la dégradation du NO chez E. meliloti.</i>	82
II.	ROLE DU NO D'ORIGINE BACTERIENNE AU COURS DE L'INTERACTION SYMBIOTIQUE ENTRE <i>E. MELILOTI</i> ET <i>M.</i>	
	<i>TRUNCATULA</i>	85
	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	89
1.	<i>E. meliloti ne possède pas de NO synthase bactérienne (bNOS)</i>	90
2.	<i>La dénitrification est la voie principale de synthèse de NO chez E. meliloti en vie libre</i>	92
3.	<i>L'assimilation du nitrate contribue à la production de NO en vie libre</i>	92
4.	<i>La synthèse de NO par le partenaire bactérien ne joue pas de rôle essentiel durant l'interaction symbiotique</i>	97
5.	<i>La dénitrification et l'assimilation du nitrate ne sont pas des voies essentielles pour l'interaction symbiotique</i>	100
	RÉFÉRENCES	104

Table des illustrations

Tableau 1 : Souches utilisées.

Tableau 2 : Plasmides utilisés.

Tableau 3 : Oligonucléotides utilisés.

Figure 1 : Affiche publicitaire du Ministère de l'agriculture et de l'alimentation visant à promouvoir les Légumineuses.

Figure 2 : Cycle de l'azote et tableau des différentes molécules impliquées dans le cycle avec leurs différents niveaux d'oxydation.

Figure 3 : Représentation schématique du cycle de l'azote microbien dans le contexte de la rhizosphère et de l'interaction rhizobium-légumineuse.

Figure 4 : Comparaison entre la voie de dénitrification, la DNRA et l'assimilation du nitrate.

Figure 5 : Représentation schématique de deux voies assimilatrices du nitrate.

Figure 6 : Organisation génomique des gènes impliqués dans l'assimilation du nitrate chez différents modèles bactériens.

Figure 7 : Représentation schématique de la régulation de l'assimilation du nitrate et de l'ammonium.

Figure 8 : Régulation de l'expression des gènes de la N₂O réductase chez *Bradyrhizobium*.

Figure 9 : Représentation schématique de la voie assimilatrice du nitrate chez la bactérie symbiotique *Bradyrhizobium diazoefficiens*.

Figure 10 : Représentation schématique des nitrate réductases membranaires NarGHI, périplasmique NapABC et assimilatrice NasC / NasG-NasB retrouvées chez *Paracoccus denitrificans*.

Figure 11 : Différentes enzymes pouvant être impliquées dans la dénitrification bactérienne.

Figure 12 : Comparaison des cascades de régulation des gènes de dénitrification par le NO et l'oxygène chez les rhizobia *Ensifer meliloti* et *Bradyrhizobium diazoefficiens*.

Figure 13 : Arbre phylogénétique réalisé à partir de l'ARN 16S des protéobactéries.

Figure 14 : Arbre phylogénétique des légumineuses.

Figure 15 : Représentation des différentes étapes de la nodulation.

Figure 16 : Représentation simplifiée du métabolisme symbiotique établi entre la cellule végétale et le symbiosome.

Figure 17 : Différentes réactions impliquant l'oxyde nitrique (NO) et l'anion superoxyde ($^{\circ}\text{O}_2^-$) ou l'oxygène (O₂).

Figure 18 : Exemples d'effets du NO et des RNS sur les lipides membranaires, les protéines et l'ADN.

Figure 19 : Représentation schématique des modifications post-traductionnelles spécifiques réalisées par le NO sur certaines protéines.

Figure 20 : Caractéristiques des différentes oxyde nitrique synthase (Nos) de mammifère.

Figure 21 : Synthèse du NO lors de la symbiose.

Figure 22 : Dégradation du NO lors de la symbiose.

Figure 23 : Détection du NO lors des différentes étapes de l'interaction symbiotique entre *E. meliloti* et *M. truncatula*.

Figure 24 : Etude de la croissance de différents mutants en présence de différentes sources d'azote.

Figure 25 : Effet de la mutation du gène SMb20436 (SMb20436::Tn5) sur la synthèse de NO et de NO₂⁻.

Figure 26 : Etude de la régulation de la région promotrice de l'opéron *nirBD narB*.

Figure 27 : Organisation génomique de l'opéron *nirBD narB* et niveaux d'expression du gène *narB* et de l'ARN non codant SMb23331 dans les différentes zones du nodule.

Figure 28 : Analyse de la transcription de SMb23331 dans différentes souches et conditions.

Figure 29 : Régulation du promoteur de SMb23331.

Figure 30 : Effet de la surexpression de l'ARN non codant SMb23331 sur l'activité du promoteur de l'opéron *nirBD narB cysG*.

Figure 31 : Effet de la surexpression de l'ARN non codant SMb23331 sur la croissance d'*E. meliloti* en présence de nitrate.

Figure 32 : Effet de la surexpression de l'ARN non codant SMb23331 sur le niveau de transcrits des gènes *nirB* et *narB*.

Figure 33 : Effet de la surexpression de l'ARN non codant SMb23331 sur la fixation d'azote.

Figure 34 : Etude de la sensibilité au NO pour différentes souches d'*E. meliloti*.

Figure 35 : Etude de la sensibilité au NO des mutants *tHb1* et *tHb2* d'*E. meliloti*.

Figure 36 : Dégradation du NO exogène par différentes souches d'*E. meliloti*.

Figure 37 : Effet de la délétion des globines tronquées sur la fixation d'azote.

Figure 38 : Modèle montrant les voies de synthèse du NO et la régulation possible de la voie assimilatrice de nitrate chez *E. meliloti*.

Table des abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADP : Adénosine DiPhosphate

Anammox : ANaerobic AMMonium OXidation

ARA : Acetylen Reduction Assay

ARNm : Acide RiboNucléique messenger

ARNnc : Acide RiboNucléique non-codant

ATP : Adénosine-5'-TriphosPate

cPTIO : 2-(4-Carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-l-oxyl-3-oxide

CFU : Colony Forming Unit

DAF-2 : 4,5-Diaminofluoresceine

DAF-FM : 4-Amino-5-Methylamino-2',7'-Difluorofluorescein

DNRA : Dissimilatory Nitrate Reduction to Ammonium

ETC : Electron Transporter Chain

GFP : Green Flouresent Protein

GOGAT : Glutamine-2-OxoGlutarate-Amino-Transférase

GS : Glutamine Synthétase

GSH : Glutathion

GSNO : S-nitrosoglutathion

GSNOR : GSNO reductase

HR : Hypersensitive Response

Lb : Leghémoglobine

Mb : Megabase

mCherry/mRFP : Monomeric red fluorescent proteins

NCR : Nodule specific Cystein Rich

NiR : Nitrite réductase

NO : Nitric Oxide

Nor : NO reductase

NOS : NO synthase

NR : Nitrate Réductase

PCR : Polymerase Chain Reaction

Pb : Paire de base

RNS : Reactive Nitrogen Species

ROS : Reactive Oxygen Species

Q : Ubiquinone

QH₂ : Ubiquinol

SpNN : Spermine NONOate

TCA : Tricarboxylic Acid Cycle

Introduction

Au cours du XXI^{ème} siècle, l'être humain sera confronté à des défis majeurs. Parmi ces défis, le réchauffement climatique constitue probablement l'une des menaces les plus importantes pour notre santé et notre société. Plusieurs modèles de prévisions suggèrent que la terre subira une augmentation de la température d'environ 1.5 °C dès 2030 (voir rapport GIEC (<https://www.ipcc.ch/report/sixth-assessment-report-working-group-i/>)).

Ce phénomène s'ajoute à d'autres problématiques environnementales telles que la pollution des sols, de l'eau et l'effondrement de la biodiversité qui nécessitent d'être prises en compte rapidement. La production agricole est une des activités anthropiques les plus dommageables pour l'environnement notamment de par l'utilisation d'engrais et de produits phytosanitaires, qui engendrent une pollution des sols et de l'eau. L'agriculture du futur va devoir prendre en compte différents paramètres comme le respect de l'environnement ou la santé humaine, tout en maintenant un rendement élevé pour assurer la sécurité alimentaire mondiale.

La majorité des plantes ont une croissance qui est basée sur deux facteurs limitants qui sont l'eau et la source d'azote. L'azote permet la synthèse de nombreuses molécules (acides nucléiques, protéines, cofacteurs enzymatiques, ...). La plupart des végétaux sont incapables d'utiliser l'azote atmosphérique présent à 78 % dans notre atmosphère et ont donc recours à l'azote minéral présent dans le sol (nitrate, ammonium, ...). Cependant, la disponibilité de l'azote varie en fonction du type de sol et des techniques d'agriculture. De ce fait, l'azote peut devenir rapidement limitant pour la croissance des plantes. Pour pallier cela, un ajout d'intrant azoté est nécessaire pour fournir à la plante une quantité d'azote adéquate. Ces intrants posent différents problèmes environnementaux ou de santé publique comme la pollution des sols et des eaux ou la prolifération d'algues vertes (Sutton et al., 2011). À l'inverse, les plantes de la famille des légumineuses ont la capacité d'établir une interaction symbiotique avec des bactéries fixatrices d'azote, les rhizobies. Cette capacité va leur permettre d'utiliser directement l'azote atmosphérique et donc ne pas dépendre d'intrant azoté. De plus, les légumineuses sont une source de protéines et de micronutriments (Figure 1). De ce fait, l'une des clés pour atteindre une agriculture dite propre et respectueuse de l'environnement pourrait être une plus large utilisation des légumineuses. D'ailleurs, l'Organisation des Nations Unies (ONU) a montré son intérêt pour les Fabacées en proclamant l'année 2016 « Année internationale des Légumineuses ». De plus, l'ONU et la FAO (Organisation pour l'alimentation

Les légumineuses

Graines d'avenir

SOURCE : FÉDÉRATION
NATIONALE DES LÉGUMES SECS,
legume-sec.com

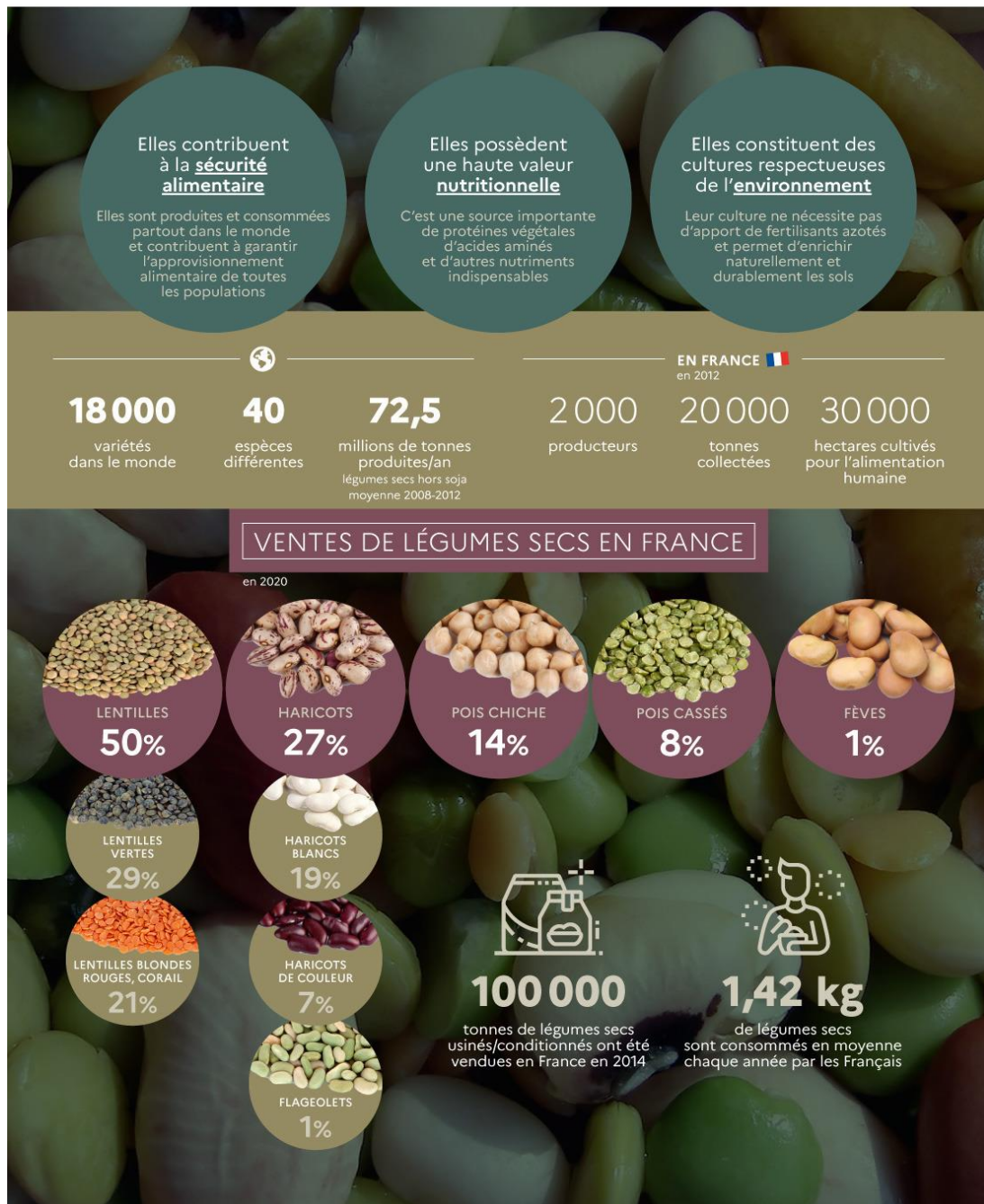


Figure 1 : Affiche publicitaire du Ministère de l'agriculture et de l'alimentation visant à promouvoir les Légumineuses.

(<https://agriculture.gouv.fr/infographie-les-legumineuses-graines-davenir>)

et l'agriculture (fao.org)) ont créé conjointement une journée internationale des légumineuses pour mettre en avant leurs bienfaits nutritionnels et environnementaux. En France, après plus de 50 ans de décisions politiques en faveur des cultures céréalières, les surfaces cultivées de légumineuses à graines ont été réduites de 161 000 ha en 1960 à moins de 15 000 ha entre 2003 et 2007 (Voisin et al., 2013). Au contraire, à l'heure actuelle, l'objectif serait d'augmenter l'utilisation des légumineuses, mais également d'étendre la capacité symbiotique à d'autres plantes (Charpentier and Oldroyd, 2010; Foyer et al., 2018).

Depuis de nombreuses années, les recherches sur les symbioses végétales se sont focalisées sur la compréhension de l'initiation et l'établissement de l'interaction symbiotique entre la plante et la bactérie. De nombreuses études ont permis de mettre en lumière différents signaux moléculaires permettant la mise en place de l'interaction entre la plante et la bactérie et de décrypter leurs mécanismes d'actions. Parmi ces différents signaux, on retrouve l'oxyde nitrique (NO), déjà connu pour être impliqué dans les interactions hôtes-pathogènes. Cette petite molécule gazeuse a été décrite comme nécessaire dans différentes étapes de l'interaction symbiotique entre plantes et microorganismes. De plus, le NO peut être à la fois synthétisé et dégradé aussi bien par la bactérie que par la plante durant l'interaction symbiotique. Malgré ces connaissances, le rôle du NO produit par la bactérie reste moins connu que celui produit par la plante.

Mon travail de thèse a porté sur l'étude du rôle du NO d'origine bactérienne dans l'établissement et le maintien de la symbiose. Pour cela, j'ai dans un premier temps étudié les voies de synthèse du NO chez le partenaire bactérien, mais aussi certaines voies impliquées dans sa dégradation. Dans un second temps, j'ai étudié l'implication des différentes voies de synthèse du NO durant l'interaction entre la légumineuse *Medicago truncatula* et son partenaire bactérien *Sinorhizobium meliloti*.

I. L'azote et le métabolisme bactérien

1. Le cycle de l'azote

L'azote (N) est un élément essentiel à la vie que l'on retrouve sous forme de composé gazeux, solide ou dissous dans des liquides. Il intervient dans la composition de biomolécules

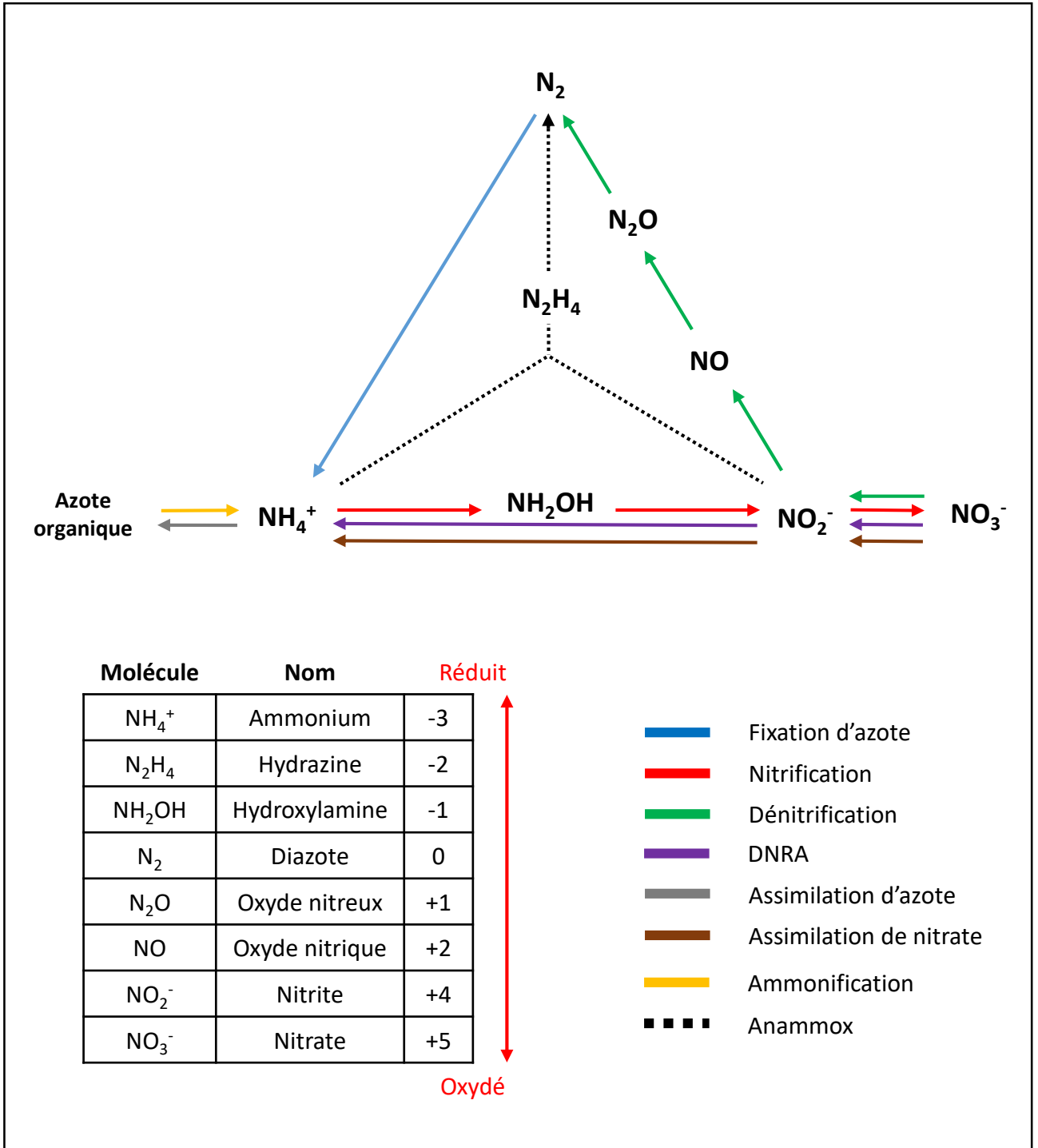


Figure 2 : Cycle de l'azote et tableau des différentes molécules impliquées dans le cycle avec leurs différents niveaux d'oxydation.

(DNRA : dissimilatory nitrate reduction to ammonium).

essentielles comme les protéines, l'acide désoxyribonucléique (ADN) ou la chlorophylle. Le cycle biogéochimique de l'azote comprend plusieurs molécules pouvant avoir un état redox allant de +5 à -3 comme le nitrate (NO_3^-), le nitrite (NO_2^-), le diazote (N_2), l'ammoniac (NH_3) et l'azote organique (Figure 2). Ce cycle permet de maintenir un équilibre entre les différentes molécules azotées et cela grâce à différentes réactions en grande partie effectuées par des microorganismes. Le métabolisme de l'azote bactérien implique des voies liées à la production de biomasse, mais aussi à la production d'énergie. Le cycle de l'azote appliqué aux microorganismes peut se décrire en 6 réactions majeures : la fixation du diazote, la nitrification, la dénitrification, l'assimilation, l'ammonification de l'azote organique et l'oxydation de l'ammonium en anaérobie (Anammox) (Kuypers et al., 2018) (Figure 2).

Le diazote est une molécule gazeuse, neutre, stable et abondante naturellement. La plus grande quantité d'azote se trouve dans notre atmosphère avec environ 78 % en volume de diazote dans sa composition. Seuls les organismes possédant une enzyme spécifique, la nitrogénase, ont la capacité d'utiliser cette source d'azote afin de synthétiser de l'ammoniac (NH_3) ou de l'ammonium (NH_4^+) en fonction du pH. Ces organismes sont principalement des bactéries comme les cyanobactéries ou des archées. À l'inverse, de nombreux organismes aquatiques ou terrestres sont dépourvus de nitrogénase. C'est le cas pour la majorité des plantes qui dépendent donc de la présence dans le sol d'azote sous forme minérale directement assimilable. Dans le sol, les plantes interagissent avec des bactéries colonisant l'environnement racinaire proche (rhizosphère). Dans de ce type d'interaction, les racines des plantes vont sécréter des composés spécifiques (acides aminés, acides organiques, sucres ...) capables d'attirer les microorganismes qui vont alors coloniser la rhizosphère (Santoyo et al., 2021). En échange, certaines bactéries de la rhizosphère vont permettre à la plante d'acquérir plus de nutriment par des mécanismes comme la fixation d'azote. L'inoculation des sols par des microorganismes bénéfiques est connue depuis longtemps en agronomie (Okon and Labandera-Gonzalez, 1994). De façon générale, les bactéries capables de fixer l'azote atmosphérique présentes au sein de la rhizosphère peuvent être classées en deux groupes : les bactéries diazotrophes libres, aérobies ou anaérobies (genre *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, ...) et les bactéries ayant la capacité d'établir une interaction symbiotique avec des plantes comme les rhizobia (symbiontes des légumineuses) ou appartenant au genre *Frankia* (symbiontes des plantes actinorhiziennes). L'ammonium formé par la fixation de

- ① : *Nitrosomonas* spp ⑤ : *Pseudomonas* spp Rhizobia
- ② : *Nitrobacter* spp ⑥ : Rhizobia nos⁻
- ③ : *Nitrospora* spp ⑦ : Diazotrophe libre
- ④ : *Paracoccus* spp

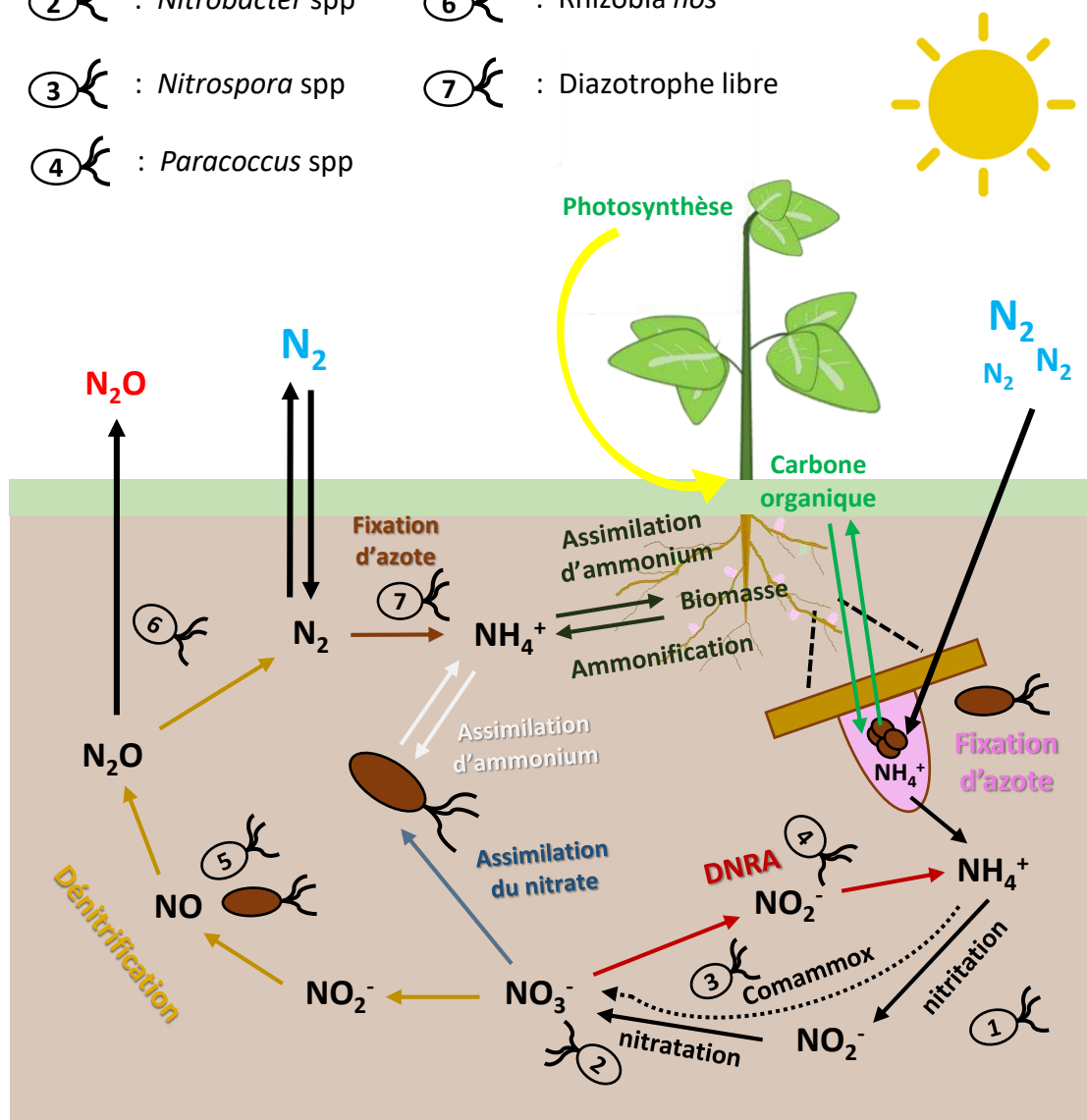


Figure 3 : Représentation schématique du cycle de l'azote microbien dans le contexte de la rhizosphère et de l'interaction rhizobium-légumineuse. Réduction dissimilatrice du nitrate en ammonium (DNRA).

l'azote peut être assimilé par la plante et permettre la production de biomasse (azote organique). Une fois disponible, la biomasse pourra être décomposée par des bactéries ammonifiantes pour redonner de l'ammonium (Figure 3).

La nitrification est un enchainement de deux réactions permettant d'obtenir du NO_3^- par une première étape d'oxydation de NH_4^+ en NO_2^- puis par l'oxydation du NO_2^- en NO_3^- (Figure 2). Dans un premier temps, l'oxydation de NH_4^+ en NO_2^- en passant par l'hydroxylamine (NH_2OH) est appelée nitritation. Cette étape permet à certains microorganismes (exemple : *Nitrosomonas* spp.) de stocker de l'énergie sous forme d'électrons par l'intermédiaire des quinones. Dans un second temps, d'autres bactéries (exemple : *Nitrobacter* spp.) réalisent l'étape de nitrification où le NO_2^- est oxydé en NO_3^- . Récemment, des organismes capables de réaliser une nitrification de façon complète (Comammox : COMplete AMMONia OXidation) ont été identifiés (genre *Nitrospira*) (Daims et al., 2015; van Kessel et al., 2015) (Figure 3). Certains organismes ont la capacité d'oxyder l'ammonium en condition anaérobie en utilisant le NO_2^- comme accepteur final d'électrons pour produire du N_2 (Anammox : ANaerobic AMMONium OXidation). Cette voie est réservée aux organismes chimio-lithotrophes (phylum des Planctomycètes) possédant un organite cellulaire spécifique nommé «anammoxosome» (Kuenen, 2008). Ce système est de plus en plus étudié pour son intérêt dans la remédiation de l'ammonium dans les systèmes de traitement des eaux (Mao et al., 2017).

Le nitrate résultant des voies oxydatives de nitrification va pouvoir être utilisé à des fins métaboliques ou énergétiques par certains microorganismes. D'un point de vue métabolique, le NO_3^- peut être réduit en NO_2^- , puis en ammonium assimilable. Cette voie anabolique se nomme « Assimilation du nitrate » et permet d'incorporer de l'ammonium provenant de la réduction de nitrate dans la biomasse (Figure 2 et 4). Pour pouvoir respirer en anaérobie, le NO_3^- peut être utilisé comme accepteur final d'électrons dans deux voies différentes. La première, la réduction dissimilatrice du NO_3^- en ammonium (DNRA) permet la production d'ammonium à partir de NO_2^- provenant de la réduction du NO_3^- (Figure 2 et 4). Cette voie catabolique permet de générer 8 électrons (réduction du NO_2^- par la nitrite réductase Nrf) qui pourront servir à la respiration. De plus, l'ammonium produit n'est pas assimilé mais excrété. Cette voie est active en présence d'une quantité importante de matière carbonée par rapport à la matière azotée disponible (Kraft et al., 2011). La dénitrification est la deuxième voie qui permet à certaines bactéries de respirer en anaérobie grâce à la

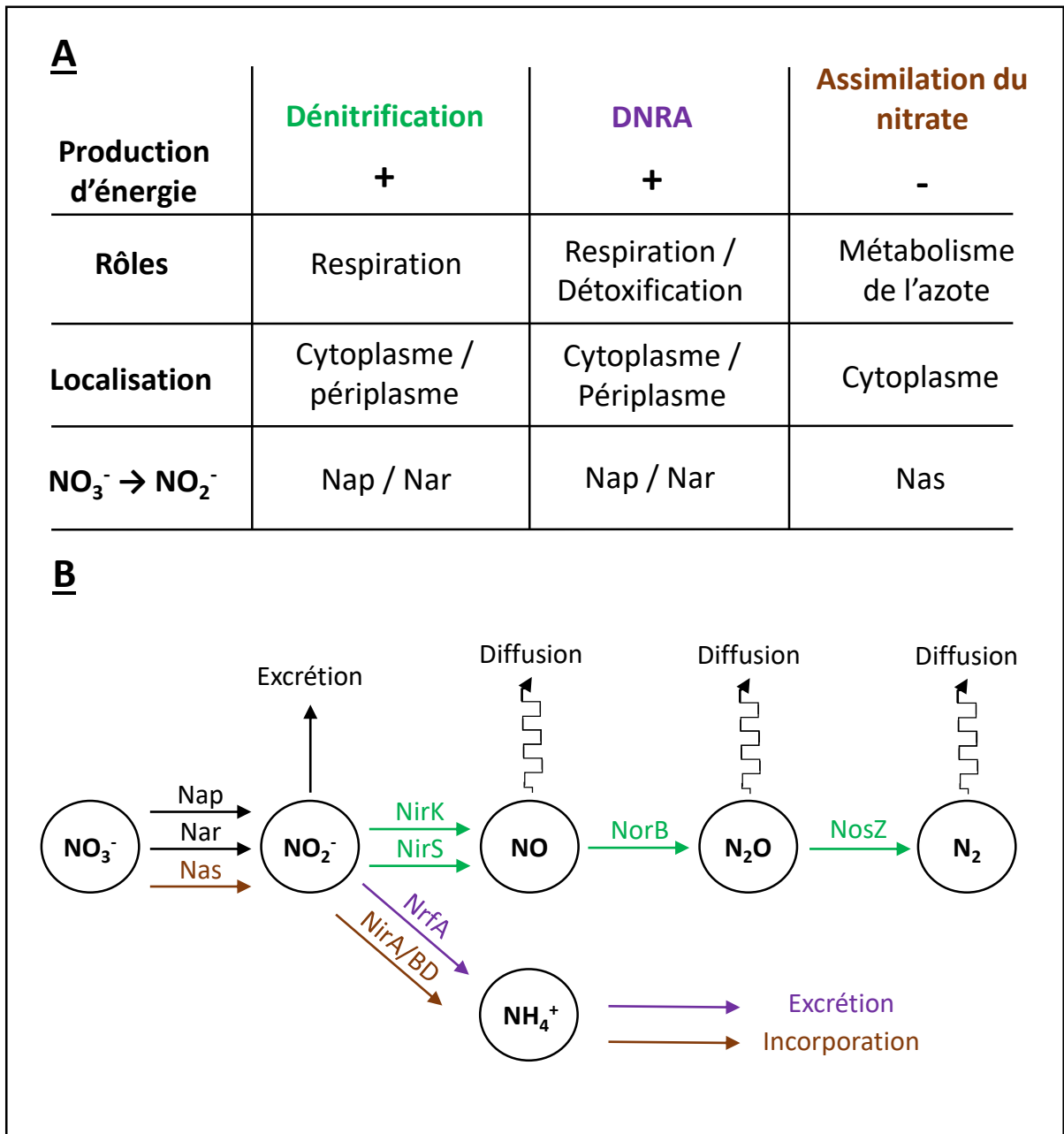


Figure 4 : Comparaison entre la voie de dénitrification, la DNRA et l'assimilation du nitrate.

(A) Caractéristiques des voies microbiennes de dénitrification, réduction dissimilatrice du nitrate en ammonium (DNRA) et assimilation du nitrate. **(B)** Représentation simplifiée de la réduction du nitrate jusqu'au diazote ou en ammonium avec l'intervention des différentes enzymes impliquées dans la dénitrification, réduction dissimilatrice du nitrate en ammonium (DNRA) et assimilation du nitrate.

production d'énergie provenant de réductions successives. Cette voie est une des plus importantes du cycle de l'azote. Elle permet de réduire successivement le NO_3^- en NO_2^- , oxyde nitrique (NO), protoxyde d'azote ou oxyde nitreux (N_2O) et enfin en diazote (N_2). Ces réductions successives vont permettre la production d'énergie nécessaire à la respiration en anaérobiose (Zumft, 1997) (Figure 2 et 4). Communément, ces voies font intervenir des métalloprotéines complexes utilisant un cation de molybdène comme cofacteur. Pour effectuer l'assimilation du nitrate ou la dénitrification, une réduction du NO_3^- et du NO_2^- est nécessaire par l'intermédiaire de nitrate réductases (NR) et de nitrite réductases (NiR). Il existe trois types de nitrate réductases bactériennes : les NR périplasmiques (Nap), les NR membranaires respiratoires (Nar) et les NR assimilatrices cytoplasmiques (Nas) (Moreno-Vivián et al., 1999; Richardson et al., 2001). Les nitrite réductases (NiR) sont au nombre de quatre et diffèrent au niveau de leur localisation, fonctions et cofacteurs. Certaines bactéries comme *Paracoccus denitrificans* possèdent les trois types de NR. Chez cette bactérie, le NO_3^- peut être utilisé de trois façons différentes : comme accepteur d'électrons lors de la respiration anaérobie (Nar), comme puits à électrons pour éliminer l'excès de réducteurs provenant du métabolisme des substrats carbonés en aérobiose (Nap) et comme source d'azote pour l'anabolisme durant la croissance en aérobiose et anaérobiose (Nas) (Richardson et al., 2001). Parmi toutes ces voies impliquées dans le cycle de l'azote, deux jouent un rôle important dans le métabolisme du NO : la voie d'assimilation du nitrate et la dénitrification.

2. L'assimilation du nitrate

Le NO_3^- est essentiel pour de nombreuses bactéries hétérotrophes. En plus de son utilité nutritive, le NO_3^- est un accepteur d'électrons impliqué dans des mécanismes de respiration. Chez les bactéries hétérotrophes comme *Azotobacter vinelandii* ou la bactérie gram positive *Bacillus subtilis*, l'assimilation du nitrate est nécessaire pour assurer une croissance aérobie avec uniquement du NO_3^- comme source d'azote (Ramos et al., 1993; Ogawa et al., 1995). La première étape de cette voie métabolique est le transport du NO_3^- ou du NO_2^- dans la cellule. Une fois dans le cytoplasme, le NO_3^- va être réduit en NO_2^- par une NR assimilatrice. Le NO_2^- sera ensuite réduit en ammonium par une NiR. Il faut deux électrons pour réduire le NO_3^- en NO_2^- et six électrons pour réduire le NO_2^- en ammonium. Ces deux

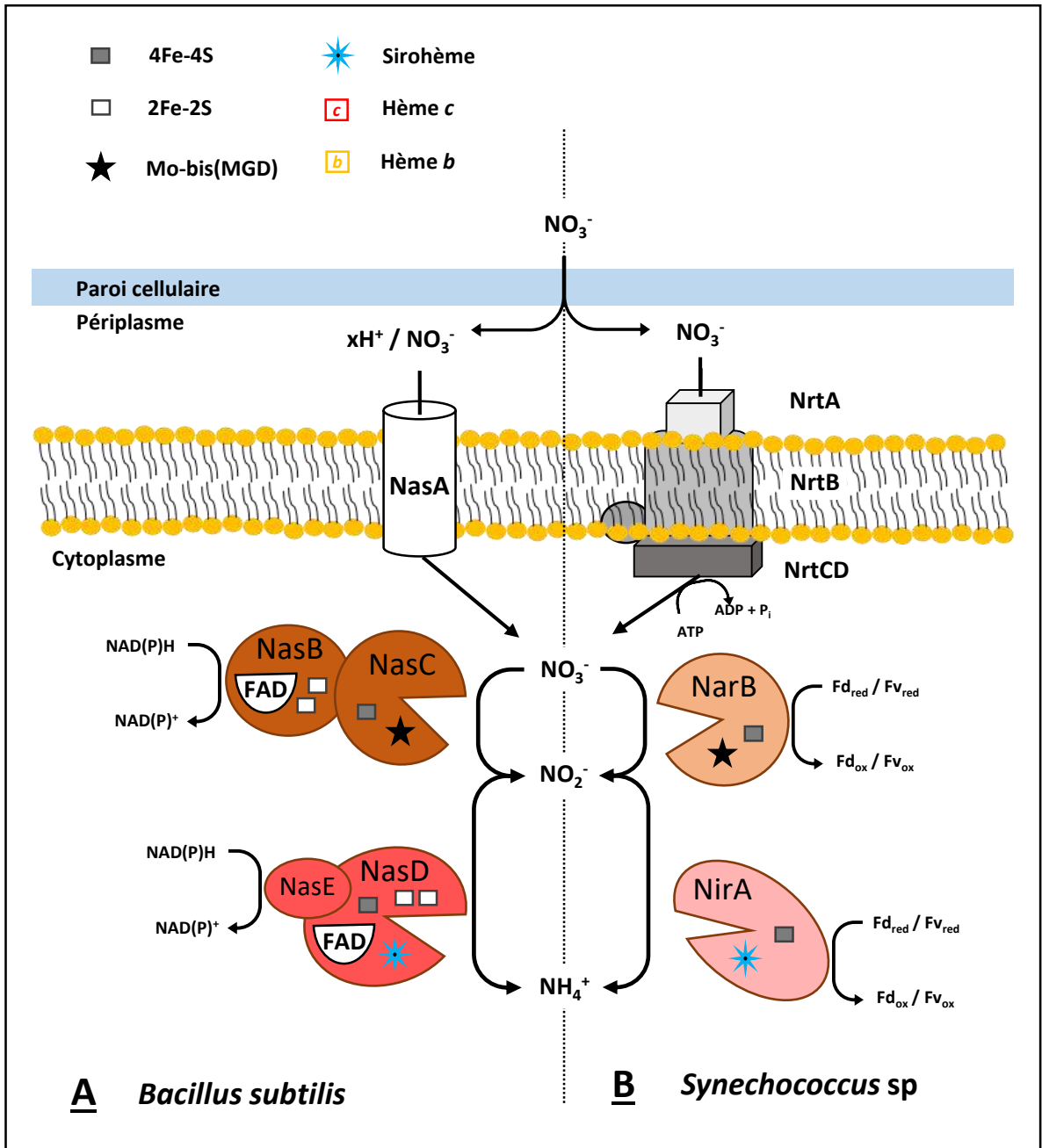


Figure 5 : Représentation schématique de deux voies assimilatrices du nitrate.

(A) Voie décrite chez *Bacillus subtilis* comprenant le transporteur NasA, la nitrate réductase NasBC et la nitrite réductase NasDE. **(B)** Voie décrite chez *Synechococcus* sp comprenant le transporteur NrtABCD, la nitrate réductase NarB et la nitrite réductase NirA. Fd = ferredoxine, Fv = flavodoxine.

réactions de réduction enzymatique sont coûteuses pour la bactérie et nécessitent donc une régulation fine.

a. Nitrate réductase assimilatrice

La réduction de 2 électrons du NO_3^- en NO_2^- ($\text{NO}_3^- + 2e^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O}$) peut être effectuée par les NR assimilatrices cytoplasmiques (Nas). Il existe deux types de Nas chez les procaryotes : Les Nas monomériques (Flavodoxine ou Ferredoxine dépendantes) généralement présentes chez des cyanobactéries et les Nas hétérodimériques (NADPH dépendantes) présentes chez de nombreuses bactéries hétérotrophes. Ces deux types de Nas ont en commun l'utilisation de groupement prosthétique fer-soufre pour le transfert d'électrons et le Mo-bis-Molybdoptérine guanine dinucléotide (Mo-bisMGD) comme cofacteur à molybdène. Malgré ce point commun, les Nas diffèrent d'un organisme à un autre, notamment au niveau de leurs propriétés moléculaires ainsi que sur le nombre et le type de centres de transfert d'électrons (González et al., 2006a). On retrouve ces différences si on compare deux bactéries du sol comme *B. subtilis* et *A. vinelandii* ou *B. subtilis* et la cyanobactérie *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Figure 5). En effet, *B. subtilis* possède une Nas hétérodimérique NADPH dépendante (codée par l'opéron *nasBCDEF*) (Ogawa et al., 1995). Cette Nas se compose d'une sous-unité catalytique NasC comprenant un cofacteur Mo-bisMGD et un centre (4Fe-4S). Elle possède aussi une petite sous-unité NasB qui se compose d'un centre contenant deux groupements 2Fe-2S et d'un cofacteur Flavine Adénine Dinucléotide (FAD). Chez la bactérie du sol *A. vinelandii* et les cyanobactéries comme *Synechococcus* sp. PCC 7942, on retrouve une Nas monomérique (NasB et NarB respectivement) constituée uniquement d'un cofacteur Mo-bisMGD et d'un centre 4Fe-4S (Gangeswaran et al., 1993; Ramos et al., 1993; Rubio et al., 1996). De plus, ce type de Nas ne dépend pas du NADPH, mais de la flavodoxine pour *A. vinelandii* et de la flavodoxine ou de la ferredoxine pour *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Gangeswaran and Eady, 1996; Rubio et al., 2002).

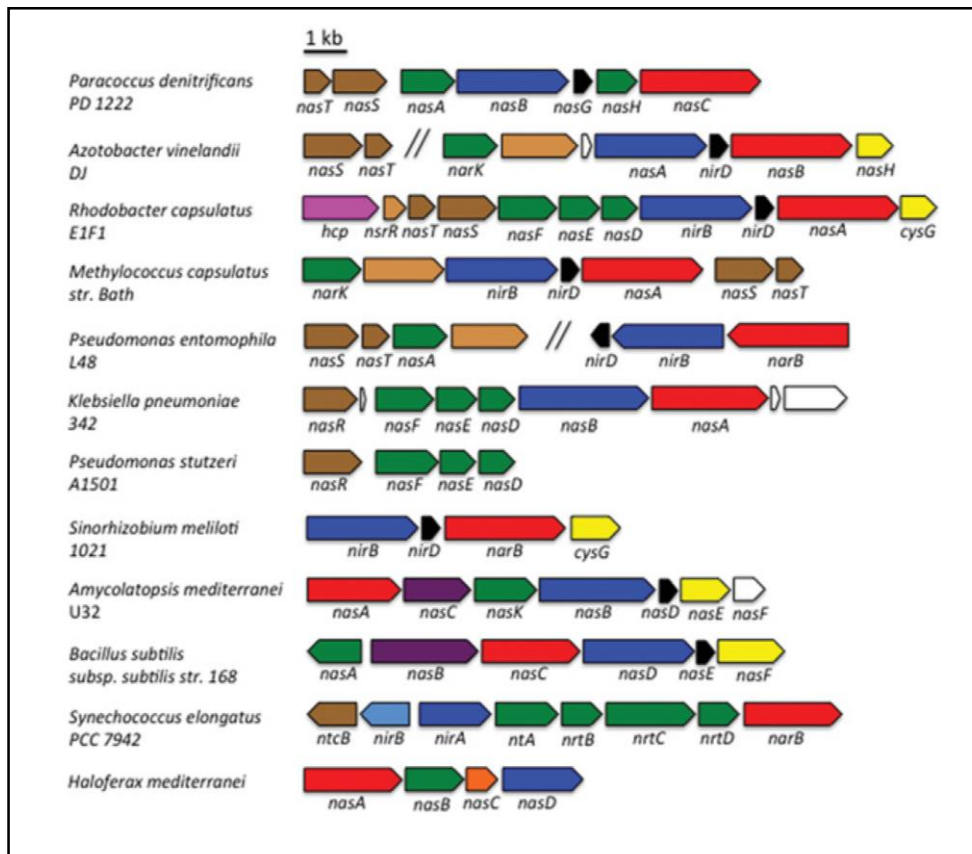


Figure 6 : Organisation génomique des gènes impliqués dans l'assimilation du nitrate chez différents modèles bactériens.

Les différentes couleurs représentent les régions codantes de façon putative pour : nitrate réductase (rouge) ; nitrite réductase (bleu) ; protéine de type Rieske (2Fe-2S) (noir) ; transporteur de nitrate/nitrite (vert) ; uroporphyrin-III-C-méthyltransférase (jaune) ; régulateur dépendant du nitrate (marron) ; régulateur putatif (marron clair) ; protéines contenant du FAD (violet) ; molybdoptérine guanine dinucléotide (orange) ; protéine impliqué dans l'assimilation de l'hydroxylamine (rose) ; autres gènes (blanc). (Luque-Almagro et al., 2011)

b. Nitrite réductase assimilatrice

La réduction de 6 électrons du NO_2^- en NH_4^+ ($\text{NO}_2^- + 6e^- + 8\text{H}^+ \rightarrow \text{NH}_4^+ + 2\text{H}_2\text{O}$) peut être effectuée par deux types de NiR capables de réduire le NO_2^- en ammonium : la nitrite réductase dépendante de la ferrédoxine (Fd) et la nitrite réductase dépendante du NADPH. Ces deux types de NiR ont en commun la présence d'un groupement prosthétique 4Fe-4S et d'un groupement sirohème. Les NiR monomériques dépendantes de la ferrédoxine sont principalement retrouvées chez des organismes photosynthétiques comme les cyanobactéries. C'est le cas chez *Synechococcus sp.* PCC 7942 où l'on retrouve la NiR (Fd) NirA (Luque et al., 1993) (Figure 5). A contrario, les bactéries hétérotrophes comme *B. subtilis* ou *Escherichia coli* possèdent plus fréquemment des NiR dépendantes du NADPH qui peuvent être monomériques ou hétérodimériques (Figure 5). Une liaison non covalente à un cofacteur FAD réduit permet l'utilisation du NADPH comme donneur d'électrons. *E. coli* possède deux NiR capables de réduire le NO_2^- en ammonium : une NiR périplasmique cytochrome *c* dépendante (codée par l'opéron *NrfABCDEFG*) et une NiR cytoplasmique dépendante du NADPH (codée par *NirBD*) (Cole and Richardson, 2008). Plus précisément, NirBD se compose d'une grande sous-unité NirB contenant le site catalytique et une petite sous-unité NirD portant le groupement FAD. Cette NiR a la particularité d'être induite uniquement en anaérobiose et par conséquent de réduire le NO_2^- provenant de la respiration du nitrate (détoxification) et non le NO_2^- provenant de l'assimilation du nitrate en condition aérobie (Cole, 1996). *B. subtilis* est aussi pourvue d'une NiR dépendante du NADPH (NasDE) composée de deux sous-unités (codé par l'opéron *NasBCDEF*) homologues à NirBD de *E. coli* (Ogawa et al., 1995). Il est intéressant de noter que *B. subtilis* possède seulement une NiR et deux NR impliquées dans des voies différentes (une NR assimilatrice cytoplasmique NasBC et une NR respiratoire membranaire NarGHI). De ce fait, l'unique NiR de *B. subtilis* NasDE intervient dans la respiration anaérobie mais aussi durant l'assimilation du nitrate en aérobie, et cela grâce à une régulation spécifique (Nakano et al., 1998). Ces deux exemples d'organismes illustrent bien l'hétérogénéité que l'on peut observer dans les NR (*nas*) et NiR (*nir*) impliquées dans l'assimilation du nitrate (Figure 6).

c. Le transport de nitrate et de nitrite

La forme ionisée du nitrate et du nitrite en milieu aqueux empêche le passage de ces molécules à travers les membranes. En effet, si le transport du NO_3^- reposait sur un système passif, la concentration en NO_3^- dans le cytoplasme serait limitée à 0.001 % de la concentration externe (Parsonage et al., 1985; Goddard et al., 2017).

Le transport actif du NO_3^- et du NO_2^- peut être assuré par deux types de transporteurs : les transporteurs de types ABC (ATP Binding Cassette) et les transporteurs de type MFS (Major Facilitator Superfamily). Les transporteurs de type ABC permettent de transporter du NO_3^- et du NO_2^- moyennant un coût en ATP pour la cellule. Ces transporteurs codés par les gènes *nasFED* ou *nrtABCD* ont été décrits chez des organismes modèles comme la protéobactérie *Klebsiella pneumoniae* et chez la cyanobactérie *Synechococcus* sp. Strain PCC 7942 respectivement (Figure 6) (Maeda and Omata, 1997; Wu and Stewart, 1998). Chez ces organismes, le NO_3^- est pris en charge par les sous-unités NasF ou NrtA respectivement. Ces sous-unités sont essentielles au transport du NO_3^- lorsque celui-ci est présent à faible concentration et cela grâce à leur forte affinité pour le NO_3^- . NasE ou NrtB sont quant à elles les sous-unités qui constituent les domaines membranaires permettant le passage du périplasme au cytoplasme. Pour finir, la liaison à l'ATP est assurée du côté cytoplasmique par un homodimère NasD ou un hétérodimère NrtCD. Dans le cas de l'utilisation du NO_3^- pour la respiration, il est nécessaire d'assurer un transport de celui-ci sans hydrolyse d'ATP. Pour ce faire, l'utilisation d'un transporteur anti-transport $\text{NO}_3^- / \text{NO}_2^-$ (sous-famille NarK2) peut être utile pour importer une molécule de NO_3^- dans le cytoplasme en échange d'une molécule de NO_2^- . Ce transporteur a pour intérêt d'être à la fois électro-chimiquement neutre et de permettre une relocalisation d'une partie du NO_2^- cytoplasmique qui peut être toxique à forte concentration. Ce NO_2^- pourra par la suite être pris en charge par une voie de réduction périplasmique comme la dénitrification (Rowe et al., 1994). Une autre façon de transporter le NO_3^- est l'utilisation d'un transporteur symport $\text{NO}_3^- / \text{H}^+$ (sous-famille NarK1) (Moir and Wood, 2001). Ce type de transporteur permet le passage du périplasme vers le cytoplasme d'une molécule de NO_3^- et d'un proton simultanément. Cette combinaison $\text{NO}_3^- / \text{H}^+$ a pour avantage de maintenir une charge neutre et ne nécessite pas de molécule de NO_2^- . Certains microorganismes comme *E. coli* ou *P. denitrificans* ont la capacité de posséder ces deux types de transporteurs (Figure 10). Chez *B. subtilis*, la mutation du gène codant pour le transporteur

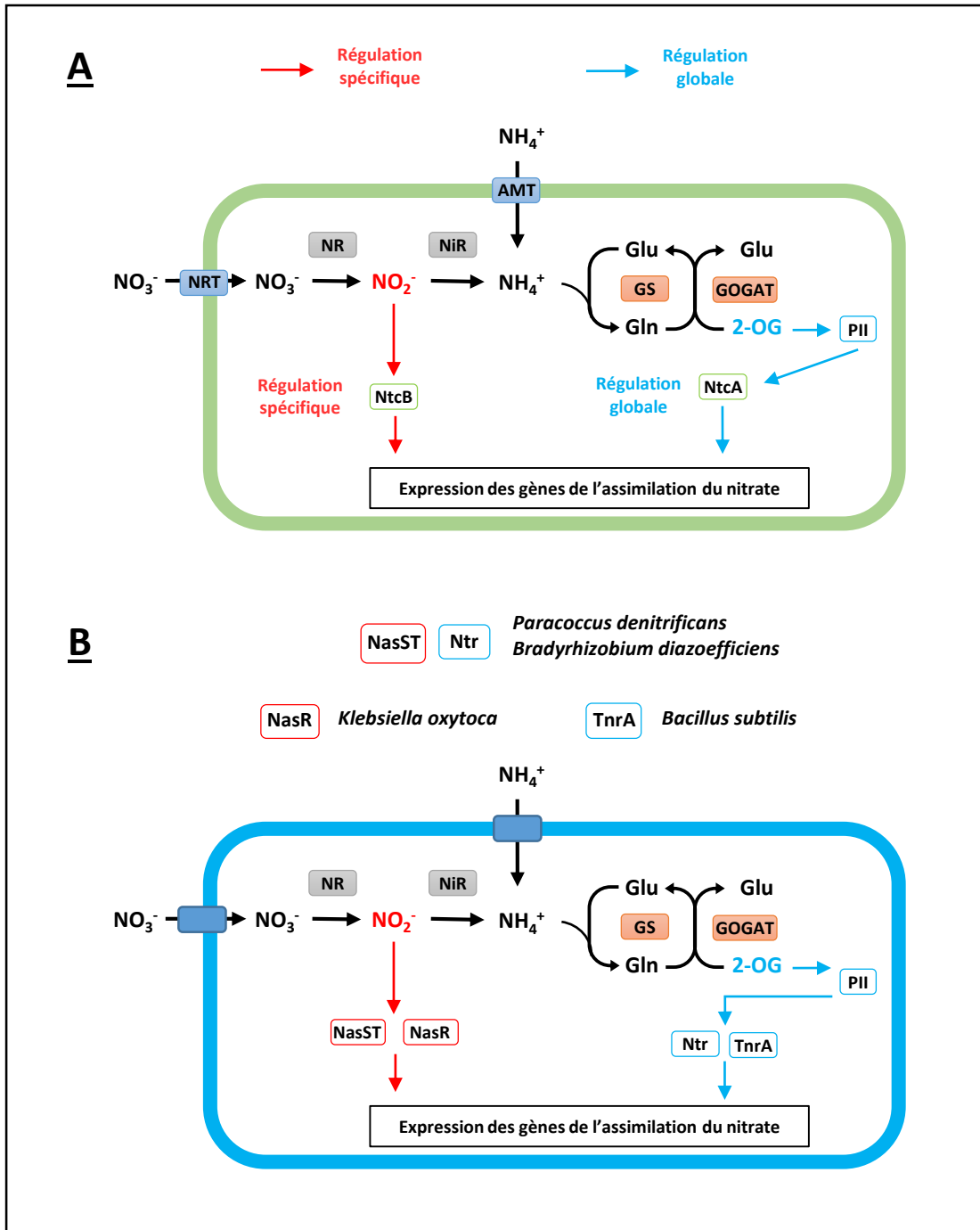


Figure 7 : Représentation schématique de la régulation de l'assimilation du nitrate et de l'ammonium.

(A) chez les cyanobactéries **(B)** chez quelques espèces de protéobactéries et *Bacillus subtilis*. (Adapté de (Luque et al. 2011, Ohashi et al. 2011)).

NasA empêche la croissance en présence de NO_3^- comme seule source d'azote (Ogawa et al., 1995) (Figure 5). Chez *E. coli*, le transport de NO_3^- et de NO_2^- serait effectué par deux protéines, NarK et NarU, présentant 75 % d'homologie (Jia and Cole, 2005). Malgré leur homologie, NarK serait un anti-porteur $\text{NO}_3^- / \text{NO}_2^-$ (Fukuda et al., 2015) et NarU un transporteur $\text{NO}_3^- / \text{H}^+$ (Yan et al., 2013). Leur mode de fonctionnement reste encore à déterminer. Chez *P. denitrificans*, les transporteurs NarK1 (transporteurs $\text{NO}_3^- / \text{H}^+$) et NarK2 (anti-porteur $\text{NO}_3^- / \text{NO}_2^-$) constituent le complexe protéique NarK. Ce complexe est nécessaire à la croissance anaérobie lorsque le nitrate est utilisé comme seule source d'azote (Goddard et al., 2008; Goddard et al., 2017).

d. La régulation de l'assimilation du nitrate

L'assimilation du nitrate est généralement soumise à deux niveaux de régulation faisant intervenir à la fois le substrat et le produit de la voie. En effet, il est connu depuis longtemps que le NO_3^- et le NO_2^- ont un effet inducteur et l'ammonium un effet répresseur (Luque-Almagro et al., 2011). De façon globale, l'assimilation du nitrate peut être régulée en présence d'ammonium par des voies impliquées dans la régulation générale du métabolisme de l'azote. Ces mécanismes, senseurs et régulateurs, ont pour but de contrôler les différents niveaux de carbone, d'azote et d'énergie. Cette fonction est assurée par la famille de protéines PII impliquée dans la transduction du signal lié au métabolisme de l'azote (GlnK et GlnB). En réagissant avec des molécules effectrices telles que le 2-oxoglutarate et l'ATP/ADP, les protéines PII vont établir des interactions protéine/protéine

La régulation générale du métabolisme de l'azote chez les cyanobactéries implique les facteurs de transcription NtcA et NtcB (Figure 7A). Ces protéines font partie de la famille de régulateurs transcriptionnels de type CRP (cyclic AMP receptor protein) et LysR respectivement (Ohashi et al., 2011). NtcA est le régulateur général de l'acquisition et de l'assimilation de l'azote chez les cyanobactéries (Vega-Palas et al., 1992). Cette protéine est indirectement régulée par une petite protéine PII (PipX). En présence d'ammonium, NtcA réprime les gènes impliqués dans l'assimilation du nitrate. A l'inverse, lors d'un ratio C/N élevé (épuisement en ammonium), NtcA va avoir un effet positif sur la transcription des gènes impliqués dans le métabolisme de l'azote (Forchhammer and Selim, 2019). NtcB est un

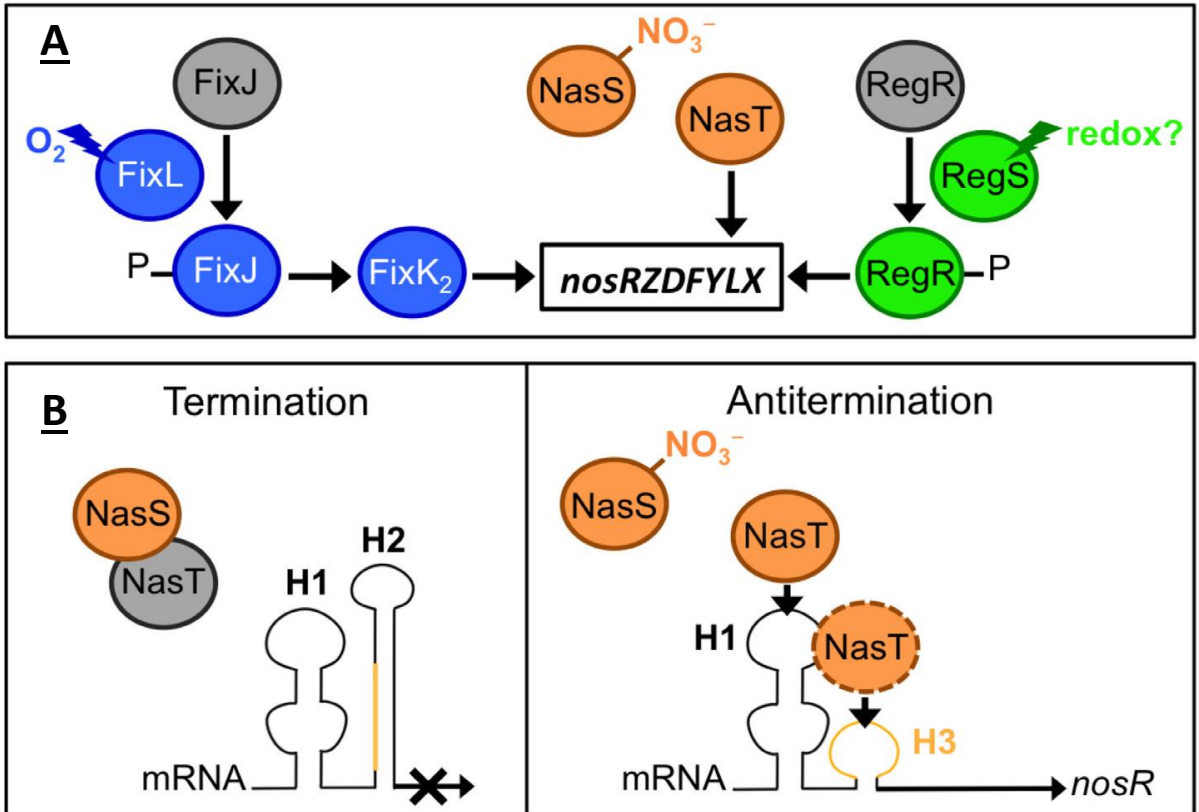


Figure 8 : Régulation de l'expression des gènes de la N_2O réductase chez *Bradyrhizobium*.

(A) Implication de 3 systèmes de régulation à deux composants comprenant le système FixLJ / FixK₂ (senseur d'oxygène), NasST (régulation spécifique du nitrate) et RegRS (régulation dépendante de l'état redox). **(B)** Fonctionnement du régulateur NasST en présence ou absence de nitrate. En absence de nitrate, NasST forme un complexe inactif, ce qui permet la formation de la structure tige boucle H2 et provoque la terminaison de la transcription de l'ARNm *nosR*. En présence de nitrate, NasT va être libéré de NasS (senseur de nitrate) pour interagir avec les tiges boucles H1 et H2 de l'ARNm *nosR*, empêchant ainsi la formation de la structure terminatrice H2, et permettant donc la transcription des gènes *nos* (Sanchez et al. 2019).

régulateur répondant spécifiquement à la présence de NO_2^- . Ce régulateur est nécessaire pour l'activation des gènes d'assimilation du nitrate chez les cyanobactéries (Aichi et al., 2001).

Chez les bactéries hétérotrophes gram-négatives telles que *P. denitrificans* et *Klebsiella oxytoca* (opéron *nasFEDCBA*), l'assimilation du nitrate est réprimée par la présence d'ammonium. Le système de régulation à deux composants NtrBC a été décrit comme étant directement impliqué dans cette régulation (Figure 7B) (Luque-Almagro et al., 2011). En effet, lorsque l'azote est limitant, la protéine senseur kinase NtrB s'autophosphoryle et transfère le groupement phosphate à NtrC (Sanders et al., 1992). En présence d'azote, NtrB agit comme une phosphatase qui déphosphoryle et inactive NtrC. Lorsque NtrC est sous sa forme phosphorylée, il agit comme un activateur transcriptionnel via le facteur Sigma54 permettant l'induction de gènes impliqués dans le métabolisme de l'azote comme *glnA*, codant pour la glutamine synthase (Chen and Reitzer, 1995). Chez ces bactéries, un deuxième niveau de régulation dépendant du NO_3^- contrôle l'expression des gènes d'assimilation. Cette régulation est assurée spécifiquement par les protéines NasST pour *P. denitrificans* ou NasR pour *K. oxytoca* (Figure 7B) (Luque-Almagro et al., 2011). NasS est un senseur de $\text{NO}_3^- / \text{NO}_2^-$ qui se compose d'une séquence proche de celle de la sous-unité périplasmique NrtA du transporteur de type ABC NrtABCD (Koropatkin et al., 2006). NasT possède une activité anti-termination et régule la transcription de ses gènes cibles grâce à un domaine de liaison à l'ARN nommé domaine ANTAR (AmiR and NasR Transcription Antitermination Regulators). En absence de NO_3^- , NasS et NasT forment un complexe inactif (Figure 8B). Cette conformation amène à un arrêt prématuré de la transcription. A contrario, la présence de NO_3^- ou NO_2^- provoque la dissociation du complexe NasST. Cette étape permet la libération de NasT permettant ainsi l'expression des gènes contrôlés par NasST (Figure 8) (Luque-Almagro et al., 2013). Chez *P. denitrificans*, une étude a montré une répression des gènes *nasST* et *nasA* chez un mutant *ntrB* de *P. denitrificans* (Luque-Almagro et al., 2017). Ainsi, l'expression des gènes *nasST* dépendrait comme pour les gènes de l'assimilation codée par l'opéron *nasABGHC*, du régulateur NtrBC et donc de la présence ou non d'ammonium.

NasR interagit avec le NO_3^- ou NO_2^- grâce à un domaine senseur (NIT) (Shu et al., 2003) et possède un domaine ANTAR ayant une fonction similaire à celle de NasT (Shu and Zhulin, 2002) (Figure 7B). Malgré des différences structurales avec le régulateur NasST, NasR possède un mécanisme d'action proche de celui-ci. En présence de NO_3^- , il empêche la formation de

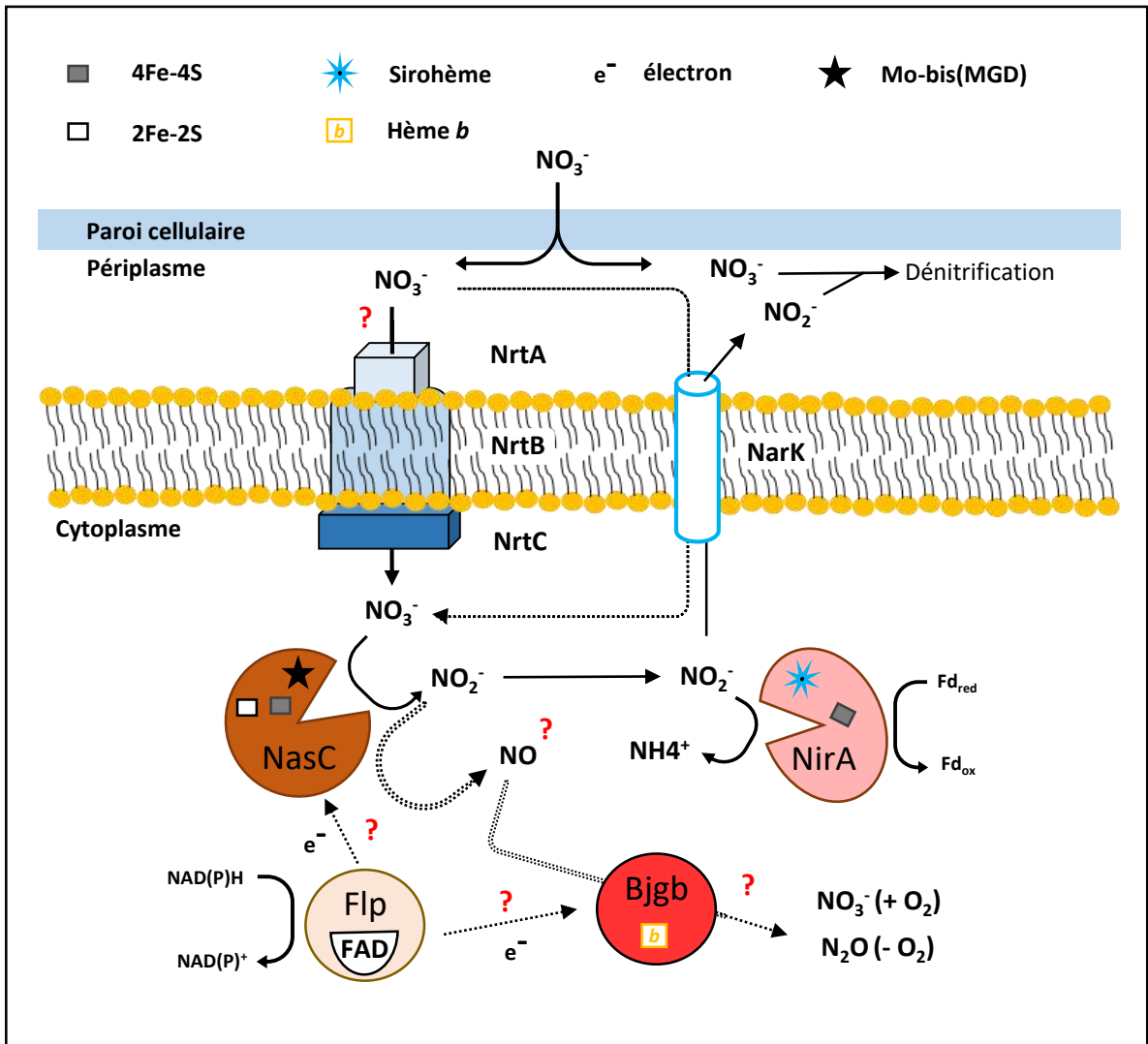


Figure 9 : Représentation schématique de la voie assimilatrice du nitrate chez la bactérie symbiotique *Bradyrhizobium diazoefficiens*.

Cette voie se compose des transporteurs NrtABC et NarK, de la nitrate réductase NasC, de la nitrite réductase NirA, de la sous-unité Flp et de l'hémoglobine Bjgb. (adapté de Salas et al. 2021)

tige-boucle (hairpin) sur l'ARNm afin de permettre l'expression des gènes de la voie assimilatrice du nitrate (Lin and Stewart, 1998; Chai and Stewart, 1999; Boudes et al., 2012; Goodson et al., 2020).

Chez les bactéries gram-positives comme *B. subtilis*, TnrA est le principal facteur de transcription impliqué dans la régulation du métabolisme de l'azote (Figure 7B) (Kayumov et al., 2011). De ce fait, une mutation de *tnrA* empêche l'utilisation du NO_3^- comme source d'azote (Wray et al., 1996). *B. subtilis* possède d'autre part un régulateur à deux composants ResDE répondant spécifiquement au NO_3^- . ResDE est nécessaire à l'induction en condition anaérobie de la nitrite réductase NasDEF et à l'expression de la nitrate réductase respiratoire NarGHI (Nakano et al., 1998).

e. L'assimilation du nitrate chez *Bradyrhizobium diazoefficiens*

Chez les rhizobia, de nombreuses études ont été menées dans le but de caractériser les mécanismes de la dénitrification ou de la fixation d'azote. À l'inverse, l'assimilation du nitrate et sa régulation ont été peu étudiées. C'est chez *Bradyrhizobium diazoefficiens*, le modèle de l'interaction symbiotique avec le soja, que la majorité des études ont été menées jusqu'à présent (Figure 9). *B. diazoefficiens* possède une NR cytoplasmique dépendante du NADPH (NasC) similaire à celle présente chez *P. denitrificans* (Cabrera et al., 2016). De plus, une NADPH oxydoréductase FAD-dépendante nommée Flp a été proposée comme donneur d'électrons de NasC. Chez *P. denitrificans*, l'absence de cette sous-unité est compensée par l'activité NADH réductase de la NiR NasB et sa sous-unité de type ferrédoxine 2Fe-2S NasG (Gates et al., 2011) (Figure 10). L'opéron codant pour NasC et Flp (*narK bjgb flp nasC*) code aussi pour un transporteur (*narK*) ainsi qu'une hémoglobine impliquée dans la dégradation du NO (*bjgb*) (voir partie 2.b). NarK serait un transporteur de NO_3^- et de NO_2^- de type MFS impliqué chez *B. diazoefficiens*. La délétion de ce transporteur n'affecte pas l'utilisation de nitrate comme seule source d'azote chez *B. diazoefficiens*, ce qui suggère qu'un autre transporteur pourrait être impliqué. L'import de NO_3^- pourrait quant à lui être assuré par un transporteur NrtABC. En effet, on retrouve en amont de l'opéron portant *narK* trois gènes prédits pour coder un transporteur appartenant à la famille NrtABC. La réduction du NO_2^- en ammonium est effectuée par une NiR assimilatrice (NirA). Le gène codant pour cette NiR ne

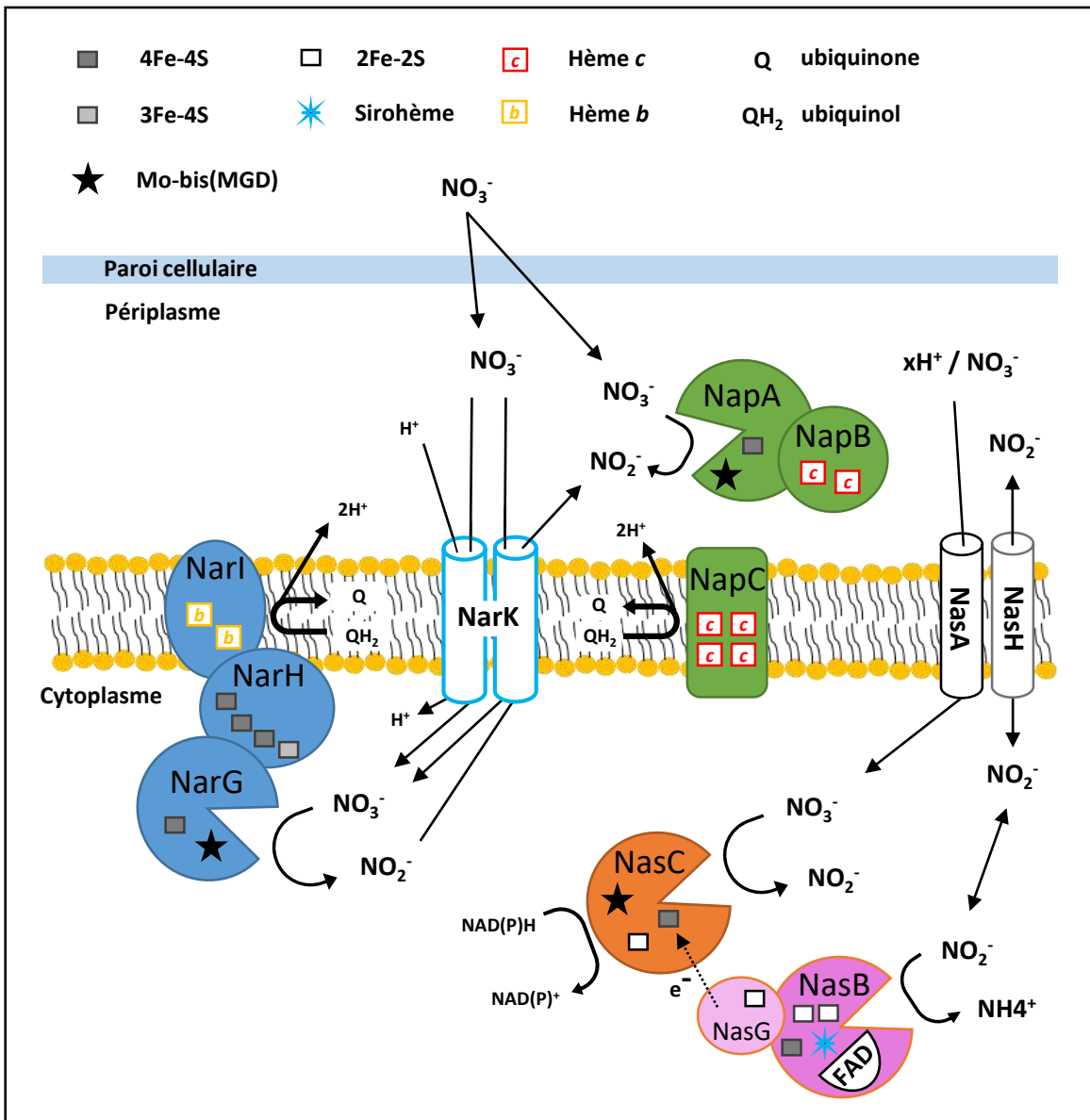


Figure 10 : Représentation schématique des nitrate réductases membranaires NarGHI, périplasmique NapABC et assimilatrice NasC / NasG-NasB retrouvées chez *Paracoccus denitrificans*.

(Adapté de Gate et al. 2011)

se trouve pas dans l'opéron portant *NasC*, mais en aval de celui-ci et proche des gènes codant pour le système de régulation à deux composants *NasST*. Cette configuration est similaire à celle observée chez *P. denitrificans* (Luque-Almagro et al., 2013) (Figure 6). Chez *B. diazoefficiens*, le système de régulation *NasST* est nécessaire pour l'expression de l'opéron *nark-bjgb-flp-nasC* et du gène *nirA*. De plus, ces gènes sont aussi soumis à une régulation faisant intervenir le système de régulation générale de l'azote *NtrBC* (Franck et al., 2015; López et al., 2017). Chez cette bactérie, la nitrate réductase *NasC* est essentielle pour la croissance avec uniquement du NO_3^- comme source d'azote. Quant à la nitrite réductase *NirA*, elle est essentielle pour la croissance avec uniquement du NO_3^- ou du NO_2^- comme source d'azote (Cabrera et al., 2016).

3. La dénitrification

La dénitrification est l'une des principales voies du cycle de l'azote. Cette voie permet à certains microorganismes de pouvoir respirer en condition anaérobie ou microaérobie en utilisant le NO_3^- comme accepteur final d'électrons à la place de l'oxygène (Zumft, 1997). Cette voie de respiration alternative est présente chez de nombreux champignons, archées et bactéries comme les protéobactéries (Shapleigh, 2006; Hayatsu et al., 2008). La dénitrification a été caractérisée chez des organismes tels que les α -protéobactérie *P. denitrificans*, *B. diazoefficiens* et *Ensifer meliloti* ou bien chez d'autres protéobactéries comme la γ -protéobactérie *Pseudomonas aeruginosa* (van Spanning et al., 2007; Torres et al., 2011; Torres et al., 2014b; Bueno et al., 2017). Chez des bactéries rhizosphériques comme les *Bradyrhizobium*, la dénitrification est une compétence rhizosphérique importante qui permet de s'adapter à des variations de concentration en O_2 et cela en vie libre ou durant l'interaction symbiotique avec une légumineuse (Inaba et al., 2012). En effet, dans le sol, la concentration en O_2 peut varier rapidement et cela oblige les bactéries colonisant la rhizosphère à devoir utiliser d'autres accepteurs final d'électrons permettant la respirant anaérobie comme le NO_3^- ou d'autre composé comme le fer ou le soufre (Lecomte et al., 2018). La dénitrification est un enchainement de réductions pouvant commencer avec du NO_3^- soluble pour produire un gaz, le diazote. Les désoxygénations successives du NO_3^- vont permettre de produire des protons qui en passant à travers la membrane génèrent un gradient utilisé pour produire de l'ATP

(Kraft et al., 2011). À l'inverse de l'assimilation du nitrate qui est cytoplasmique, la dénitrification est périplasmique. Elle est constituée de quatre étapes indépendantes de réduction : tout d'abord, le NO_3^- est réduit en NO_2^- , puis successivement en NO, N_2O et en N_2 . Ces différentes réductions sont catalysées par quatre enzymes : nitrate réductase, nitrite réductase, nitrique oxyde (NO) réductase et oxyde nitreux (N_2O) réductase (Figure 4). Ces réductases appartiennent à la famille des métalloprotéines. Elles sont pour la plupart constituées de multiples sous-unités couplées à des chaînes de transport d'électrons.

a. Nitrate réductase membranaire et périplasmique

La première étape qui permet l'initiation de la dénitrification est la réduction dissimilatoire du NO_3^- en NO_2^- ($\text{NO}_3^- + 2e^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O}$) par une nitrate réductase associée à la membrane (Nar) ou au périplasme (Nap) (Figure 10).

Les Nar ont été identifiées à la fois chez des organismes dénitrifiants comme *P. denitrificans* et non dénitrifiants comme *E. coli* (González et al., 2006a). Les gènes *nar* organisés en opéron (*narGHIIJ*) sont généralement activés par une carence en oxygène et par la présence de NO_3^- (Moreno-Vivián et al., 1999). D'un point de vue structural, la NR membranaire NarGHI est hétérotrimérique, ancrée à la membrane, et possède un site catalytique tourné vers le cytoplasme. L'ancrage membranaire de ce complexe est assuré par NarI, qui permet aussi de recevoir les électrons provenant du pool de quinols. NarG constitue la sous-unité catalytique du complexe et se compose d'un cofacteur molybdène (Mo-bisMGD) et d'un centre 4Fe-4S. Quant à NarH, il se compose de plusieurs centres Fe-S permettant le transfert d'électrons. Il permet de faire le lien entre NarI et NarG. Lors de la réaction, deux protons sont libérés dans le périplasme, contribuant à la génération d'un gradient de protons membranaires et permettant la production d'ATP (Kraft et al., 2011). Le gène *narJ* code une protéine chaperonne nécessaire à l'assemblage et à la maturation du complexe NarGHI (Richardson et al., 2001). Chez *P. denitrificans*, NarJ serait aussi nécessaire pour la maturation et l'assemblage de la NR assimilatrice NasC (Pinchbeck et al., 2019). Les protéines Nar sont généralement absentes chez les rhizobia. C'est le cas par exemple chez *B. diazoefficiens* où la nitrate réductase Nap est essentielle à la respiration anaérobie du nitrate en raison de l'absence de Nar (Delgado et al., 2003; Fernández et al., 2019).

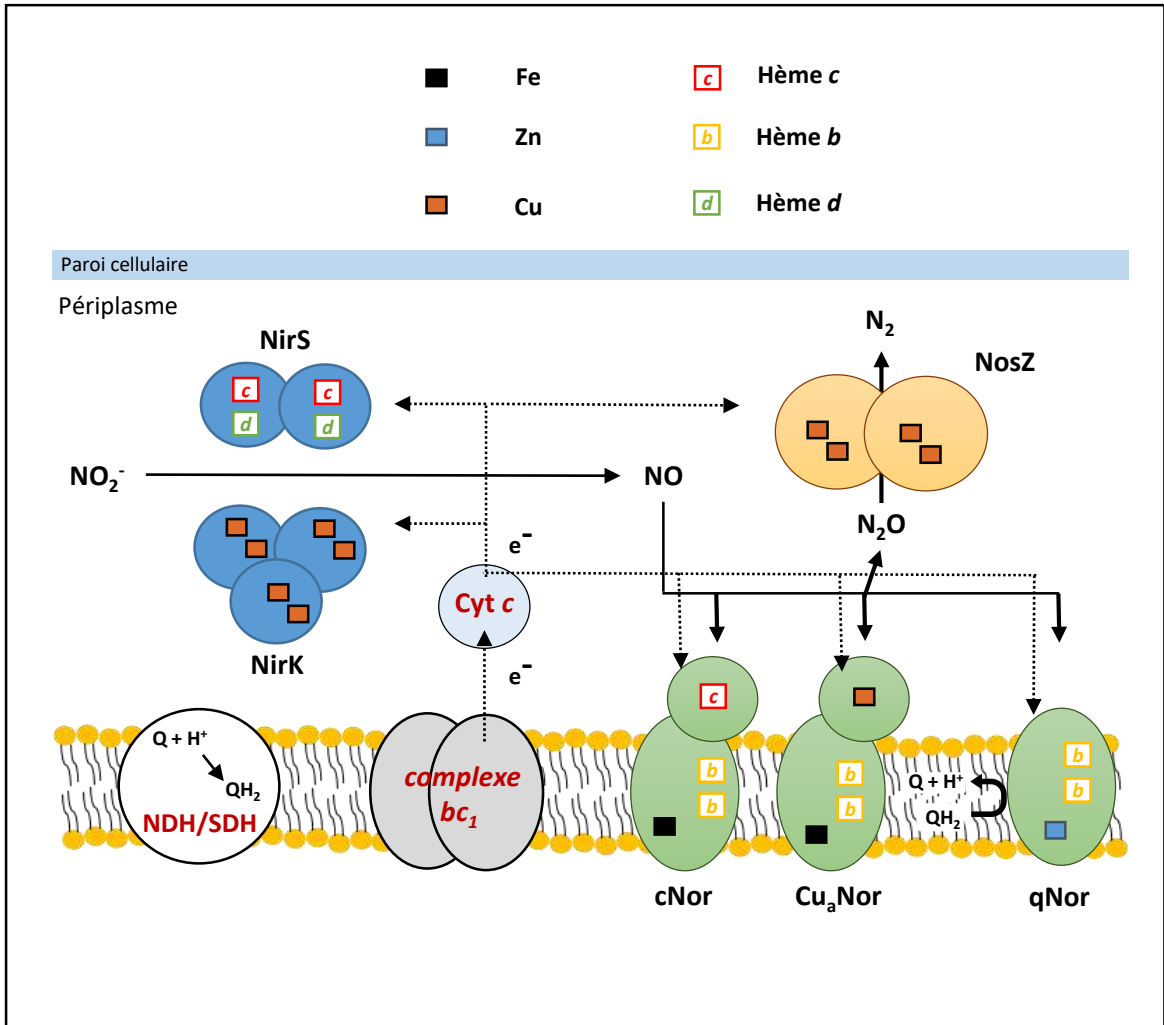


Figure 11 : Différentes enzymes pouvant être impliquées dans la dénitrification bactérienne.

Nitrite réductase (NirS et NirK), NO réductase (cNor, qNor et Cu_aNor), N₂O réductase (NosZ), NADH déshydrogénase (NDH) et Succinate déshydrogénase (SDH).

(adapté de (Salas et al. 2021)).

Les Nap sont connues pour être impliquées dans la respiration anaérobie, mais aussi pour maintenir un équilibre de l'état redox en aérobie chez certains organismes. NapABC (opéron *napDABC*) est la forme de NR périplasmique la plus courante chez les bactéries dénitrifiantes (van Spanning et al., 2007). Chez *B. diazoefficiens* et *E. meliloti*, elle est codée par l'opéron *napEDABC* ou *napEFDABC*, respectivement (Delgado et al., 2007). Cette Nap est composée de la grande sous-unité catabolique NapA qui contient un cofacteur molybdène (Mo-bisMGD) et un centre 4Fe-4S nécessaire à la réaction. NapB est un cytochrome *c* à dihème permettant le transfert d'électrons jusqu'à NapA. Dans cette réaction, les deux électrons proviennent d'un pool de quinols membranaires et sont directement transférés à NapB puis dirigés vers NapA *via* une sous unité membranaire nommée NapC. NapD a un rôle de chaperonne et participe à l'assemblage des différentes sous-unités. Les autres gènes tels que *napKEFGH* seraient impliqués dans la synthèse, la maturation et l'activité de Nap. La plupart du temps, cette réaction périplasmique ne génère pas de gradient électrochimique en raison de l'absence de transfert de protons (Coelho and Romão, 2015). Si *B. diazoefficiens* a la capacité de se développer en anaérobie, ce n'est pas le cas de *E. meliloti* qui utilise la dénitrification pour respirer uniquement en microaérobiose (Torres et al., 2011; Torres et al., 2014b). Une étude récente a montré qu'une surexpression de *napEFDABC* permet à *E. meliloti* de croître en condition anaérobie, démontrant un manque d'efficacité de cette Nap (Torres et al., 2018).

b. Nitrite réductase périplasmique

La nitrite réductase périplasmique (NiR) est impliquée dans la seconde étape de la dénitrification après la réduction de NO_3^- en NO_2^- ($\text{NO}_2^- + e^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{NO} + \text{H}_2\text{O}$) (Figure 11). Cette oxydoréductase périplasmique a pour fonction de réduire le NO_2^- périplasmique en NO lorsque l'oxygène est limitant (Kuypers et al., 2018). Chez les bactéries, il existe deux types de NiR respiratoires impliquées dans la dénitrification : la première est une cytochrome oxydase *cd₁* (*cd₁-Nir*) codée par le gène *nirS*; la seconde est une NiR contenant un atome de cuivre (Cu-Nir) codée par le gène *nirK* (Philippot, 2002; van Spanning, 2011; Rinaldo et al., 2018). NirS, aussi appelée cytochrome *cd₁*, est un homodimère composé d'un cytochrome *c* et d'un groupement hème D₁ pour chaque monomère (Rinaldo et al., 2016). La NiR périplasmique NirK (codée par *nirK* ou *nirKV*) est homotrimérique et contient deux centres cuivre dans

chaque monomère. NirV est une disulfurase nécessaire pour l'assemblage du site actif de NirK (Nojiri, 2016). Pour catalyser la réduction du NO_2^- en NO, ces enzymes vont recevoir un électron du cytochrome *c* provenant du cytochrome membranaire *bc₁*. Chez *B. diazoefficiens*, une étude a montré l'implication du cytochrome soluble *c550* dans le transfert d'électrons provenant du cytochrome membranaire *bc₁* vers NirK (Bueno et al., 2008).

Chez les bactéries dénitrifiantes, il est courant de trouver un seul type de NiR périplasmique au sein d'un même organisme. La présence d'une NiR NirK ou NirS chez les bactéries dénitrifiantes va dépendre de plusieurs facteurs environnementaux comme le type de sol ou bien le pH. De ce fait, ces gènes sont fréquemment utilisés comme marqueurs moléculaires pour évaluer à la fois l'abondance de ces bactéries au sein d'une population et la structure de la communauté en réponse aux changements environnementaux (Herold et al., 2018). Chez les rhizobia tels que *B. diazoefficiens*, *E. meliloti* et *Rhizobium etli*, on retrouve uniquement une NiR périplasmique (NirKV). Chez *B. diazoefficiens*, une mutation du gène *nirK* empêche la croissance en condition d'anaérobiose et en présence de nitrate. De plus, cette mutation entraîne une accumulation de nitrite dans le milieu de culture (Velasco et al., 2001). Certaines espèces bactériennes possèdent toutefois les deux types de NiR. C'est le cas de la bactérie *Bradyrhizobium nitroreducens* sp ou l'on retrouve à la fois NirK et NirS (Jang et al., 2018). C'est également le cas pour chez *Bradyrhizobium oligotrophicum* ou les deux NiR périplasmiques NirK et NirS sont impliquées dans la dénitrification et répondent aux mêmes conditions de faible teneur en oxygène. De plus, il a été observé que contrairement au gène *nirK*, *nirS* pouvait également être exprimé en aérobiose (Sánchez and Minamisawa, 2018).

c. NO réductase

L'avant dernière étape de la dénitrification est la réduction du NO en N_2O ($2\text{NO} + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{N}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}$) par la NO réductase (Nor) (Figure 11). Cette enzyme est ancrée à la membrane et possède un site catalytique orienté vers le périplasma. Il existe 3 types de Nor qui se différencient par le donneur d'électrons : les cNor dépendantes d'un cytochrome *c*, les qNor dépendantes du pool de quinols et enfin les qCuNor qui peuvent interagir avec les quinols, mais aussi avec les cytochromes. Les qNor (monomère) et les cNor (NorB, hétérodimère) ont une structure primaire similaire (Cramm et al., 1999). Les cNor et les

qCuNor se composent de deux sous-unités. Pour toutes ces Nor, la formation du N₂O se fait par un transfert de protons depuis le cofacteur NADPH et par un transfert d'électrons via les hèmes jusqu'à deux molécules de NO fixées au fer libre (Hino et al., 2010; Shiro, 2012). Les NO réductases sont connues pour ne pas contribuer au gradient électrochimique de protons (Zumft, 2005).

Chez les rhizobia, on trouve majoritairement des Nor de type cNor codées par l'opéron *norEFCBQD* (Torres et al., 2016). Cette enzyme se compose d'un hétérodimère ancré à la membrane (gènes *norCB*) où NorB est la sous-unité catalytique qui contient deux hèmes de type *b* et un atome de Fe non-hémique et NorC contient un hème de type *c* et intervient dans le transfert d'électrons entre le cytochrome *c* et NorB. Les gènes accessoires *norD* et *norQ* codent pour des protéines essentielles dans la maturation de la cNor. C'est aussi le cas pour les gènes *norE* et *norF*, codant des protéines impliquées dans la maturation et la stabilisation de la cNor (Tosha and Shiro, 2016). S'il est obligatoire de retrouver un cluster contenant *norBC* et *norDQ*, ce n'est pas le cas pour *norEF* qui peuvent être absents en fonction des espèces. Les rôles de ces protéines accessoires sont variables et leurs mutations peuvent affecter partiellement l'activité de Nor (de Boer et al., 1996; Zumft, 2005). Chez *E. meliloti*, un mutant *norB* est plus sensible au NO en culture qu'une souche sauvage. Cela confirme l'implication d'une cNor dans la dégradation du NO chez cette bactérie (Meilhoc et al., 2013). Chez *R. etli*, NorCB (cNor) est impliquée dans la dégradation du NO (Gómez-Hernández et al., 2011). Enfin chez *B. diazoefficiens*, une mutation du gène *norB* ou *norC* inhibe la croissance en microaérobie, et provoque une accumulation de NO (Mesa et al., 2002).

d. N₂O réductase

La dernière réaction de la voie de dénitrification est la réduction de deux électrons du N₂O en N₂ ($N_2O + 2e^- + 2H^+ \rightarrow N_2 + H_2O$) par une N₂O réductase soluble NosZ (Zumft, 1997) (Figure 11). De nombreux microorganismes sont capables de croître en condition limitante en O₂ avec seulement du N₂O comme seule source d'énergie. NosZ est un homodimère périplasmique qui contient un centre cuivre binucléaire Cu_A et un centre cuivre multinucléaire Cu_Z dans chaque monomère. Le centre cuivre Cu_A a pour fonction de transférer les électrons au site catalytique, centre cuivre Cu_Z (Pauleta et al., 2016). La réduction du N₂O implique le

cytochrome membranaire *bc1* qui participe au transfert d'électron (Zumft, 1997). Chez les bactéries dénitrifiantes, NosZ est codée dans un opéron (*nosRZDFYL*) qui comprend d'autres gènes nécessaires à la maturation et à la stabilité de NosZ. Ce type de Nos est considéré comme appartenant au groupe 1. Récemment, chez des bactéries non dénitrifiantes, un autre type de Nos a été identifié (Jones et al., 2013). Ces Nos, appartenant au groupe 2, auraient pour fonction d'éliminer le N₂O généré par la détoxification du NO (Hein and Simon, 2019).

Chez *B. diazoefficiens*, on retrouve une Nos appartenant au groupe 1 (opéron *nosRZDFYLX*). Chez cette souche, un mutant du gène *nosZ* ou *nosR* engendre une accumulation de N₂O mais n'empêche pas la croissance dans des conditions nécessitant la dénitrification, ce qui montre que cette dernière étape n'est pas obligatoire pour la respiration du NO₃⁻ (Velasco et al., 2004). Une étude récente a montré l'implication du cytochrome *c₅₅₀* codé par le gène *cycA* dans l'activité de NosZ (Jiménez-Leiva et al., 2019). *E. meliloti* possède aussi une Nos fonctionnelle (opéron *nosRZDFYLX*). Cette souche possède une voie de dénitrification complète mais ne permettant pas de respirer le NO₃⁻ et le NO₂⁻ en anaérobie (Torres et al., 2011). Une étude a permis de démontrer que *E. meliloti* a la capacité d'utiliser uniquement du N₂O comme accepteur final d'électrons pour respirer en anaérobie (Bueno et al., 2015). Cette capacité avait été montrée auparavant chez *B. diazoefficiens* (Sánchez et al., 2013a).

Le N₂O est un puissant gaz à effet de serre (300 fois plus puissant que le CO₂), de ce fait, l'étude du fonctionnement de la dénitrification suscite actuellement un regain d'intérêt. La communauté bactérienne d'un milieu peut jouer un rôle en tant que puits ou source de N₂O. En effet, certains organismes ne possèdent pas toutes les enzymes de la dénitrification permettant la réduction complète du NO₃⁻ en N₂. C'est le cas de certaines bactéries qui ne possèdent pas de Nos et qui sont donc amenées à accumuler et rejeter du N₂O. En effet, environ 40 % des bactéries dénitrifiantes ne possèdent pas de N₂O réductase (Graf et al., 2014). De plus, même chez une bactérie possédant une voie complète, les régulations transcriptionnelles et post-transcriptionnelles peuvent provoquer un déséquilibre dans l'activité des enzymes qui peut se traduire par l'accumulation de N₂O ou d'autres produits intermédiaires comme le NO (Lycus et al., 2017). En effet, certains facteurs environnementaux comme un pH faible peuvent affecter négativement l'expression de la N₂O réductase et donc accroître l'émission de N₂O, comme c'est le cas pour *E. meliloti* qui est incapable d'exprimer la N₂O réductase à pH=6 (Bakken et al., 2012; Bueno et al., 2015).

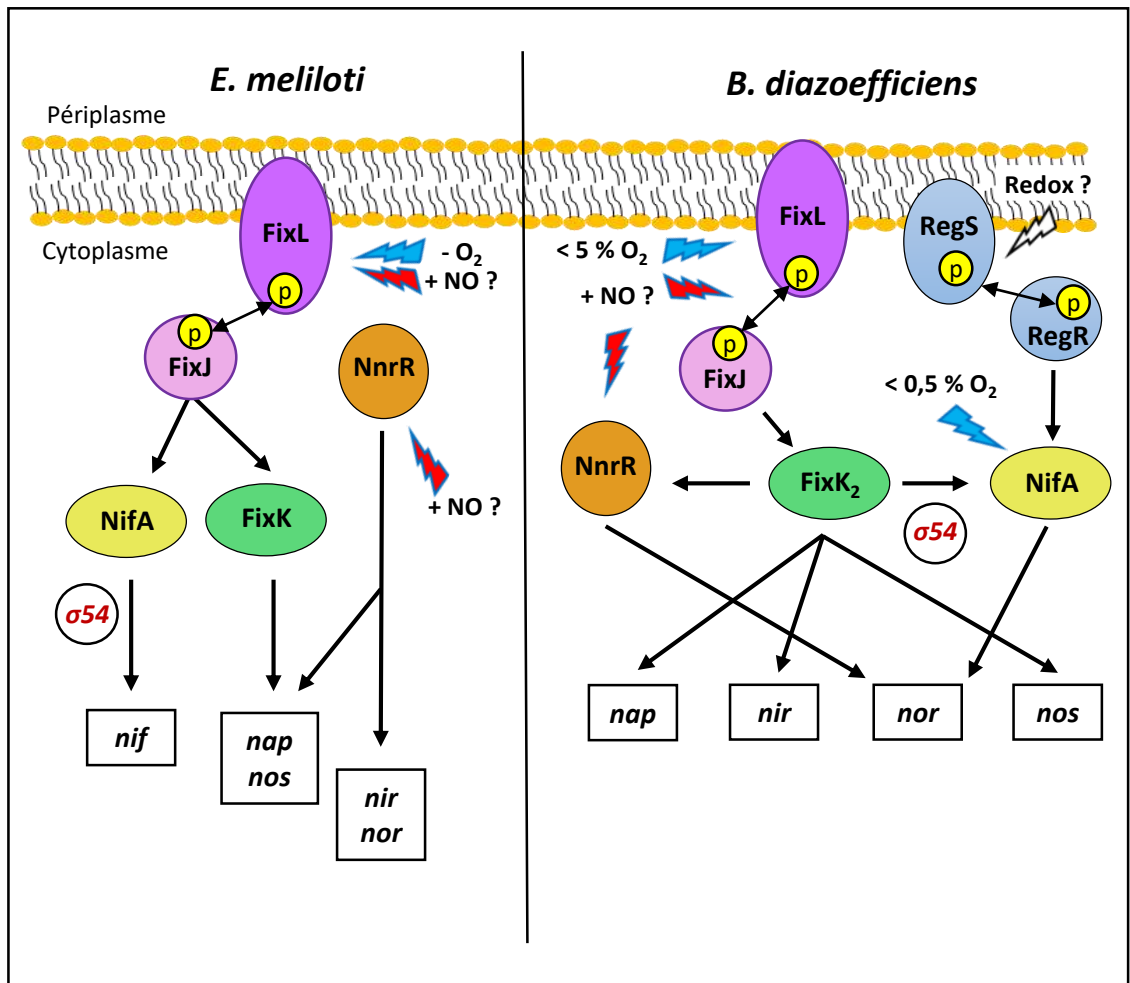


Figure 12 : Comparaison des cascades de régulation des gènes de dénitrification par le NO et l’oxygène chez les rhizobia *Ensifer meliloti* et *Bradyrhizobium diazoefficiens*.

Les régulations positives sont indiquées par des flèches. Les points d’interrogation indiquent que le mécanisme de perception du signal par le régulateur est méconnu (Adapté de (Meilhoc et al. 2011, Salas et al. 2021)).

La N₂O réductase est la seule enzyme connue pour réduire le N₂O en N₂. De ce fait, l'expression et l'activité de cette enzyme sont considérés comme des leviers naturels pour limiter les émissions en N₂O en agriculture. En effet, plusieurs études ont montré que l'inoculation de culture de soja avec des souches de *B. diazoefficiens* surexprimant la N₂O réductase permettent de réduire les émissions de N₂O (Akiyama et al., 2016). Or, pour la sélection de souches d'intérêts agronomiques pour des inoculations en champ, les critères de sélection sont principalement liés à une meilleure efficacité d'infection et de fixation. Récemment, une étude réalisée sur des souches commerciales d'*E. meliloti* a montré la perte du cluster permettant l'expression de la N₂O réductase. Cette perte se traduit par une augmentation du N₂O rejeté par les cultures inoculées par ces souches, et pose donc un véritable problème écologique (Brambilla et al., 2018). Le rhizobium *R. etli* est un autre exemple de bactérie ne possédant pas une voie complète. En effet, *R. etli* ne possède pas de Nap, Nar et de Nos (González et al., 2006b). De ce fait, cette bactérie n'est pas capable d'effectuer la respiration du NO₃⁻. Cette souche possède tout de même une NirK périplasmique et une Nor fonctionnelle. Des expérimentations ont permis de montrer la nécessité de NirK pour réduire le NO₂⁻ en NO (Bueno et al., 2005). De plus, Nor est nécessaire pour réduire le NO en condition de vie libre. La présence de cette voie chez *R. etli* aurait pour fonction de détoxifier la cellule du NO₂⁻ et du NO afin d'éviter leurs accumulations (Gómez-Hernández et al., 2010). Ces exemples nous montrent bien qu'il n'existe pas de modèle unique décrivant la composition et le fonctionnement de la voie de dénitrification parmi des bactéries appartenant à la même classe.

e. La régulation de la dénitrification

La régulation de la dénitrification est un processus complexe faisant intervenir plusieurs niveaux de régulation (Figure 12). La dénitrification est essentiellement régulée par la concentration en oxygène. De façon secondaire, elle est aussi régulée par l'oxyde nitrique (NO), qui est un produit intermédiaire de la voie. Nous allons voir dans ce paragraphe que deux organismes proches comme *E. meliloti* et *B. diazoefficiens* possèdent des voies de dénitrification complètes où l'on retrouve des systèmes de régulation différents.

Chez *E. meliloti*, le premier niveau de régulation est l'induction des gènes de la dénitrification par la microaérobiose. Cette régulation est effectuée via le régulateur à deux composants FixLJ présent chez de nombreuses rhizobia. Dans un premier temps, ce régulateur a été identifié comme étant le régulateur majeur de réponse à la microaérobiose en condition de vie libre ou durant l'interaction symbiotique (Bobik et al., 2006). Lorsque la concentration en O₂ est faible, FixL une histidine kinase jouant le rôle de senseur va s'autophosphoryler et transférer son phosphate au régulateur de réponse FixJ pour l'activer. L'activation de FixJ va conduire à une induction de deux régulateurs intermédiaires, FixK qui contrôle l'expression des gènes de respiration *fix* (*fixNOQP*) codant pour la cytochrome oxydase de type *cbb₃* et certains gènes de la dénitrification comme *nap* ou *nos*, et NifA qui contrôle les gènes de fixation d'azote *nif* (Becker et al., 2004; Bobik et al., 2006; Meilhoc et al., 2010; Meilhoc et al., 2011). L'activation de FixLJ peut également se faire en présence de NO. En effet, cette molécule entre en compétition avec l'oxygène pour se lier au fer de l'hème de FixL et ainsi activer le régulateur. Malgré cela, seul l'oxygène peut supprimer l'activité kinase de FixL (Gilles-Gonzalez et al., 2008). Un deuxième niveau de régulation est apporté par le régulateur senseur de NO NnrR (Nitrite and Nitric oxide Reductase Regulator FNR/CRP). En présence de NO, NnrR va réguler l'expression de gènes impliqués dans la dénitrification tels que *nirK* et *norC* (Meilhoc et al., 2010). NnrR et FixK présentent des similitudes au niveau du site de liaison à l'ADN et de nombreux gènes sont régulés communément par ces deux régulateurs en présence de NO. Il est intéressant de noter que ces deux régulateurs appartiennent à deux voies de signalisation distinctes chez *E. meliloti* (Meilhoc et al., 2010). Ce n'est pas le cas chez *B. diazoefficiens* où NnrR est sous le contrôle de FixLJ par l'intermédiaire de FixK₂ (Cabrera et al., 2011; Jiménez-Leiva et al., 2019). En effet, chez *B. diazoefficiens*, l'expression des gènes *nap*, *nir* et *nos* nécessiterait l'intervention de FixK₂ (cascade de régulation FixLJ/FixK₂/NnrR) en condition de microaérobiose. De plus, le régulateur NnrR (dépendant de FixK₂) et la présence de NO seraient nécessaires à l'expression des gènes *nor* (Bueno et al., 2017; Torres et al., 2017). Récemment, le régulateur à deux composants NasST a été caractérisé comme participant à la régulation en aérobie et anaérobie de la transcription des gènes *nos* en réponse au NO₃⁻ (Sánchez et al., 2014; Sánchez et al., 2017) (Figure 8). En plus de la cascade de régulation FixLJ/FixK₂/NnrR (≤ 5 % O₂ en phase gazeuse), les gènes de dénitrification de *B. diazoefficiens* sont aussi sous le contrôle de la cascade de régulation RegSR/NifA dont le

mécanisme est actuellement inconnu ($\leq 0,5$ % O₂ en phase gazeuse) (Bueno et al., 2010; Torres et al., 2014a) (Figure 12).

II. La symbiose rhizobium / légumineuse

La symbiose (du grec *symbiōsis* qui signifie « vivre ensemble ») se caractérise par une interaction entre deux ou plusieurs partenaires, généralement d'espèces différentes, qui vont vivre ensemble pendant un certain temps (De Bary, 1879) (Oulhen et al., 2016). Il existe cependant plusieurs niveaux d'interaction comme le mutualisme (bénéfique pour les deux organismes), le commensalisme (bénéfique pour un seul partenaire) ou le parasitisme (bénéfique pour un des partenaires et nuisible pour l'autre). Dans le cadre des interactions bénéfiques entre plantes et microorganismes, il existe deux types d'interactions distinctes. Les symbioses dites associatives, comme les interactions avec des bactéries rhizosphériques qui favorisent la croissance des plantes (PGPR = Plant Growth-Promoting Rhizobacteria). Ces interactions avec certaines bactéries de la rhizosphère permettent aux plantes de bénéficier d'avantages tel que la disponibilité de nutriment (fixation d'azote) ou la protection face à des stress ou des agents pathogènes (Wei and Zhang, 2006; Santoyo et al., 2021). De leur côté, les bactéries vont être attirées et bénéficier de divers composés tels que des acides aminés, des acides gras et des sucres. En effet, les sécrétions racinaires de la plante représentent en moyenne 21 % du carbone fixé par la photosynthèse (Jog et al., 2014). La composition de la rhizosphère va dépendre du type de plante et de l'environnement. Le second type de symbiose est dit mutualiste et se caractérise par une différenciation morphologique chez l'un ou les deux partenaires. Dans les symbioses mutualistes entre plantes et microorganismes, on retrouve principalement 3 types d'interactions : les interactions plantes-champignons (symbioses mycorhiziennes), et les symbioses fixatrices d'azote entre des plantes appartenant à la famille des légumineuses et des rhizobia, ou des plantes actinorhiziennes et des bactéries du genre *Frankia*.

Les symbioses mycorhiziennes sont très répandues chez les plantes puisqu'elles concernent 70 à 80 % des espèces de plantes vascularisées (Brundrett and Tedersoo, 2018). Les deux types de symbiose mycorhiziennes les plus connus sont l'endomycorhize à arbuscules (AM) et l'ectomycorhize (EM). Ces interactions permettent aux plantes d'augmenter le volume

de sol exploré via un réseau mycélien facilitant l'absorption de l'eau et des minéraux par la plante. En échange la plante va fournir au champignon des éléments carbonés issus de la photosynthèse (Buscot, 2015).

La symbiose entre plantes actinorhiziennes et bactéries du genre *Frankia* est une interaction qui permet à ce type de plante d'obtenir une source d'azote assimilable provenant de la fixation d'azote bactérienne. Cette Endosymbiose nécessite la mise en place d'un organe racinaire particulier que l'on appelle actinorhize (nodosité fixatrice d'azote) dans lequel les bactéries vont pouvoir effectuer la fixation. Les plantes actinorhiziennes sont généralement des arbres ou des arbustes (Aulnes). Les *Frankia* sont des bactéries filamenteuses difficiles à transformer de façon stable par des techniques de génétique usuelles. L'étude de cette interaction est intéressante car on retrouve généralement ce type de symbiose dans des environnements extrêmes présentant un pH ou un niveau de salinité élevé (terrassment minier, zone aride) et où l'azote est limitant (Franche et al., 2009; Hocher et al., 2019). L'étude de ces interactions présente de nombreux intérêts avec des applications pour l'environnement, comme la réhabilitation de certains sols ou la protection du littoral.

La symbiose mutualiste entre les légumineuses et les rhizobia est celle qui va être développée dans les chapitres suivants. Cette interaction permet à cette famille de plantes de subvenir à ses besoins en azote grâce à l'endosymbiose de bactéries fixatrices, les rhizobia, au sein d'un organe particulier, la nodosité. Cette symbiose va permettre aux légumineuses comme *Medicago truncatula* de s'adapter à des environnements limitants en azote minéral grâce à la capacité du partenaire bactérien à fixer l'azote atmosphérique. En échange, la plante va fournir à la bactérie (*Ensifer meliloti* dans le cas de *M. truncatula*) de la matière carbonée issue de la photosynthèse, ainsi qu'un environnement protecteur. Il est intéressant de noter que les associations symbiotiques entre légumineuse et rhizobia peuvent être plus ou moins spécifiques. Chaque souche de rhizobium peut s'associer avec un nombre limité de plantes hôtes et inversement. Il existe des associations très spécifiques comme celle de *Azorhizobium caulinodans* qui ne s'associe qu'avec un certain nombre d'espèces du genre *Sesbania*. A l'inverse, la souche *Ensifer fredii* NGR234 est capable de s'associer avec plus de 112 genres de plantes hôtes (Pueppke and Broughton, 1999; Poole et al., 2018).

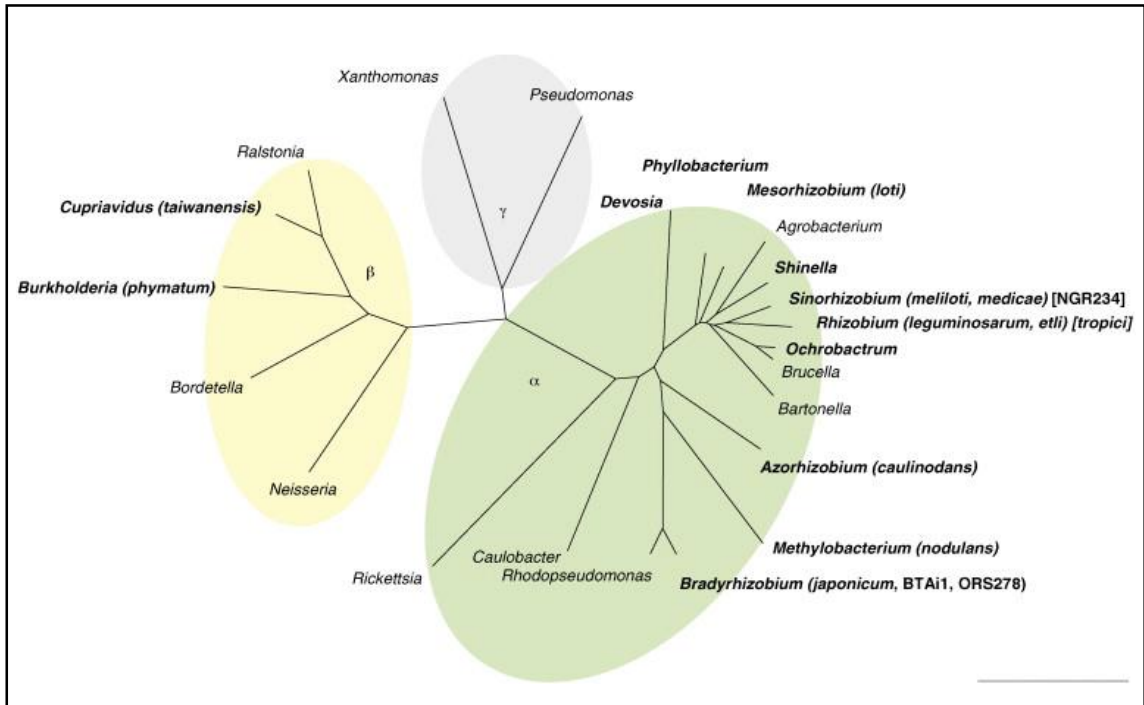


Figure 13 : Arbre phylogénétique réalisé à partir de l'ARN 16S des protéobactéries. Les rhizobia sont marquées en gras. Les espèces de rhizobia dont le séquençage du génome a été réalisé sont entre parenthèses (Masson-Boivin et al. 2011).

1. Les modèles d'études

a. Les rhizobia

Le terme rhizobia est couramment utilisé pour désigner un groupe de plus de 200 bactéries capables d'induire la formation de nodosités et de fixer l'azote atmosphérique en interaction avec des légumineuses. Ces bactéries appartiennent au Phylum des protéobactéries et plus précisément aux classes des α -protéobactéries et β -protéobactéries. Les rhizobia possèdent un génome d'une taille allant de 5 à 10 Mb avec un ou plusieurs chromosomes et plasmides (Poole et al., 2018). La classification des rhizobia a évolué au cours du temps. Dans un premier temps, toutes les bactéries capables d'établir une symbiose fixatrice d'azote avec des légumineuses ont été rattachées au genre *Rhizobium*. Récemment, des études phylogénétiques reposant sur des techniques de biologie moléculaire modernes ont montré l'existence chez les rhizobia de 18 genres différents. Parmi eux, on retrouve les *Ensifer*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Mesorhizobium* pour les α -protéobactéries et les *Cupriavidus* et *Burkholderia* pour les β -protéobactéries (Shamseldin et al., 2017) (Figure 13). Les rhizobia sont étudiées pour leur capacité à établir une interaction symbiotique avec les légumineuses. Or, ces bactéries passent également une partie de leur cycle de vie dans le sol et au sein de la rhizosphère. En vie libre, ces bactéries aérobies se présentent morphologiquement sous forme de bâtonnets. Elles sont mobiles grâce à la présence d'un ou plusieurs flagelles. Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, les rhizobia ont la capacité d'utiliser le NO_3^- dans certaines conditions pour se développer. En effet, le NO_3^- peut être assimilé en ammonium (assimilation du nitrate) pour des besoins métaboliques, ou utilisé comme accepteur final d'électrons pour respirer (dénitrification).

Chez les rhizobia, la fixation de N_2 s'effectue généralement lors d'une interaction symbiotique, même si certaines rhizobia telles que *Azorhizobium caulinodans* sont capables de fixer l'azote à la fois en symbiose et en vie libre (DREYFUS et al., 1988). Certaines rhizobia telles que *Bradyrhizobium* spp. sont capables de fixer à l'état libre grâce à des conditions de microaérobie et la présence de sources carbonées retrouvées dans les apoplastes (Yoneyama et al., 2017). Récemment, certaines souches de *Bradyrhizobium* ont été identifiées comme capables de fixer l'azote en vie libre, mais aussi lors de l'interaction avec des plantes autres que des légumineuses, comme le sorgho (Hara et al., 2019).

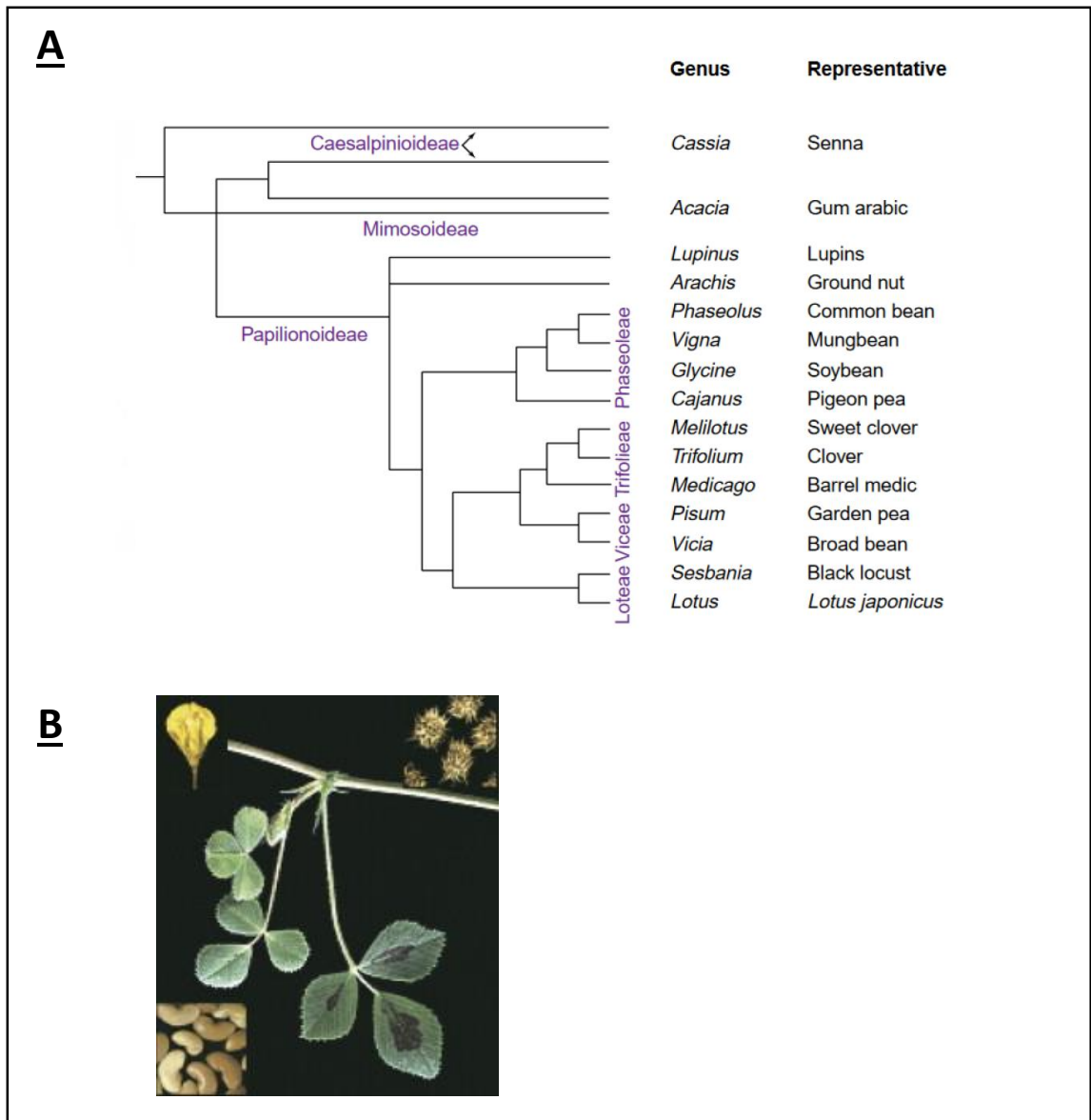


Figure 14 : Arbre phylogénétique des légumineuses.

(A) Arbre phylogénétique des légumineuses (Udvardi et al. 2005). **(B)** Photo de fleur, gousses, graines et feuilles de *Medicago truncatula*.

Ensifer meliloti (anciennement *Sinorhizobium meliloti*) est un rhizobium à gram-négatif présent naturellement dans les sols. Cette bactérie appartient à la sous classe Alpha des protéobactéries. Cette bactérie est capable de noduler un nombre limité de légumineuses des genres *Medicago*, *Melilotus* et *Trigonella*. La souche bactérienne utilisée au cours du projet de thèse est la souche RM2011 qui présente l'avantage technique d'être résistante à la streptomycine. Son génome a été entièrement séquencé (<https://iant.toulouse.inra.fr/bacteria/annotation/cgi/rhime2011/rhime2011.cgi>) (Sallet et al., 2013) et contient un chromosome de 3.65 Mb et deux mégaplasmides pSymA (1.35 Mb) et pSymB (1.68 Mb). Le chromosome porte l'ensemble des gènes de ménage (Capela et al., 2001). Le pSymA porte une majorité des gènes essentiels à l'interaction symbiotique et le pSymB ceux codant pour des protéines ayant des fonctions dans le prélèvement de nutriments (transporteurs), la réponse au stress et l'invasion de la plante (exopolysaccharides) (Barloy-Hubler et al., 2000).

b. Les légumineuses

Les légumineuses (*Leguminosae* ou *Fabaceae*) appartiennent à la famille des plantes dicotylédones de l'ordre des *Fabales*. Cette famille de plantes compte 750 genres qui regroupent 19 300 espèces que l'on peut retrouver sous forme d'herbes, arbustes et arbres (Figure 14A). Ces plantes sont généralement connues pour être capables de fixer l'azote atmosphérique grâce à une interaction symbiotique avec des bactéries du sol. Il est intéressant de noter que toutes ne sont pas capables d'établir une interaction symbiotique. Les légumineuses les plus connues sont des espèces d'intérêt agronomique comme le soja, le haricot, le pois, la luzerne, le lupin ou les lentilles. Les légumineuses se répartissent en 6 sous-familles. Les Caesalpinioideae (mimosa, arbre de Judée) et les Papilionoideae (luzerne, soja, pois ...) sont capables de former des symbioses fixatrices d'azote. En revanche, les Cercidoideae, Detarioideae, Dialioideae et Duparquetioideae n'en sont pas capables (Andrews and Andrews, 2017; Azani et al., 2017).

La luzerne est une légumineuse fourragère (genre *Medicago*) largement cultivée pour son utilité dans l'alimentation animale. L'espèce la plus connue est la luzerne *Medicago sativa*. Cette plante est peu adaptée à l'étude en laboratoire car elle possède un génome tétraploïde

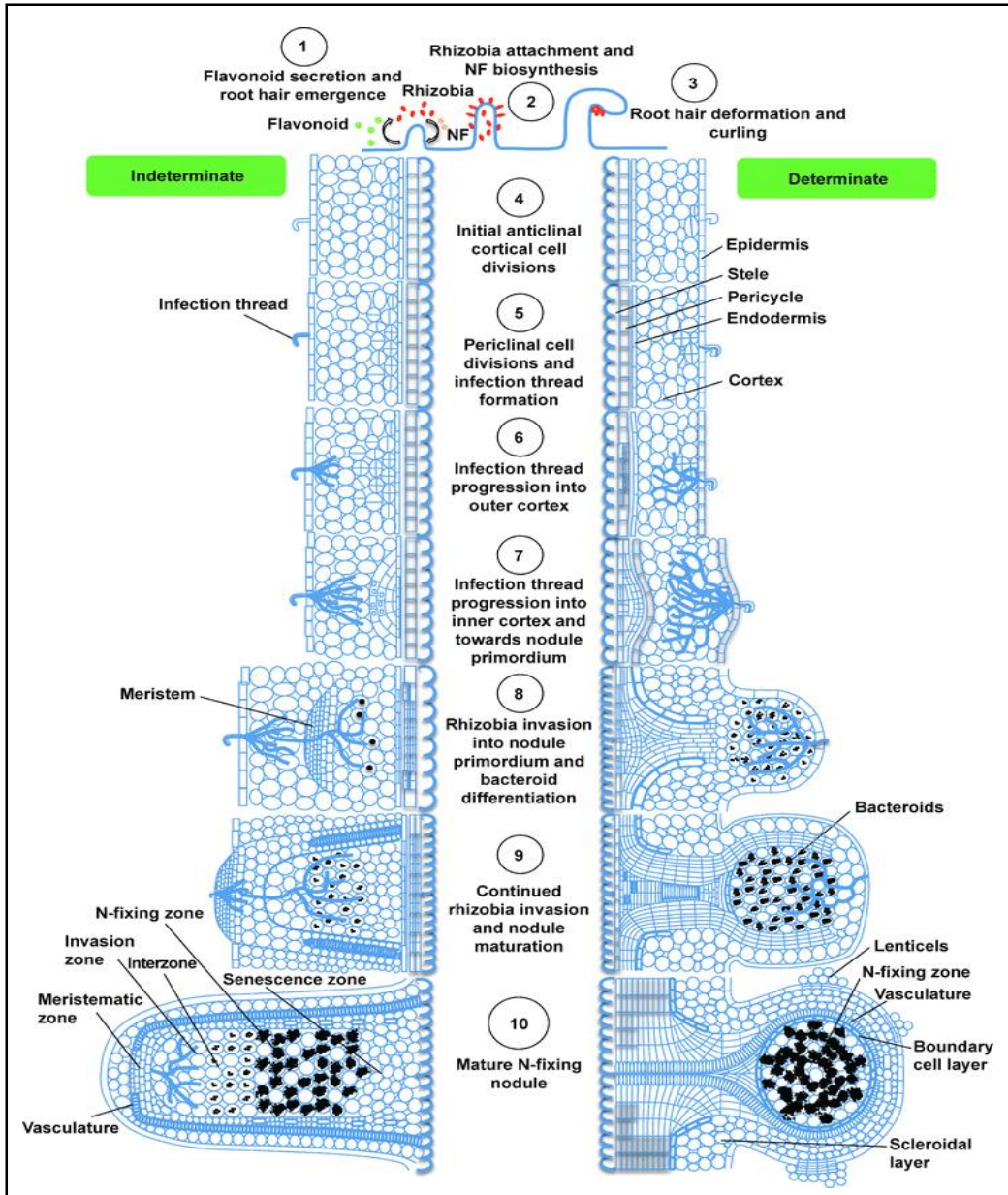


Figure 15 : Représentation des différentes étapes de la nodulation. Représentation des différentes étapes (de haut en bas) du développement de nodules indéterminés (à gauche) ou déterminés (à droite). (Ferguson et al. 2010)

de grande taille et est allogame. De ce fait, durant ma thèse, j'ai utilisé la plante modèle *Medicago truncatula*, communément appelée luzerne tronquée (Figure 14B). Cette petite luzerne proche de la référence agronomique *M. sativa* possède plusieurs avantages. Premièrement, *M. truncatula* est un organisme diploïde ($2n=16$), autogame et son génome de 500 Mb est séquencé (Pecrix et al., 2018). De plus, de nombreux outils de recherche sont disponibles afin de faciliter l'étude de celle-ci (transformation par *Agrobacterium*, banque de mutants d'insertion, études transcriptomiques ...). De plus, la petite taille et le cycle de vie court de cette luzerne facilitent sa culture et son étude *in vitro*.

2. L'interaction symbiotique entre *Medicago truncatula* et *Ensifer meliloti*

La mise en place de la symbiose entre *M. truncatula* et *E. meliloti* peut se diviser en quatre grandes étapes. La première étape est un dialogue moléculaire entre la plante et la bactérie. Viennent ensuite l'étape de l'infection de la racine par la bactérie et le développement du primordium nodulaire. La troisième étape est la formation d'un nouvel organe racinaire, la nodosité, et sa maturation qui va permettre à la bactérie de fixer l'azote atmosphérique. La dernière étape, appelée sénescence nodulaire, correspond à la mort des cellules végétales et des bactéries au sein du nodule (Figure 15).

a. Le dialogue moléculaire

Les plantes secrètent dans le sol des composés tel que des sucres ou des acides organiques qui attirent les bactéries dans l'environnement proche des racines. Dans un environnement pauvre en azote, les légumineuses vont sécréter des flavonoïdes dans la rhizosphère. Ces flavonoïdes vont attirer les bactéries par chimiotactisme vers les racines (Perret et al., 2000) et vont être perçus par les rhizobia grâce aux régulateurs de transcription NodD, permettant ainsi l'activation de l'expression de gènes codant (*nod*, *nol* et *noe*) pour des enzymes nécessaires à la synthèse, la maturation et le transport de facteurs Nod (*nodABC*). Les facteurs Nod sont des lipo-chito-oligosaccharides (LCO) qui vont être perçus à leur tour par la plante grâce à des récepteurs membranaires LysM-RLKs (Gough and Cullimore, 2011). La liaison des facteurs Nod au domaine LysM extracellulaire du récepteur LysM-RLKs induit une

signalisation calcium-dépendante qui permet la transduction du signal de la membrane jusqu'au noyau et donc l'activation de l'expression de facteurs de transcription par l'intermédiaire de plusieurs protéines dont la protéine kinase calcium et calmoduline dépendante CCaMK (calcium- and calmodulin- dependent serine/threonine protein kinase). Ces facteurs de transcription vont réguler l'expression de nombreux gènes (nodulines) qui vont permettre simultanément l'invasion bactérienne par le poil absorbant et la reprise des divisions cellulaires pour former le futur nodule (Zipfel and Oldroyd, 2017).

b. Infection de la plante par la bactérie

L'infection de la plante par la bactérie a lieu au niveau des poils racinaires. Une fois la bactérie au contact d'un poil racinaire, la plante, sous l'action des facteurs Nod, va déclencher un allongement et une courbure du poil de façon à former une poche d'infection. Les bactéries vont s'y diviser pour former une microcolonie. Au contact de cette microcolonie, la paroi végétale va être hydrolysée localement par la production de cellulases bactériennes, et permettre la formation d'une structure tubulaire appelée cordon d'infection, par invagination de la membrane plasmique et dépôt de composants pariétaux (Gage, 2004; Oldroyd et al., 2011). Les bactéries vont progresser à l'intérieur de cette structure en se divisant (Gage, 2002), et ainsi atteindre le cortex racinaire, où elles vont être internalisées par endocytose au sein des cellules végétales. Les bactéries, appelées bactéroïdes à partir de ce stade, sont séparées du cytoplasme de la cellule végétale par une membrane dite pér bactéroidienne formant ainsi le symbiosome (Leborgne-Castel et al., 2010; Oldroyd et al., 2011). C'est au sein de ce symbiosome que les bactéroïdes vont se différencier en bactéroïdes fixateurs d'azote. Cette différenciation se caractérise par une augmentation de la taille de la cellule, une endoréplication du génome, et une perméabilisation de la membrane.

c. Maturation de la nodosité

Il existe deux types de nodosités différentes chez les légumineuses, dites déterminées ou indéterminées (Figure 15). Cette caractéristique est propre à la plante hôte et est définie par le type de méristème.

Les nodosités déterminées ont une forme arrondie et possèdent un méristème central non-persistant. Chez ce type de nodosité, les premiers événements de division apparaissent dans le cortex externe de la racine. Les légumineuses comme le soja (*Glycine max*) ou le lotier (*Lotus japonicus*) forment des nodules de type déterminé. Dans ces nodules, le méristème cesse son activité environ dix jours après l'infection (Newcomb et al., 2011). Après l'arrêt des divisions cellulaires, la croissance du nodule résulte de l'augmentation de taille des cellules végétales.

M. truncatula forme des nodules de type indéterminé, caractérisés par la présence d'un méristème apical et persistant. De ce fait, la croissance du nodule va avoir lieu au cours du temps en raison de la division cellulaire continue. Cet accroissement constant et la position apicale du méristème vont donner une forme allongée à ce type de nodule. Pour les nodosités indéterminées, les premières divisions cellulaires ont lieu dans le cortex interne, puis dans l'endoderme et le péricycle.

La croissance continue du nodule permet à tout moment de distinguer quatre zones correspondant à des stades successifs de développement du nodule et de différenciation des bactéroïdes (Ferguson et al., 2010).

- Zone I : située à l'apex du nodule, c'est la zone méristématique qui permet la croissance du nodule par divisions cellulaires constantes. Cette zone est dépourvue de bactéries.
- Zone II : la zone d'infection est le lieu où les bactéries sont libérées des cordons d'infection et internalisées dans les cellules végétales (bactéroïdes). C'est dans cette zone que les bactéroïdes vont progressivement se différencier.
- Zone III : la zone de fixation contient les bactéroïdes complètement différenciés. Cette zone présente un environnement microaérobie, favorable au fonctionnement de la nitrogénase pour fixer l'azote atmosphérique.
- Zone IV : la zone de sénescence, où les cellules bactériennes et végétales meurent et se dégradent, est la zone du nodule la plus âgée et donc située à proximité de la racine.

d. La fixation d'azote

La mise en place de la fixation d'azote par le nodule est une des étapes les plus importantes dans l'établissement et le maintien de l'interaction symbiotique. Cette voie fait partie du cycle de l'azote et permet aux bactéries qui possèdent la nitrogénase de réduire une molécule de N₂ en deux molécules de NH₃ ($N_2 + 8H^+ + 16 ATP \rightarrow 2 NH_3 + H_2 + 16 ADP + 16 Pi$) (Hoffman et al., 2014).

C'est au cours de la différenciation du bactéroïde que va avoir lieu l'expression de gènes nécessaires à la synthèse et la maturation de la nitrogénase. Ce complexe enzymatique codé par *nifHDK* est composé de deux métalloprotéines. La première sous-unité (site catalytique) est une protéine tétramérique contenant un cofacteur fer-molybdène (Fe-Mo) appelée dinitrogénase, codée par *nifD* et *nifK*. La seconde sous-unité est un homodimère Fe appelé dinitrogénase réductase codé par *nifH* et responsable du transfert d'électrons vers la dinitrogénase (Seefeldt et al., 2009). S'ajoutent à cela les gènes *nifB*, *nifE*, *nifX* et *nifX* qui codent pour des enzymes impliquées dans la biosynthèse du cofacteur Fe-Mo de la nitrogénase (Rubio and Ludden, 2008).

Comme pour la dénitrification, la régulation des gènes *nif* (fixation d'azote) et *fix* (respiration) dépend de la concentration en O₂. Par conséquent, la régulation de la nitrogénase va directement dépendre des régulateurs FixLJ et NifA, où NifA est directement responsable de l'activation de la transcription des gènes *nifHDK*. Comme vu précédemment lors du chapitre sur la régulation de la dénitrification, l'expression de NifA dépend de l'activation de FixLJ et donc de la microaérobie et du NO (Bobik et al., 2006; Meilhoc et al., 2010). L'activation de FixLJ par la microaérobie permet aussi par l'intermédiaire de FixK, l'expression de gènes codant pour des cytochrome-oxydases membranaires hautement affines pour l'oxygène (codées par *fixNOQP*) (David et al., 1988). Ces oxydases respiratoires sont essentielles à la respiration des bactéroïdes et donc au fonctionnement de la nitrogénase, malgré les conditions limitantes en oxygène (Renalier et al., 1987; Kuzma et al., 1993; Delgado et al., 1998).

La fixation d'azote est une réaction très coûteuse en énergie avec 16 molécules d'ATP consommées pour une molécule de N₂ réduite. Afin de fournir aux bactéroïdes l'ATP et la capacité réductrice nécessaires au fonctionnement de la nitrogénase, la plante va métaboliser

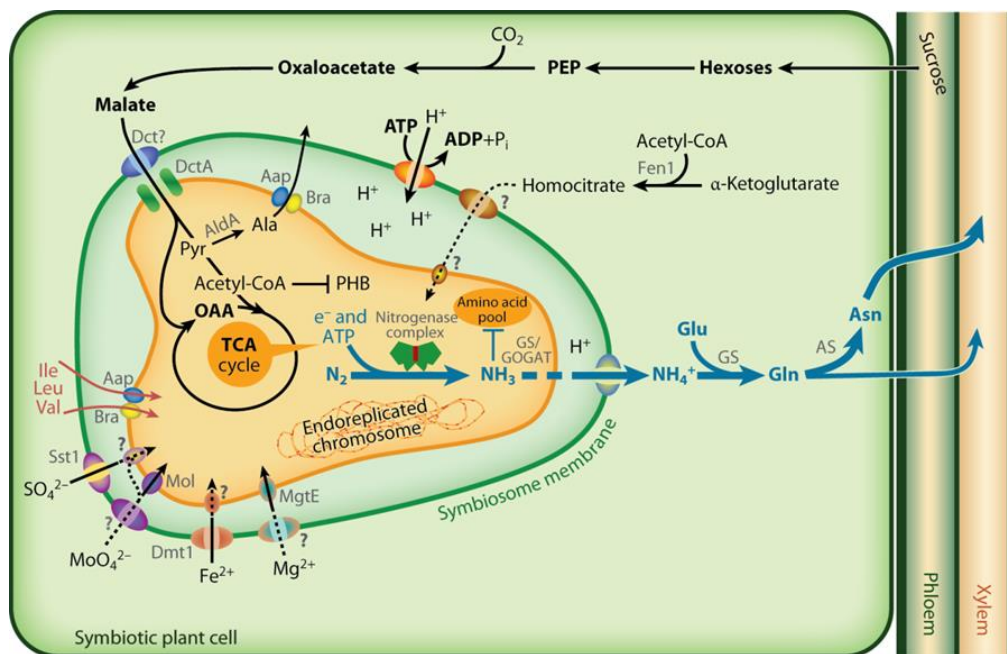


Figure 16 : Représentation simplifiée du métabolisme symbiotique établi entre la cellule végétale et le symbiosome.

L'activité nitrogénase (source d'ammonium) du bactéroïde nécessite une forte contribution énergétique (glucides provenant de la photosynthèse) de la part de la plante hôte. Ces glucides sont directement assimilés en malate dans le bactéroïde par le cycle de Krebs permettant la synthèse d'ATP nécessaire à l'activité nitrogénase. La nitrogénase réduit le diazote en ammonium qui est ensuite assimilé par la plante sous forme d'asparagine (Asn) et de glutamine (Gln). (Udvardi & Poole. 2013)

le saccharose provenant de la photosynthèse en hexoses pour produire principalement du malate, du succinate et du fumarate (Figure 16) (Kahn et al., 1998). En contrepartie, le NH_3 produit par les bactéroïdes va être assimilé dans le cytoplasme des cellules végétales via le cycle GS-GOGAT. Cet enchaînement de deux réactions permet de synthétiser de la glutamine à partir de glutamate et d'ammonium par l'action de la glutamine synthase (GS). La synthèse de glutamate se fait à partir de glutamine et de 2-oxoglutarate par l'intermédiaire de la Glutamine-2-OxoGlutarate-Amino-Transférèse (GOGAT) (Udvardi and Poole, 2013).

Pour que la fixation d'azote soit optimale, il est nécessaire que l'environnement proche de la nitrogénase comporte une faible concentration en oxygène. En effet, la nitrogénase est extrêmement sensible à l'oxygène (Shah and Brill, 1977). Dans une nodosité, la concentration en oxygène se situe entre 10 et 40 nM (Appleby, 1992). Pour que cette concentration soit finement contrôlée, des mécanismes permettant la mise en place d'un environnement microoxique au sein du nodule sont nécessaires dans le nodule. Premièrement, le nodule présente une barrière de diffusion limitant la diffusion de différents gaz comme l' O_2 . Cette barrière prend place dans le cortex interne du nodule et se compose d'un épithélium comprenant une forte densité cellulaire et des espaces intercellulaires obstrués par la sécrétion de glycoprotéines (Batut and Boistard, 1994). Dans un second temps, la concentration nodulaire en O_2 est régulée par la présence d'une hémoglobine végétale produite en grande quantité, nommée leghémoglobine (Nash and Schulman, 1976). La leghémoglobine présente une forte affinité pour l'oxygène et est responsable de la coloration rose des nodosités fixatrices. La capture de l' O_2 par la leghémoglobine va permettre de transporter celui-ci vers les mitochondries pour alimenter la chaîne de transfert d'électrons (Ott et al., 2005).

e. La sénescence nodulaire

Après quelques semaines, la mise en place de la sénescence va s'établir naturellement à partir de la zone IV du nodule, puis, elle va s'étendre du centre de la zone III jusqu'aux couches cellulaires périphériques et apicales. Cette évolution conique (du centre vers l'extérieur) de la sénescence aurait pour intérêt d'optimiser la remobilisation des produits de dégradation (Pérez Guerra et al., 2010). L'apparition de la sénescence va être marquée par la

diminution de la fixation d'azote jusqu'à son arrêt total. Visuellement, la sénescence se caractérise par l'apparition d'une couleur verte remontant depuis la base du nodule. En effet, si un nodule fixateur se caractérise par sa couleur rose, le changement du rose au vert est dû à la dégradation de la leghémoglobine en biliverdine. La mise en place de la sénescence va s'effectuer en deux étapes (Vasse et al., 1990; Van De Velde et al., 2006). Dans un premier temps, la dégradation des bactéroïdes et la fusion des symbiosomes amène à l'apparition de nombreuses vésicules dans le cytoplasme des cellules végétales. Cette étape permet la remobilisation des nutriments au profit de la plante. Dans un second temps, ce sont les cellules végétales qui sont dégradées. La sénescence va entraîner des changements caractéristiques dans l'expression de certains gènes impliqués dans la dégradation cellulaire comme des cystéines protéases (CP), des lipases et différentes hydrolases (Van De Velde et al., 2006). Chez *Medicago*, l'expression spécifique de cystéines protéases (*MtCP6* et *MtVPE*) à l'interface de la zone III et de la zone IV est caractéristique de la mise en place de la sénescence (Pierre et al., 2014).

Même si peu de choses sont connues sur les mécanismes moléculaires qui contrôlent la sénescence nodulaire, plusieurs études suggèrent l'implication de certaines phytohormones dans le processus de sénescence. En effet, l'éthylène, l'acide jasmonique et l'acide abscissique activeraient la sénescence alors que les gibbérellines et les cytokinines la ralentiraient (Puppo et al., 2005; Van De Velde et al., 2006; Chen et al., 2014b). Les systèmes antioxydants et l'équilibre redox médiés par la plante et le bactéroïde pourraient avoir un rôle dans l'établissement de la sénescence. Pour exemple, un mutant des catalases *katA katB* d'*E. meliloti* conduit à l'apparition d'une sénescence précoce (Jamet et al., 2003). Une étude récente a montré l'importance du glutathion dans le maintien de l'interaction symbiotique. En effet, chez *E. meliloti*, un mutant du gène *gshB* codant une synthétase du glutathion, provoque une sénescence précoce des nodules (Harrison et al., 2005; Yang et al., 2020).

Chez des nodules fixateurs, l'apparition de la sénescence peut être induite par un changement de conditions environnementales comme un stress hydrique, un stress salin ou l'obscurité prolongée. A la différence de la sénescence développementale, la sénescence nodulaire induite progresse plus rapidement depuis la zone 4, avec un front non conique (Pérez Guerra et al., 2010). De plus, seuls environ 50% des gènes surexprimés lors d'une sénescence naturelle ont été également trouvés induits par l'obscurité (Pérez Guerra et al.,

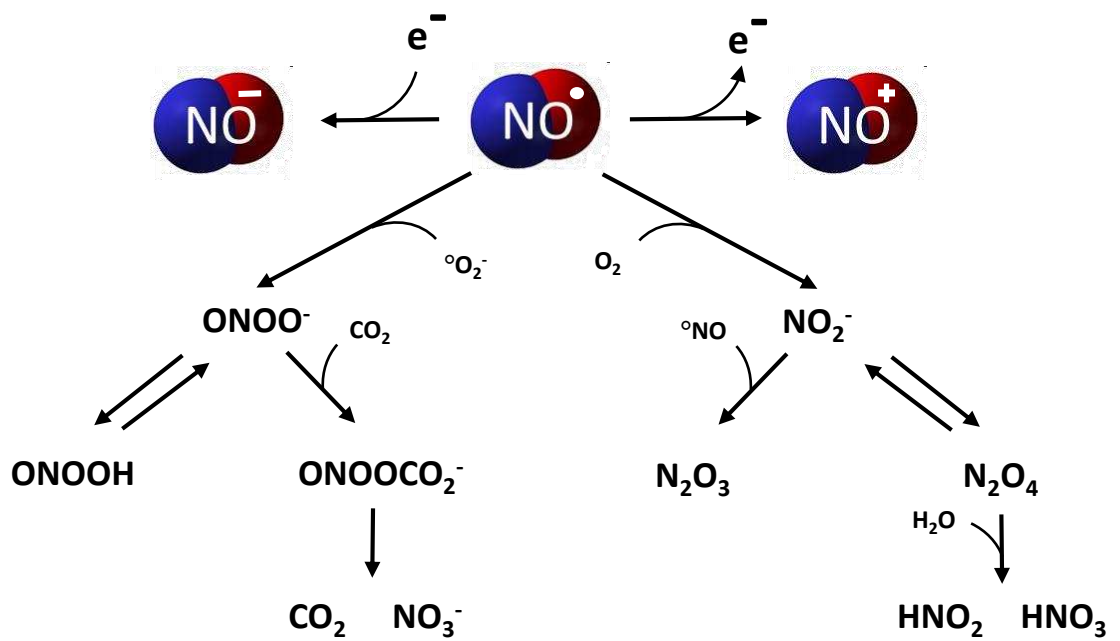
2010). Les sénescences naturelle et induite impliqueraient donc des mécanismes moléculaires différents.

III. L'oxyde nitrique (NO)

1. Caractéristiques et propriétés chimiques du NO.

L'oxyde nitrique ou monoxyde d'azote (NO) a été découvert en 1772 par un chimiste anglais, Joseph Priestley, qui l'a décrit comme un gaz incolore provoquant une sensation de bien être accompagnée de crises de rire. Elue molécule de l'année en 1992 par le journal « *Science* », le NO est étudié pour ses propriétés chimiques depuis plus de 200 ans. C'est en 1977 que Murad démontre que la nitroglycérine et d'autres composés libérant du NO agissent comme vasodilatateurs. En 1980, Furchgott montre que les cellules de l'endothélium produisent une molécule de signalisation qu'il appelle EDRF (endothelium-derived relaxing factor). C'est en 1987 que Ignarro découvre que l'EDRF, qui agit comme un produit de relaxation des muscles lisses vasculaires, est du monoxyde d'azote. En 1998, le prix Nobel de physiologie et de médecine est décerné à Robert Furchgott, Louis J. Ignarro et Ferid Murad pour leurs recherches sur l'importance du NO comme molécule signal dans le système cardiovasculaire. Depuis ces années-là, le NO a d'abord été très étudié chez les mammifères comme molécule impliquée dans la vasodilatation, la neurotransmission ou l'immunité. À la suite de cela, beaucoup d'études se sont tournées vers le NO chez les végétaux et chez les procaryotes (Porrini et al., 2020). Au 15/12/2021, on retrouve plus de 182 403 articles sur PubMed avec le mot clé « nitric oxide ».

Le NO est une petite molécule diatomique gazeuse très réactive composée d'un atome d'azote et d'un atome d'oxygène. Sa réactivité est due à la présence d'un électron orbital non apparié lui conférant des propriétés oxydantes (Stamler et al., 1992). Présent dans l'air, le NO peut provenir de différentes réactions comme par exemple la dénitrification effectuée par certaines bactéries, la combustion (pollution des moteurs thermiques) ou la foudre (Hutfless et al., 2018). Le NO a une demi-vie très variable, allant de quelques secondes jusqu'à une trentaine de minutes dans certaines conditions (Toledo and Augusto, 2012). Le temps de demi-vie et la réactivité du NO peuvent varier en fonction des conditions environnementales,



Molécule	Nom	Molécule	Nom
ONOO^-	Peroxynitrite	NO_2^-	Nitrite
ONOOH	Acide peroxynitreux	N_2O_3	Trioxyde d'azote
ONOOCO_2^-	Nitrosoperoxycarbonate	N_2O_4	Peroxyde d'azote
NO_3^-	nitrate	HNO_2	Acide nitreux
CO_2	Dioxyde de carbone	HNO_3	Acide nitrique

Figure 17 : Différentes réactions impliquant l'oxyde nitrique (NO) et l'anion superoxyde ($^{\circ}\text{O}_2^-$) ou l'oxygène (O_2).

comme le pH, la température ou de sa propre concentration. Le NO est un radical libre qui possède des propriétés oxydantes et peut donc réagir avec d'autres molécules, notamment certaines protéines, l'ADN et les lipides (Toledo and Augusto, 2012).

Le NO a la capacité de pouvoir diffuser dans des milieux hydrophiles comme le cytoplasme (hydrosoluble). Étant lipophile, il peut facilement traverser les membranes lipidiques. Dans un organisme, le rôle du NO peut varier en fonction de sa concentration. En effet, le NO peut agir comme molécule signal à faible concentration (nM). À l'inverse, à forte concentration (μM), le NO peut devenir une molécule toxique (Toledo and Augusto, 2012). Ainsi, il est important que la concentration du NO soit finement régulée afin de contrôler son action au sein d'un système biologique.

2. Les modes d'action du NO

Le NO est une molécule capable de réagir avec beaucoup de molécules. Ces interactions peuvent s'avérer nécessaires dans des voies de régulation où le NO intervient en tant que molécule signal. Les réactions entre le NO et d'autres molécules comme les espèces réactives de l'oxygène (ROS) peuvent se révéler toxiques (Figure 17). En effet, le NO et l'ion superoxyde (O_2^-) peuvent interagir pour donner du peroxynitrite (ONOO^-) qui se révèle beaucoup plus dangereux que les radicaux libres eux-mêmes. Les espèces réactives de l'azote (RNS) ont un fort pouvoir nitrosatif/oxydatif et peuvent donc réagir avec des composants cellulaires tel que l'ADN, les lipides et des acides aminés. Le NO peut aussi réagir avec d'autres molécules comme avec le NO_2^- pour donner du trioxyde de diazote (N_2O_3) ou avec des molécules telles que l'anion hydroxyde (OH^-) et l'anion carbonate (CO_3^-) (Stern and Zhu, 2014).

a. Effet du NO sur l'ADN et les lipides

Le NO et les RNS comme le peroxynitrite sont responsables de dommages sur l'ADN tels que des cassures ou des mutations (Figure 18). Une concentration trop élevée en NO peut entraîner des mutations générées par la déamination des cytosines en thymidine par l'intermédiaire du N_2O_3 (Wink et al., 1991). *In vitro*, le NO a été montré comme responsable de l'apparition de xanthine ou hypoxanthine par déamination de guanine ou d'adénine sur

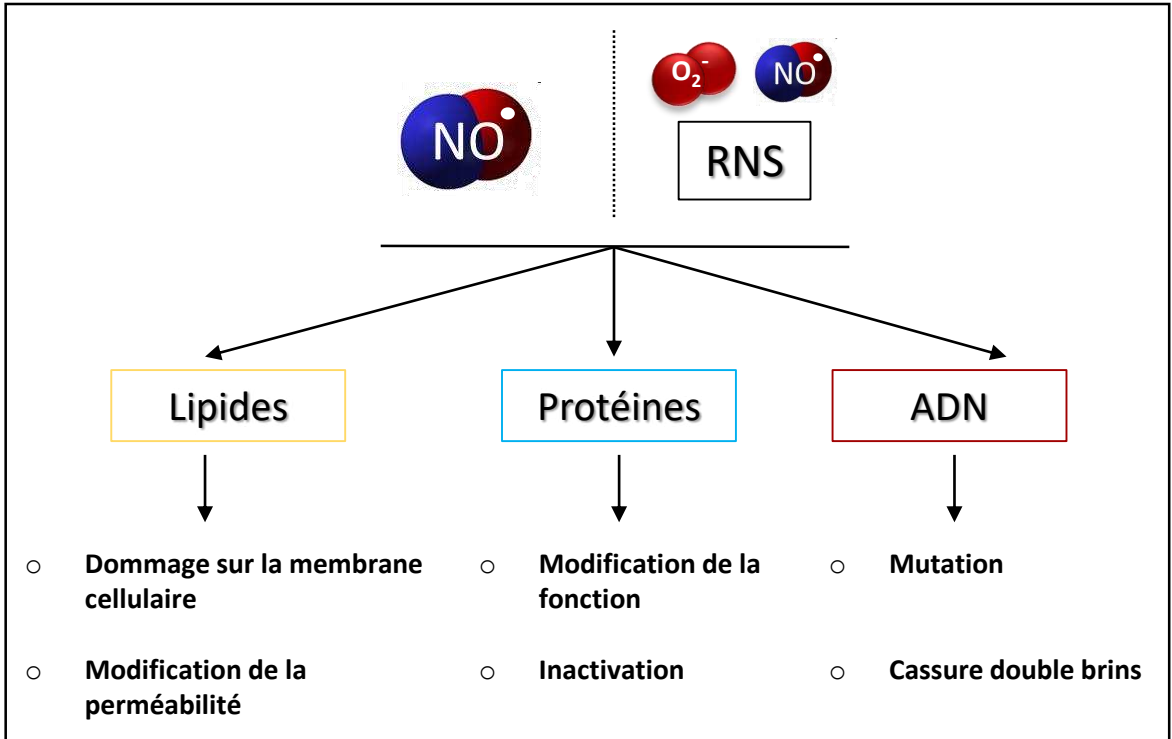


Figure 18 : Exemples d'effets du NO et des RNS sur les lipides membranaires, les protéines et l'ADN.

des molécules d'ADN ou d'ARN (Nguyen et al., 1992). Le peroxynitrite peut quant à lui provoquer des cassures double-brin de l'ADN en oxydant le résidu guanosine en 2-oxo-2'-dioxypyrimidine (Stern and Zhu, 2014).

L'effet cytotoxique du peroxynitrite peut être dû à sa capacité à interagir avec les lipides et les lipoprotéines présentes dans la membrane cellulaire. Le ONOO⁻ va déclencher une peroxydation des acides gras poly-insaturés et entraîner une désorganisation de la membrane cellulaire (Porrini et al., 2020).

b. Effet du NO sur les protéines

Comme pour l'ADN et les lipides, le NO va pouvoir réagir avec des protéines et les modifier. On connaît trois types de modifications post-traductionnelles causées par le NO : la S-nitrosylation, la Tyrosine nitration et la Métal-nitrosylation (Figure 19).

S-nitrosylation : Cette modification est une liaison covalente du NO aux groupements thiols (S-nitrosothiol SNO) des cystéines contenues dans les protéines (Figure 19). La modification d'une cystéine peut entraîner l'apparition ou la cassure de ponts disulfures induisant un changement de conformation de la protéine (Astier et al., 2012). Cette réaction ne se produit pas sur toutes les cystéines d'une protéine. En effet, la présence de chaîne latérale d'acides aminés acides ou basiques dans un environnement proche de la cystéine pourrait favoriser l'apparition, la dissociation ou la stabilisation de la S-nitrosylation (Marino and Gladyshev, 2010; Astier et al., 2012). La réaction de S-nitrosylation est une modification réversible. En effet, une S-nitrosylation peut être supprimée par dénitrosylation spontanée ou par des enzymes capables de dénitrosyler les protéines comme les thiorédoxines (Trx) ou les GSNOR (Benhar et al., 2008). De nombreuses protéines bactériennes sont S-nitrosylées suite à une exposition au NO comme lors d'une interaction hôte-pathogène ou durant la respiration des nitrates (Stern and Zhu, 2014). Chez les bactéries, les modifications apportées par les S-nitrosylations peuvent avoir de fortes conséquences sur la fonction des protéines. C'est le cas pour le régulateur de transcription OxyR initialement identifié pour réguler des gènes impliqués dans la réponse au stress oxydatif. En présence d'un stress nitrosatif, la S-nitrosylation de OxyR entraîne un changement d'affinité pour l'ADN permettant l'expression de gènes différents, impliqués dans la dénitrosylation des protéines (Seth et al., 2012). Chez

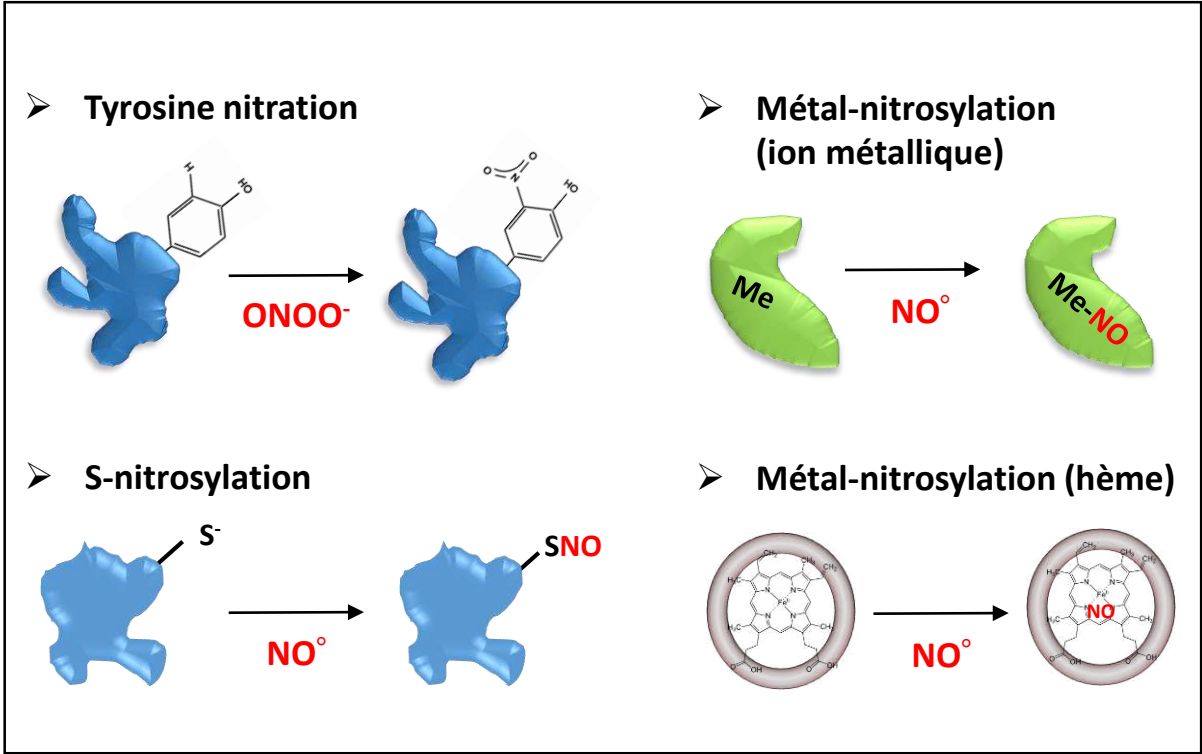


Figure 19 : Représentation schématique des modifications post-traductionnelles spécifiques réalisées par le NO sur certaines protéines.

les plantes, de nombreuses études ont permis de caractériser des protéines pouvant être S-nitrosylées (Lindermayr et al., 2005; Romero-Puertas et al., 2008; Jain et al., 2018). La glutathion peroxydase est un exemple de protéine pouvant être inhibée de façon réversible par S-nitrosylation (Castella et al., 2017). Un autre exemple de S-nitrosylation bien caractérisé est celui du glutathion en nitroso-glutathion (GSNO) constituant une réserve de NO chez les plantes et les animaux (Liu et al., 2001; Sakamoto et al., 2002). Par trans-nitrosylation, le GSNO peut ensuite transférer le NO sur des résidus cystéines présents dans un environnement basique sur des protéines cibles, notamment en condition de stress biotique et abiotique (Astier et al., 2012). Chez *Arabidopsis thaliana*, un mutant de la GSNO réductase (GSNOR) entraîne une augmentation du nombre de protéines S-nitrosylées accompagnée d'un défaut de développement et d'une moins bonne résistance à différents stress (Feechan et al., 2005; Lee et al., 2008).

Tyrosine nitration : La tyrosine nitration est la liaison d'un groupement nitro (-NO₂) en position ortho du cycle aromatique de la tyrosine préalablement oxydée par un groupement hydroxyle (OH^o) ou carbonate (CO₃^{o-}) (Figure 19). Le groupement (-NO₂) provient principalement de la décomposition du ONOOCO₂⁻ en CO₃^{o-} et -NO₂ en présence de CO₂ (Stern and Zhu, 2014; Kolbert et al., 2017). Considéré comme irréversible et très stable, une activité dénitrase capable de réverser la tyrosine nitration pourrait cependant exister (Abello et al., 2009; Deeb et al., 2013). Chez les bactéries, les tyrosine nitrations peuvent inhiber l'activité de la glutamine synthétase et de la ribonucléotide réductase (Stern and Zhu, 2014). Outre cela, on connaît peu de protéines inhibées par ce type de modification post-traductionnelle. Chez plusieurs espèces végétales, une augmentation du nombre de protéines Tyr-nitrées a été observé en condition de stress (Cecconi et al., 2009; Corpas et al., 2009a). Chez *M. truncatula*, la glutathionne peroxydase est inhibée de façon irréversible par une tyrosine nitration (Castella et al., 2017).

Métal-nitrosylation : Cette réaction est la liaison du NO avec un métal présent au sein d'une métalloprotéine comme le fer, le cuivre ou le zinc (Figure 19). Cette réaction réversible peut entraîner des changements structuraux impactant la fonction des protéines ciblées (Ford, 2010). Chez les mammifères, cette réaction est impliquée dans la production de GMPc par l'activation de la guanylate cyclase par une liaison du NO à l'atome de fer du groupement hème, provoquant un changement de conformation (Russwurm and Koesling, 2004). Chez les

bactéries, la respiration peut être altérée par l'interaction entre le NO et certaines oxydases de la chaîne respiratoire. A contrario, cette même interaction avec un groupement hème est importante pour les globines impliquées dans la dégradation du NO et donc la protection du complexe respiratoire (Stevanin et al., 2000; Gell, 2018). Chez les plantes où peu d'informations sont disponibles sur cette modification post-traductionnelle, la métal-nitrosylation des hémoglobines a été décrite comme un mécanisme de protection contre le stress face au NO (Astier et al., 2012).

3. La réponse bactérienne au NO

Comme vu précédemment, le NO est une molécule capable de réagir avec beaucoup de composés cellulaires. Pour faire face au NO, les bactéries possèdent des systèmes de régulation permettant la mise en place de systèmes d'adaptation au NO ou de dégradation du NO. Plusieurs mécanismes de régulation impliquant une modification apportée par le NO ou des RNS sont connus.

NnrR est un régulateur appartenant à la famille des FNR-CRP. Les protéines de la famille FNR-CRP se composent de 3 domaines : un domaine N-terminal senseur, un domaine de dimérisation et un domaine de liaison à l'ADN (Zumft, 2002). L'interaction entre le NO et le groupement 4Fe-4S d'un FNR inhiberait sa capacité à se lier à l'ADN *in vitro*, ce qui se traduit *in vivo* par un arrêt de l'expression de gènes spécifiques (Crack et al., 2013). Ce régulateur est retrouvé par exemple chez *E. meliloti* (voir chapitre 1.3.e). Chez cette bactérie, NnrR est responsable de la régulation des gènes *nirK* et *norB* qui sont impliqués dans la dénitrification (Meilhoc et al., 2010). Chez le pathogène *Brucella melitensis*, NnrA, un orthologue de NnrR, est nécessaire à la virulence et à la résistance au NO (Mirnejad et al., 2017).

NorR est un régulateur transcriptionnel appartenant à la famille des facteurs EBP (Enhancer Binding Protein). Son activité ATPase est induite par la liaison du NO au niveau du fer de son groupement hème (Bush et al., 2011; Stern and Zhu, 2014). Chez *E. coli* et *V. cholerae*, NorR contrôle l'expression de gènes impliqués dans la détoxification du NO comme *norVW* ou *hmp* respectivement. Chez *V. cholerae*, NorB est important pour la résistance au NO et de ce fait permet à cette bactérie de conserver son pouvoir pathogène face aux défenses de l'hôte durant l'infection (Stern et al., 2013; Stern and Zhu, 2014).

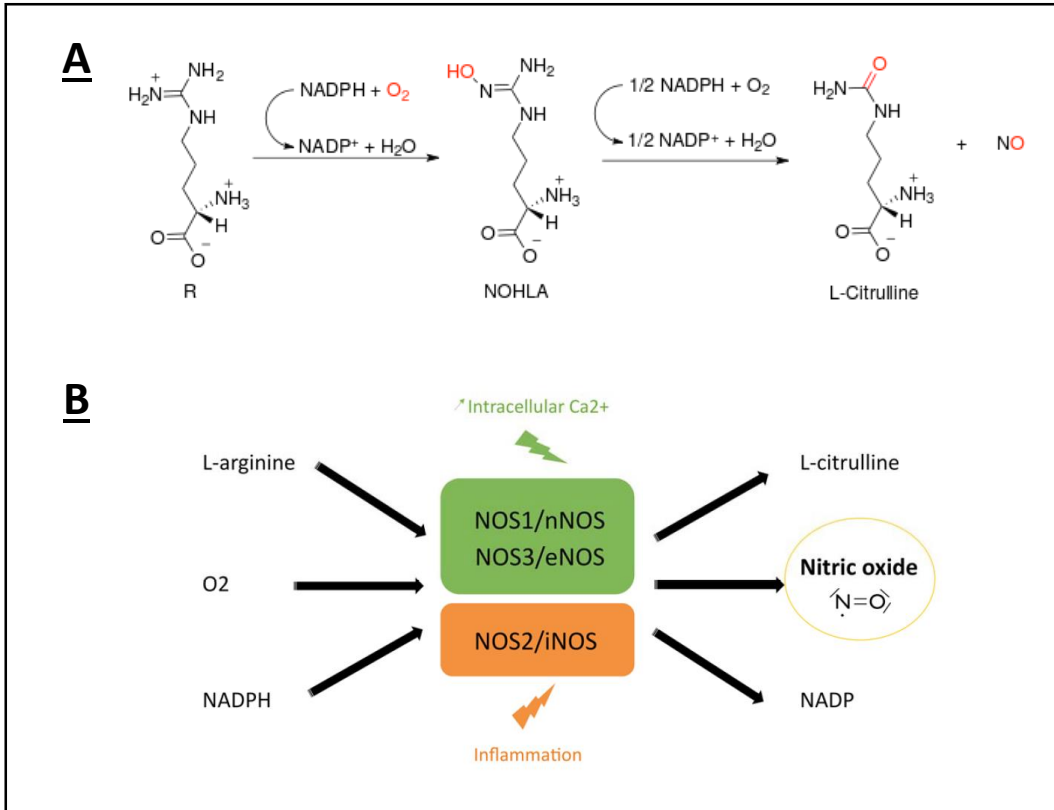


Figure 20 : Caractéristiques des différentes oxyde nitrique synthase (Nos) de mammifère.

(A) Réaction de synthèse de NO par oxydation de L-arginine, catalysée par une NO synthase. **(B)** NO synthase animale : Isoforme endothéliale (eNOS), isoforme neuronale (nNOS) et isoforme inducible (iNOS). Les eNOS et nNOS sont constitutives et dépendent de signaux calciques. La iNOS est induite au cours de la réponse immunitaire. (Adapté de Tran et al. 2010)

NsrR est un régulateur transcriptionnel négatif de la famille Rrf2 impliqué dans la régulation de nombreux gènes nécessaires à l'adaptation au NO (Nakano et al., 2006). Une modification du groupement Fe-S par le NO permettrait de diminuer son affinité pour l'ADN et serait à l'origine d'une dérégulation des gènes cibles (Volbeda et al., 2017). Chez le pathogène *Vibrio fulnicus*, NsrR est un régulateur transcriptionnel négatif de gènes potentiellement impliqués dans la lutte contre le stress nitrosatif, dont la flavohémoglobine HmpA. Cette répression peut être levée par une diminution d'affinité entre l'ADN et NsrR suite à la modification du cluster Fe-S en présence de NO (Choi et al., 2021). Chez *B. subtilis*, le régulateur à deux composants ResDE (voir chapitre 1.2.d) est responsable de la régulation du gène *hmp* impliqué dans la dégradation du NO. Cette régulation dépendrait de la dérégulation de ResDE via le régulateur NsrR en présence de NO (Tucker et al., 2010).

Ces différents exemples montrent la diversité des systèmes de réponse au NO que l'on retrouve chez les bactéries. Ces systèmes de régulation vont permettre la mise en place de voies de synthèse ou de dégradation/piégeage du NO au sein des cellules pour y maintenir son homéostasie.

4. La synthèse du NO

Dans un premier temps, la synthèse de NO a été caractérisée chez les mammifères. Chez ces organismes, l'oxyde nitrique synthase (mNOS) catalyse la conversion de L-arginine en L-citrulline plus du NO, et cela en présence d'oxygène (Figure 20). Il existe trois isoformes de NOS en fonction du tissu considéré : une isoforme endothéliale (eNOS), une isoforme neuronale (nNOS), et une isoforme inducible (iNOS) présente dans les macrophages (Figure 20) (Hemmens and Mayer, 1998). Les eNOS et nNOS sont exprimées de façon constitutive. À l'inverse, la iNOS est une NO synthase inducible par des signaux de la réponse immunitaire. Malgré cela, ces trois NOS partagent une forte homologie de séquence (Santolini, 2011). Les mNOS sont des homodimères ou chaque monomère contient un domaine oxygénase en position N-terminal et un domaine réductase en position C-terminal fusionnés en un seul polypeptide. Le domaine oxygénase qui contient le site actif, permet la liaison à l'arginine, à l'hème et au cofacteur redox, la tétrahydrobioptérine (BH4). Le domaine réductase possède quant à lui un site de liaison pour la flavine adénine dinucléotide (FAD), la flavine

mononucléotide (FMN) et pour le NADPH. Ces deux domaines sont reliés par un domaine de liaison à la calmoduline (CaM) (Santolini, 2011).

Chez les animaux, d'autres voies permettent de produire du NO chimiquement par réduction du nitrite dans un environnement acide et en condition limitante en oxygène (voie nitrate-nitrite-NO) (Lundberg et al., 2008). Ce type de voie se met en place lorsque la concentration en oxygène ne permet plus le fonctionnement des mNOS. Elles nécessitent la présence de composés comme l'acide ascorbique ou des polyphénols (Lundberg et al., 2008).

a. La synthèse du NO chez les bactéries

Certaines espèces bactériennes synthétisent du NO grâce à une **oxyde nitrique synthase (bNOS)**. Les bNOS sont des homodimères tronqués avec une fonction proche de celle des mNOS, d'où le terme NOS-like. De nombreuses NOS bactériennes possèdent une partie de la région oxygénase tronquée en N-terminale (domaine de liaison au zinc) et ne possèdent pas de site de liaison à la calmoduline. Ainsi, sauf exception, les bNOS n'ont pas de domaine réductase en C-terminal (Hutfless et al., 2018). Les bactéries ne synthétisent pas de calmoduline ni de cofacteur tétrahydrobioptérine (BH₄) (Porrini et al., 2020). Pour fonctionner, les bNOS pourraient interagir avec d'autres réductases bactériennes. Les bNOS peuvent aussi utiliser des cofacteurs différents des mNOS comme le tétrahydrofolate (FH₄). Ce type d'enzyme a été caractérisé principalement chez des organismes gram-positifs comme la bactérie du sol *B. subtilis* ou la bactérie pathogène *Staphylococcus aureus*. Chez ces bactéries, la présence de bNOS se révèle importante lors de la lutte contre des stress oxydatifs, mais aussi dans la protection contre des antibiotiques (Gusarov and Nudler, 2005; Gusarov et al., 2009). Les structures de ces deux bNOS sont proches de celle du domaine oxygénase des mNOS (Crane et al., 2010; Hutfless et al., 2018). Chez les Protéobactéries, peu de bNOS ont été identifiées (Santolini, 2019). A ce jour, seule une étude a suggéré la présence d'une bNOS chez un rhizobium. Cette étude, réalisée chez *E. meliloti*, montre une production de NO dépendante de la L-arginine (Pii et al., 2007). Cependant, aucun gène codant pour une bNOS potentielle n'a été identifié dans les génomes de rhizobia.

La dénitrification est une des voies principales de synthèse de NO chez les bactéries qui ne possèdent pas de bNOS, Dans cette voie, le NO est un intermédiaire métabolique

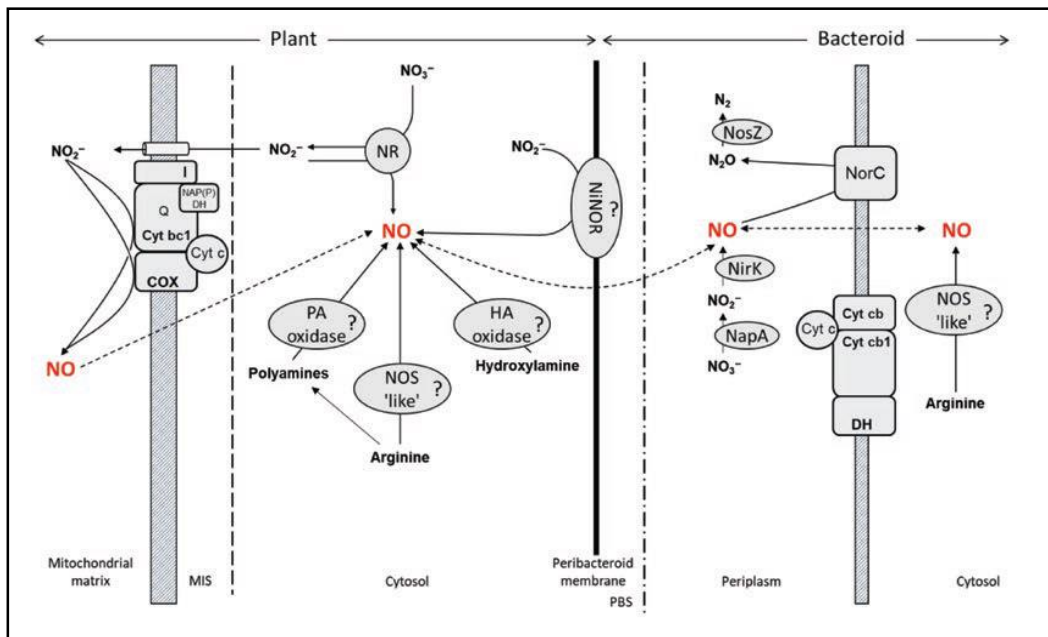


Figure 21 : Synthèse du NO lors de la symbiose.

Dans la cellule végétale, le NO peut être synthétisé via la réduction du nitrite (NO_2^-) par la nitrate réductase (NR), la nitrite NO réductase (NiNOR), xanthine oxido-réductase (XOR) et la chaîne respiratoire mitochondriale. Du NO pourrait être aussi produit via des voies oxydatives par des activités NOS like, des polyamines oxydases (PA oxidase) et les hydroxylamines oxydases (HA oxydase). Dans le bactéroïde, le NO peut être synthétisé par la voie de dénitrification. (Adapté de Berger et al. 2019)

synthétisé à partir de NO_2^- par la nitrite réductase (NirK ou NirS) et réduit en N_2O par la NO réductase (Nor) (voir section 1.3). Chez les rhizobia comme *E. meliloti* et *B. diazoefficiens*, la dénitrification est connue pour être impliquée dans la synthèse de NO. Récemment, une équipe travaillant sur *B. diazoefficiens* a montré l'implication de la voie assimilatrice du nitrate dans la production directe de NO (voir section 1.2.e). En effet, la NR assimilatrice NasC serait capable de contribuer à la synthèse de NO en participant à la production de NO_2^- nécessaire à la nitrite réductase periplasmique NirK pour le réduire en NO ou bien directement par un nouveau mécanisme encore non identifié (Cabrera et al., 2016).

b. La synthèse du NO chez les plantes

En condition oxydative, la présence de NO synthase a été suspectée pendant de nombreuses années chez les plantes. En effet, chez certaines plantes, il est possible d'observer une activité NOS-like lors de l'utilisation de L-arginine comme substrat (Corpas et al., 2009b). C'est le cas chez le pois où une activité NOS-like utilisant l'arginine, du NADPH, du BH_4 et de la calmoduline est détectable (Corpas et al., 2004). De plus, le traitement de certaines plantes comme le pois ou des nodules de *M. truncatula* avec un inhibiteur de mNOS (L-N^G-monométhyl Arginine citrate) a permis de montrer une réduction de l'activité enzymatique par diminution de la quantité de NO (Baudouin et al., 2006; Corpas et al., 2006). Récemment, une étude bio-informatique a permis de lever le doute sur l'existence d'une potentielle NOS végétale. En effet, aucun gène codant pour un orthologue de mNOS n'a été identifié à ce jour dans les génomes des plantes terrestres séquencées (Jeandroz et al., 2016). Cependant, des séquences complètes présentant une similarité avec des mNOS ont été identifiées chez un groupe de 265 espèces d'algues dont *Ostreococcus tauri* (Jeandroz et al., 2016).

Il existe chez les plantes d'autres voies oxydatives capables de produire du NO telles que des polyamines oxydases, dont l'activité a été détectée chez *Arabidopsis* (Tun et al., 2006; Wimalasekera et al., 2011). De façon similaire, d'autres travaux ont mis en évidence une synthèse de NO par l'intermédiaire de l'hydroxylamine chez le tabac (Rümer et al., 2009).

En condition réductrice, les plantes possèdent des enzymes utilisant le molybdène comme cofacteur, telles que les nitrate réductases, les NOFNiR (NO-forming nitrite reductases) et les xanthine déshydrogénases (XDH) (Chamizo-Ampudia et al., 2017). La voie

principale serait la réduction du NO_3^- en NO_2^- puis du NO_2^- en NO par une nitrate réductase. En effet, les nitrate réductases de plantes sont capables de réduire le NO_2^- en NO en utilisant le NADPH comme pouvoir réducteur et cela en condition hypoxique avec une forte concentration en NO_2^- (Yamasaki and Sakihama, 2000; Rockel et al., 2002). Or, la faible concentration du NO_2^- présent *in planta* et la faible affinité des nitrate réductases pour le NO, laissent penser que le rôle des nitrate réductases serait principalement de réduire le NO_3^- en NO_2^- . Ce NO_2^- pourra être par la suite réduit par d'autres voies spécifiques (Rockel et al., 2002). Chez *Chlamydomonas reinhardtii*, la nitrate réductase peut interagir directement avec une protéine NOFNIR pour produire du NO à partir de NO_2^- (Chamizo-Ampudia et al., 2016).

Chez *M. truncatula*, il existe trois gènes codant pour des nitrate réductases : *MtNR1*, *MtNR2* et *MtNR3*. Une étude utilisant des mutants générés par RNAi de *MtNR1* et *MtNR2* a permis d'observer dans des nodules une diminution de la concentration en NO, indiquant une implication de ces enzymes dans la synthèse de NO (Horchani et al., 2011). Une étude récente a montré l'importance de ces nitrates réductases durant l'interaction symbiotique (Berger et al., 2020a). De plus, l'expression des gènes *MtNR1* et *MtNR2* semble corrélérer avec la synthèse de NO durant la symbiose car ces gènes sont exprimés dans les tissus où l'on peut observer une accumulation de NO. Cela n'est pas le cas de *MtNR3*, qui est une nitrate réductase spécifique exprimée uniquement lors de la sénescence nodulaire. Ces différentes études s'accordent sur le fait que les nitrate réductases ne seraient pas les seules enzymes responsables de la synthèse de NO dans la nodosité. La synthèse de NO dans le nodule proviendrait d'un couplage avec la chaîne de transfert d'électrons mitochondriale (ETCs) ou d'autres mécanismes réducteurs comme la xanthine déshydrogénase (XDH) ou une NOFNIR (codée par *MtNOFNiR3*) (Figure 21) (Horchani et al., 2011; Berger et al., 2020a).

5. La dégradation du NO

À forte concentration, le NO peut se révéler être une molécule toxique pour les cellules. De ce fait, il est important de pouvoir réguler sa concentration rapidement pour contrôler son effet. Les organismes exposés à du NO ont ainsi mis en place des systèmes permettant de réguler sa concentration en le stockant ou en le dégradant.

Pour piéger le NO, les cellules possèdent des molécules qui participent au maintien de l'équilibre redox comme le glutathion. Cette molécule est un tripeptide (Glu-Cys-Gly) agissant comme un piègeur de NO, mais également comme un réservoir de NO cellulaire. En effet, le NO peut se lier au groupement thiol du glutathion (S-nitrosylation) pour donner du S-nitrosoglutathion (GSNO). Le GSNO pourra être ensuite dénitrosylé par la GSNO réductase (GSNOR), en utilisant un pouvoir réducteur fourni par le NADH, en disulfure de glutathion (GSSG) et hydroxylamine (NH₂OH) (Li et al., 2021). Le système GSNO/GSNOR est présent chez les mammifères et les plantes pour réguler l'homéostasie du NO (Gupta et al., 2011). Chez les plantes, la GSNOR joue un rôle important dans la réponse aux pathogènes (Rustérucci et al., 2007). Chez les bactéries, l'utilisation du glutathion est moins étudiée. Le glutathion est principalement retrouvé chez des bactéries gram négative (Fahey, 2013).

La dégradation du NO peut être assurée par des hémoglobines. Ce sont des protéines présentes chez les eucaryotes, les bactéries et les archées et principalement connues pour fixer et transporter l'oxygène chez les animaux. Certaines hémoglobines sont impliquées dans le métabolisme du NO. Toutes les hémoglobines conservent une structure de base nommée globine et composée de 6 à 8 hélices α pouvant adopter différents repliements. Les repliements qui forment la globine constituent l'environnement qui va permettre de moduler la cinétique d'association et de dissociation entre les différents ligands et l'atome de fer (Gell, 2018). Une fois repliée, cette partie forme une poche hydrophobe qui accueille un groupement prosthétique, l'hème. L'hème possède un atome de fer central capable de se lier principalement avec des molécules gazeuses diatomiques comme l'O₂ ou le NO et secondairement avec des molécules comme le CO, le NO₂⁻, le H₂S et le HNO.

a. La dégradation du NO chez les bactéries

Pour dégrader le NO, les bactéries possèdent plusieurs systèmes de détoxification comme les hémoglobines ou les NO réductases. Il existe 3 classes d'hémoglobines chez les bactéries : les flavohémoglobines (fHbs), les hémoglobines à domaine unique (sdHbs) et les hémoglobines tronquées (trHbs).

Les flavohémoglobines (codées par le gène *hmp*) constituent la classe d'hémoglobines la plus étudiée et la mieux décrite chez les bactéries. Cette NO dioxygénase hétérodimérique

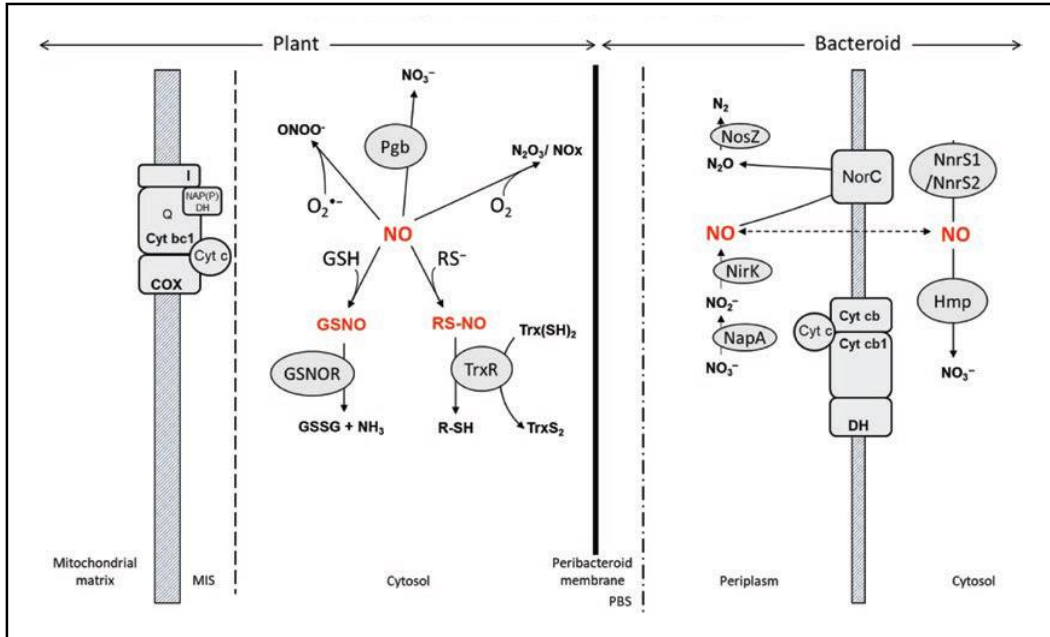


Figure 22 : Dégradation du NO lors de la symbiose.

En interagissant avec l'anion superoxyde, Le NO peut former du peroxyne (ONOO⁻). Le NO peut aussi interagir avec le glutathion (GSH) pour former du glutathion S-nitrosylé (GSNO) ou avec les thiols de certaines protéines pour former une protéine S-nitrosylée (RS-NO). La GSNO réductase (GSNOR) serait responsable de la dégradation du GSNO en disulfure de glutathion (GSSG). Enfin, le NO peut être dégradé en nitrate par des phytohémoglobines (Pgb). Chez le bactéroïde, la dégradation du NO est effectuée par la NO réductase (NorC) impliqué dans la dénitrification. De plus, le NO peut aussi être converti en nitrate par la flavohémoglobine (Hmp). (Adapté de Berger et al. 2019).

se compose d'un domaine globine capable de lier le NO en N-terminal et d'un domaine réductase proche de celui de la ferrédoxine-NADP⁺ réductase en C-terminal. Le domaine réductase contient un site de liaison au FAD et au NADPH. Ce domaine spécifique est essentiel pour le fonctionnement de Hmp. En effet, il permet de transférer les électrons provenant du NADPH au groupement hème (Gell, 2018). Comme toutes les globines, Hmp peut lier le NO ou l'O₂ grâce à l'atome de fer contenu dans le groupement hème. Or, Hmp a la particularité d'avoir une affinité plus forte pour le NO que pour l'O₂. En condition aérobie, le NO interagit directement avec l'O₂ lié à l'atome de fer pour être oxydé en NO₃⁻ (Forrester and Foster, 2012). Cette enzyme aurait la particularité de pouvoir aussi détoxifier le NO en anaérobiose. En effet, Hmp aurait la capacité *in vitro* de réduire le NO en oxyde nitreux en anaérobiose (Kim et al., 1999). Hmp est connue pour être impliquée dans des mécanismes de pathogénicité chez certaines bactéries comme *E. coli* ou *Salmonella enterica*. En effet, une mutation du gène *hmp* entraîne une hypersensibilité au NO produit par l'hôte comme agent antimicrobien lors de la réponse immunitaire, facilitant ainsi l'élimination de ces pathogènes par les macrophages (Stevanin et al., 2002; Svensson et al., 2010). Chez les rhizobia, la détoxification du NO est importante pour lutter contre les stress nitrosatifs dans les nodules afin de protéger l'activité de la nitrogénase. Chez la bactérie symbiotique *E. meliloti*, Hmp a été montrée comme importante pour la résistance au NO en culture (Meilhoc et al., 2010) (Figure 22). En plus de cela, Hmp est impliquée dans la dégradation du NO dans le nodule durant l'interaction avec *M. truncatula* (Cam et al., 2012). Chez *E. meliloti*, l'expression du gène *hmp* est régulée par le système à 2 composants FixLJ *via* le régulateur intermédiaire FixK (Meilhoc et al., 2010). La flavohémoglobine Hmp n'est pas la seule globine capable de détoxifier le NO. En effet, *B. diazoefficiens* possède une hémoglobine à domaine unique (Bjgb) codée par l'opéron de la voie assimilatrice du nitrate *narK-bjgb-flp-nasC*. Chez cette espèce, un mutant *bjgb* présente une sensibilité accrue au NO en culture (Cabrera et al., 2011; Cabrera et al., 2016). Cabrera et ses collègues ont décrit le système Bjgb-Flp comme possiblement impliqué dans la dégradation du NO produit par NasC suite à la réduction du NO₃⁻ ou du NO₂⁻ (Cabrera et al., 2016). Actuellement, le mécanisme de dégradation du NO par les hémoglobines à domaine unique reste méconnu.

Les hémoglobines tronquées ont été décrites pour participer à la dégradation du NO chez certaines bactéries pathogènes, notamment chez des Mycobactéries. Comme les

hémoglobines à domaine unique, ces globines ne possèdent pas de domaine flavoréductase. De plus elles sont plus courtes de 20 à 40 acides aminés. Les TrHbs ont la particularité de posséder des canaux permettant un transport facilité des ligands (NO; O₂; CO) vers l'hème (Pesce et al., 2013). Les hémoglobines tronquées se répartissent en trois groupes selon leur structure : TrHbN, TrHbO et TrHbP. Les hémoglobines tronquées seraient impliquées dans le stockage de l'oxygène, l'adaptation des bactéries en milieu hypoxique et la détoxification du NO (Pesce et al., 2013; Singh et al., 2019). Chez certains pathogènes, les TrHbs sont impliquées dans la tolérance au stress nitrosatif. Ainsi, chez *Mycobacterium tuberculosis*, TrHbN codée par *glnN* est impliquée dans la détoxification du NO. Cette activité se révèle être importante pour son pouvoir pathogène (Pathania et al., 2002a). Chez *Mycobacterium bovis*, TrHbN protège la chaîne respiratoire du NO et convertit celui-ci en NO₃⁻ (Ouellet et al., 2002). Même si ce type de globine est plus étudié dans l'interaction hôte pathogène, il pourrait aussi intervenir durant l'interaction symbiotique. En effet, *Frankia* possède deux TrHbs, TrHbN qui aurait un rôle dans l'oxydation du NO et TrHbO qui jouerait un rôle dans l'adaptation aux faibles concentrations en oxygène (Coats et al., 2009). Chez la cyanobactérie *Nostoc commune*, une hémoglobine de type N serait impliquée dans la protection de la nitrogénase contre l'oxygène (Hill et al., 1996).

Les NO réductases sont le deuxième système de dégradation du NO le plus courant chez les bactéries. Il existe deux types de NO réductases chez les procaryotes : les NO réductases impliquées dans la voie de dénitrification (voir chapitre 1.3) et les NO réductases cytoplasmiques appelées flavorubrédoxines. Les NO réductases participant à la dénitrification sont importantes pour la détoxification du NO. Ce rôle de détoxification a été mis en évidence chez plusieurs bactéries. Par exemple, chez *P. aeruginosa*, un mutant *nor* présente une accumulation de NO. Cette accumulation entraîne une diminution de la viabilité des bactéries et une désorganisation du biofilm, indiquant un rôle crucial de Nor dans le maintien de l'homéostasie du NO (Barraud et al., 2006). Le fonctionnement de ce type d'enzyme a été décrit préalablement (voir chapitre 1.3.c). Chez *E. coli*, on retrouve une flavorubrédoxine codée par *norVW*. Cette protéine se compose d'un domaine flavinique et d'un domaine contenant le site catalytique, homologue aux protéines rubrédoxines, comprenant 2 molécule de fer libres. Le gène *norW* code une oxydoréductase qui permet de transférer les électrons à NorV. Chez *E. coli*, la complémentation d'une souche mutante pour la flavohémoglobine Hmp

avec NorV permet de restaurer un niveau de pathogénicité égal à celui d'une souche sauvage et donc de retrouver une meilleure résistance face au macrophage (Baptista et al., 2012). Chez une souche d'*E. coli* entérohémorragique, la NO réductase NorVW participe à la résistance au NO produit par l'hôte (Gardette et al., 2020).

La protéine NnrS est impliquée dans la résistance au NO et donc potentiellement dans sa dégradation chez les bactéries pathogènes *Vibrio cholerae* et *Neisseria meningitidis* (Jamet et al., 2013; Stern et al., 2013). Chez la bactérie symbiotique *E. meliloti*, il a été proposé que deux gènes, *nnrS1* et *nnrS2*, seraient impliqués directement ou indirectement dans le catabolisme du NO en conditions de vie libre et symbiotique (Blanquet et al., 2015).

Pour conclure, il existe souvent plusieurs systèmes de dégradation du NO chez les bactéries qui sont confrontées à cette molécule au cours de leur cycle de vie. C'est particulièrement le cas chez les pathogènes qui doivent lutter contre les réponses de défense de l'hôte comme le stress nitrosatif. Les bactéries symbiotiques telles qu'*E. meliloti* possèdent au moins 2 systèmes de détoxification du NO (Hmp, Nor) leurs permettant de contrôler le NO en vie libre et durant l'interaction symbiotique.

b. La dégradation du NO chez les plantes

Comme chez les bactéries, la concentration en NO dans la cellule végétale va directement dépendre d'un équilibre entre synthèse et dégradation. Chez les plantes, il existe plusieurs systèmes permettant de réguler l'homéostasie du NO (Figure 22). Le piégeage de cette molécule peut être assuré par l'anion superoxyde (O_2^-) et le glutathion (système GSNO/GSNOR). La dégradation du NO chez les plantes est quant à elle principalement effectuée par des globines spécifiques, les phytoglobines. Comme chez les bactéries, ces NO dioxygénases sont capables d'oxyder le NO en nitrate en présence d' O_2 .

Chez les plantes terrestres, il existe trois classes de phytoglobines : les hémoglobines symbiotiques (symPhytogb et leghémoglobine Lbs), les hémoglobines non symbiotiques (Phytogb0, 1 et 2) et les hémoglobines tronquées (Phytogb3) (Hill et al., 2016). Les symPhytogb sont des phytoglobines symbiotiques présentes au sein de plantes réalisant une symbiose fixatrice d'azote autres que les légumineuses comme par exemple *Parasponia* (Hill et al., 2016). A contrario, les leghémoglobines sont présentes chez les légumineuses fixatrices

d'azote. Chez les légumineuses, il existe trois types de phytoglobines exprimées durant l'interaction symbiotique : Phyto**gb**1, Phyto**gb**3 et Lbs (Berger et al., 2020b), qui jouent un rôle dans la régulation du niveau de NO et de O₂ dans les nodosités.

La leghémoglobine est la phyto**gb** la plus abondante dans une nodosité. Son rôle est de réduire la concentration en O₂ libre pour atteindre une concentration de l'ordre du nanomolaire. Elle assure le transport de l'O₂ jusqu'aux mitochondries et aux bactéroïdes (Singh and Varma, 2017). Cet environnement pauvre en oxygène libre présent dans le nodule permet à la nitrogénase de fonctionner correctement. Le nombre de gènes codant pour des Lbs est variable chez les légumineuses (12 chez *M. truncatula*, 6 chez *L. japonicus*) (Berger et al., 2020b). Nous ne connaissons pas encore l'intérêt biologique de posséder un nombre important de Lbs. L'un de leurs rôles serait d'être impliquées dans le maintien de la microaérobiose dans le nodule afin de pouvoir respirer le NO par l'intermédiaire des nitrates réductase et de la chaîne de transfert d'électrons mitochondriale (Igamberdiev and Hill, 2004). Chez *L. japonicus*, l'utilisation de simple ou triple mutants de Lbs a permis d'observer l'apparition d'une sénescence précoce du nodule avec une augmentation du niveau de super oxyde et de peroxyde d'hydrogène, supposant un effet additionnel des Lbs (Ott et al., 2005; Wang et al., 2019). L'interaction entre les Lbs et le NO est possible, mais reste faible dans le nodule. Cela est dû à une meilleure affinité des Lbs pour l'oxygène, comparée aux phyto**gb**1 (Berger et al., 2018).

Les phytogb**1** sont décrites comme ayant une forte affinité pour l'O₂ et le NO. Elles possèdent une activité dioxygénase qui leur permet d'oxyder le NO en nitrate via l'oxygénation du fer ferreux (Fe²⁺) en fer ferrique (Fe³⁺) (Igamberdiev and Hill, 2004). Chez *M. truncatula* ou *L. japonicus*, les gènes codant les phyto**gb**1 sont fortement exprimés durant l'interaction symbiotique. En effet, il a été observé une induction spécifique du gène codant pour la phyto**gb** non symbiotique 1 (*Phyto**gb**1.1*) lors de l'infection par une bactérie symbiotique. Phyto**gb**1.1 serait responsable de la diminution du niveau de NO et de l'inhibition de l'immunité de la plante nécessaire lors de l'étape d'infection (Nagata et al., 2008; Fukudome et al., 2016; Berger et al., 2020b). Dans les nodules matures de *M. truncatula* ou *L. japonicus*, Phyto**gb**1.1 est également impliquée dans la régulation du niveau du NO et permet donc à la nitrogénase de fonctionner correctement (Fukudome et al., 2019a; Berger et al., 2020b).

Les phytogb3**** sont proches des hémoglobines tronquées bactériennes de type trHbN (Wittenberg et al., 2002). Ces globines ont une affinité faible pour le NO et l'O₂ et leur expression n'est pas induite par l'hypoxie (Watts et al., 2001). Peu d'études portent sur leur fonctionnement et leurs rôles chez les plantes. Chez *M. truncatula*, il existe deux gènes codant pour des phyto**gb3** (*phyto**gb3.1*** et *phyto**gb3.2***) qui ne partagent pas la même expression et localisation (Vieweg et al., 2005; Roux et al., 2014; Berger et al., 2020b). Plus précisément, Le gène *phyto**gb3.1*** est exprimé dans les cellules infectées de la zone III du nodule et le gène *phyto**gb3.2*** est exprimé principalement dans les tissus vasculaires du nodule (Vieweg et al., 2005). Récemment, il a été montré que le gène *phyto**gb3.1*** est exprimé durant la sénescence nodulaire (Berger et al., 2020b).

IV. Le NO dans les interactions plantes-bactéries

1. Le NO dans les interactions plantes-pathogènes

L'attaque d'un végétal par un pathogène va déclencher une production de NO ayant un double effet dans la mise en place des mécanismes de défense. Premièrement, le NO va à avoir un effet toxique direct sur le pathogène en provoquant un stress nitrosatif. Dans un second temps, le NO va permettre à la plante l'induction de mécanismes de défense comme la réponse hypersensible (HR) (Chen et al., 2014a). Cette production spécifique du NO a été observée au cours de plusieurs interactions comme par exemple dans l'interaction entre *Pelargonium peltatum* et le champignon *Botrytis cinerea* ou encore entre *M. truncatula* et l'oomycète *Aphanomyces euteiches* (Floryszak-Wieczorek et al., 2007; Thalineau et al., 2016). Chez la plante modèle *A. thaliana*, une élévation du niveau de NO, provoqué par la mutation par RNAi d'une phyto**globine** responsable de l'oxydation du NO (GLB1), permet une meilleure résistance à l'infection par *Botrytis cinerea* (Mur et al., 2012). De façon générale, le NO et les ROS auraient un rôle déterminant dans la mise en place de la HR permettant aux plantes de lutter contre les pathogènes (Delledonne et al., 1998; Durner et al., 1998). De plus, durant la HR, des modifications post-traductionnelles par S-nitrosylation ont été détectées chez *A. thaliana*, indiquant un rôle plus global du NO (Romero-Puertas et al., 2008).

La régulation de ces modifications post-traductionnelles implique principalement la protéine GSNOR qui réduit le GSNO en glutathion sulfinamide. Le GSNO est responsable de transnitrosylation des protéines cibles (Astier et al., 2012). La GSNOR a été décrite premièrement comme un régulateur positif de la réponse immunitaire. Ce rôle a été caractérisé dans l'interaction entre *A. thaliana* et la bactérie *Pseudomonas syringae*. Durant cette interaction, un mutant de *AtGSNOR1* présente une accumulation de S-nitrosothiol et une sensibilité accrue au pathogène (Feechan et al., 2005). Chez la tomate, une surexpression de la GSNOR (SIGSNOR) entraîne une augmentation de la résistance à la bactérie *P. syringae* (Hussain et al., 2019). En parallèle, d'autres études ont montré une implication différente de la GSNOR dans la défense contre certains pathogènes. En effet, durant l'interaction entre *A. thaliana* et l'oomycète *Peronospora parasitica*, une diminution par RNAi de la GSNOR entraîne une augmentation de la résistance basale au pathogène (Rustérucci et al., 2007). Chez plusieurs espèces de *Solanum* infectées par le champignon *Pseudoidium neolycopersici*, les auteurs ont observé une répression de la GSNOR végétale lors de l'infection par le pathogène (Jahnová et al., 2020). Ces différentes observations indiquent que le NO est certainement impliqué dans différents mécanismes de défense. De plus, on peut observer que chez une même plante, la réponse peut varier en fonction du type de pathogène. Ces différences peuvent être directement dues aux microorganismes.

Les pathogènes possèdent différents mécanismes qui leur permettent de s'adapter aux défenses de la plante. Les bactéries possèdent par exemple les régulateurs de transcription OxyR, SoxR ou NorR répondant au NO et capables d'activer des régulateurs impliqués dans la lutte contre les stress oxydatifs et nitrosatifs. Pour lutter contre le burst de NO et le stress provoqué par les RNS, les bactéries utilisent des enzymes capables de dégrader le NO comme la flavorubrédoxine (NorV) ou la flavohémoglobine (Hmp) (voir section 3.5). Le séquençage des génomes a permis d'identifier la conservation de la flavohémoglobine Hmp et du régulateur NorR chez de nombreux pathogènes de plante (Mur et al., 2006). Chez la bactérie phytopathogène *Dickeya dadantii*, responsable de la pourriture molle, l'absence de la flavohémoglobine HmpX entraîne une perte de pathogénicité (Favey et al., 1995). En effet, HmpX permet à cette bactérie de faire baisser la quantité de NO provenant de la plante, ce qui permet une diminution des défenses de la plante en diminuant la réponse hypersensible (Boccaro et al., 2005). La bactérie à large spectre d'hôte *Ralstonia solanacearum*, responsable

du flétrissement bactérien, utilise HmpX et la NO réductase NorB pour détoxifier le NO. Lors de l'infection de la tomate, la réduction du NO_2^- et la détoxification du NO sont deux mécanismes impliqués dans la virulence de *R. solanacearum* (Dalsing et al., 2015).

Certains microorganismes utilisent le NO pour attaquer les cellules végétales. C'est le cas de certains pathogènes qui utilisent des phytotoxines spécifiques activables ou désactivables par le NO. En effet, le NO synthétisé par la bNOS de la bactérie pathogène *Streptomyces* spp permet de nitrater la thaxtomine A pour activer cette phytotoxine (Wach et al., 2005). Cette forme nitratée est essentielle pour la pathogénicité d'un certain nombre de streptomycètes (Loria et al., 2008). Dans le cas du champignon pathogène *Magnaporthe oryzae*, responsable du brunissement du riz, la mutation de différentes voies de synthèse du NO entraîne une diminution du niveau d'infection (Samalova et al., 2013). Ces différentes utilisations du NO, à la fois par la plante et par les pathogènes, montrent bien l'étendue des modes d'action de cette petite molécule au sein d'un système faisant intervenir deux organismes capables chacun de de l'utiliser comme arme ou pour se protéger.

2. Le NO dans les interactions symbiotiques

Comme vu précédemment, le NO est une molécule importante à la fois pour les défenses de la plante, mais aussi pour le pouvoir pathogène de certaines bactéries. Dans le cadre des interactions symbiotiques, plusieurs études ont mis en évidence la présence de NO. On peut donc se demander quel est le rôle du NO dans une interaction symbiotique en comparaison du rôle qu'il peut avoir dans les interactions hôte-pathogène.

La présence de NO a été détectée dans plusieurs types d'interactions symbiotiques comme chez les lichens (algue-champignon) ou durant l'interaction mycorhizienne (plante-champignon). Chez le lichen, une production de NO a été observée lors des premières étapes de l'interaction, au moment de la réhydratation de *Ramalina* (Weissman et al., 2005). De plus, le NO synthétisé par le symbionte est important dans la régulation du stress oxydatif du lichen (Catalá et al., 2010). Une hypothèse serait que ce NO est important pour lutter contre le stress oxydatif et permettrait la mise en place de la symbiose.

Durant la symbiose mycorhizienne, du NO a été détecté à plusieurs étapes importantes de la mise en place de l'interaction (Martínez-Medina et al., 2019b). En effet, une étude a montré une augmentation de la quantité de NO dans les racines de *M. truncatula* quelques minutes après l'inoculation avec des exsudats de spores de *Gigaspora margarita* en germination (Calcagno et al., 2012). Cette réponse précoce serait une conséquence de l'interaction spécifique du symbionte sur les racines de la plante hôte. De la même manière, une augmentation de la quantité de NO a été observée chez la Tomate après ajout sur les racines d'exsudats de spores de symbiontes en germination (Martínez-Medina et al., 2019a). Du NO a aussi été observé durant des étapes plus tardives de l'interaction comme chez la plante *Citrus trifoliata*, où une augmentation du niveau de NO racinaire a été détectée 21 jours après inoculation par le champignon mycorhizien arbusculaire *Diversispora versiformis*, suggérant un rôle du NO dans le maintien de l'interaction (Zou et al., 2017).

De nombreuses études ont aussi montré que du NO était présent dans les différentes étapes de l'interaction légumineuses-rhizobia. Deux études ont tout d'abord montré la présence de leghémoglobine nitrosylée dans des nodules de soja et de niébé (*Vigna unguiculata*), suggérant la présence de NO lors de la symbiose (Maskall et al., 1977; Mathieu et al., 1998). Par la suite, du NO a été détecté à la surface des racines de *Medicago sativa* et de *L. japonicus* quelques heures après inoculation par leurs symbiontes respectifs (Nagata et al., 2008). Cette production de NO serait spécifique car l'inversion des symbiotes n'engendre aucune production de NO chez les deux plantes (Nagata et al., 2008).

En parallèle, le rôle du NO dans les étapes précoces a aussi été observé dans d'autres interactions faisant intervenir le soja ou *L. japonicus* (Leach et al., 2010; Fukudome et al., 2016). Chez le soja, une approche pharmacologique a mis en évidence une réduction du nombre de nodosités associée à une diminution de la quantité de NO. De plus, l'ajout d'une molécule donneuse de NO a permis une réversion partielle de ce phénotype, indiquant que le NO est important pour l'établissement de l'interaction (Leach et al., 2010). Chez *L. japonicus*, la mutation du gène *LjGlb1* codant pour une phytooglobine, entraîne une augmentation de la quantité de NO associée à une diminution du nombre de nodule (Fukudome et al., 2016). Durant les étapes tardives, une surexpression de la phytooglobine LjGlb1 chez *L. japonicus* entraîne une diminution de la quantité de NO et un retard dans l'apparition de la sénescence nodulaire, suggérant que le NO est impliqué dans le déclenchement de la sénescence

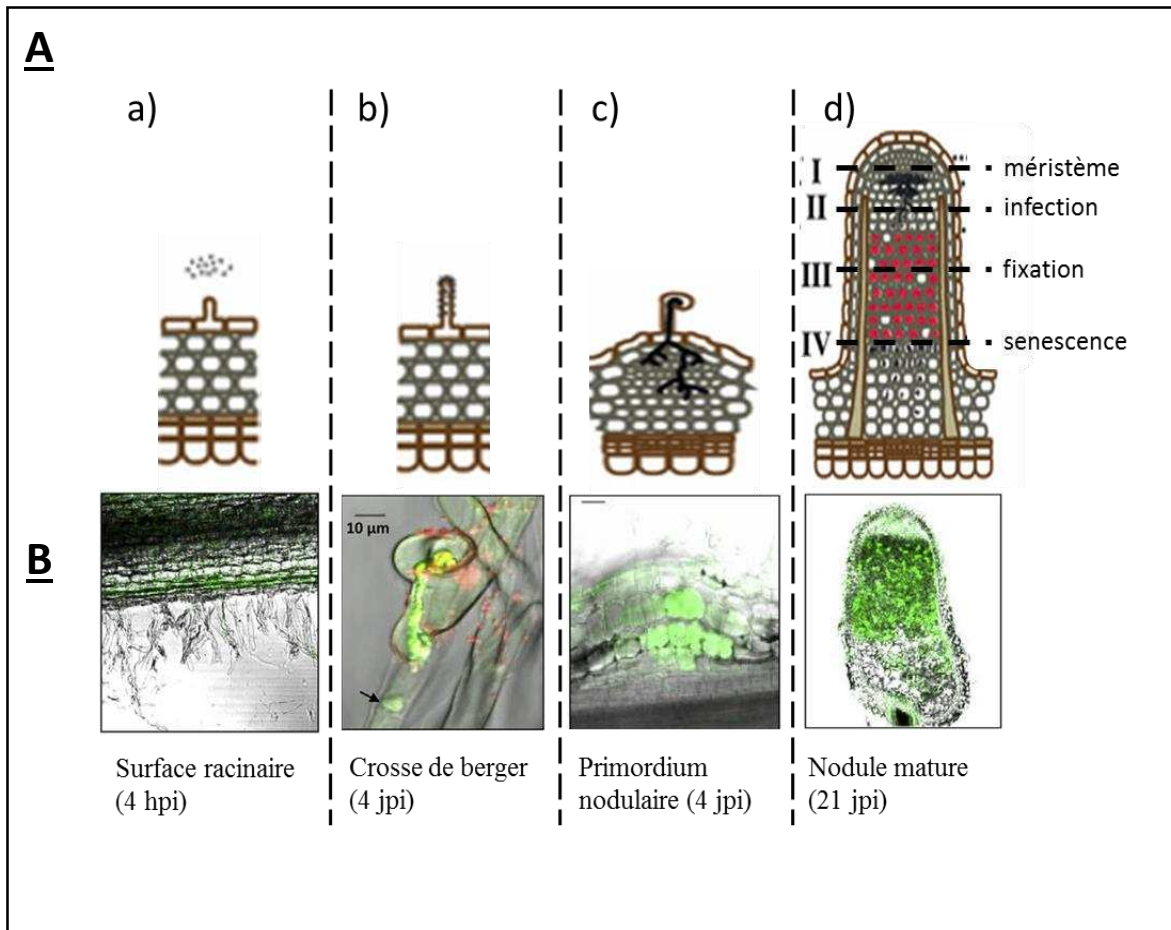


Figure 23 : Détection du NO lors des différentes étapes de l'interaction symbiotique entre *E. meliloti* et *M. truncatula*.

(A) Représentation schématique des étapes de l'interaction symbiotique : a) dialogue moléculaire entre la bactérie et la plante 4 heures post-inoculation (hpi), b) interaction des bactéries avec la surface racinaire 4 jours post-inoculation (jpi), c) courbure du poil absorbant avec apparition du cordon d'infection et du primordium nodulaire par division des cellules végétales (4 jpi), et d) représentation d'un nodule indéterminé mature (21 jpi) avec les 4 zones qui le composent. **(B)** Observations microscopiques de la production de NO (en vert) au cours différentes étapes de l'interaction symbiotique grâce à une sonde fluorescente spécifique (DAF-2 DA). (Adapté de del Giudice et al. 2011).

(Fukudome et al., 2019a). Cependant, même s'il a été possible de mettre en évidence du NO depuis les étapes précoces de la symbiose jusqu'à la sénescence des nodules, son rôle présente encore de nombreuses zones d'ombre.

Différentes études ont montré un lien entre la concentration en NO dans la nodosité et l'activité nitrogénase. Chez *L. japonicus*, l'addition d'un donneur de NO sur des nodules conduit à une diminution de l'efficacité de fixation d'azote. A contrario, l'application d'un piègeur de NO supprime l'inhibition de la fixation d'azote provoqué par l'ajout de NO_3^- (Kato et al., 2010). Dans le même sens, une approche génétique de surexpression du gène de la phytoglobine *LjGlb1* chez *L. japonicus* entraîne une diminution de la quantité de NO et une augmentation de l'activité nitrogénase par rapport à une plante sauvage (Shimoda et al., 2009).

3. Le NO dans la symbiose entre *Ensifer meliloti* et *Medicago truncatula*

Depuis de nombreuses années, la symbiose entre *Ensifer meliloti* et *Medicago truncatula* fait partie des modèles d'interactions symbiotiques où l'on s'intéresse au NO et à son rôle. En effet, plusieurs études ont permis d'identifier les étapes de l'interaction symbiotique au cours desquelles du NO est détecté (Figure 23). Les premiers travaux ont été réalisés par Baudouin et ses collègues qui ont détecté du NO dans des nodules matures de 10, 20 et 30 jours après inoculation avec *E. meliloti*. Dans cette étude, du NO avait aussi été observé dans des cellules infectées de la zone III du nodule, suggérant une potentielle implication des bactéroïdes dans la synthèse de cette molécule (Baudouin et al., 2006). Par la suite, du NO a aussi été détecté au niveau de la microcolonie 4 jours après inoculation, puis dans les cordons d'infection et dans le primordium nodulaire (del Giudice et al., 2011). Du NO a été aussi détecté au niveau de la jonction entre la zone fixatrice et la zone de sénescence (Cam et al., 2012). Enfin, une étude récente a permis de mesurer précisément des augmentations de la quantité de NO et cela dans les racines de *M. truncatula* 10 heures après inoculation, durant le développement des nodules (4 jours post-inoculation) et dans des nodules matures (3 à 4 semaines après inoculation) (Berger et al., 2020b).

Une augmentation de la quantité de NO a également été observée chez *M. truncatula* et *M. sativa* au cours des premières heures après inoculation (Nagata et al., 2008; Berger et

al., 2020b). Cette réaction rappelle les mécanismes de défense utilisés par la plante pour lutter contre un pathogène. De façon intéressante, une étude réalisée chez *M. sativa* a montré que cette augmentation de la quantité de NO est différente s'il s'agit d'une inoculation avec son symbionte *E. meliloti* ou avec un pathogène comme *Ralstonia solanacearum*. En effet, l'inoculation par le symbionte provoque une synthèse de NO dans les racines de façon transitoire comparée à celle du pathogène qui provoque une production continue de NO pendant plus de 24h après inoculation (Nagata et al., 2008). Le pic transitoire de NO serait la conséquence d'une adaptation des mécanismes de défense de la plante au symbionte bactérien pour permettre l'infection (Berger et al., 2020b). Des approches génétiques et pharmacologiques (molécules donneuses ou piègeuses de NO) ont été utilisées pour moduler les niveaux de NO et observer les conséquences de ces modifications sur la nodulation. Chez *M. truncatula*, la diminution de la quantité de NO au moment de l'infection par l'ajout d'un piègeur de NO (cPTIO) entraîne un retard de nodulation (del Giudice et al., 2011). Cet effet du cPTIO sur la nodulation avait déjà été observé auparavant chez *M. truncatula* (Pii et al., 2007). De plus, Del Giudice et ses collègues ont réalisé des compétitions d'infection entre la souche surexprimant *hmp* et une souche sauvage, démontrant une faible compétitivité de la souche surexprimant *hmp*, associée à sa plus grande capacité à dégrader le NO (del Giudice et al., 2011). L'ensemble de ces résultats montre l'importance du NO au niveau des étapes précoces de la symbiose.

Du NO a également été détecté durant l'organogenèse du nodule (del Giudice et al., 2011; Berger et al., 2020b). Une étude transcriptomique par microarray de la réponse de racines de *M. truncatula* à l'ajout de deux donneurs de NO a permis d'identifier un changement d'expression de 290 gènes au moment du développement du nodule (10 dpi). Parmi ces gènes, on retrouve des gènes impliqués dans les mécanismes de synthèse des flavonoïdes ou bien dans la signalisation redox, indiquant une potentielle implication du NO durant le développement nodulaire (Ferrarini et al., 2008). Une deuxième étude transcriptomique, cette fois-ci réalisée par RNA-seq, sur des racines inoculées et traitées ou non pendant 8 heures avec du cPTIO, a permis d'identifier 2.030 gènes différentiellement exprimés au moment de la formation du primordium nodulaire. Parmi ces gènes, certains codent des facteurs de transcription ou sont impliqués directement dans le développement du nodule, suggérant l'importance du NO au moment de l'organogenèse de la nodosité

(Boscari et al., 2013). De plus, Boscari et ses collègues ont observé une répression de gènes de défense potentiellement attribuée au NO lors de la mise en place de l'interaction symbiotique (Boscari et al., 2013). Toutes ces données suggèrent que le NO pourrait non seulement être impliqué dans la répression des mécanismes de défense des plantes pour permettre l'infection par la bactérie symbiotique, mais aussi dans l'initiation des mécanismes cellulaires nécessaires à l'organogenèse du nodule.

Un nodule mature est caractérisé par sa capacité à fixer l'azote atmosphérique et cela grâce à la nitrogénase des bactéroïdes. En 1982, une étude *in vitro* a mis en lumière l'inhibition par le NO de la nitrogénase purifiée de *B. diazoefficiens* (Trinchant and Rigaud, 1982). Paradoxalement, des observations microscopiques ont mis en évidence la présence de NO dans des cellules contenant des bactéroïdes au sein de nodules matures de *M. truncatula* (Baudouin et al., 2006). En plus de cela, les auteurs de cette étude ont montré grâce à l'utilisation de nodules non fixateurs que la production de NO dans le nodule ne dépendait pas de l'activité nitrogénase. Au vu du potentiel effet négatif du NO sur la nitrogénase, plusieurs études ont cherché à comprendre son rôle au sein des nodules matures. Très récemment, les effets du NO sur l'activité de la nitrogénase ont été décrits chez *M. truncatula*. Dans cette étude, la surexpression du gène codant la phytoglobine *Phytogb1* entraîne une augmentation de l'activité nitrogénase. À l'inverse, son inactivation par RNAi entraîne une diminution de cette activité (Berger et al., 2020b). Cet effet de la diminution de la concentration en NO au sein du nodule avait déjà été observé chez *M. truncatula*, mais en utilisant une autre approche où les plantes étaient inoculées avec une mutant d'*E. meliloti* surexprimant *hmp* (Meilhoc et al., 2010; Cam et al., 2012). Plusieurs hypothèses peuvent être formulées pour expliquer l'inhibition de la nitrogénase par le NO : (i) l'inhibition de la nitrogénase pourrait être due à la S-nitrosylation des sous-unités de ce complexe enzymatique (Xue et al., 2010; Puppo et al., 2013a) ; (ii) la compétition du NO avec l'oxygène pour la leghémoglobine pourrait entraîner une élévation du niveau d'oxygène suite à la formation de nitrosyl-leghémoglobine, un inhibiteur de la nitrogénase (Kato et al., 2010) ; (iii) le NO pourrait inhiber l'expression des gènes codant la nitrogénase. C'est ce qui a été observé chez le soja, où une augmentation de la concentration en NO suite à un stress entraîne une inhibition de l'expression des gènes *nifH* et *nifD* codant la nitrogénase (Sánchez et al., 2010a).

Dans des nodules matures, une augmentation du niveau de NO peut être mesurée suite à un stress. En effet, une augmentation de la quantité de NO dans les nodules a été observée lors d'une exposition à un stress hypoxique chez *M. truncatula* et à un stress par immersion chez le soja (Sánchez et al., 2010a; Horchani et al., 2011). Le NO peut aussi inhiber d'autres enzymes telles que la glutamine synthase (GS), enzyme impliquée dans l'assimilation de l'azote chez la plante. Chez *M. truncatula*, l'activité de la GS peut être inhibée par le NO via une tyrosine nitration (Melo et al., 2011). Cette inhibition va entraîner un défaut d'assimilation, mais aussi une régulation de la réponse antioxydante (Melo et al., 2011). En effet, la GS a pour substrat le glutamate, qui est une molécule précurseur d'un composé antioxydant, le glutathion (Silva and Carvalho, 2013). En plus de la GS, environ 80 protéines pouvant être S-nitrosylées ont été identifiées chez la plante et la bactérie durant l'interaction symbiotique. Ces enzymes participent à certaines voies du métabolisme primaire comme le cycle des TCA ou la glycolyse (Puppo et al., 2013b).

Enfin, le NO a été décrit comme une molécule signal induisant la sénescence nodulaire. Dans cette étape, l'arrêt de la fixation et la mort des cellules bactériennes puis végétales va entraîner la dégradation du nodule. Des expériences utilisant des mutants bactériens d'*E. meliloti* surexprimant le gène *hmp* codant la flavohémoglobine impliquée dans la dégradation du NO ont permis d'observer un retard de sénescence des nodules (Cam et al., 2012). Par ailleurs, il a été montré récemment que la surexpression du gène de la phytoglobine *Phytogb1* entraîne une diminution de la quantité de NO dans le nodule, ainsi qu'une baisse du niveau d'expression du gène de la cystéine protéase 6 (CP6), un marqueur connu de sénescence nodulaire. À l'inverse, l'inactivation de *Phytogb1* par RNAi conduit à une augmentation de la quantité de NO, ainsi qu'une augmentation de l'expression du marqueur de sénescence CP6 (Berger et al., 2020b). Très récemment, Fukudome et ses collègues ont transformé la bactérie *M. loti*, qui ne possède pas de flavohémoglobine, avec un plasmide permettant la surexpression de *hmp* d'*E. meliloti*. Les auteurs n'ont pas observé de retard dans l'apparition de la sénescence comme cela a été observé chez *E. meliloti*. Néanmoins, les auteurs ont observé un retard d'infection et une meilleure fixation d'azote (Fukudome et al., 2021). L'ensemble de ces données supportent l'idée que le NO est impliqué dans l'induction de la sénescence nodulaire.

V. Présentation du sujet de thèse

Nous avons vu au travers de cette étude bibliographique que le NO est une molécule importante aussi bien dans les interactions pathogènes que symbiotiques. Dans les interactions pathogènes le NO est à la fois utilisé par les plantes, mais aussi par les bactéries pour se défendre et attaquer. Dans les interactions symbiotiques, le NO est produit à la fois par le partenaire végétal et par le partenaire bactérien. Un certain nombre d'études permettent de proposer des pistes quant au rôle du NO dans ce type d'interaction. Cependant, il est encore difficile de différencier le rôle du NO d'origine bactérienne avec celui synthétisé par la plante. Cette difficulté vient du fait que les deux organismes sont capables de synthétiser du NO de manière indépendante et que les voies qui permettent cette synthèse ne sont pas encore complètement élucidées.

L'objectif central de ma thèse a été de caractériser l'ensemble des systèmes de biosynthèse du NO présents chez le partenaire bactérien, avec l'objectif, de les inactiver par une approche génétique pour étudier le rôle du NO d'origine bactérienne au cours de la symbiose entre *E. meliloti* et *M. truncatula*.

Matériels et Méthodes

I. Culture de souches bactériennes

Les différentes souches d'*Escherichia coli* DH5 α et *Ensifer meliloti* 2011 utilisées dans ce travail sont listées dans le tableau 1.

Les souches d'*E. coli* ont été cultivées à 37 C° dans du milieu LB (Luria Bertani : Tryptone 1%, extrait de levure 0,5%, NaCl 1%, pH 7) additionné de 1,5% d'agar-agar pour le milieu gélosé.

Les souches de *E. meliloti* ont d'abord été cultivées une nuit à 28 C° en milieu LB supplémenté avec du CaCl₂ (2,5 mM) et du MgSO₄ (2,5 mM) puis environ 8 à 10h dans du milieu minimum de Vincent (MMV) (Vincent. 1970) : K₂HPO₄ (5,74 mM), KH₂PO₄ (7,35 mM), MgSO₄ (1 mM), Na₂ succinate (10 mM), CaCl₂ (456 μ M), FeCl₃ (35 μ M), biotine (4 μ M), H₃BO₃ (48,5 μ M), MnSO₄ (10 μ M), ZnSO₄ (1 μ M), CuSO₄ (0,5 μ M), CoCl₂ (0,27 μ M) et NaMoO₄ (0,5 μ M). La source d'azote utilisée a été adaptée en fonction des expérimentations (NH₄Cl (18,7 mM), glutamate (10 mM). Après cette deuxième étape, une dernière culture dans du MMV a été effectuée de façon à obtenir des cellules en phase exponentielle de croissance soit une DO_{600nm} comprise entre 0,2 et 0,3.

Au besoin, les milieux ont été supplémentés en KNO₃⁻ (20 mM), NaNO₂⁻ (5 mM) ou en molécule donneuse de NO, la spermine NONOate (Cayman Chemicals Coger ; CAY-82150-M100) (25 μ M dans une solution de NaOH 10 mM).

Les cultures liquides ont été réalisées en aérobie ou en microaérobie (2% O₂) en fonction des expériences menées.

Selon les souches cultivées, des antibiotiques sont ajoutées aux milieux de culture: carbenicilline (Cb) 50 μ g/ml, gentamycine (Gm) 40 μ g/ml, tétracycline (Tet) 10 μ g/ml, néomycine (Neo) 100 μ g/ml et streptomycine (Sm) 100 ou 300 μ g/ml.

II. Suivi de la croissance bactérienne en culture liquide

Après une première culture liquide en LBMC et une pré-culture en MMV, les cellules ont été centrifugées 10 minutes à 8000 g, lavées dans du MMV sans source d'azote et resuspendues à une DO_{600nm} de 0,1 dans du MMV avec une ou plusieurs sources d'azote en

Tableau 1 : Souches utilisées.

Souches	Description	Référence ou source
Escherichia coli		
DH5a	F ⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20 φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK-mK+), λ ⁻	Invitrogen
Sinorhizobium meliloti		
GMI11495 (CBT707)	S. meliloti 2011 (SU47), Sm ^R	Pobigaylo et al., 2006
CBT612	GMI11495 <i>napA</i> ::Tn5, Sm ^R , Neo ^R	Pobigaylo et al., 2006
CBT614	GMI11495 <i>nirK</i> ::Tn5, Sm ^R , Neo ^R	Pobigaylo et al., 2006
CBT2614	GMI11495 SMb20436::Tn5, Sm ^R , Neo ^R	Pobigaylo et al., 2006
CBT2622	GMI11495 SMb21114::Tn5, Sm ^R , Neo ^R	Pobigaylo et al., 2006
CBT2474	CBT707 Δ <i>narB</i> , Sm ^R	Ruiz et al., 2019
CBT2665	CBT707 Δ <i>nirBD</i> , Sm ^R	Ce travail
CBT2659	CBT707 Δ <i>nirKV</i> , Sm ^R	Ce travail
CBT2661	CBT707 Δ <i>hmp</i> (SMa1191), Sm ^R	Ce travail
CBT2663	CBT707 Δ <i>napEFDABC</i> , Sm ^R	Ce travail
CBT2767	CBT707 Δ <i>norECBQD</i> , Sm ^R	Ce travail
CBT2667	CBT707 Δ <i>tHb1</i> (SMc01520), Sm ^R	Ce travail
CBT2669	CBT707 Δ <i>tHb2</i> (SMc02351), Sm ^R	Ce travail
CBT2473	CBT707 Δ <i>nirBDnarB</i> , Sm ^R	Ruiz et al., 2019
CBT2695	CBT2474 (Δ <i>narB</i>) Δ <i>nirKV</i> , Sm ^R	Ce travail
CBT2696	CBT2473 (Δ <i>nirBDnarB</i>) Δ <i>nirKV</i> , Sm ^R	Ce travail
CBT2697	CBT2663 (Δ <i>napEFDABC</i>) Δ <i>nirKV</i> , Sm ^R	Ce travail
CBT2698	CBT2696 (Δ <i>nirBDnarB</i> -Δ <i>nirKV</i>) Δ <i>napEFDABC</i> , Sm ^R	Ce travail
CBT2768	CBT2697 (Δ <i>napEFDABC</i> -Δ <i>nirKV</i>) Δ <i>norECBQD</i> Sm ^R	Ce travail
CBT2769	CBT2698 (Δ <i>nirBDnarB</i> -Δ <i>napEFDABC</i> -Δ <i>nirKV</i>) Δ <i>norECBQD</i> , Sm ^R	Ce travail
CBT2725	CBT2669 (Δ <i>tHb2</i>) Δ <i>tHb1</i> , Sm ^R	Ce travail
CBT1655	CBT707 + pLS-233-03	Ce travail
CBT2489	CBT707 + pLS-303-1 (SMb23331)	Ce travail
CBT2529	CBT707 + pBRC-3-1	Ce travail
CBT2632	CBT2622 + pBRC-3-1	Ce travail
CBT2656	CBT1655 + pBRC-3-1	Ce travail
CBT2657	CBT2489 + pBRC-3-1	Ce travail
CBT2771	CBT707 + pBRC-7-6-2	Ce travail
CBT2776	CBT707 + pHC60 (GFP)	Ce travail
CBT2777	CBT707 + pBHR-mRFP (RFP)	Ce travail
CBT2778	CBT2473 + pHC60 (GFP)	Ce travail
CBT2779	CBT2473 + pBHR-mRFP (RFP)	Ce travail
CBT2780	CBT2697 + pHC60 (GFP)	Ce travail
CBT2781	CBT2697 + pBHR-mRFP (RFP)	Ce travail
CBT2782	CBT2698 + pHC60 (GFP)	Ce travail
CBT2783	CBT2698 + pBHR-mRFP (RFP)	Ce travail

fonction de l'expérimentation (NH_4Cl , glutamate, KNO_3^- , NaNO_2^-). La $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de la culture a été mesurée à espaces réguliers pendant 8 heures et une dernière mesure a été réalisée au bout de 24h.

III. Construction de plasmides et de souches mutantes

La liste des plasmides et la liste des oligonucléotides utilisés dans ce travail sont présentées dans les tableaux 2 et 3.

L'ensemble des étapes de clonage a été réalisé à l'aide des kits de purification de plasmide Wizard plus SV Miniprep DNA purification System (Promega) et Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega).

Les PCR ont été réalisées à l'aide de la GoTaq (Promega) ou de la Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo). Sauf exception, les produits PCR générés ont été clonés dans un premier temps dans le plasmide pGEM-T (Promega) avant d'être récupérés par restriction et sous-clonés dans le vecteur de destination finale. Tous les clonages réalisés dans ce travail ont été vérifiés par séquençage.

Les transformations bactériennes ont été réalisées par choc thermique à l'aide de bactérie chimio-compétentes pour *E. coli* (Sambrook, J. and Russell, D. W. 2001) et par électroporation pour *E. meliloti* (Ferri et al., 2010).

1. Surexpression de l'ARN non-codant anti-sens SMb23331

Le plasmide pBBR1MCS-5 (Kovach et al., 1995) a été utilisé afin de placer le gène SMb23331 sous le contrôle du promoteur Lac, constitutif chez *E. meliloti*. Le plasmide pBBR1MCS-5 a été modifié par l'ajout d'un site de restriction *NruI* permettant de générer une extrémité franche au point +1 du promoteur Lac (plasmide pLS233-03). Le gène SMb23331 (304 pb) a été amplifié par PCR à l'aide d'une Taq polymérase proofreading à partir d'ADN génomique d'*E. meliloti* 2011 GMI11495 en utilisant les amorces OCB1912 et OCB1913 permettant l'ajout d'un site *BamHI* à l'extrémité 3' du fragment. Le fragment PCR produit a ensuite été digéré par *BamHI* avant d'être cloné dans pLS233-03 préalablement linéarisé par

Tableau 2 : Plasmides utilisées.

Souches	Description	Référence ou source
Plasmides		
pJET	Cloning vector, Amp ^R	ThermoFisher
pGEM-T	Cloning vector, Amp ^R	Promega
pGEM 5'UTRnarB	5'UTR <i>narB</i> ligation avec pGEM-T	Ruiz et al., 2019
pGEM 3'UTRnarB	3'UTR <i>narB</i> ligation avec pGEM-T	Ruiz et al., 2019
pGEM 5'UTRnirB	5'UTR <i>nirB</i> ligation avec pGEM-T	Ruiz et al., 2019
pBRC-4-1-3	5' UTR <i>nirK</i> ligation avec pGEM-T	Ce travail
pBRC-4-2-4	3' UTR <i>nirV</i> ligation avec pGEM-T	Ce travail
pBRC-4-3-4	5' UTR <i>hmp</i> ligation avec pGEM-T	Ce travail
pBRC-4-4-3	3' UTR <i>hmp</i> ligation avec pGEM-T	Ce travail
pBRC-4-5-3	5' UTR <i>napE</i> ligation avec pGEM-T	Ce travail
pBRC-4-6-10	3' UTR <i>napC</i> ligation avec pGEM-T	Ce travail
pBRC-4-7-2	5' UTR <i>nirB</i> ligation avec pGEM-T	Ce travail
pBRC-4-8-7	3' UTR <i>nirD</i> ligation avec pGEM-T	Ce travail
pBRC-4-9-8	5' UTR <i>thb1</i> ligation avec pGEM-T	Ce travail
pBRC-4-10-10	3' UTR <i>thb1</i> ligation avec pGEM-T	Ce travail
pBRC-4-11-3	5' UTR <i>thb2</i> ligation avec pGEM-T	Ce travail
pBRC-4-12-2	3' UTR <i>thb2</i> ligation avec pGEM-T	Ce travail
pJQ200-mp19	Suicide vector, Gm ^R	Quandt and Hynes., 1993
pJQ 5'3'UTRnarB	5'3'UTRs <i>narB</i> ligation avec pJQ200-mp19, Gm ^R	Ruiz et al., 2019
pJQ 5'UTRnirB 3'UTRnarB	5'UTR <i>nirB</i> 3'UTRnarB ligation avec pJQ200-mp19, Gm ^R	Ruiz et al., 2019
pBRC-5-1-3	5' 3' UTRs <i>nirKV</i> ligation avec pJQ200-mp20, Gm ^R	Ce travail
pBRC-5-2-4	5' 3' UTRs <i>hmp</i> ligation avec pJQ200-mp19, Gm ^R	Ce travail
pBRC-5-3-3	5' 3' UTRs <i>napEFDABC</i> ligation avec pJQ200-mp19, Gm ^R	Ce travail
pBRC-5-4-5	5' 3' UTRs <i>nirBD</i> ligation avec pJQ200-mp19, Gm ^R	Ce travail
pBRC-5-5-8	5' 3' UTRs <i>thb1</i> ligation avec pJQ200-mp19, Gm ^R	Ce travail
pBRC-5-6-6	5' 3' UTRs <i>thb2</i> ligation avec pJQ200-mp20, Gm ^R	Ce travail
pBRC-10-1	5' 3' UTRs <i>norECBQD</i> ligation avec pJQ200-mp20, Gm ^R	Ce travail
pBBR1 MCS-5	lacPOZ', mob, Gm ^r	Kovach et coll., 1995
pLS-233-03	pBBR1 MCS-5 modif +1 pLac	Laurent Sauviac
pLS-303-1	pLS-233-3 + insert as-ncRNA SMb23331	Ce travail
pCZ962	pFAJ1700 modifié, Tet ^R	Claudine Zischek
pBRC-3-1	pCZ962+ promoteur opéron <i>nirBDnarBcysG</i>	Ce travail
pBRC-7-6-2	pCZ962+ promoteur SMb23331	Ce travail
pHC60	Expression constitutive de la GFP, Tet ^R	Chang and Walker., 1998
pBHR-mRFP	Expression constitutive de la RFP, Tet ^R	Smit et al., 2005

NruI et *BamHI* pour créer pLS-303-1. Une ligation (extrémité 5' Blunt et 3' *BamHI*) entre l'insert et le vecteur a été réalisée en présence de la T4 ADN ligase (Promega), pendant une nuit à 16 C°. Des cellules chimio-compétentes *E. coli* DH5 α ont été transformées et les transformants sélectionnés sur milieu LB gélosé en présence d'antibiotique à 37 C°. La présence de l'insert a été vérifiée par PCR. Le plasmide a été extrait de différents clones obtenus sur boîte et un séquençage a été réalisé sur la zone contenant l'insert afin de vérifier l'absence de mutation. Les clones d'intérêt ont été conservés à - 80 C° dans du glycérol à 70%.

Le plasmide d'intérêt a été extrait et 1 à 100 ng d'ADN ont été mélangés avec 50 μ l de *E. meliloti* électro-compétentes et laissés dans la glace pendant 10 minutes dans une cuve d'électroporation. L'électro-transformation a été réalisée avec les paramètres suivants : 2100 V, 25 μ F, 200 Ω pendant 1 mm. Après le pulse, les cellules ont été resuspendues dans 950 μ l de LBMC sans antibiotique pendant 4h à 28 C°. Les cellules ont ensuite été étalées sur boîte de pétri contenant du milieu LBMC en présence de gentamycine et de streptomycine.

2. Construction de plasmides portant des fusions transcriptionnelles avec le gène *lacZ*

L'ensemble des fusions transcriptionnelles ont été réalisées dans le vecteur pCZ962 en clonant la région promotrice des séquences d'intérêt en amont de la séquence codant pour la β -galactosidase (Déjean et al., 2013).

La région portant le promoteur putatif de l'opéron *nirBD narB cysG* d'une taille de 664 pb a été amplifiée par PCR avec les amorces OCB1924 et OCB1925 permettant l'ajout des sites *NcoI* en 5' et *XhoI* en 3'. La région portant le promoteur putatif de l'ARN non codant Smb23331 d'une taille de 500 pb a été amplifiée par PCR avec les amorces OCB2130 et OCB2131 permettant l'ajout des sites *NcoI* en 5' et *XhoI* en 3'. Chaque fragment PCR a été cloné dans pGEM-T et vérifié par séquençage pour ensuite être récupéré par restriction avec *NcoI* et *XhoI* et sous cloné dans le plasmide pCZ962 préalablement digéré par *NcoI* et *XhoI*.

Tableau 3 : Oligonucléotides utilisées.

Oligonucléotides	Sequences 5'-3'	Description
Deletion		
OCB1988	GGATCC ATGGCGCAAGAGGTCAAGAC	Fw 5' UTR <i>nirBD</i>
OCB1989	GAGCTC GACGGAGGAAGACATGCAG	Rev 5' UTR <i>nirBD</i>
OCB1990	GTCGAC CGGCTGATCATTGCGAACG	Fw 3' UTR <i>nirBD</i>
OCB1991	GGATCC GTGGTCACTCCGACGCTTC	Rev 3' UTR <i>nirBD</i>
OCB1557	GTCGAC GCTGATCATGCGA	fw 5' <i>nirB</i> (<i>nirBDnarB</i>)
OCB1558	GGATCC TTTCAGTCATGTGGT	rev 5' <i>nirB</i> (<i>nirBDnarB</i>)
OCB1567	GTCGAC GACAAGCAGGATTT	fw 5' <i>narB</i>
OCB1568	GGATCC CTTATTCCGCCGC	rev 5' <i>narB</i>
OCB1569	GGATCC ATCTGGCCAAAAG	fw 3' <i>narB</i>
OCB1570	GAGCTC CGATCCGAAGTGA	rev 3' <i>narB</i>
OCB1984	GGATCC TCGGTATCGGGCATTCAAG	Fw 5' UTR <i>napE</i>
OCB1985	GTCGAC TGACTTTTCGACGTGCCAGG	Rev 5' UTR <i>napE</i>
OCB1986	GAGCTC ACTCGACCACGAGTCCGC	Fw 3' UTR <i>napC</i>
OCB1987	GGATCC TATGGACGAGGCTCACAG	Rev 3' UTR <i>napC</i>
OCB1976	GGATCC GAAACTCTCCTTGAGAAG	Fw 5' UTR <i>nirK</i>
OCB1977	GAGCTC GAAAGCCGAACGATCTCG	Rev 5' UTR <i>nirK</i>
OCB1978	GTCGAC CTCAGTACCATGGCGCAATG	Fw 3' UTR <i>nirV</i>
OCB1979	GGATCC GAGCCGACGCTTGAGATCG	Rev 3' UTR <i>nirV</i>
OCB2253	ATGCCTGCAGGTCGAGCATCAAGCTGAGAACAG	Fw 5' UTR <i>norD</i>
OCB2254	ATTGGGTGCGGATCGAGA	Rev 5' UTR <i>norD</i>
OCB2255	CGATCCGACCCAATGCGGAATAGGAGAAAGGCG	Fw 3' UTR <i>norE</i>
OCB2256	CGGCCAGTGAATTCGCTGACGTCCAAGGCGAAT	Rev 3' UTR <i>norE</i>
OCB1980	GGATCC GATCTGTTTGCCGAGTGAG	Fw 5' UTR <i>hmp</i>
OCB1981	GTCGAC CGTAGAGCACCGAGGATAC	Rev 5' UTR <i>hmp</i>
OCB1982	GAGCTC GACAGCGTTCTGAATCTCG	Fw 3' UTR <i>hmp</i>
OCB1983	GGATCC CAGGGCGCTCTAACTGCAC	Rev 3' UTR <i>hmp</i>
OCB1992	GGATCC CAGAACAAGGAATAGCTTGG	Fw 5' UTR <i>tHb1</i>
OCB1993	GAGCTC ATCCAGCCTCACTGCCTTC	Rev 5' UTR <i>tHb1</i>
OCB1994	GTCGAC GCAACGCATCGAACGGATC	Fw 3' UTR <i>tHb1</i>
OCB1995	GGATCC CGTCATGGTCAACCTC	Rev 3' UTR <i>tHb1</i>
OCB1996	GGATCC CAGTTCGTGCTCATACCATC	Fw 5' UTR <i>tHb2</i>
OCB1997	GAGCTC AGGGCATCGAGGAGGGTC	Rev 5' UTR <i>tHb2</i>
OCB1998	GTCGAC CCAGCGCTTCACGGATCAG	Fw 3' UTR <i>tHb2</i>
OCB1999	GGATCC GACGACCCGGCACTCAAG	Rev 3' UTR <i>tHb2</i>

3. Construction de mutants de délétion

Les délétions de gènes d'*E. meliloti* ont été réalisées par la méthode de délétion par double crossing-over. Pour ce faire, nous avons utilisé un plasmide intégratif pJQ200mp19 (Quandt and Hynes, 1993) contenant des fragments d'environ 500 pb de la région amont et aval de la région à supprimer. Les régions de recombinaison amont et aval ont été obtenues par PCR sur de l'ADN génomique de la souche d'*E. meliloti* 2011 GMI11495 en utilisant des amorces à queue flottante permettant l'addition des sites *SacI*-*Bam*HI et *Bam*HI-*Sal*I à leurs extrémités. Ces différentes régions ont été clonées individuellement dans le plasmide pGEM-T (Promega pGEM-T vector systems) et l'absence de mutation a été vérifiée par séquençage. Après extraction des plasmides et digestion des fragments amont (*SacI* - *Bam*HI) et aval (*Sal*I - *Bam*HI), les régions correspondant aux extrémités de la zone à déléter (un seul gène ou plusieurs) ont été juxtaposés dans le vecteur intégratif pJQ200mp19 préalablement linéarisé (*SacI* - *Sal*I). Après séquençage, les plasmides ont ensuite été introduits chez *E. meliloti* par électro-transformation. Les bactéries ayant réalisé le premier évènement de recombinaison permettant l'intégration du plasmide dérivé de pJQ200mp19 ont été sélectionnées sur milieu gélosé contenant de la gentamycine. Les clones obtenus ont ensuite été mis en culture liquide en milieu LBMC sans antibiotique pour permettre l'apparition d'un deuxième évènement de recombinaison qui se traduit par la perte du plasmide. Ce type d'évènement est sélectionné par étalement de la culture liquide sur LBMC gélosé contenant 5% de saccharose, toujours en absence de gentamycine. Le vecteur dérivé de pJQ200mp19 exprimant le gène *sacB*, seules les cellules ayant réalisé un second évènement de recombinaison permettant l'excision du plasmide peuvent se développer sur ce milieu car l'expression de *sacB* en présence de saccharose est toxique pour ces cellules. Les bactéries résistantes au saccharose ont ensuite été repiquées sur LBMC contenant de la gentamycine pour rechercher des clones sensibles à la gentamycine. Ces derniers ont alors été analysés par PCR en utilisant des oligonucléotides hybridant de part et d'autre des régions amont et aval utilisées pour les étapes de recombinaison (Tableau 3). Les clones présentant une amplification PCR correspondant à la région génomique portant la délétion recherchée ont été mis en collection et le produit PCR a été séquencé pour vérifier la délétion.

Tableau 3 : Oligonucléotides utilisées.

Deletion verification		
OCB1588	CGAGATGGCAGTTGATGATG	Fw <i>nirB</i>
OCB1606	CGTCATCCTTGACCAGGGTC	fw <i>nirB</i>
OCB1607	CTGCCGAAATTGGCGGGATG	Rev <i>nirB</i>
OCB1609	CCTCGGCATCCGCATCGAG	fw <i>nirD</i>
OCB1610	GCGAGCTCCAGGTCTCTG	Rev <i>nirD</i>
OCB1611	CCTATTTGACCGCTTCGTC	fw <i>narB</i>
OCB1612	CGGATCGCCTGTGCCAGG	rev <i>narB</i>
OCB2065	CCTGCTCGCTGCGAATCTC	Fw <i>napEFDABC</i>
OCB2066	ATGTCGAGACGATCAAGGAC	Rev <i>napEFDABC</i>
OCB885	CCGTCGAGCAGGACCGAAT	Fw <i>napEFDABC</i>
OCB886	GAACAGGCCTTTCTGGATGTA	Rev <i>napEFDABC</i>
OCB2061	TACGACACTCCGGTCGATC	Fw <i>nirKV</i>
OCB2062	GCCAGCCAGAGCGTGAACA	Rev <i>nirKV</i>
OCB887	CGACGGCAAAGGCAATTCAA	Fw <i>nirKV</i>
OCB888	CGGGCTGCTCGAAGGTGTA	Rev <i>nirKV</i>
OCB1606	CGTCATCCTTGACCAGGGTC	fw <i>nirB</i> / <i>nirBDnarB</i>
OCB1607	CTGCCGAAATTGGCGGGATG	rev <i>nirB</i>
OCB1611	CCTATTTGACCGCTTCGTC	fw <i>narB</i>
OCB1612	CGGATCGCCTGTGCCAGG	rev <i>narB</i> / <i>nirBDnarB</i>
OCB2257	GAGATGCTGTCCGCGG	Fw <i>norECBQD</i>
OCB2258	GCGGGATGTGGTCAACATC	Rev <i>norECBQD</i>
OCB2063	CATCGGGTCGCAACACGAC	Fw <i>hmp</i>
OCB2064	CACTCGGCAATCAGGTCAAG	Rev <i>hmp</i>
OCB2069	CGGCTATCTTCTCGATACGA	Fw <i>tHb1</i>
OCB2070	TTACGGATGGTAACCTGCATA	Rev <i>tHb1</i>
OCB2071	ATCATTGCTGTTGATCGCGAC	Fw <i>tHb2</i>
OCB2072	CAGTTCAACTTCGAATTCCTG	Rev <i>tHb2</i>
Surexpression ARNnc		
OCB1912	CCGTCAGCAATTGTCCCGAGACGTAGAA	Fw 5' PCR ncRNA SMB23331
OCB1913	TATCTGACAGGATCCGTCAAGACCACCTGT	Rev 3' PCR ncRNA SMB23331
OCB2010	CGCGCAGTATCGCCGAGCACGGTCC	sonde SMB23331 northern
Promoteur <i>nirBDnarBcysG</i>		
OCB1924	CCATGGCTCATGAATCGTCGCTC	Fw <i>NcoI</i>
OCB1925	CTCGAGTATTGGTCACTCCGCAG	Rev <i>XhoI</i>
Promoteur SMB23331		
OCB2130	CCATGGGCGAAGCTGCGCCACAG	Fw SMB23331
OCB2131	CTCGAGAGGACTATTACATCGCCAAC	Rev SMB23331
qRT-PCR		
OCB1914	TCGGCGTCAACCAGATCACTGC	fw <i>narB</i>
OCB1915	AATGCTTCTGCATCGGATTGCTCG	rev Smb20987
OCB1587	TTCTTCCGGCTCTTCGAAAC	fw <i>narB</i>
OCB1588	CGAGATGGCAGTTGATGATG	rev <i>narB</i>
OCB1583	ATGTCATGCCGACACTGATG	fw <i>nirB</i>
OCB1584	CTTTGTGACGACCTTGATGC	rev <i>nirB</i>
OCB1589	TCAGATAACGTGGTCAAGG	fw <i>napA</i>
OCB1590	TAGCCCTTGATGCAGTTGAG	rev <i>napA</i>
OCB1591	CATGACCTTCAACGGTTCG	fw <i>nirK</i>
OCB1592	TATTGTGCTGCAGCGTGTTC	rev <i>nirK</i>
OCB1017	ACACGCTCTCCGAAGTGC	fw <i>norB</i>
OCB1018	CCCATGAAACCCATCAGC	rev <i>norB</i>
OCB1638	GTCATCGACCTCACCCATTT	fw SMC01171
OCB1639	TCTGCAGCAAGAACCACTTG	rev SMC01171
OCB1070	GCCAGGTTATGGACAAGACG	fw SMC00519
OCB1071	ACCGTTCGGTAGTATGAGC	rev SMC00519

IV. Dosage du NO et du NO₂⁻ dans des cultures bactériennes en milieu liquides

1. Dosage de la production de NO et de NO₂⁻ en culture

Les précultures ont été réalisées comme décrit précédemment. Les différentes souches d'*E. meliloti* ont été cultivées jusqu'en phase exponentielle de croissance en MMV (25 ml ; DO_{600nm} = 0.2 à 0.3). Les cellules ont alors été lavées et la source d'azote a été remplacée. Quand cela est nécessaire, du nitrate (KNO₃, 20 mM) ou de l'arginine (10 mM) ont été ajoutés au milieu (T=0). Les cultures ont alors été transférées dans des erlenmeyers de 50 ml et incubées en microaérobie (2% oxygène) ou dans des erlenmeyers de 100 ml en aérobie sous agitation (180 rpm) à 28 C° pendant 1h30. La DO_{600nm} de chaque culture a été mesurée afin de normaliser les valeurs de quantification de NO et NO₂⁻.

Dosage du NO₂⁻ : Le NO₂⁻ produit par les différentes cultures a été dosé par la méthode de Griess (Donald Nicholas and Nason, 1957). Pour cela, 1 ml de culture a été centrifugé et 100 µl du surnageant ont été incubés avec 100 µl de réactif de Griess pendant 30 minutes à température ambiante. L'absorbance a été mesurée avec un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 540 nm. La concentration en NO₂⁻ a été calculée à l'aide d'une gamme étalon réalisée à partir de NaNO₂ (0 à 50 µM).

Dosage du NO : Le NO produit par les cultures a été dosé en utilisant une sonde fluorescente spécifique du NO, la DAF-2 (5 µM final, Sigma-Aldrich) ou la DAF-FM (7 µM, Invitrogen). Un volume de 1 ml de culture a été incubé en présence de la sonde pendant 1h dans le noir à température ambiante. La fluorescence a été mesurée à l'aide d'un fluorimètre (Qubit fluorometer, excitation 495 nm et émission 515 nm). Les résultats ont été exprimés en unité arbitraire en divisant la fluorescence (RFU) par la DO_{600nm} de chaque culture.

Une gamme étalon a été réalisée en ajoutant le donneur de NO, spermine NONOate (0, 10, 30, 50 et 70 µM) dans des erlenmeyers contenant 10 ml de MMV. La sonde fluorescente a été ajoutée à 1 ml de milieu pendant une heure à 28 C° avant mesure de la fluorescence obtenue. La gamme étalon ne permet pas de calculer une quantité de NO mais de calibrer le fluorimètre et la sonde. Le temps de demi-vie est de 39 minutes à 37 °C dans un tampon phosphate à 0,1 M (pH = 7.4).

2. Mesure de la dégradation de NO

Les pré-cultures ont été réalisées comme décrit précédemment. Les différentes souches d'*E. meliloti* ont été cultivées jusqu'en phase exponentielle de croissance en MMV (25 ml ; $DO_{600nm} = 0,2$ à $0,3$). Une quantité connue de spermine NONOate (SpNN 30 ou 70 μM) a été ajoutée à chaque culture en présence de sonde DAF-2 (5 μM final, Sigma-Aldrich) sous agitation à 28°C. La mesure de fluorescence a été réalisée 2h plus tard pour quantifier le NO produit par la SpNN et non dégradé par les bactéries. Plus la capacité de dégradation d'une souche est affectée négativement, plus la quantité de NO dosé est importante. Un contrôle négatif sans ajout de donneur de NO a aussi été réalisé. Pour le dosage du NO et la préparation d'une gamme étalon, voir le paragraphe IV.1.

V. Test de sensibilité au NO

Les précultures ont été réalisées comme décrit dans la paragraphe I. Les tests de sensibilité au NO ont été réalisés sur des souches d'*E. meliloti* en culture dans du MMV à 28°C sous agitation (180 rpm) (25 ml ; $DO_{600nm} = 0,1$). Le donneur de NO (Spermine NONOate) a été préparé à partir d'une solution mère (100 mM) réalisée extemporanément dans une solution de NaOH (10 mM) à pH 6,9 puis diluée dans le milieu de culture aux concentrations désirées. Pour chaque souche, 3 concentrations différentes en SpNN ont été utilisées : 0 μM , 25 μM et 50 μM . La DO_{600nm} des cultures a été mesurée après ajout de la SpNN toutes les 1h30 pendant 7h30.

VI. Dosage de l'activité β -galactosidase

Les précultures ont été réalisées comme décrit dans la paragraphe I. Les souches contenant le plasmide permettant l'expression du gène *lacZ* sous le contrôle de la région promotrice étudiée ont été cultivées en phase exponentielle de croissance ($DO = 0,2$) dans du milieu minimum de Vincent à 28°C. Après 1h30, 4h ou 7h d'incubation en aérobie ou microaérobie avec différentes source d'azote, la DO_{600nm} a été mesurée et 100 μl de culture

ont été prélevés pour doser l'activité β -galactosidase selon la méthode de Miller (Miller. 1972). Brièvement, les 100 μ l de cellules ont été incubés avec 700 μ l tampon Z (NaH_2PO_4 40 mM, Na_2HPO_4 60 mM, KCl 10 mM, MgSO_4 1 mM, pH7) supplémenté de β -mercapto-ethanol (0.05 M) et de BSA (1 mg/ml), 100 μ l de chloroforme, 50 μ l de SDS 0.1% et 150 μ l d'ONPG 4mg/ml. Le mélange réactionnel a été incubé à 28 °C jusqu'à l'apparition d'une coloration jaune, puis la réaction a été stoppée en ajoutant 375 μ l de Na_2CO_3 (1 M). Les échantillons ont ensuite été centrifugés (10 min à 15000 g) la DO à 420nm (DO_{420}) a été mesurée sur les surnageants.

VII. qRT-PCR

Les précultures ont réalisées comme décrit dans la paragraphe I. Les bactéries ont été cultivées dans du milieu MMV jusqu'en phase exponentielle de croissance ($\text{DO}_{600\text{nm}}=0,2$ à 0,3). La culture (20ml) a été filtrée sur membranes (0,2 μ m). Les filtres portant les bactéries ont été ensuite directement congelés dans de l'azote liquide et conservés à -80 C°.

Pour extraire les ARN, les cellules présentes sur les filtres ont été lysées avec 2 ml de tampon de lyse (SDS 1 %, EDTA 4 mM, protéinase K 40 μ g/ml) à 65°C pendant 20 minutes. Les lysats cellulaires ont ensuite été incubés à 4 C° pendant 10 minutes en présence de NaCl (0.5 ml à 5 M pour 1 ml de lysat). Après centrifugation, les acides nucléiques contenus dans le surnageant ont été précipités à l'isopropanol 1h à 4 C avant d'être centrifugés. Les culots obtenus ont été lavés avec de l'alcool à 70%, séchés et repris dans de l'eau traitée au DEPC. La concentration des ARN a été mesurée au Nanodrop (ND-1000, THERMO scientific) pour être ajustée à 100 μ g/ μ l.

Les ARN ont ensuite été purifiés avec le kit Rneasy (Qiagen) et repris dans 100 μ l avant d'être traités à la turbo Dnase (Invitrogen Turbo Dnase free kit) à 37 C° pendant 60 minutes. La concentration et la pureté des échantillons ont été mesurées au Nanodrop.

La transcription inverse a été réalisée grâce à la transcriptase inverse Superscript II (Invitrogen) avec comme amorces des hexamères aléatoires. Les expériences de qPCR en temps réel ont été réalisées avec la technologie LightCycler 480 (Roche) en utilisant le kit SYBR Green I Master (Roche) en respectant le protocole du fournisseur. Le niveau d'expression de

chaque gène a été déduit à partir d'une gamme étalon réalisée avec l'ADN génomique d'*E. meliloti*. La normalisation des données a été effectuée avec un gène de référence dont l'expression ne varie pas dans les différentes conditions étudiées (SMc01171).

VIII. Analyse des ARN par Northern Blotting

Les acides nucléiques totaux ont été extraits avec le protocole de lyse décrit plus haut. La purification des ARN totaux a été réalisée à l'aide du kit Mirvana (Ambion) qui permet de préserver les ARNs de petite taille (Sallet et al., 2013). L'éluion a été réalisée avec 100µl d'eau Rnase free et la concentration d'ARN a été estimée par mesure au Nanodrop.

Pour les expériences de Northern blotting, 10 µg d'ARN ont été dénaturés pendant 5 minutes à 70°C en présence de tampon de charge (2X : Tris 89 mM, acide borique 89 mM, EDTA 2mM, pH 8,0, Ficoll 12%, bromophenol blue 0,01%, xylène cyanol 0,02%, urée 7 M), puis séparés par électrophorèse sur gel d'acrylamide/Bis-Acrylamide 12% (19 :1)

Les ARNs ont ensuite été transférés sur membrane de nylon (Positive™ Membrane, QBiogene) en utilisant un système d'électro-transfert semi-sec (AE-6675L, Atto) à 3 mA/ cm² pendant 1 heure avec du TBE (0,5X). Les membranes ont ensuite été colorées quelques minutes au bleu de méthylène (0,02% en solution dans de l'acide acétique 0,3 M, pH 5,5) pour vérifier le transfert des ARN avant d'être incubées 1h à 55°C dans un tampon de pré-hybridation (SSC 6X, ADN de sperme de saumon simple brin 50 µg/ ml, SDS 0,5%). L'hybridation a été réalisée pendant 16h à 55°C dans le tampon de préhybridation auquel a été rajouté un oligonucléotide radiomarqués en 5'.

Le marquage des sondes a été réalisé à l'aide de 10 unités de T4 polynucléotide kinase (Promega 10 U/µL) en présence de 10 pmoles d'oligonucléotide et 8 pmoles de [γ -32P] ATP (6000 Ci.mmol⁻¹). Les séquences des oligonucléotides utilisés comme sondes sont référencées dans le tableau 3. Suite à l'hybridation, les membranes ont été lavées (trois lavages consécutifs de quelques secondes) avec du tampon SSC 6X puis exposées pendant 2 à 20h contre des écrans permettant de recueillir le signal (Storage Phosphor Screen, Kodak). Le signal obtenu a ensuite été révélé grâce à un phospho-imager Storm 840 (Molecular Dynamics).

IX. Culture de plantes

1. Préparation et inoculation des graines en tube

Les graines de *M. truncatula* Jemalong A17 ont été préparées comme décrit précédemment (Journet et al., 2006). Brièvement, les graines ont été traitées avec de l'acide sulfurique 97% pendant une dizaine de minutes, puis rincées dans 3 bains successifs d'eau stérile. Les graines ont ensuite été placées dans 25 ml de javel pendant 2 minutes et relavées dans 3 bains d'eau stérile. Les graines ont ensuite été déposées sur une gélose 1X et placée à 4 C° pendant 24h puis à 20 C° pendant 20h dans l'obscurité.

Les plantules ont ensuite été placées dans les tubes contenant 15 mL du milieu Fahraeus sans source d'azote en gélose inclinée (Fahraeus. 1957) : CaCl₂ (0,132 g/L) MgSO₄.7H₂O (0,12 g/L), KH₂PO₄ (0,1 g/L), Na₂HPO₄.2H₂O (0,075 g/L), Fe-citrate (5 mg/L), MnCl₂.4H₂O (0,07 mg/L), CuSO₄.5H₂O (0,07 mg/L), ZnCl₂ (0,07 mg/L), H₃BO₃ (0,07 mg/L), Na₂MoO₄.2H₂O (0,07 mg/L), pH 7.5.

Après 48h d'incubation à 22C° avec 16h de jour et 8H de nuit, les plantules sont inoculées avec 100 µl de suspension bactérienne à DO_{600nm} finale de 0,001 dans de l'eau stérile. Les suspensions bactériennes utilisées pour l'inoculation des plantes ont été réalisées à partir de colonies bactériennes sur boîtes de pétri fraîchement préparées.

2. Préparation et inoculation de plantules pour les expériences de compétition

Les plantes ont été cultivées sur boîtes de pétri carrées (9cm x 9cm) contenant 50 ml de milieu Farhaeus gélosé. Les graines de *M. truncatula* ont été préparées et mises à germer comme décrit précédemment. Cinq plantules ont été déposées par boîte et un papier kraft est enroulé autour de la boîte en ne laissant visible que la partie aérienne des plantules afin de protéger les racines de la lumière. Les boîtes ont été incubées pendant 48h en position verticale à 22°C avec 16h de jour et 8H de nuit. Chaque plantule a alors été inoculée avec 50 µl de suspension bactérienne contenant deux souches bactériennes en proportion 1:1 dans de l'eau stérile (DO_{600nm} finale 0,01).

Les souches bactériennes utilisées pour les tests de compétition contiennent un plasmide exprimant constitutivement soit le gène codant pour le marqueur fluorescent GFP soit celui codant pour la RFP. Pour contrôler la proportion de chaque souche dans la suspension, cette suspension a été diluée puis étalée sur milieu sélectif permettant de compter la proportion de chaque souche sous une loupe fluorescente (Microscope: Axio.zoom V16, Zeiss ; Source: HXP 200C ; Filtres GFP long pass Emission 485/12 Excitation 515LP, GFP band pass Emission 470/40 Excitation 525/50, RFP Emission 546/12 Excitation 607/86). Environ 15 jours après inoculation, les nodules présents sur les racines ont été observés à l'aide de l'Axio zoom V16 pour dénombrer les nodules verts (contenant les bactéries portant le plasmide exprimant la GFP) et les nodules rouges (contenant les bactéries portant le plasmide exprimant la RFP). Des contrôles ont été réalisés en co-inoculant une souche WT exprimant la GFP et une autre souche WT exprimant la RFP afin de s'assurer que le type de fluorescence utilisé n'influence pas la capacité à noduler d'*E. meliloti*. Enfin, pour éliminer le risque de biais éventuellement causé par le type de fluorescence, toutes les co-inoculations de souches ont été testées en inversant les marqueurs.

3. Suivi macroscopique de la nodulation

Environ 7 jours après l'inoculation des séries de plantes avec les différentes souches bactériennes, les nodules ont été observés tous les 2 jours au minimum. Les observations ont été réalisées sous une loupe binoculaire. Les nodules ont été considérés sénescents lorsqu'une coloration verte était observable à leur base. Les suivis de nodulation ont été réalisés sur une durée d'environ 5 semaines en fonction de la manipulation. Le dernier comptage a été effectué le jour du test de l'activité de fixation.

4. Mesure de la fixation d'azote (test ARA)

La mesure de l'activité nitrogénase a été réalisée par un test de réduction de l'acétylène en éthylène par chromatographie en phase gazeuse (ARA) (Hardy et al. 1968). Pour cela, les tubes contenant les plantes ont été fermés avec des bouchons étanches en silicone et 1 ml d'air a été enlevé de chaque tube à l'aide d'une seringue pour être remplacé par 1 ml

d'acétylène pur. Les tubes ont alors été incubés pendant 4 heures en chambre de culture. Un prélèvement de 0,4 ml de gaz a été réalisé dans chaque tube puis injecté dans un chromatographe en phase gazeuse Agilent équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (7820A). L'aire du pic d'éthylène obtenu pour chaque essai a été mesurée. Classiquement, la fixation moyenne a été calculée sur 3 séries indépendantes d'environ 10 plantes pour chaque série. Chaque valeur a été exprimée en pourcentage de la moyenne de la fixation obtenue pour la série sauvage de chaque série de plante.

5. Mesure du poids sec

Une fois le test de réduction de l'acétylène réalisé, les plantes sont coupées au niveau du collet. La partie aérienne a été placée dans un tube à hémolyse à 65°C pendant 48h puis laissée à l'air libre 2 heures avant la pesée sur une balance de précision.

Résultats

I. Métabolisme du NO chez la bactérie *E. meliloti*

Le NO est connu depuis longtemps pour son implication dans des mécanismes de lutte contre les pathogènes durant les interactions plante-microorganismes. Depuis une quinzaine d'années, il a été montré que le NO intervient dans les interactions symbiotiques. Plusieurs études ont notamment mis en évidence l'implication de cette molécule lors de chaque étape de l'interaction symbiotique entre la bactérie *E. meliloti* et la plante *M. truncatula* (Baudouin et al., 2006; del Giudice et al., 2011). Cependant, il est encore difficile à l'heure actuelle d'attribuer au NO un rôle spécifique lors de chacune des étapes de la symbiose. En effet, contrairement aux cellules animales où il n'existe qu'une seule voie de synthèse, les mécanismes permettant de produire du NO dans les nodules sont plus nombreux et encore pas entièrement identifiés. Cela est notamment dû au fait que les 2 partenaires possèdent chacun plusieurs systèmes complexes de synthèse de NO. De ce fait, il est difficile d'étudier précisément dans la nodosité le rôle des voies de synthèse de NO de chacun des deux partenaires symbiotiques.

Dans la nodosité, le partenaire végétal possède plusieurs systèmes de synthèse de NO composés principalement de deux nitrate réductases, MtNR1 et MtNR2, ainsi que de la chaîne mitochondriale de transport d'électrons (Berger et al., 2020a). Récemment, il a été montré qu'une inhibition des NR végétales par addition de tungstate diminue la quantité de NO détectable à différentes étapes de la nodulation (de 60 à 90 %) (Berger et al., 2020a). De plus, d'autres enzymes comme les NOFNiR (NO-forming nitrite reductases) (MtNOFNiR3) ou les xanthine oxydases (XDH) pourraient être impliquées directement ou indirectement dans la synthèse de NO au sein de la nodosité de *M. truncatula* (Berger et al., 2020a). La participation du partenaire bactérien à la production du NO nodulaire peut varier en fonction des organismes étudiés. En effet, au cours de l'interaction entre *B. diazoefficiens* et le soja, la bactérie produirait 90 % du NO présent dans la nodosité (Sánchez et al., 2010b). De plus, dans cette interaction, la voie de dénitrification serait responsable spécifiquement de la production de NO au sein des cellules infectées (Calvo-Begueria et al., 2018). En revanche, lors de l'interaction entre *E. meliloti* et *M. truncatula*, la bactérie serait responsable de la synthèse de d'environ 35 % du NO présent dans la nodosité (Horchani et al., 2011). Chez *E. meliloti*, seule

la voie de dénitrification est actuellement connue pour synthétiser du NO en vie libre et dans la nodosité (Horchani et al., 2011; Torres et al., 2014b).

Les effets du NO au sein d'un organisme vont directement dépendre de sa concentration. De plus, à forte concentration, le NO est une molécule toxique qui peut entraîner de nombreux dommages cellulaires. Les plantes et les bactéries possèdent des systèmes de détoxification du NO qui permettent d'en contrôler la concentration. Le génome de *M. truncatula* code pour plusieurs phytoglobines dont PhytoGb1 qui est largement impliquée dans la dégradation du NO dans la nodosité (Berger et al. 2020). PhytoGb1 participerait à la diminution de la quantité de NO afin de permettre l'infection par la bactérie, mais agirait aussi dans des nodules matures pour maintenir le fonctionnement efficace de la nitrogénase (Berger et al. 2021). Chez les légumineuses, des systèmes piègeurs de NO comme le GSNO participent aussi au métabolisme du NO (Berger et al. 2021). Chez la bactérie, la dégradation est principalement effectuée par la flavohémoglobine (Hmp) et par la NO réductase (Nor) de la voie de dénitrification (Meilhoc et al. 2013). La surexpression du gène *hmp* pendant l'interaction symbiotique a permis de mettre en avant l'importance de la dégradation bactérienne dans la régulation du niveau de NO nécessaire au maintien de la fixation d'azote. D'autres systèmes comme les protéines NnrS1 et NnrS2 pourraient contribuer à la dégradation, même si leur implication directe et/ou indirecte et leurs mécanismes d'action restent à déterminer (Blanquet et al., 2015).

Afin de déterminer le rôle du NO et notamment celui du NO d'origine bactérienne pendant l'interaction symbiotique, il est primordial d'identifier l'ensemble des systèmes de synthèse et de dégradation de NO présents chez la bactérie. Cette première étape est essentielle pour pouvoir ensuite les inactiver par mutagenèse et en analyser les conséquences aux différentes étapes de la symbiose. Mon premier objectif a été d'identifier et de caractériser des voies possibles de synthèse de NO bactérien autres que la dénitrification. Cette première étape de mon travail a permis la publication de 2 articles scientifiques. Je me suis également intéressé à des systèmes permettant la dégradation du NO chez *E. meliloti*, autres que Hmp et Nor, en particulier des globines tronquées putatives.

1. Implication de la voie assimilatrice du nitrate dans la synthèse du NO chez *E. meliloti*

Publication N°1: The Nitrate Assimilatory Pathway in *Sinorhizobium meliloti*: Contribution to NO Production. Ruiz B, Le Scornet A, Sauviac L, Rémy A, Bruand C, Meilhoc E. Front Microbiol. 2019.

E. meliloti est une bactérie qui peut vivre à l'état libre dans le sol, mais aussi dans une forme symbiotique au sein de nodules racinaires formés sur les racines de la légumineuse *M. truncatula*. Cette bactérie est capable de survivre à des conditions microaérobiques (< 2 % O₂) grâce en partie à l'utilisation d'oxydases à forte affinité pour l'oxygène (FixNOQP) et à la voie de dénitrification (Torres et al., 2011; Torres et al., 2014b). Cette voie permet à différents microorganismes d'utiliser le NO₃⁻ comme accepteur final d'électrons à la place de l'O₂ quand celui-ci devient limitant. Actuellement, la voie de dénitrification est la seule connue pour participer à la synthèse de NO chez *E. meliloti*. En effet, chez cette bactérie, la nitrate réductase *napA* et la nitrite réductase *nirK* vont permettre de réduire le NO₃⁻ et le NO₂⁻ pour former du NO en condition limitante en oxygène. Chez *B. diazoefficiens*, une étude récente a montré l'implication d'une seconde voie dans la synthèse de NO. En effet, chez cette bactérie, la voie d'assimilation du nitrate composée de la nitrate réductase NasC et la nitrite réductase NirA auraient la capacité de produire du NO à partir de NO₃⁻ par un mécanisme de réduction inconnu (Cabrera et al., 2016). Dans le génome d'*E. meliloti*, nous avons identifié un opéron *nirBD narB cysG* codant pour une nitrate et nitrite réductases assimilatrices putatives. De façon intéressante, la nitrate réductase NarB présente une homologie de 53 % avec NasC de *B. diazoefficiens*. Au sein de cet opéron, on retrouve aussi un gène codant pour une nitrite réductase putative NirBD et pour une protéine CysG probablement impliquée dans la synthèse de cofacteur sirohème nécessaire à la nitrite réductase assimilatrice. Une précédente étude transcriptomique réalisée au laboratoire, qui consistait à étudier l'expression de tous les gènes de la plante et de la bactérie dans les différentes zones du nodule préalablement isolées par microdissection laser, a permis de montrer que *nirB* et *narB* sont fortement exprimés dans la zone III dédiée à la fixation de l'azote (Roux et al., 2014). L'ensemble de ces éléments nous a conduit à caractériser cette voie assimilatrice en vie libre et sa potentielle implication dans la synthèse de NO.



The Nitrate Assimilatory Pathway in *Sinorhizobium meliloti*: Contribution to NO Production

Bryan Ruiz, Alexandre Le Scornet, Laurent Sauviac, Antoine Rémy, Claude Bruand and Eliane Meilhoc*

Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes (LIPM), INRA, CNRS, INSA, Université de Toulouse, Castanet-Tolosan, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Maria J. Delgado,
Spanish National Research Council
(CSIC), Spain

Reviewed by:

Michael Kahn,
Washington State University,
United States
Nicholas James Watmough,
University of East Anglia,
United Kingdom

*Correspondence:

Eliane Meilhoc
Eliane.Meilhoc@inra.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Microbial Symbioses,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 21 December 2018

Accepted: 18 June 2019

Published: 03 July 2019

Citation:

Ruiz B, Le Scornet A, Sauviac L,
Rémy A, Bruand C and Meilhoc E
(2019) The Nitrate Assimilatory
Pathway in *Sinorhizobium meliloti*:
Contribution to NO Production.
Front. Microbiol. 10:1526.
doi: 10.3389/fmicb.2019.01526

The interaction between rhizobia and their legume host plants culminates in the formation of specialized root organs called nodules in which differentiated endosymbiotic bacteria (bacteroids) fix atmospheric nitrogen to the benefit of the plant. Interestingly, nitric oxide (NO) has been detected at various steps of the rhizobium-legume symbiosis where it has been shown to play multifaceted roles. It is recognized that both bacterial and plant partners of the *Sinorhizobium meliloti*–*Medicago truncatula* symbiosis are involved in NO synthesis in nodules. *S. meliloti* can also produce NO from nitrate when living as free cells in the soil. *S. meliloti* does not possess any NO synthase gene in its genome. Instead, the denitrification pathway is often described as the main driver of NO production with nitrate as substrate. This pathway includes the periplasmic nitrate reductase (Nap) which reduces nitrate into nitrite, and the nitrite reductase (Nir) which reduces nitrite into NO. However, additional genes encoding putative nitrate and nitrite reductases (called *narB* and *nirB*, respectively) have been identified in the *S. meliloti* genome. Here we examined the conditions where these genes are expressed, investigated their involvement in nitrate assimilation and NO synthesis in culture and their potential role *in planta*. We found that *narB* and *nirB* are expressed under aerobic conditions in absence of ammonium in the medium and most likely belong to the nitrate assimilatory pathway. Even though these genes are clearly expressed in the fixation zone of legume root nodule, they do not play a crucial role in symbiosis. Our results support the hypothesis that in *S. meliloti*, denitrification remains the main enzymatic way to produce NO while the assimilatory pathway involving NarB and NirB participates indirectly to NO synthesis by cooperating with the denitrification pathway.

Keywords: nitric oxide, *Sinorhizobium meliloti*, denitrification, symbiosis, *Medicago truncatula*, nitrate assimilation

INTRODUCTION

Rhizobia are Gram negative bacteria which are found as free-living organisms in the soil but also have the unique capacity to establish a nitrogen fixing endosymbiosis with legumes. Indeed rhizobia possess the capacity to reduce atmospheric nitrogen into ammonium to the benefit of their host plants thanks to their nitrogenase. As a consequence, in contrast to other plants, legumes can grow

without addition of exogenous nitrogen (i.e., fertilizers) which is compatible with the development of sustainable agriculture practices.

Due to their agronomical and environmental interest, legume-rhizobium symbioses have been studied for many years and molecular determinants governing the recognition step between the two partners, the infection and the bacteroid differentiation process including nitrogen fixation, have been identified. Among those, nitric oxide (NO) has been detected at every step of the symbiotic interaction (Hichri et al., 2016b). NO is a diffusible and reactive gaseous molecule that plays a major signaling role in various processes in mammals. The importance of NO in plants emerged recently but it is now well described that it participates in numerous plant signaling pathways such as those controlling seed germination, root growth, flowering and stomatal closure (Domingos et al., 2015). Interestingly, it has also been shown that NO is involved in the hypersensitive response (HR) during the plant defense response against pathogen attack (Boccaro et al., 2005).

Although the role of NO during the symbiotic interaction is not fully understood, it has been shown that NO can have a positive role during the infection steps, while it can inhibit the bacterial nitrogenase responsible for nitrogen fixation, and the plant glutamine synthetase involved in nitrogen assimilation (Trinchant and Rigaud, 1982; del Giudice et al., 2011; Melo et al., 2011). NO has also been shown to be a signal for nodule senescence (Cam et al., 2012). Hence, to maintain efficient infection and nitrogen fixation, the level of NO inside legume root nodules must be finely tuned. The NO level results from a balance between NO synthesis and consumption, two processes which rely on both partners (Hichri et al., 2016a). Indeed, both plant and bacterial hemoglobins have been shown to be involved in NO transformation or detoxification (Berger et al., 2018). In addition, the bacterial NO reductase Nor, catalyzing the reduction of NO into nitrous oxide (N₂O) in the denitrification pathway is also involved in NO consumption in legume nodules.

Even though both plant and bacteroid participate in NO production, the relative contribution of each partner varies between different legume-rhizobium models (Sánchez et al., 2010; Horchani et al., 2011). In the symbiosis between *Bradyrhizobium japonicum* and soybean, bacteria account for about 90% of NO present in the nodules, while in the *S. meliloti*-*M. truncatula* symbiosis the bacteria produce about 35% of the amount of NO detected. Neither rhizobia nor legumes possess a gene that encodes a NO synthase of the type found in mammalian cells (Jeandroz et al., 2016). NO can originate from different routes in plants, the best characterized being the stepwise reduction of nitrate (Boscari et al., 2013; Astier et al., 2017). In *M. truncatula*, at least two out of the three nitrate reductase genes identified in the genome encode proteins that seem to be involved in NO synthesis (Berger et al., 2018). The second step of the reaction (i.e., production of NO from nitrite) could be catalyzed through the action of the mitochondrial electron transport chain in plants (Horchani et al., 2011).

On the bacteroid side, the denitrification pathway, which has been well characterized in *B. japonicum* and *S. meliloti* (Figure 1) is the most likely source of NO, not only during the symbiotic

interaction with legumes but also in soils (Torres et al., 2011, 2014). The regulation of this pathway has been well described in both organisms. In *S. meliloti*, the expression of *nap* genes is regulated in response to oxygen levels by the transcriptional regulator FixK, itself under the control of the two-component system FixLJ. The expression of the *nir* and *nor* genes is mainly regulated by the NO specific regulator NnrR, present in many rhizobia and, as a consequence, their expression depends upon the presence of NO (Meilhoc et al., 2010).

Recent work has shown that in *B. japonicum*, the nitrate assimilation pathway which includes a nitrate reductase NasC and an assimilatory nitrite reductase NirA, could also produce NO by a yet unknown mechanism (Cabrera et al., 2016). Luque-Almagro et al. (2011) examined a number of available genomes and suggested that the nitrate assimilation pathway in *S. meliloti* might include four genes (i.e., *nirB nirD narB cysG*). Assimilatory nitrate and nitrite reductase enzymatic activities were detected in *S. meliloti* cultures grown in presence of nitrate and reduced in the presence of ammonium (Kumar Halder and Chakrabarty, 2015). Interestingly NarB displays 53% identity and shares four main protein domains with NasC. NirBD is anticipated to be a siroheme-dependent assimilatory nitrite reductase that catalyses reduction of nitrite to ammonia and as such, shares the same function with NirA from *B. japonicum*. However, there is no synteny between both organisms regarding these genes. Indeed while both genes are located next to each other in the *S. meliloti* genome, in *B. japonicum* the genes that encode NasC and NirA are located at different loci. *cysG* (SMb20987) encodes a putative uroporphyrin-III C-methyltransferase involved in the synthesis of sirohaem, the nitrite reductase cofactor.

In this work we analyzed the expression profiles of *narB* and *nirB* genes in free-living conditions and *in planta*, and addressed the question whether they belong to the nitrate assimilatory pathway and are involved in NO synthesis. Finally, we examined different phenotypes of *M. truncatula* plants inoculated with a *S. meliloti* strain mutated in *narB* or *nirBD narB*.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial Strains and Growth Conditions

The bacterial strains and plasmids used are listed in Table 1.

Sinorhizobium meliloti strains were grown in Luria Bertani medium supplemented with 2.5 mM CaCl₂ and 2.5 mM MgSO₄ (LBMC). When necessary, antibiotics were added in the medium at the following concentrations: streptomycin (Sm) 100 or 300 µg/ml, neomycin (Neo) 100 µg/ml and gentamycin (Gm) 40 µg/ml. To test cell growth, gene expression or NO production, *S. meliloti* was grown in the exponential phase at an optical density at 600 nm of 0.2 (OD₆₀₀ = 0.2) in Vincent Minimal Medium (VMM) with either NH₄Cl (18.7 mM) or glutamate (10 mM) as nitrogen source, at 28°C (del Giudice et al., 2011). When needed, KNO₃ (20 mM), or spermine NONOate (25 µM, from a 100 mM stock solution in NaOH 1 mM) were added to the culture. Microaerobic cultures were grown under a 2% oxygen atmosphere.

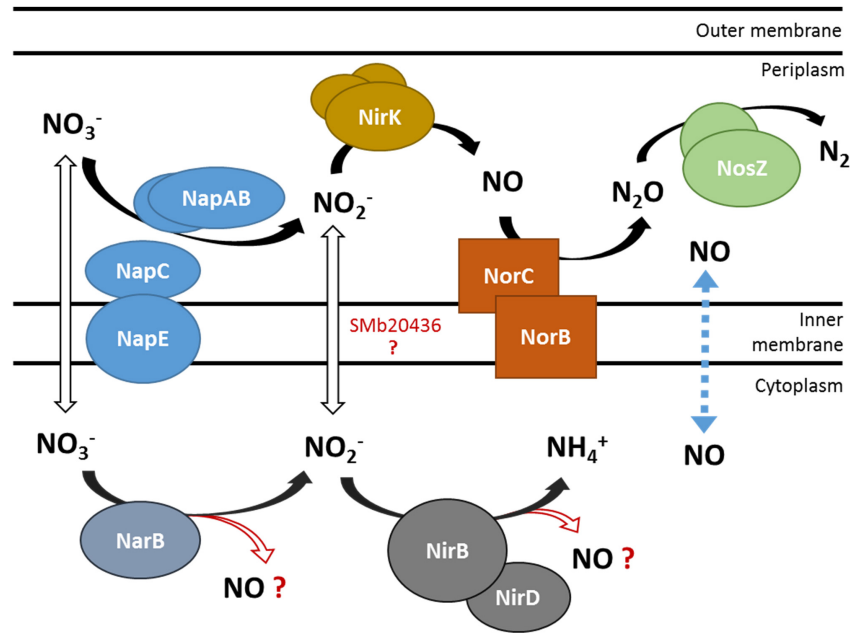


FIGURE 1 | Schematic representation of nitrate utilization and NO production by the denitrification and putative NarB NirB pathways. NO_3^- and NO_2^- transporters are not identified yet in *S. meliloti*. The dotted line represents NO diffusion across the cytoplasmic membrane. Enzymes involved in the denitrification pathway: Nap (nitrate reductase), Nir (nitrite reductase), Nor (NO reductase), Nos (nitrous oxide reductase). Smb20436: *B. japonicum* NarK homolog, putative nitrite transporter. NarB, putative assimilatory nitrate reductase; NirBD, putative assimilatory nitrite reductase.

Construction of *S. meliloti* Mutant Strains

All plasmid constructions were performed in *Escherichia coli* DH5 α . The DNA sequences of oligonucleotide primers used for PCR amplification are shown in **Table 2**.

To construct the *narB* mutant, the 5' and 3' flanking regions of *narB* were amplified by PCR by using genomic DNA of the strain GMI11495 (CBT707) as template and the oligonucleotides OCB1567/OCB1568 to amplify the 5' flanking region (413 bp) and OCB1569/OCB1570 to amplify the 3' flanking region (413 bp). The PCR fragments were then ligated with pGEM-T yielding plasmids pGEM 5'UTR*narB* and pGEM 3'UTR*narB*, respectively. The cloned *S. meliloti* regions were verified by DNA sequencing. The plasmids were digested with either *Bam*HI/*Sal*I or *Bam*HI/*Sac*I to isolate the 5' and 3' UTR, respectively. The UTRs were ligated with pJQ200mp19 digested with *Sal*I/*Sac*I yielding pJQ 5'3'UTR*narB*.

pJQ 5'3'UTR*narB* was introduced into *S. meliloti* GMI11495 (CBT707) by electroporation to yield the strain CBT2474 (Ferri et al., 2010; Dupuy et al., 2017). For this, first a single crossing over genomic integration was selected by Gm resistance. The resulting strain was then grown in the absence of antibiotics and cells having lost the plasmid following a second recombination event were selected by plating on LBMC medium supplemented with 5% sucrose as the plasmid carries the *sacB* gene which is lethal for *S. meliloti* in the presence of sucrose. A Gm sensitive clone that grew on sucrose containing medium was selected and the deletion was verified by PCR using the primers OCB1611/OCB1612 and by sequencing the product.

The whole *nirBD-narB* region was deleted by constructing a pJQ200mp19 plasmid containing the 5'*nirB* flanking region and the 3'*narB* flanking region. The 5' flanking region of *nirB* was amplified by PCR by using genomic DNA of the

TABLE 1 | List of plasmids and strains used.

Plasmids and strains	Description	References
Plasmids		
pGEM-T	Cloning vector, Amp ^r	Promega
pGEM 5'UTR <i>nirB</i>	5'UTR <i>nirB</i> ligated with pGEM-T	This work
pGEM 5'UTR <i>narB</i>	5'UTR <i>narB</i> ligated with pGEM-T	This work
pGEM 3'UTR <i>narB</i>	3'UTR <i>narB</i> ligated with pGEM-T	This work
pJQ200mp19	Gene replacement vector, Gm ^r	Quandt and Hynes, 1993
pJQ 5'3'UTR <i>narB</i>	5'3'UTR <i>narB</i> ligated with pJQ	This work
pJQ 5'UTR <i>nirB</i> 3'UTR <i>narB</i>	5'UTR <i>nirB</i> 3'UTR <i>narB</i> ligated with pJQ	This work
E. coli		
DH5 α	F- Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZY</i> α <i>argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (<i>rk-</i> , <i>mk+</i>) <i>phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1</i> λ -	Invitrogen
S. meliloti		
GMI11495 (CBT707)	<i>S. meliloti</i> 2011 Sm ^R	Pobigaylo et al., 2006
CBT612	CBT707 <i>napA::Tn5</i> , Sm ^R , Neo ^R	Pobigaylo et al., 2006
CBT614	CBT707 <i>nirK::Tn5</i> , Sm ^R , Neo ^R	Pobigaylo et al., 2006
CBT2473	CBT707 Δ <i>nirB nirD narB</i> , Sm ^R	This work
CBT2474	CBT707 Δ <i>narB</i> , Sm ^R	This work

TABLE 2 | List of oligonucleotides.

Oligonucleotides	Sequences 5'-3'	Description
OCB1557	GTCGACGCTGATCATTGCGA	fw <i>nirB5'</i>
OCB1558	GGATCCTTCAGTCATGTGGT	rev <i>nirB5'</i>
OCB1606	CGTCATCCTTGACCAGGGTC	fw <i>nirBDnarB</i> deletion screening
OCB1567	GTCGACGACAAGCACGAGTT	fw <i>narB5'</i>
OCB1568	GGATCCTCTTATTCCGCCGC	rev <i>narB5'</i>
OCB1569	GGATCCATCTGGCCAAAAG	fw <i>narB3'</i>
OCB1570	GAGCTCCGATCCGAACTGGA	rev <i>narB3'</i>
OCB1611	CCTATTTCGACCGCTTCGTC	fw <i>narB</i> deletion screening
OCB1612	CGGATCGCTGTGCCAGG	rev <i>narB</i> and <i>nirBDnarB</i> deletion screening
OCB1607	CTGCCGAAATTGGCGGGATG	<i>nirB</i> rev
OCB1587	TTCTTCGGCTCTTCGAAAC	qRT-PCR <i>narB</i> fw
OCB1588	CGAGATGGCAGTTGATGATG	qRT-PCR <i>narB</i> rev
OCB1583	ATGTCATGCCGACACTGATG	qRT-PCR <i>nirB</i> fw
OCB1584	CTTTGTGACGACCTTGATGC	qRT-PCR <i>nirB</i> rev
OCB1638	GTCATCGACCTCACCCATTT	qRT-PCR SMc01171 fw
OCB1639	TCTGCAGCAAGAACCCTTG	qRT-PCR SMc01171 rev
OCB1914	TCGGCGTCAACCAGATCACTGC	qRT-PCR <i>narB</i> fw
OCB1915	AATGCTTCTGCATCGGATTGCTCG	qRT-PCR <i>cysG</i> rev

strain GMI11495 (CBT707) as template and the oligonucleotides OCB1557/OCB1558 as primers (fragment size 423 bp). The PCR fragment was then ligated with pGEM-T yielding plasmid pGEM 5'UTR*nirB*. The cloned *S. meliloti* region was verified by DNA sequencing. The plasmids pGEM 5'UTR*nirB* and pGEM 3'UTR*narB* were digested with either *Bam*HI/*Sal*I or *Bam*HI/*Sac*I to obtain the 5' and 3' UTR, respectively. The UTRs were ligated with pJQ200mp19 digested with *Sal*I/*Sac*I yielding pJQ 5'UTR*nirB*3'UTR*narB*. The plasmid was introduced into *S. meliloti* GMI11495 (CBT707) by electroporation to give the strains CBT2473. The deletion was verified by PCR using the primers OCB1606/OCB1612 and by sequencing the product.

Measurement of NO Production in *S. meliloti* Cultures

Sinorhizobium meliloti strains were grown exponentially at 28°C in VMM containing either NH₄Cl or glutamate (OD₆₀₀ = 0.2–0.3). To remove NH₄Cl or glutamate from the medium, cells were collected by centrifugation (8000 × g, 10 min), washed once with sterile water, resuspended in VMM without NH₄Cl or glutamate. When needed, KNO₃ (20 mM) was added to the cultures. Cultures were then either kept at 28°C under agitation (aerobic conditions) or left without agitation under 2% oxygen atmosphere (microaerobic conditions) for 1.5 h. The NO produced by bacteria and released in the culture medium was quantified using the fluorescent non-permeable probe DAF-2 (Sigma-Aldrich). To measure NO level, 1 ml of culture was transferred to a tube containing DAF-2 (1 μl of a 5 mM solution in DMSO). Tubes were then kept for 1 h at

20°C in the dark. 100 μl of the suspension were then transferred to a 96 well plate (Greiner, dark bottom). Fluorescence was measured using a microplate spectrofluorimeter (Fluostar Omega, BMG Labtech, Champigny sur Marne, France) (excitation wavelength 485 nm/emission wavelength 520 nm). NO produced is expressed as fluorescence/OD₆₀₀ (measured just before incubation with DAF-2). Different concentrations of the NO donor, spermineNONOate, were tested under the same conditions to verify that the fluorescence obtained was proportional to the NO amount. In addition, two other controls were performed to test the method specificity (data not shown): (1) the fluorescence signal was drastically increased when using an *hmp* *S. meliloti* mutant strain affected in NO degradation, (2) the fluorescence was reduced when using an *S. meliloti* strain overexpressing *hmp* (Cam et al., 2012). The experiment was repeated four times, with two technical repeats for each biological repeat.

Nitrite Determination in the Culture Medium

Cultures were grown as described above. For every culture sample collected to measure NO production, a second 1 ml aliquot was withdrawn to assay nitrite concentration in the medium. For this, the sample was centrifuged (10000 g, 5 min) and 100 μl of supernatant were incubated for 30 min (room temperature) with the Griess reagent (Nicholas and Nason, 1957). Absorbance was measured at 540 nm. NO₂⁻ concentration was calculated from a calibration curve using NaNO₂ (from 0 to 50 μM). The experiment was repeated five times, with two technical repeats for each biological repeat.

RNA Extraction

Strains were grown exponentially at 28°C in VMM. At an OD₆₀₀ between 0.2 and 0.3, Spermine NONOate (25 μM) or KNO₃ (20 mM) was added to the culture. Cultures were incubated at 28°C either under agitation in aerobic conditions or under 2% oxygen atmosphere without agitation. 1.5 and 3 h later, cells (20 ml) were collected by filtration, immediately frozen in liquid nitrogen and stored at –80°C until RNA extraction. When needed, NH₄Cl was removed as described before.

RNA was prepared from the collected samples by incubating filters for 20 min at 65°C in lysis buffer (SDS 1.4%, EDTA 4 mM, Proteinase K 40 μg/ml). Lysates were then incubated at 4°C (10 min) in presence of NaCl (1.7 M) and centrifuged. Nucleic acids were precipitated from the supernatant in the presence of isopropanol (4°C, 1 h), washed with ethanol 70%, dried and resuspended in DEPC-treated water (100 μg/μl). RNA was purified using the RNeasy kit (Qiagen) followed by DNase treatment (TURBO DNA-free kit, Invitrogen) (37°C, 1 h). Sample concentration and purity were measured with a nanodrop (Nanodrop ND-1000, ThermoFisher Scientific).

qRT-PCR Analysis

Reverse transcription was performed using Superscript II (Invitrogen) and random hexamers as primers. RNA samples isolated from at least three independent cultures were tested for

each condition. Real time RT-PCR tests were run on a Light Cycler 480 (Roche) using the SYBR Green I Master kit (Roche) according to the manufacturer instructions. A calibration curve was established for each gene with known amounts of *S. meliloti* genomic DNA. The *S. meliloti* gene SMC01171 was used as a reference for normalization as its expression was constant in all conditions tested. Primers used for expression analyses of each gene are indicated in **Table 2**.

The cDNA generated were also used for amplification of putative intergenic regions between *nirBD* and *narB* using primers OCB1611/OCB1607 and between *narB* and *cysG* using primers OCB1914/OCB1915. In negative controls, reverse transcriptase was omitted while in positive controls PCR was performed with *S. meliloti* genomic DNA as template.

Plant Assays

Seeds of *M. truncatula* cv jemalong A17 were surface sterilized, germinated on agar plates and allowed to grow on nitrogen-free Fahreus medium in test tubes during 2 days (Garcia et al., 2006). Series of plants were inoculated with either the wild type or the mutant strains (100 μ l per plant of a resuspension in sterile water at OD₆₀₀ = 0.001) or with 100 μ l water as a control. Plants were grown in a culture room (22°C) with day and night periods of 16 and 8 h, respectively. Dry weights of the plant shoots were measured 4 and 5 weeks post-inoculation.

Nodules were macroscopically estimated as senescent when a green color was visible on a significant part of the nodule volume. The proportion of senescent nodules for each plant was calculated by dividing the number of senescent nodules by the total number of nodules (expressed in %).

The average number of nodules per plant, the percentage of senescent nodules and the dry weight of shoots were calculated from 19 to 27 plants (total number of plants obtained from three independent series).

Nitrogenase activity was determined by the acetylene reduction assay (Hardy et al., 1968), using plants grown in test tubes fitted with rubber stoppers. 1 ml of acetylene was added to each tube. Plants were then incubated in the growth chamber for 3 h. One ml of gas was taken from each tube and analyzed for ethylene content, using a gas chromatograph equipped with a hydrogen flame ionization detector (7820A Agilent). The amount of ethylene produced by each plant was assessed by measuring the ethylene peak area and comparing to a standard (ethylene). Nitrogenase activity was measured on 7–9 plants for each genotype and each time point.

RESULTS

Expression of *narB* and *nirB* Genes in *S. meliloti*

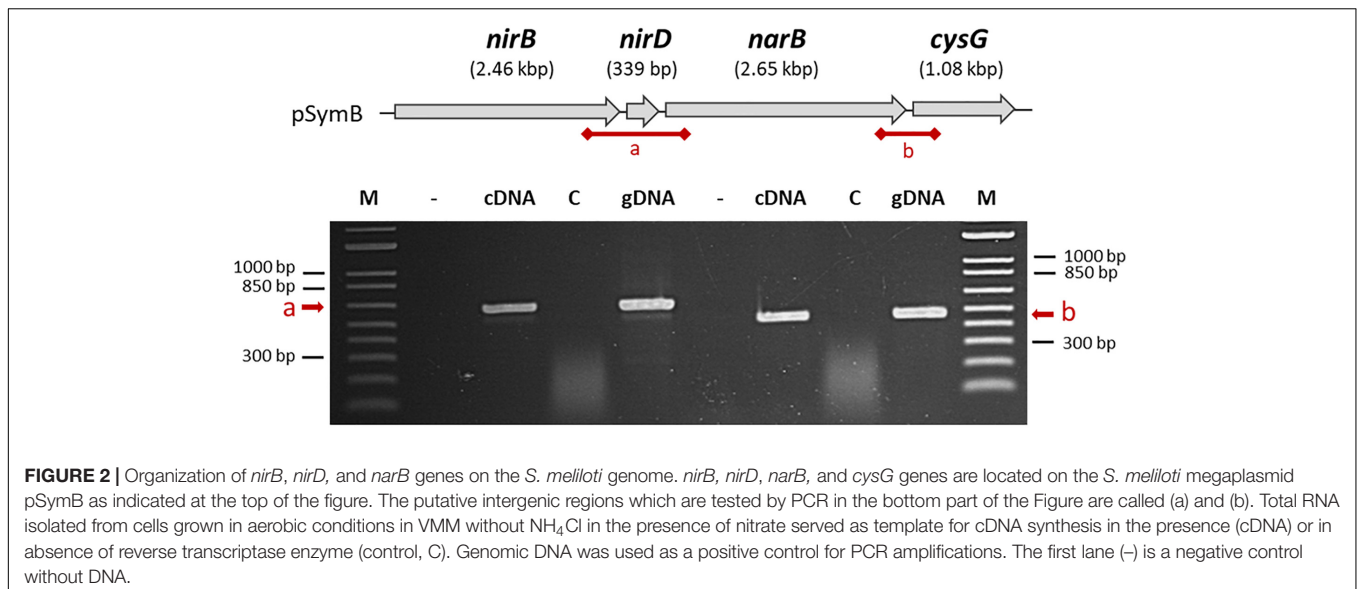
Even though *narB* and *nirB* are assumed to be part of the nitrate assimilation pathway in *S. meliloti* no experimental data were available (Luque-Almagro et al., 2011). Ferroni and colleagues measured nitrate reductase total activity in *S. meliloti* cultures grown under aerobic and microaerobic conditions in the presence of nitrite and/or nitrate (Ferroni et al., 2011).

These authors suggested that nitrate reductase activity in aerobic conditions could be associated with assimilatory ammonification, in line with the work of (Sekiguchi and Maruyama, 1988). A more recent study in *S. meliloti* showed that a nitrate assimilatory enzyme activity, estimated through detection of nitrite in the medium, was observed when nitrate was in the medium and that the generation of nitrite was drastically reduced when ammonium was also present (Kumar Halder and Chakrabarty, 2015). No link has been made so far between assimilatory nitrate/nitrite reductase activities and the genes encoding these functions.

To gain insight into the conditions of expression of *narB* and *nirB* we analyzed gene expression in different culture conditions by using qRT-PCR.

First, to investigate the transcriptional architecture of the region, PCR experiments were performed on cDNA to detect whether a transcript spanned the intergenic regions shown in **Figure 2** between *nirBD* and *narB* (a) or between *narB* and *cysG* (b). PCR generated a 600 bp DNA fragment for the region labelled as (a) indicating that *narB*, *nirB*, and *nirD* could be in a single transcriptional unit. Similarly, a 473 bp fragment was obtained for region (b) showing that *cysG*, located downstream of *narB* could also be transcribed with it.

narB and *nirB* expression was first analyzed in conditions in which denitrification genes are known to be expressed. Expression was analyzed 1.5 and 3 h after addition of either nitrate or NO donor. A decrease in gene expression level was observed at 3 h (data not shown); hence, only the set of results obtained at 1.5 h is shown in **Figure 3A**. We first observed that the expression of both genes were at comparable levels, confirming that they share the same regulation, as expected if they were part of the same operon. The expression level was low whether cells were grown in aerobic (20% O₂) or microaerobic conditions (2% O₂). Expression was not significantly affected by addition of nitrate or a NO donor in the medium. These results are in agreement with previous microarray data which did not identify these genes as being regulated by low oxygen or NO (Bobik et al., 2006; Meilhoc et al., 2010). *napA* and *nirK* expression was assessed in the same set of experiments. *napA* expression level was low, with about the same order of magnitude as *narB* and *nirB*. *nirK* was found to be expressed at a much higher level, especially when NO was added to the medium (in either aerobic or microaerobic conditions) in agreement with previous results (Meilhoc et al., 2010) (data not shown). In a second set of experiments we removed NH₄Cl from the culture medium as ammonium is known to repress assimilatory nitrate reductase activity. The results obtained are shown in **Figure 3B**. Strikingly, the expression of *narB* and *nirB* was about 1000-fold higher when ammonium was removed from the medium, indicating that *narB* and *nirB* gene expression was indeed inhibited by ammonium. Both *narB* and *nirB* displayed similar expression patterns and their expression was comparable whether cells were incubated in aerobic or microaerobic conditions. NO did not influence significantly *narB* and *nirB* gene expression and nitrate only slightly induced the expression level of both genes. *napA* and *nirK* expression levels were not significantly modified when NH₄Cl was removed from the medium (data not shown).



Growth of *S. meliloti* Strains in Presence of Nitrate

In order to test whether NarB and NirBD are involved in nitrate assimilation, we grew both the WT and *nirBDnarB* strains in aerobic conditions, in Vincent minimal medium (VMM) containing either nitrate as the sole nitrogen source or a combination NH₄Cl/nitrate or glutamate/nitrate. The results are shown in **Figure 4**. Growth of the WT strain was comparable whether the nitrogen source in the medium was NH₄Cl or glutamate. When glutamate was removed from the medium and replaced by nitrate the WT strain also displayed similar growth kinetics. Interestingly, when NH₄Cl was removed from the culture medium before adding nitrate as the sole nitrogen source, WT cells displayed a 6 h lag phase before resuming growth. This could be explained by a previous repression of *narB nirBD* gene expression by NH₄Cl which could limit nitrate assimilation. The *narB nirBD* mutant growth was similar to that of the WT when glutamate or NH₄Cl was present in the medium. Remarkably, the strain lacking NarB and NirBD was barely able to grow when nitrate was the sole N source present in the medium. These results suggest that *narB nirBD* genes are involved in nitrate assimilation.

Production of NO From the NarB NirBD Pathway

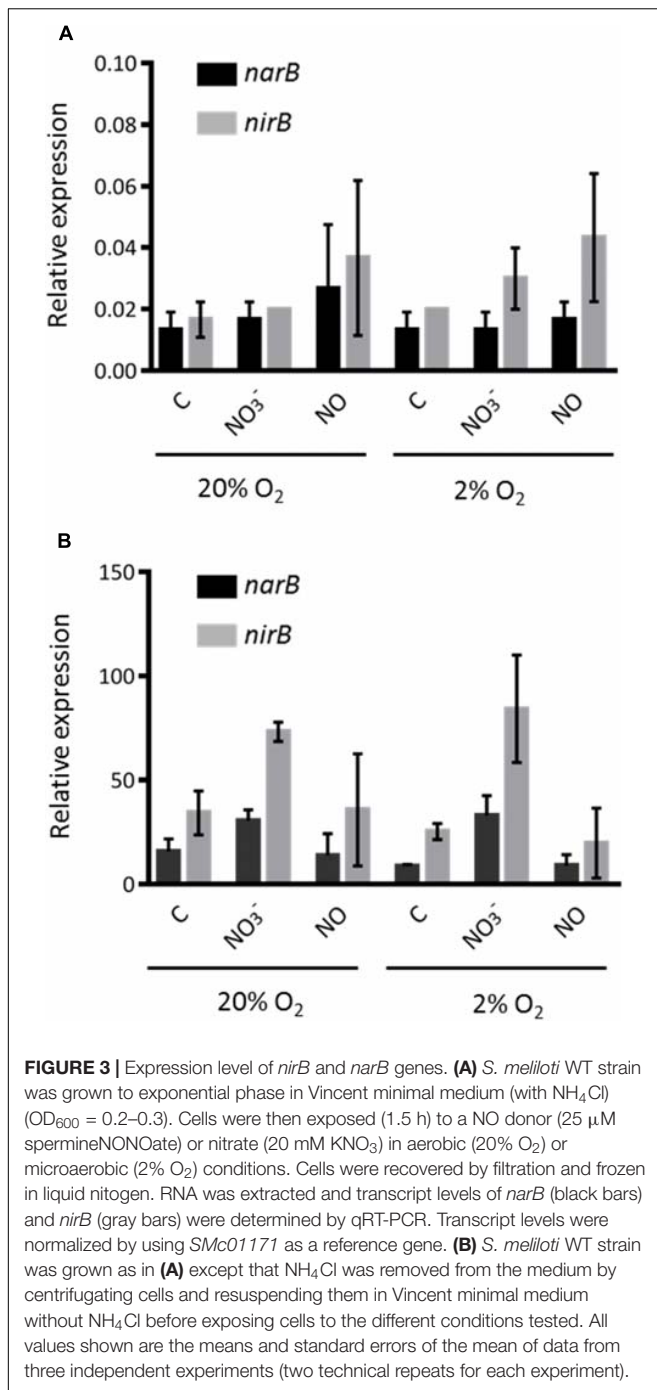
The only enzymatic source of NO described so far in *S. meliloti* is the denitrification pathway. Indeed Horchani and colleagues used *napA* and *nirK* mutants to demonstrate that about 35% of NO inside *M. truncatula* root nodules was produced by the bacteria (Horchani et al., 2011). To confirm these results we tested the involvement of *napA* and *nirK* in the production of NO in *S. meliloti* cultures grown in microaerobic conditions (oxygen 2%). We first examined the production of NO in the presence of nitrate in a WT strain grown in Vincent minimal medium (VMM) containing NH₄Cl or glutamate (**Figure 5A**). NO was

produced in both cases and to a higher extent (fivefold) when glutamate was used as a nitrogen source. NO was not detectable in absence of nitrate. We found that a *napA* mutant still produced about 39% of the amount of NO measured in the WT strain suggesting that either there might be an independent way of producing NO or an alternative way to produce nitrite.

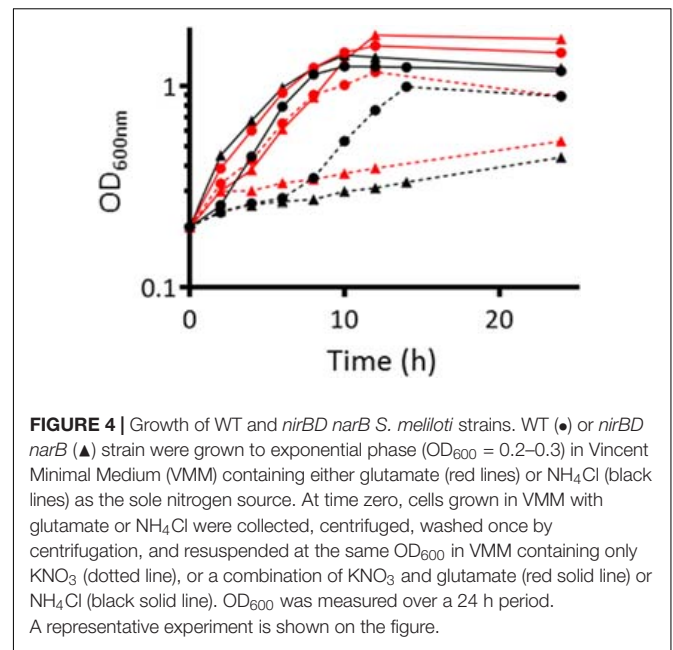
To test the involvement of *narB* and *nirB* in NO synthesis, we constructed a *narB* deletion mutant and a mutant deleted for both *nirB* and *narB*. It has to be noted that this deletion also encompasses *nirD*, a gene located between *nirB* and *narB*. *nirD* is predicted to encode a small protein (112 amino acids) displaying homology with a nitrite reductase small subunit probably involved in the electron transfer to NirB. As *narB* and *nirB* expression is repressed in the presence of ammonium, we grew these strains in VMM medium containing glutamate and nitrate.

Under these conditions, the *narB* and *nirBDnarB* mutants produced only 21 and 17% of the NO produced by the WT strain, respectively. A similar decrease was observed when NH₄Cl was present in the culture medium, conditions where *narB* and *nirB* were poorly expressed. In these experiments, NO was measured with a different method (chemiluminescence, data not shown). These data show that NarB and NirB have a role to play in NO production. Strikingly, the amount of NO dropped to almost zero in a *nirK* mutant showing that NO is produced by reduction of nitrite and indicating that the NarB/NirB involvement is likely due to the generation of nitrite by NarB. In this context it is interesting to note that NO production in the WT grown in the minus ammonium conditions where *nirBDnarB* were fully expressed, was increased by a factor of about 4 compared to the condition where ammonium was present. This observation also supports the idea that NarB NirBD promote NO production by generating nitrite to be used by the denitrification pathway.

In order to test whether NarB NirBD are involved in NO synthesis independently from the denitrification pathway, we tested NO production from the same strains grown in the same media as described above in aerobic conditions (**Figure 5A**).



Under these conditions, the denitrification pathway and especially the NirK nitrite reductase is not active. The results clearly show that NO was not produced in significant amount in the WT strain growing in aerobic conditions in VMM with glutamate and nitrate. These results strongly suggest that NarB NirBD only participates in NO production when denitrification is active. To verify whether NarB NirBD were active under aerobic conditions, we quantified the amount of nitrite produced by the different strains in the same conditions as for the

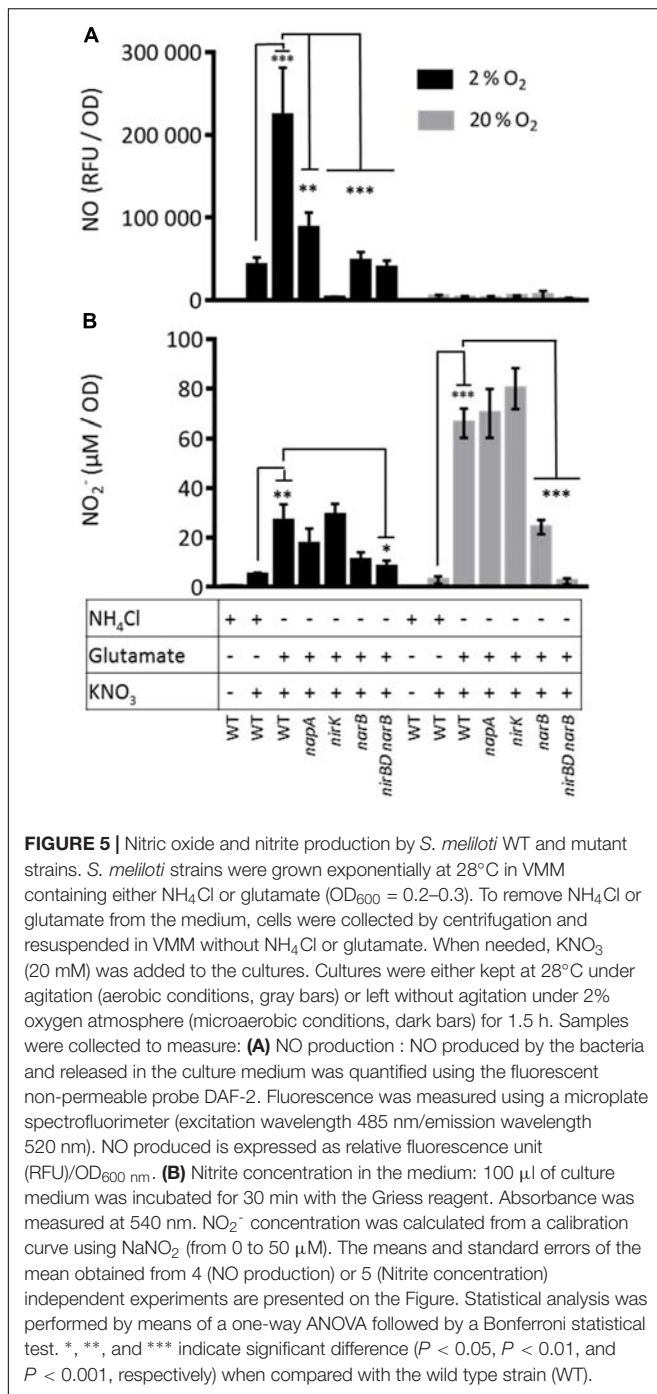


NO production assay. The results are shown in **Figure 5B**. Interestingly, in aerobic conditions, in the presence of nitrate and ammonium, nitrite was barely detectable in the medium while in the presence of glutamate a much higher level (20-fold) of nitrite was measured, indicating that NarB was functional in these conditions. Nitrite production by the *napA* and *nirK* mutants was not significantly different from that of the WT strain. Nitrite production in the *narB* and *nirBD narB* strains was reduced by 60 and 95%, respectively as compared to the WT. These data show that the NarB- NirBD pathway was active in aerobic conditions even though no production of nitric oxide could be measured. When the same experiment was performed in microaerobic conditions (**Figure 5B**) the level of nitrite was much lower, perhaps due to nitrite reductase activity in the denitrification pathway.

Nitrite was only produced when nitrate was present in the medium. The amount of nitrite produced by the WT strain was higher when the strain was grown in presence of glutamate as compared to ammonium suggesting that NarB could participate to nitrite production in these conditions. Accordingly, the nitrite production was reduced by a factor of 2.5 and 3 in the *narB* or *nirBD narB* mutant strains, respectively. Altogether these results show that in conditions where only *narB* and *nirB* are expressed there is a production of nitrite but not NO.

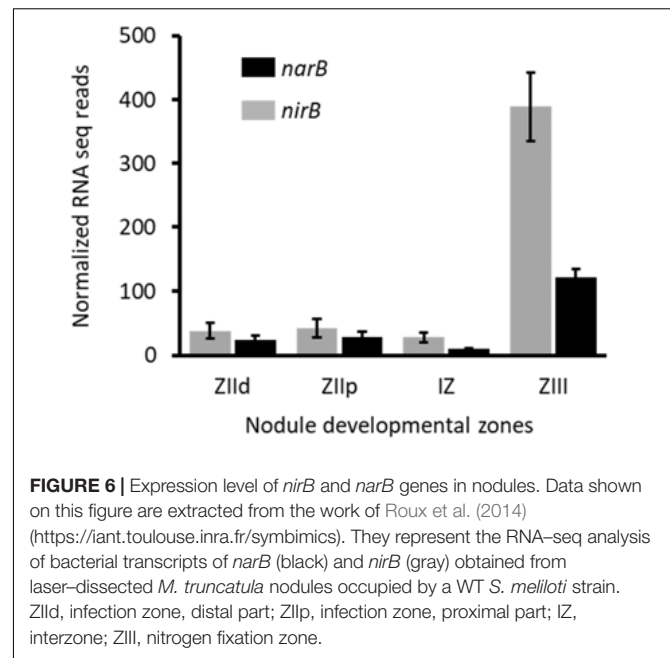
Role of NarB and NirB in planta

To assess *narB* and *nirB* gene expression in symbiosis, we analyzed transcriptomic data generated by Roux and colleagues (Roux et al., 2014). *M. truncatula* forms indeterminate nodules in which all the developmental stages can be seen in a mature nodule. These different zones are: the meristem (Zone I), the infection zone (Zone II distal and proximal) where bacteria are released in the plant cells, the Interzone (IZ) between Zones II and III, and the nitrogen fixing zone (Zone III). Roux et al. (2014)



isolated each zone by laser microdissection and the plant and bacterial RNA they contained were extracted and sequenced. The zone-specific expression of *narB* and *nirB* genes is reported in **Figure 6**. The strongest expression of *narB* and *nirB* was observed in the nitrogen fixing zone (ZIII). *nirK* was also expressed in ZIII but to a lesser extent than *nirB* (not shown). Therefore *narB* and *nirB* are expressed in bacteroids contained in plant nodules and particularly in the fixation zone.

As these genes are more highly and specifically expressed in the nitrogen fixation zone we hypothesized that they could have a



role to play in the symbiotic interaction. To assess the role of these genes *in planta* we inoculated series of *M. truncatula* plantlets with the WT strain or with *narB* and *nirBD narB* mutants and analyzed different plant phenotypes such as the number of root nodules (**Figure 7A**), appearance of senescent nodules (**Figure 7B**), shoot dry weight (**Figure 7C**), and nitrogen fixation (**Figure 7D**). The average number of nodules per plant was identical when these plants were inoculated with the wild type or the mutant strains. Five weeks post-inoculation of the plants with the WT strain, 33% of the nodules were senescent. When plants were inoculated with the mutant and WT strains the proportion of senescent nodules was comparable though slightly lower in the mutants. Nitrogen fixation measured 2, 4, or 5 weeks post-inoculation was more or less similar for all strains. Dry weight of shoots measured 5 weeks post-inoculation was also similar. Hence *narB* or *nirBD narB* deletions do not lead to substantial effects on various aspects of plant fitness during symbiosis.

DISCUSSION

NarB and *NirB* Are Part of the Nitrate Assimilatory Pathway in *Sinorhizobium meliloti*

The denitrification pathway including the nitrate reductase Nap and the nitrite reductase NirK has been described in different rhizobia and especially in *B. japonicum* and *S. meliloti* (**Figure 1**; Torres et al., 2011, 2014). Surprisingly the nitrate assimilation pathway in *S. meliloti* has received less attention. Eventhough *nirBD* and *narB* were suggested to be part of this pathway and biochemical data obtained from crude extracts of *S. meliloti* indicated the existence of two kinds of nitrate reductase activities (assimilatory and dissimilatory) (Sekiguchi and Maruyama, 1988;

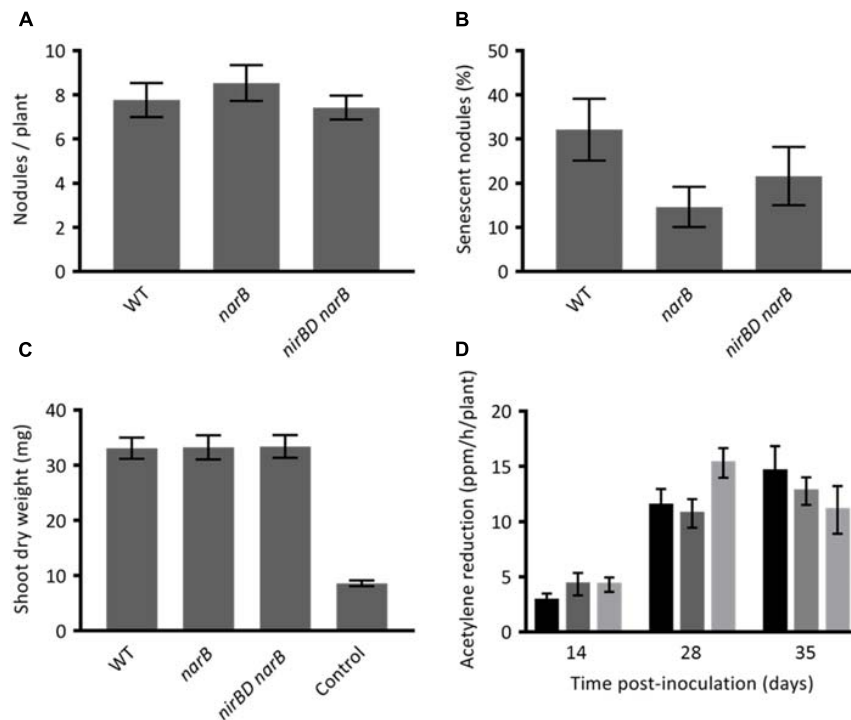


FIGURE 7 | Phenotypes of *Medicago truncatula* inoculated with *narB* or *nirBD narB* mutants. *M. truncatula* plantlets were inoculated with *S. meliloti* WT or mutant strains. **(A)** The number of nodules per plant (19 to 27 plants were tested). **(B)** Percentage of senescent nodules. A nodule was estimated senescent when a green color was visible on a significant surface of the nodule (19–27 plants were tested). **(C)** The dry weight of the aerial part of the plant (18–20 plants were tested). These three parameters were tested 5 weeks post-inoculation. **(D)** The nitrogen fixation activity was assessed by using the acetylene reduction assay (ARA). ARA was performed at 14, 28, and 35 dpi on whole plants inoculated with the WT strain (black bars), *narB* mutant (dark gray bars) or *nirBD narB* mutant (light gray bars). For each strain and time point 7–9 plants were tested. All values are the mean \pm standard error of the mean (SEM).

Ferroni et al., 2011; Luque-Almagro et al., 2011; Kumar Halder and Chakrabartty, 2015), experimental data were really scarce on the whole. We initiated a study to determine whether NarB and NirB are part of the nitrate assimilatory pathway.

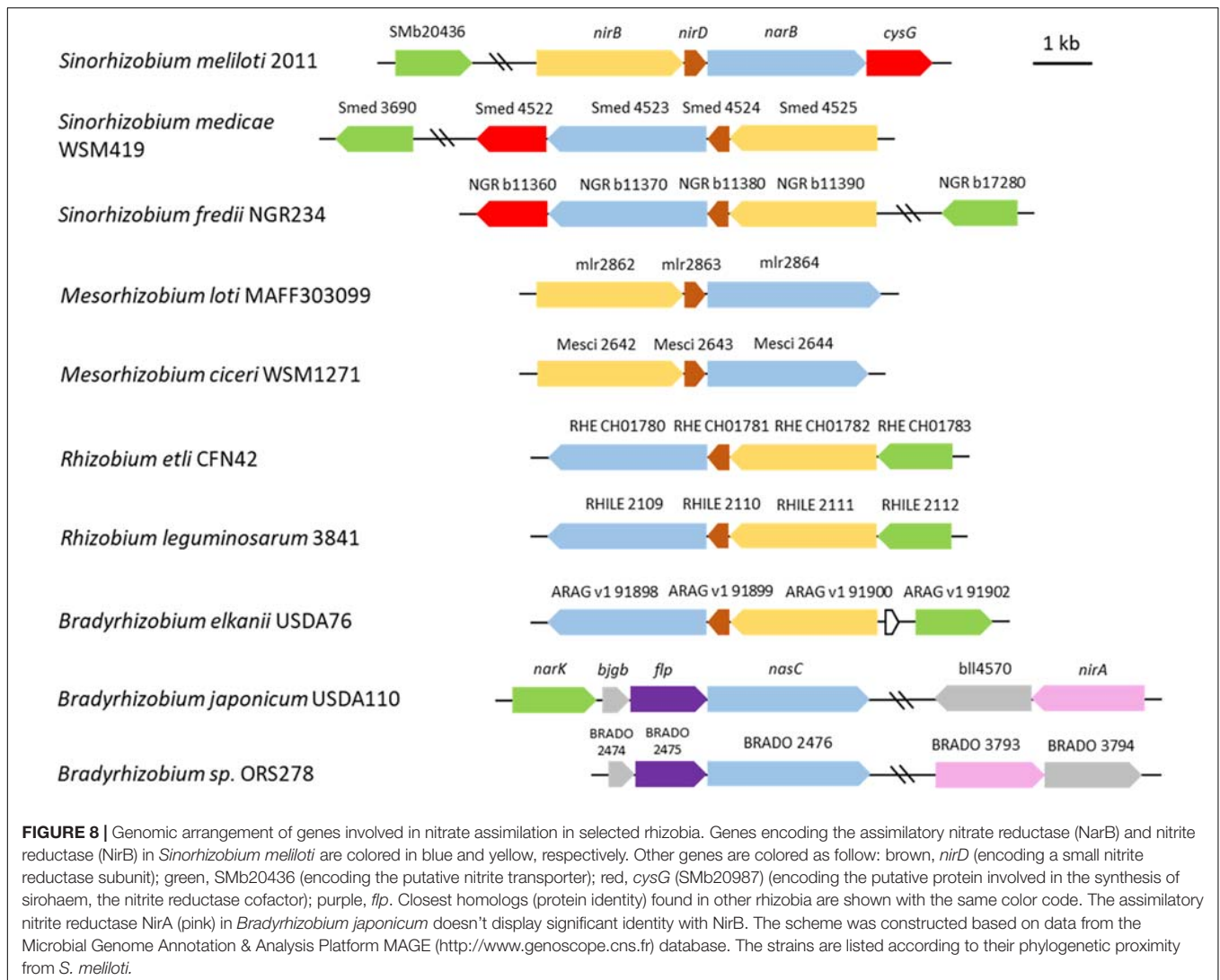
narB and *nirB* display an expression pattern different from that of denitrification genes. Indeed both genes are expressed under microaerobic and aerobic conditions, which is not the case for denitrification genes. Strikingly, although their expression level was measurable when cells were grown in the presence of NH_4Cl , it was highly induced (~ 1000 -fold) when NH_4Cl was removed from the medium. In previous work, assimilatory nitrate and nitrite reductase activities were observed only in bacteria grown with nitrate as sole nitrogen source and thus they were described to be inducible (Kumar Halder and Chakrabartty, 2015). In that work, nitrite levels were measured in the medium of cultures grown in presence of glutamate as nitrogen source and found to be inhibited by NH_4Cl . Our results show that this regulation occurs at the transcriptional level.

RT-PCR experiments demonstrated that *nirB*, *nirD*, *narB* and *cysG*, the gene located downstream of *narB*, constitute a single transcriptional unit. *cysG* encodes a putative uroporphyrin-III C-methyltransferase involved in the synthesis of sirohaem, the nitrite reductase cofactor (Luque-Almagro et al., 2011). In all conditions tested, *nirB* and *narB* displayed similar expression profiles confirming that they belong to a same operon.

It is interesting to note that synteny of these genes is maintained in about one third of the alpha-proteobacteria reference genomes (214) and in half of the 25 rhizobial reference genomes found in the Microbial Genome Annotation & Analysis Platform MAGE¹ database. This organization is not conserved in *B. japonicum* where the assimilatory nitrite reductase encoded by *nirA* is located at a locus distinct from *nasC* (Figure 8). *nirD* encodes a putative protein which displays homology with a nitrite reductase small subunit and is conserved among rhizobia (Figure 8) except most Bradyrhizobial reference genomes (MAGE).

The regulation mechanism of these genes is not known yet in *S. meliloti*. In *B. japonicum* NasT and NasS are involved in the regulation of the assimilatory nitrate reductase encoding gene *nasC* and *nirA*, NasS being a nitrate/nitrite sensor and NasT predicted to be a transcription anti-terminator (Luque-Almagro et al., 2011; Cabrera et al., 2016). *nasTS* are located close to *nirA* on the *B. japonicum* genome and this architecture is conserved in about 57% of reference bradyrhizobial genomes (MAGE) indicating that NasST could act at distance or that they might also be involved in the regulation of other genes or metabolic pathways. *S. meliloti* encodes homologs of NasS and NasT, Smb21114 (46.8% identity) and Smb21115

¹<http://www.genoscope.cns.fr>



(65.4% identity), respectively. It will be interesting to test whether these genes are involved in regulation of nitrate assimilation. Interestingly, microarray experiments analyzing the transcriptome of *S. meliloti* cells entering the stationary phase following a nitrogen deprivation showed that *narB* and *nirB* are induced about 15-fold together with SMB21114 and SMB21115 (12- and 65-fold, respectively) (Sauviac et al., 2007, LS and CB, unpublished). In addition, a small non-coding RNA (160 bp) has been annotated on the antisense strand of the *narB* genomic sequence (SMB23331). Interestingly we have observed that in the different zones of the nodule, the expression pattern of this ncRNA is inversely correlated to that of *narB* and *nirB* (Roux et al., 2014). Work is underway to determine the role of SMB21114/21115 and ncRNA SMB23331 on *narB* *nirB* expression.

Finally, a *S. meliloti* strain deleted for *narB* and *nirBD* failed to grow in a medium with nitrate as the sole nitrogen source. On the whole our results support the conclusion that NarB and NirBD are involved in the nitrate assimilatory pathway in *S. meliloti*.

NarB Contributes to the Production of NO via the Denitrification Pathway in Free-Living *S. meliloti* Cells

Nitric oxide is an important gas signaling molecule which has a role in diverse biological processes in eukaryotic as well as prokaryotic cells. NO is produced by mammalian cells in response to pathogen attack but surprisingly this molecule is also produced by the pathogen itself. Indeed some gram positive pathogens including *Bacillus* or *Staphylococcus* species were shown to possess bacterial analogs of mammalian NO synthases (Crane et al., 2010).

Surprisingly in the legume-rhizobium symbiotic interaction, NO is also produced by both partners (Sánchez et al., 2010; Horchani et al., 2011). The proportion of NO produced by the bacteria is variable depending upon the legume-rhizobium model considered. Indeed in soybean nodules about 90% of the NO detected is produced by the symbiont *B. japonicum* (Sánchez et al., 2010). These data were confirmed very recently by means of a fluorescent probe as well as electron paramagnetic

resonance spectroscopy to assess NO production in nodules (Calvo-Begueria et al., 2018). On the other hand 35% of the NO found in *M. truncatula* nodules is produced by *S. meliloti*. In both cases the role of NO produced by the bacterial partner is still puzzling in the symbiotic context. *S. meliloti* does not contain any NO synthase gene in its genome. Instead, NO synthesized by rhizobium species is thought to be an intermediate product of denitrification. In this process bacteria produce NO as an intermediate of nitrate reduction to N₂ with the purpose of acquiring energy (“nitrate respiration”) or balancing the redox state during oxygen deprivation conditions. The fraction of NO produced by *S. meliloti* in *M. truncatula* nodules has been estimated by using bacterial strains affected in the denitrification genes *napA* and *nirK*. This amount could have been underestimated if other sources of NO exist in the bacteria. In *B. japonicum*, it was shown that NasC is involved in nitrate assimilation but also in NO production (Cabrera et al., 2016). In the present study we show that a *S. meliloti* mutant strain affected in the periplasmic nitrate reductase *NapA* still produces NO although at a lower level (39% of the WT), suggesting that there is another way to produce NO from nitrate in *S. meliloti* cells. Indeed our data indicate that *NarB* participates to NO synthesis as the production of NO was diminished by 80% as compared to the WT strain when *narB* was deleted. Interestingly, NO was barely detectable when measured in a WT strain under conditions where denitrification is not active. This confirms that the assimilatory nitrate reductase contributes to NO production indirectly via the denitrification pathway. NO₂⁻ produced in the cytoplasm by *NarB* could serve as substrate for *NirK* in the periplasm. To render this possible, nitrite must be exported to the cell periplasm. In *B. japonicum* *NarK* might insure this role and it is interesting to note that the closest *NarK* homolog in *S. meliloti* (26.5% identity) is encoded by *Smb20436* which has not been characterized yet but was found to be highly induced under nitrogen deprivation conditions (LS and CB, unpublished). Its involvement in NO₂⁻ export remains, however, to be examined. Our results confirm that denitrification remains the main source of NO in *S. meliloti* as NO production was almost null when *nirK* was mutated indicating also that there is no other detectable source of NO in these conditions. *NarB* contributes to NO production via the denitrification pathway even in presence of ammonium (data not shown) and enhances greatly this production in condition where the *narB* gene is fully expressed. Whether this synergy has a role to play in *S. meliloti* metabolism is a question which remains to be addressed.

NarB and NirB Do Not Play a Major Role in the Symbiotic Interaction

NarB and *NirB* are part of the *S. meliloti* nitrate assimilatory pathway, and contribute to NO production in free living

cells. Both genes are specifically expressed in the nitrogen fixing zone of *M. truncatula* nodules. This might seem in contradiction with the fact that ammonium produced from nitrogen fixation is present in nodules. However, the assimilation rate of ammonium by the plant might be high enough to avoid any accumulation of ammonium in nodules. Results which might appear contradictory have been published in the past concerning the link between nitrogen fixation and nitrate reduction: indeed a significant correlation between nitrate reductase and nitrogenase activities was suggested in *S. meliloti* (Kondorosi et al., 1973) while no correlation between nitrate reductase (including assimilatory nitrate reductase) and nitrogenase activities was found in a different study (Antoun et al., 1980). Recently Liu and colleagues have shown, by using three *Sinorhizobium* species, a lineage-dependent contribution of the *nap nir* gene cluster to the symbiosis efficiency with soybean (Liu et al., 2017). Here we found that inoculating *M. truncatula* with *S. meliloti* strains affected in *narB*, or *nirB-narB* region do not affect nodulation kinetics or plant shoot dry weight or nitrogen fixation efficiency suggesting that these genes do not play an essential role in symbiosis. The questions remain whether these genes participate to NO production in nodules and what their function in symbiosis could be.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

BR carried out the experiments. ALS and AR constructed the *narB* and *nirBD narB* mutants. LS supervised BR, ALS, and AR works. CB and EM supervised the project and wrote the manuscript.

FUNDING

This work was supported by the French Laboratory of Excellence Project “TULIP” (ANR-10-LABX-41) and the “Agence Nationale de la Recherche” (STAYPINK-ANR-15-CE20-0005). EM was supported by the National Institute for Applied Sciences (INSA-Toulouse).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank A. Becker and B. Happel (Philipps University of Marburg, Germany) for providing us some *S. meliloti* mutants. We thank C. Delon and D. Serça (Laboratoire Aérologie, CNRS, Université de Toulouse, France) for giving us access to their NO analyser. We also thank Frans de Bruijn and Anne-Claire Cazalé for critical reading of this manuscript.

REFERENCES

Antoun, H., Bordeleau, L. M., Prévost, D., and Lachance, R.-A. (1980). Absence of correlation between nitrate reductase and symbiotic nitrogen fixation efficiency in *Rhizobium meliloti*. *Can. J. Plant Sci.* 60, 209–212. doi: 10.4141/cjps80-028

Astier, J., Gross, I., and Durner, J. (2017). Nitric oxide production in plants: an update. *J. Exp. Bot.* 69, 3401–3411. doi: 10.1093/jxb/erx420

Berger, A., Brouquisse, R., Pathak, P. K., Hichri, I., Singh, I., Bhatia, S., et al. (2018). Pathways of nitric oxide metabolism and operation of phytohemoglobins in legume nodules: missing links and future directions. *Plant Cell Environ.* doi: 10.1111/pce.13151 [Epub ahead of print].

- Bobik, C., Meilhoc, E., and Batut, J. (2006). FixJ: a major regulator of the oxygen limitation response and late symbiotic functions of *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 188, 4890–4902. doi: 10.1128/JB.00251-06
- Boccaro, M., Mills, C. E., Zeier, J., Anzi, C., Lamb, C., Poole, R. K., et al. (2005). Flavohaemoglobin HmpX from *Erwinia chrysanthemi* confers nitrosative stress tolerance and affects the plant hypersensitive reaction by intercepting nitric oxide produced by the host. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 43, 226–237. doi: 10.1111/j.1365-3113X.2005.02443.x
- Boscari, A., Meilhoc, E., Castella, C., Bruand, C., Puppo, A., and Brouquisse, R. (2013). Which role for nitric oxide in symbiotic N₂-fixing nodules: toxic by-product or useful signaling/metabolic intermediate? *Front. Plant Sci.* 4:384. doi: 10.3389/fpls.2013.00384
- Cabrera, J. J., Salas, A., Torres, M. J., Bedmar, E. J., Richardson, D. J., Gates, A. J., et al. (2016). An integrated biochemical system for nitrate assimilation and nitric oxide detoxification in *Bradyrhizobium japonicum*. *Biochem. J.* 473, 297–309. doi: 10.1042/BJ20150880
- Calvo-Begueria, L., Rubio, M. C., Martínez, J. I., Pérez-Rontomé, C., Delgado, M. J., Bedmar, E. J., et al. (2018). Redefining nitric oxide production in legume nodules through complementary insights from electron paramagnetic resonance spectroscopy and specific fluorescent probes. *J. Exp. Bot.* 69, 3703–3714. doi: 10.1093/jxb/ery159
- Cam, Y., Pierre, O., Boncompagni, E., Hérouart, 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. doi: 10.1111/j.1469-8137.2012.04282.x
- Crane, B. R., Sudhamsu, J., and Patel, B. A. (2010). Bacterial nitric oxide synthases. *Annu. Rev. Biochem.* 79, 445–470. doi: 10.1146/annurev-biochem-062608-103436
- del Giudice, J., Cam, Y., Damiani, I., Fung-Chat, F., Meilhoc, E., Bruand, C., et al. (2011). Nitric oxide is required for an optimal establishment of the *Medicago truncatula*–*Sinorhizobium meliloti* symbiosis. *New Phytol.* 191, 405–417. doi: 10.1111/j.1469-8137.2011.03693.x
- Domingos, P., Prado, A. M., Wong, A., Gehring, C., and Feijo, J. A. (2015). Nitric oxide: a multitasked signaling gas in plants. *Mol. Plant* 8, 506–520. doi: 10.1016/j.molp.2014.12.010
- Dupuy, P., Gourion, B., Sauviac, L., and Bruand, C. (2017). DNA double-strand break repair is involved in desiccation resistance of *Sinorhizobium meliloti*, but is not essential for its symbiotic interaction with *Medicago truncatula*. *Microbiol. Read. Engl.* 163, 333–342. doi: 10.1099/mic.0.000400
- Ferri, L., Gori, A., Biondi, E. G., Mengoni, A., and Bazzicalupo, M. (2010). Plasmid electroporation of sinorhizobium strains: the role of the restriction gene *hsdR* in type strain Rm1021. *Plasmid* 63, 128–135. doi: 10.1016/j.plasmid.2010.01.001
- Ferroni, F. M., Rivas, M. G., Rizzi, A. C., Lucca, M. E., Perotti, N. I., and Brondino, C. D. (2011). Nitrate reduction associated with respiration in *Sinorhizobium meliloti* 2011 is performed by a membrane-bound molybdoenzyme. *Biomol.* 24, 891–902. doi: 10.1007/s10534-011-9442-5
- García, J., Barker, D. G., and Journet, E.-P. (2006). *Seed Storage and Germination*. Available at: <https://www.noble.org/globalassets/docs/medicago-handbook/seed-storage-germination.pdf> (accessed December 21, 2018).
- Hardy, R. W. F., Holsten, R. D., Jackson, E. K., and Burns, R. C. (1968). The acetylene-ethylene assay for n₂ fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiol.* 43, 1185–1207. doi: 10.1104/pp.43.8.1185
- Hichri, I., Boscari, A., Meilhoc, E., Catalá, M., Barreno, E., Bruand, C., et al. (2016a). “Nitric oxide: a multitask player in plant–microorganism symbioses,” in *Gasotransmitters in Plants: The Rise of a New Paradigm in Cell Signaling Signaling and Communication in Plants*, eds L. Lamattina and C. García-Mata (New York, NY: Springer International Publishing), 239–268. doi: 10.1007/978-3-319-40713-5_12
- Hichri, I., Meilhoc, E., Boscari, A., Bruand, C., Frenedo, P., and Brouquisse, R. (2016b). “Chapter ten - nitric oxide: jack-of-all-trades of the nitrogen-fixing symbiosis?,” in *Advances in Botanical Research Nitric Oxide and Signaling in Plants*, ed. D. Wendehenne (Cambridge, MA: Academic Press), 193–218.
- Horchani, F., Prévot, M., Boscari, A., Evangelisti, E., Meilhoc, E., Bruand, C., et al. (2011). Both plant and bacterial nitrate reductases contribute to nitric oxide production in *Medicago truncatula* nitrogen-fixing nodules1[W][OA]. *Plant Physiol.* 155, 1023–1036. doi: 10.1104/pp.110.166140
- Jeadroz, S., Wipf, D., Stuehr, D. J., Lamattina, L., Melkonian, M., Tian, Z., et al. (2016). Occurrence, structure, and evolution of nitric oxide synthase-like proteins in the plant kingdom. *Sci. Signal.* 9:re2. doi: 10.1126/scisignal.aad4403
- Kondorosi, A., Barabas, I., Svab, Z., Orosz, L., Sik, T., and Hotchkiss, R. D. (1973). Evidence for common genetic determinants of nitrogenase and nitrate reductase in *Rhizobium meliloti*. *Nat. New Biol.* 246, 153–154.
- Kumar Halder, A., and Chakrabarty, P. R. (2015). Expression of assimilatory nitrate and nitrite reductase of *Rhizobium meliloti*. *Indian J. Microbiol. Res.* 2:133. doi: 10.5958/2394-5478.2015.00001.1
- Liu, L. X., Li, Q. Q., Zhang, Y. Z., Hu, Y., Jiao, J., Guo, H. J., et al. (2017). The nitrate-reduction gene cluster components exert lineage-dependent contributions to optimization of sinorhizobium symbiosis with soybeans. *Environ. Microbiol.* 19, 4926–4938. doi: 10.1111/1462-2920.13948
- Luque-Almagro, V. M., Gates, A. J., Moreno-Vivián, C., Ferguson, S. J., Richardson, D. J., and Roldán, M. D. (2011). Bacterial nitrate assimilation: gene distribution and regulation. *Biochem. Soc. Trans.* 39, 1838–1843. doi: 10.1042/BST20110688
- 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. doi: 10.1094/MPMI-23-6-0748
- 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 Physiol.* 157, 1505–1517. doi: 10.1104/pp.111.186056
- Nicholas, D. J. D., and Nason, A. (1957). “Determination of nitrate and nitrite,” in *Methods in Enzymology*, Vol. 3, eds S. P. Colowick and N. O. Kaplan (Cambridge, MA: Academic Press), 981–984.
- Pobigaylo, N., Wetter, D., Szymczak, S., Schiller, U., Kurtz, S., Meyer, F., et al. (2006). Construction of a large signature-tagged mini-Tn5 transposon library and its application to mutagenesis of *Sinorhizobium meliloti*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 4329–4337. doi: 10.1128/AEM.03072-05
- Quandt, J., and Hynes, M. F. (1993). Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in gram-negative bacteria. *Gene* 127, 15–21.
- Roux, B., Rodde, N., Jardinaud, M.-F., Timmers, T., Sauviac, L., Cottret, L., et al. (2014). An integrated analysis of plant and bacterial gene expression in symbiotic root nodules using laser-capture microdissection coupled to RNA sequencing. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 77, 817–837. doi: 10.1111/tj.12442
- Sánchez, C., Gates, A. J., Meakin, G. E., Uchiumi, T., Girard, L., Richardson, D. J., et al. (2010). Production of nitric oxide and nitrosylhemoglobin complexes in soybean nodules in response to flooding. *Mol. Plant Microbe Interact.* 23, 702–711. doi: 10.1094/MPMI-23-5-0702
- Sauviac, L., Philippe, H., Phok, K., and Bruand, C. (2007). An extracytoplasmic function sigma factor acts as a general stress response regulator in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 189, 4204–4216. doi: 10.1128/JB.00175-07
- Sekiguchi, S., and Maruyama, Y. (1988). Assimilatory reduction of nitrate in *Rhizobium meliloti*. *J. Basic Microbiol.* 28, 529–539. doi: 10.1002/jobm.3620280813
- Torres, M. J., Bueno, E., Mesa, S., Bedmar, E. J., and Delgado, M. J. (2011). Emerging complexity in the denitrification regulatory network of *Bradyrhizobium japonicum*. *Biochem. Soc. Trans.* 39, 284–288. doi: 10.1042/BST0390284
- Torres, M. J., Rubia, M. I., de la Peña, T. C., Pueyo, J. J., Bedmar, E. J., and Delgado, M. J. (2014). Genetic basis for denitrification in *Ensifer meliloti*. *BMC Microbiol.* 14:142. doi: 10.1186/1471-2180-14-142
- Trinchant, J. C., and Rigaud, J. (1982). Nitrite and nitric oxide as inhibitors of nitrogenase from soybean bacteroids. *Appl. Environ. Microbiol.* 44, 1385–1388.

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Ruiz, Le Scornet, Sauviac, Rémy, Bruand and Meilhoc. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Dans cette première partie, nous avons pu caractériser la présence d'une nitrate réductase (NarB) et d'une nitrite réductase (NirBD) appartenant à une voie cytoplasmique d'assimilation du nitrate. Tout d'abord, nous avons pu confirmer que les gènes codant pour les enzymes de cette voie faisaient bien partie du même opéron (*nirBD narB cysG*). La délétion des gènes codant pour la nitrate réductase et la nitrite réductase (*nirBD narB*) a permis, dans un premier temps, de confirmer l'implication de cette voie dans l'assimilation du NO_3^- en ammonium. En effet, contrairement à une souche sauvage (WT), le mutant n'est pas capable de croître dans un milieu de culture avec du NO_3^- comme seule source d'azote. Une fois la fonction de cette voie caractérisée, nous nous sommes intéressés à sa capacité à produire du NO. Pour cela, des dosages de NO ont été réalisés à partir de souches mutantes pour différentes enzymes impliquées dans la voie de dénitrification ou dans la voie assimilatrice. Ces souches ont été cultivées en conditions aérobique ou microaérobique. La première observation a été qu'aucune synthèse de NO n'avait lieu en aérobie. À l'inverse, certaines souches cultivées en condition de microaérobie produisent du NO. Dans cette condition, la mutation du gène *nirK* codant pour la nitrite réductase périplasmique (dénitrification) entraîne une absence totale de NO. Cette observation montre que NirK est essentielle à la synthèse de NO en microaérobie. De façon intéressante, les mutants affectant la voie assimilatrice présentent une forte diminution de la quantité de NO par rapport à une souche sauvage. La même observation est faite lorsque nous mesurons la quantité de nitrite produite dans le milieu. Dans ces conditions, le nitrite est le produit de la réduction du NO_3^- et permet la synthèse de NO. Ces résultats montrent l'implication de la voie assimilatrice dans la synthèse de nitrite et de NO. En conclusion, la voie assimilatrice participerait à la production de nitrite cellulaire, réduit en NO par la nitrite réductase NirK.

a. Etude du transport de nitrate/nitrite

Pour aller plus loin dans la compréhension du mécanisme permettant à la voie d'assimilation du nitrate de contribuer à la synthèse de NO, nous nous sommes concentrés sur l'hypothèse selon laquelle NarB permettrait une augmentation de la quantité de nitrite, substrat de NirK pour la synthèse du NO. Cette hypothèse repose en partie sur l'existence d'un transport de nitrite entre le cytoplasme et l'espace périplasmique ou est localisé NirK. Chez *B. diazoefficiens*, il existe un transporteur de nitrite de type MFS codé par le gène *nark*, localisé

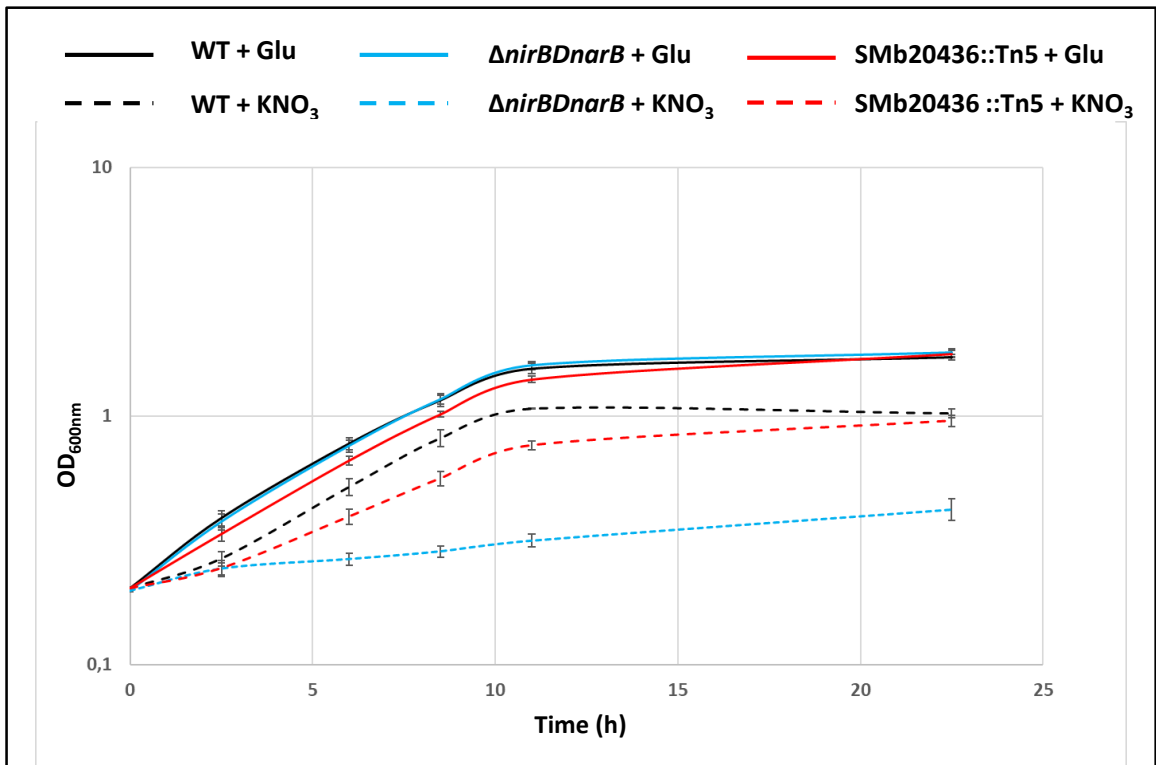


Figure 24 : Etude de la croissance de différents mutants en présence de différentes sources d'azote.

Les souches sont d'abord cultivées en milieu de Vincent contenant du glutamate comme seule source d'azote jusqu'en début de phase exponentielle ($OD_{600nm} = 0,2$ à $0,3$). Les cultures sont alors centrifugées et les bactéries sont ressuspendues dans du milieu de Vincent contenant seulement du glutamate (Glu 10 mM) ou du nitrate (KNO_3 20 mM). La croissance de chaque souche a été mesurée sur une période de 22h. Chaque valeur correspond à la moyenne de 3 mesures réalisées lors de 3 expérimentations indépendantes. Les barres d'erreurs correspondent à l'erreur standard de la moyenne.

en opérant avec le gène codant pour la nitrate réductase assimilatrice *NasC* (*narK bjgb flp nasC*). Chez *E. meliloti*, aucun gène codant pour un transporteur putatif n'est présent dans l'opéron portant les gènes de la voie assimilatrice. Cependant, une séquence codant pour un transporteur de type MFS putatif (SMb20436) a été identifiée sur le mégaplasmide pSymB. Ce transporteur présente 26.5 % d'homologie avec le transporteur NarK de *B. diazoefficiens* et 27 % avec celui d'*E. coli*. Nous nous sommes donc intéressés à la fonction de ce gène et à sa potentielle implication dans le transport de NO_3^- et de NO_2^-

Afin de voir si ce transporteur était essentiel au bon fonctionnement de la voie assimilatrice, nous avons mesuré l'impact de sa mutation sur la croissance bactérienne lorsque le NO_3^- est la seule source d'azote disponible dans le milieu. Dans cette condition, une implication de SMb20436 dans l'import de nitrate devrait limiter la croissance du mutant par rapport à la souche sauvage. Dans un premier jeu d'expériences, nous avons réalisé des mesures de croissance de différentes souches comprenant un mutant du transporteur (SMb20436::Tn5), un mutant de l'opéron codant la voie d'assimilation du nitrate (*nirBD narB*) et une souche WT et cela en présence seulement de glutamate ou de NO_3^- . Les résultats sont présentés dans la Figure 24. En présence de glutamate, ces 3 souches présentent une croissance équivalente. Pour la souche sauvage, cette croissance est similaire quelle que soit la source d'azote présente dans le milieu. En revanche, comme nous l'avons décrit précédemment, le mutant de la voie assimilatrice n'est pas capable de croître en utilisant le NO_3^- comme seule source d'azote. Enfin, lorsque seul le NO_3^- est disponible dans le milieu, le mutant SMb20436::Tn5 présente une croissance inférieure à celle d'une souche sauvage placée dans les mêmes conditions. Ces résultats suggèrent donc que SMb20436 est impliqué dans l'assimilation du nitrate.

Dans une deuxième série d'expériences, nous avons voulu déterminer si le gène SMb20436 a un rôle dans l'export vers le périplasme du NO_2^- produit par NarB dans le cytoplasme. En effet, dans le cas où plus de NO_2^- serait disponible dans le périplasme, plus de NO pourrait être produit par NirK. Nous avons donc quantifié le NO et le NO_2^- produits à partir de NO_3^- en aérobie et en microaérobie chez une souche WT et chez le mutant SMb20436::Tn5. Les résultats sont présentés dans la Figure 25. Il est important de noter que seule la condition microaérobie avec un ajout de NO_3^- permet la synthèse de NO par l'intermédiaire de NirK (Ruiz et al., 2019). Dans cette condition, une mutation de SMb20436 entraîne une diminution

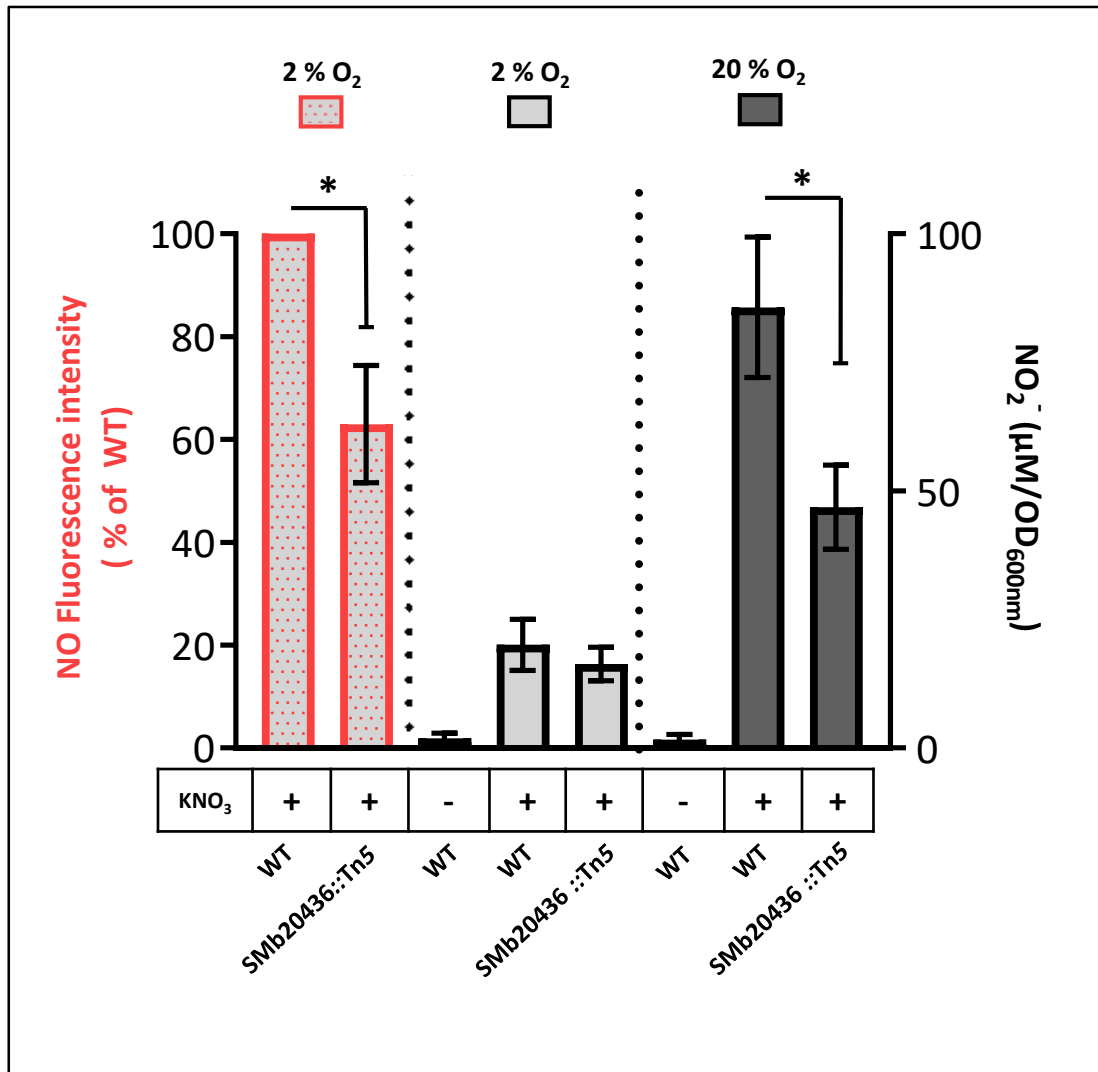


Figure 25 : Effet de la mutation du gène SMB20436 (SMB20436::Tn5) sur la synthèse de NO et de NO₂⁻.

Les différentes souches sont cultivées jusqu'en début de phase exponentielle ($OD_{600nm} = 0,2$ à $0,3$) dans du milieu de Vincent contenant du glutamate (10 mM) comme source d'azote. Les cultures sont ensuite placées 1h30 en microaérobiose ou aérobiose et supplémentées ou non en nitrate (KNO_3 20 mM). Le dosage du NO est effectué au moyen d'une sonde fluorescente spécifique du NO (Daf-2). Le dosage du nitrite est effectué en utilisant la méthode de Griess. Pour chaque condition, la valeur indiquée est la moyenne de 4 valeurs obtenues au cours de 4 expériences indépendantes. Le test statistique utilisé est un test de student (*, $p < 0,05$). Les barres d'erreurs correspondent à l'erreur standard de la moyenne. Les dosages de NO en aérobiose ne sont pas présentés ici car les valeurs obtenues sont proches de zéro.

significative de la quantité de NO par rapport à celle mesurée dans une souche WT. De plus, la quantité de NO_2^- extracellulaire en aérobic chez le mutant SMb20436::Tn5 est diminuée de façon significative par rapport au WT (Figure 25). Ces deux résultats suggèrent que SMb20436 pourrait être impliqué dans l'augmentation de NO_2^- dans le périplasme et donc aussi dans la synthèse de NO périplasmique. De plus, ces données confirment l'importance du NO_2^- cytoplasmique pour la production de NO et donc l'implication indirecte de la voie assimilatrice du nitrate dans la synthèse de NO. En conclusion, SMb20436 participe probablement au transport du NO_2^- cytoplasmique vers le périplasme où il pourra être réduit en NO par NirK. SMb20436 pourrait ainsi avoir une fonction analogue à NarK chez *B. diazoefficiens*.

b. Etude de la régulation de l'assimilation du nitrate

Des expériences de croissance ainsi que des mesures de l'expression des gènes *narB* et *nirBD*, réalisées dans des milieux contenant différentes sources d'azote (article 1) nous ont permis d'émettre des hypothèses sur les mécanismes impliqués dans la régulation de la voie assimilatrice du nitrate d'*E. meliloti*. Contrairement aux gènes de dénitrification, les gènes impliqués dans l'assimilation du nitrate sont aussi bien exprimés en condition aérobic qu'en condition microaérobic. De plus, ces expériences ont permis de montrer que la voie assimilatrice était réprimée par la présence d'ammonium et induite par le NO_3^- . En revanche, la voie ne semble pas être régulée par le NO. Au vu de ces différents résultats, nous nous sommes intéressés aux mécanismes de régulation de la voie assimilatrice de nitrate.

Chez *B. diazoefficiens* et d'autres microorganismes, la régulation spécifique de la voie assimilatrice du nitrate s'effectue via un régulateur à deux composants NasS-NasT. De plus, il a été montré chez *B. diazoefficiens* que NasS-NasT étaient capables de réguler l'expression d'autres gènes, notamment certains gènes de la dénitrification (Sánchez et al., 2019). Ce régulateur se compose généralement d'un senseur de nitrate (NasS) et d'un activateur transcriptionnel (NasT), ce dernier étant séquestré par NasS en absence de NO_3^- . Nous avons identifié dans le génome de *E. meliloti* deux gènes, SMb21114 et SMb21115, dont les produits possèdent une homologie de séquence de 46.8 % et 65.4 % avec NasS et NasT, respectivement. Pour déterminer si SMb21114 et SMb21115 ont un rôle dans la régulation des gènes de la voie assimilatrice de nitrate, nous avons construit dans un premier temps une

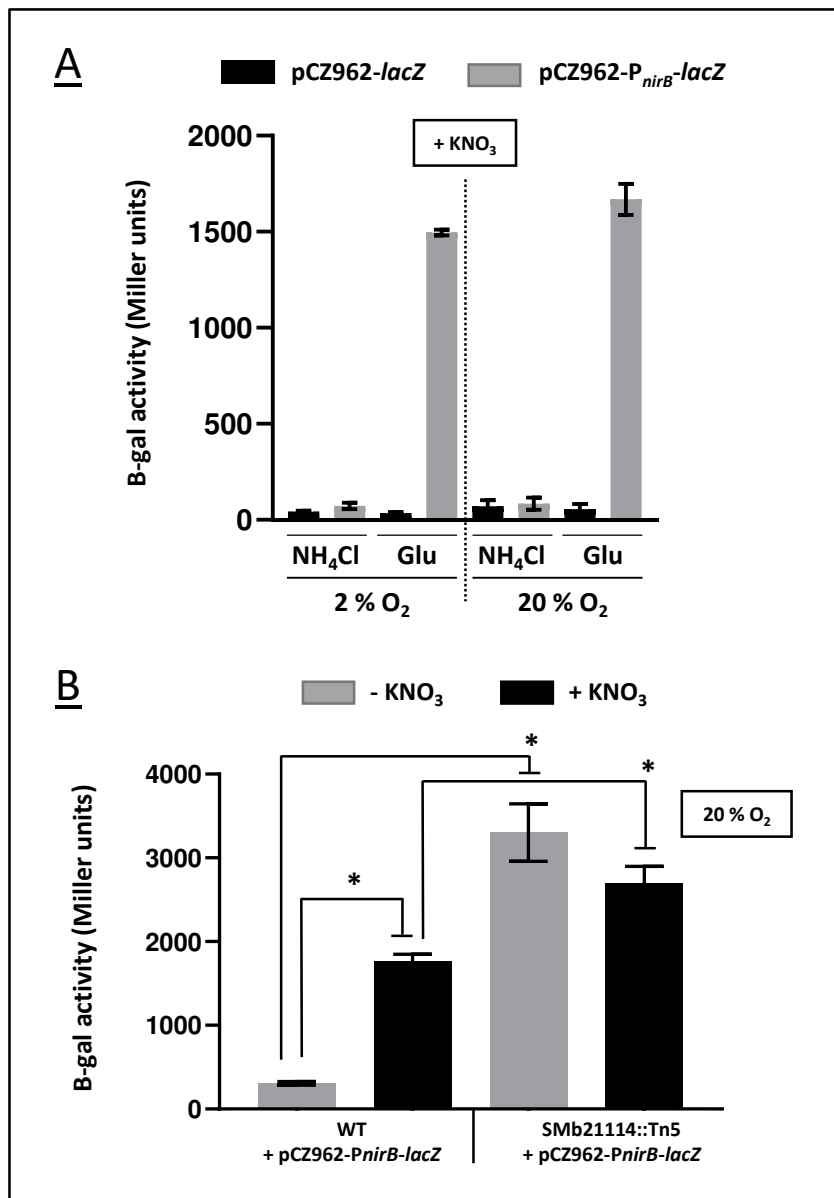


Figure 26 : Etude de la régulation de la région promotrice de l'opéron *nirBD narB*.

Les différentes souches ont été cultivées jusqu'en début de phase exponentielle ($OD_{600nm} = 0,2 - 0,3$) dans du milieu Vincent et en présence de glutamate ou de NH_4Cl . Les cultures ont ensuite été placées pendant 4h en aérobie ou microaérobie avec addition ou non de nitrate (KNO_3 20 mM). **(A)** Dosage de l'activité promotrice du gène *nirB* (*pCZ962-PnirB-lacZ*) en comparaison avec le plasmide vide (*pCZ962-lacZ*) dans la souche sauvage (WT). Chaque valeur est la moyenne des valeurs obtenues lors de deux dosages indépendants. Les barres d'erreur indiquent l'erreur standard de la moyenne. **(B)** Dosage de l'activité promotrice du gène *nirB* (*pCZ962-PnirB-lacZ*) dans une souche sauvage ou mutée pour le régulateur putatif SMb21114 (SMb21114::Tn5). Les dosages ont été réalisés en aérobie dans du milieu Vincent avec du glutamate (10 mM) et avec ou sans ajout de nitrate (KNO_3 20 mM). Pour chaque condition, la valeur indiquée est la moyenne de 4 valeurs obtenues au cours de 4 expériences indépendantes. Le test statistique utilisé est un Mann-Whitney (*, $p < 0,05$). Les barres d'erreurs correspondent à l'erreur standard de la moyenne. La même expérience a été réalisée en microaérobie et a donné des valeurs similaires à celles obtenues en aérobie (données non montrées).

fusion transcriptionnelle rapportrice constituée du gène de la β -galactosidase (*lacZ*) cloné en aval de la région promotrice de l'opéron *nirBD narB cysG*. Pour valider la construction, nous l'avons d'abord introduite dans une souche sauvage et avons mesuré l'activité β -galactosidase dans des conditions connues pour affecter l'expression de l'opéron *nirBD narB cysG* : la présence ou non de NO_3^- ou d'ammonium. Les résultats sont présentés dans la Figure 26A. Cette expérience a permis de valider la construction et de confirmer la régulation de l'opéron *nirBD narB cysG* dont la transcription est réprimée en présence d'ammonium et activée en présence de NO_3^- . Nous avons alors introduit ce plasmide dans une souche mutée pour le gène SMb21114 (SMb21114::Tn5) afin de rechercher l'effet de cette mutation sur l'expression de l'opéron *nirBD narB cysG* en présence ou non de NO_3^- . En effet, l'implication de SMb21114 (NasS putatif) comme senseur de NO_3^- impliqué dans la régulation de la voie assimilatrice se traduirait par une dérepression de SMb21115 (NasT putatif) induisant l'expression de l'opéron *nirBD narB cysG*. Les résultats sont présentés dans la Figure 26B. Comme attendu pour la souche WT, nous avons observé une augmentation de l'activité β -galactosidase en présence de NO_3^- , traduisant une activation du promoteur de l'opéron *nirBD narB cysG*. Lorsque le plasmide est introduit dans une souche mutée pour le gène SMb21114, les résultats montrent qu'avec ou sans NO_3^- , l'activité promotrice de l'opéron *nirBD narB cysG* est élevée. En conclusion, ce résultat nous montre l'implication de SMb21114 dans la régulation de la voie assimilatrice de nitrate, et cela comme répresseur de la transcription de la voie en absence de NO_3^- chez *E. meliloti*. SMb21114 et SMb21115 pourraient ainsi avoir une fonction analogue aux régulateurs NasS-NasT décrits chez *B. japonicum*.

Pour continuer à étudier les différents modes de régulation de cette voie, nous nous sommes intéressés à un ARN non codant (ARNnc) (SMb23331 ou SMb_asRNA_2841) d'une taille de 159 nucléotides, présent en anti-sens de la séquence de *narB* (SMb20986) (Figure 27). Cet ARNnc a d'abord été identifié au cours de deux études transcriptomiques réalisées par RNAseq sur des cultures d'*E. meliloti* (Sallet et al., 2013; Schlüter et al., 2013). Par ailleurs, une étude transcriptomique visant à étudier l'expression de l'ensemble des gènes de *M. truncatula* et *E. meliloti* dans les différentes zones du nodule a permis de voir que cet ARNnc est présent dans le nodule de façon inversement corrélée à la présence du transcrit de *narB* (Roux et al., 2014). Ces données sont présentées en Figure 27.

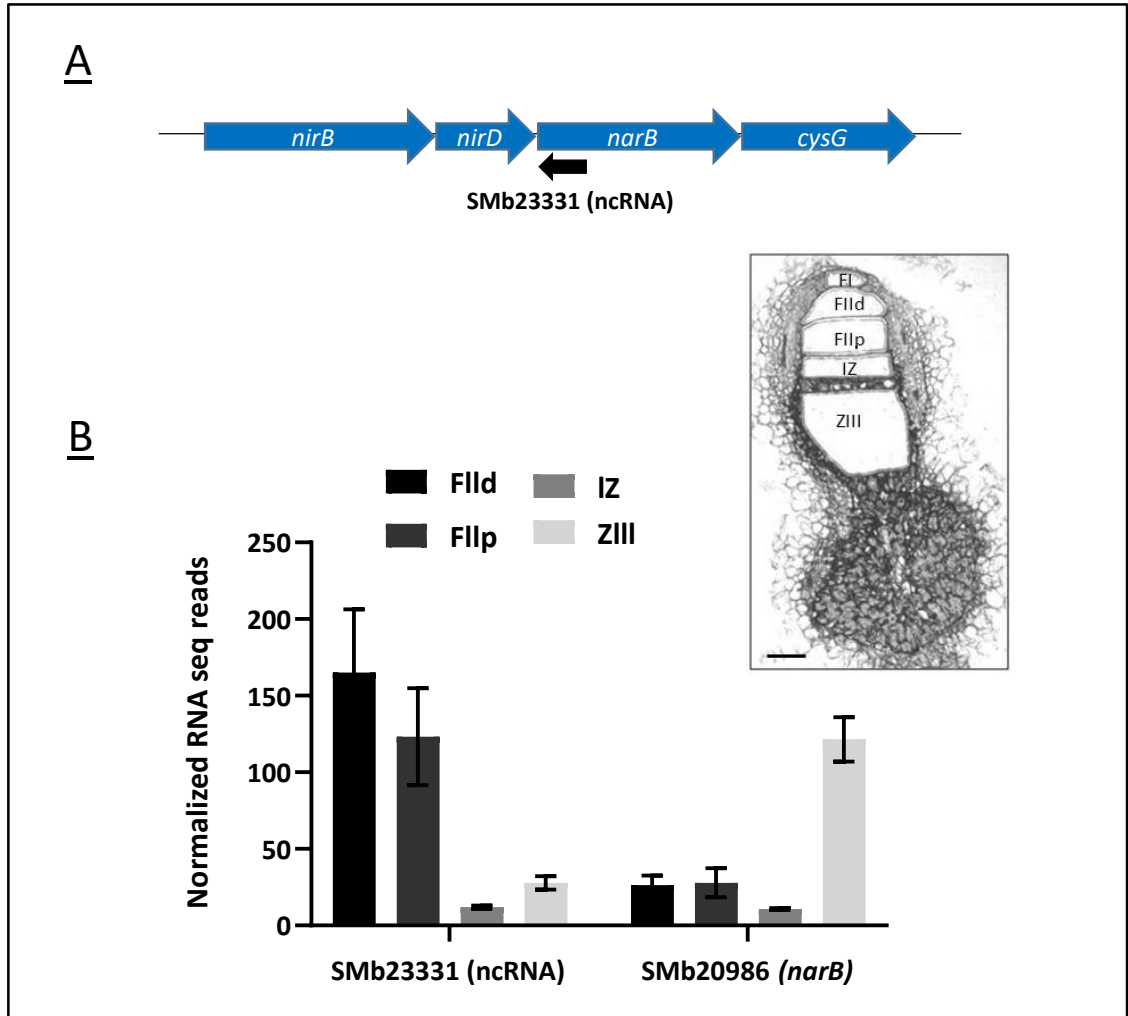


Figure 27 : Organisation génomique de l'opéron *nirBD narB* et niveaux d'expression du gène *narB* et de l'ARN non codant SMb23331 dans les différentes zones du nodule.

(A) Représentation schématique de l'opéron *nirBDnarB* et de l'ARN non codant SMb23331 en anti-sens de *narB*. (B) Expression du gène *narB* et de l'ARNnc SMb23331 dans les différentes zones du nodule lors de l'interaction *M. truncatula* - *E. meliloti*. Les données ont été obtenues par analyse transcriptomique de type RNAseq sur des zones du nodule préalablement isolées par microdissection laser (Roux et al. 2014 ; <https://iant.toulouse.inra.fr/symbimics>). FI, méristème; Fld, zone d'infection distale; Fllp, zone d'infection proximale; IZ, interzone; ZIII, zone de fixation d'azote.

Pendant longtemps, les ARN ont été considérés comme support de l'information génétique et leur régulation transcriptionnelle ou traductionnelle était attribuée à des protéines régulatrices. Ce n'est qu'à partir des années 80 qu'ont émergé différents mécanismes de régulation de gènes bactériens par des petits ARN régulateurs ne possédant pas de séquence codante (ARNnc). Cette émergence est le résultat de plusieurs découvertes, comme celle d'un ARNnc responsable de la régulation de la réplication du plasmide ColE1 (Stougaard et al., 1981; Tomizawa et al., 1981) ou bien celle d'un ARNnc chromosomique (MicF) régulant la traduction d'une protéine membranaire en s'hybridant directement avec son ARNm (Andersen et al., 1989). Par la suite, l'amélioration des techniques de biologie moléculaire a permis d'identifier de nombreux ARNnc impliqués dans divers processus comme les réponses aux stress, la virulence ou la formation de biofilm (Hoe et al., 2013). Les ARNnc régulateurs peuvent être classés en 3 catégories : 1) les ARNnc interagissant directement avec des protéines pour les réguler ; 2) les ARNnc régulateurs exprimés en *trans* et à distance des gènes cibles, qui possèdent généralement une complémentarité partielle avec les séquences cibles. De ce fait, ils possèdent dans leur séquence une zone spécifique permettant l'interaction avec une protéine chaperonne telle que Hfq pour faciliter et accélérer l'appariement entre l'ARN non codant et l'ARN messager ciblé (Papenfort and Vogel, 2010). 3) enfin, il existe des ARNnc régulateurs transcrits en anti-sens des gènes qu'ils régulent (ARNnc anti-sens). Ces ARNnc codés en *cis* possèdent donc une complémentarité totale avec leurs gènes cibles et ne nécessitent donc pas forcément de protéine chaperonne pour fonctionner (Georg and Hess, 2011). Les rôles attribués aux ARNnc anti-sens ne cessent de se diversifier avec des implications dans des mécanismes de réparation de l'ADN ou d'interférence transcriptionnelle (Georg and Hess, 2018). Peu d'ARNnc anti-sens ont été décrits comme impliqués dans l'établissement de l'interaction symbiotique. Chez *B. diazoefficiens* USDA110, plusieurs ARNnc ont été décrits comme ayant une différence d'expression entre vie libre et symbiose. C'est notamment le cas pour BjrC2a qui est plus exprimé au sein du nodule qu'en vie libre (Madhugiri et al., 2012). BjrC2a est prédit pour être un ARNnc anti-sens participant à la régulation de l'expression de l'inositol-monophosphatase chez les rhizobia. Chez *R. leguminosarum*, la synthèse de cette protéine doit être finement régulée pour assurer l'interaction symbiotique (Madhugiri et al., 2012; Harfouche et al., 2015). Chez *E. meliloti*, des analyses par RNA-seq ont montré l'existence de plus de 3000 ARNnc anti-sens, et prédit qu'environ 35 % des gènes codant pour des protéines possèdent un ARNnc anti-sens (Schlüter

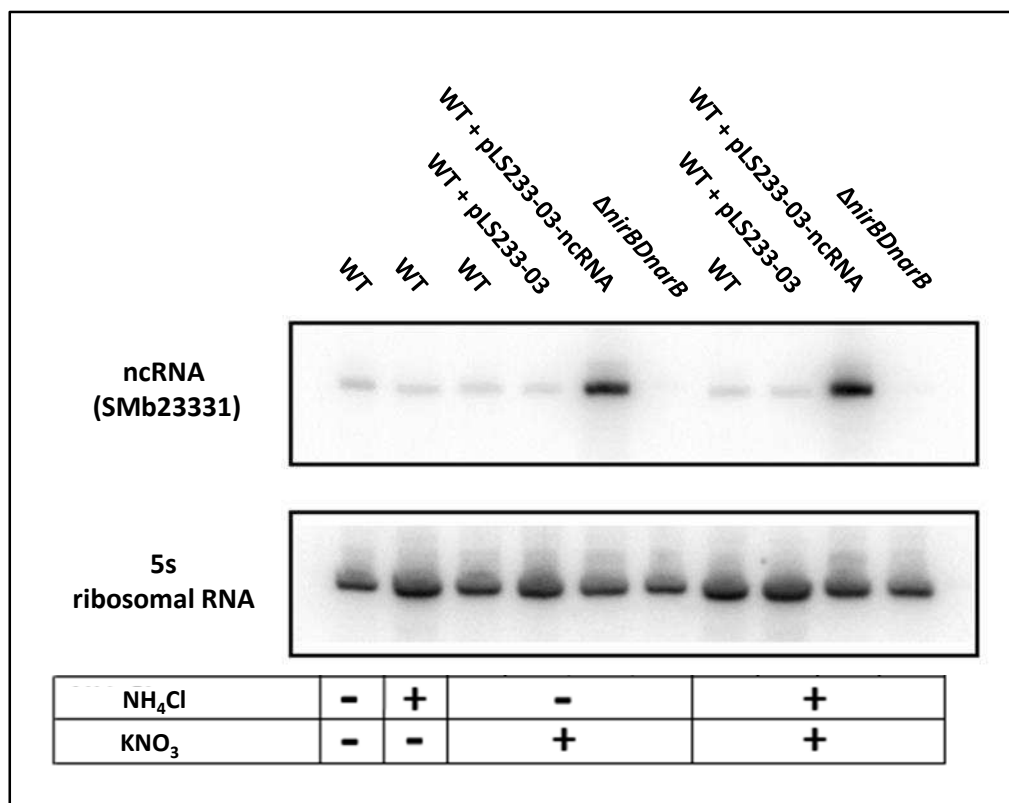


Figure 28 : Analyse de la transcription de SMb23331 dans différentes souches et conditions.

Des précultures bactériennes ont été réalisées en milieu de Vincent en présence de NH₄Cl en condition aérobie. Les bactéries ont ensuite été lavées et reprises en milieu de Vincent sans source d'azote à une DO_{600nm} de 0,3 avec ou sans addition de NH₄Cl (18,7 mM) et/ou de KNO₃ (20 mM) et replacées en culture en aérobie pendant 2h30. Les extractions d'ARNs totaux ont été réalisées à partir de cultures de la souche sauvage (WT) et du mutant de la voie d'assimilation (*ΔnirBDnarB*) ainsi que des souches dérivées de la souche sauvage portant soit le plasmide permettant de surexprimer SMb23331 (WT + pLS233-03-ncRNA) soit le plasmide vide (WT + pLS233-03). Les membranes ont été hybridées avec les oligonucléotides OCB2010 (SMb23331) et OCB1239 (ARN 5S) phosphorylés à l'aide de l'ATP[γ-32]. L'hybridation de l'ARN 5S permet de contrôler que les quantités d'ARN présentes dans chaque piste sont équivalentes. Cette expérimentation a été effectuée 2 fois de manière indépendante.

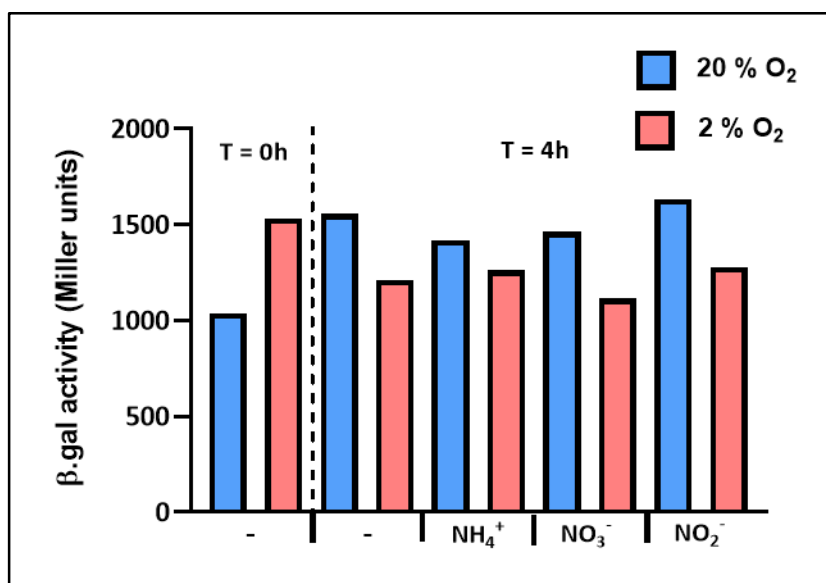


Figure 29 : Régulation du promoteur de SMb23331.

l'activité β -galactosidase a été mesurée dans une souche WT contenant le plasmide pCZ962 portant une fusion transcriptionnelle du gène *lacZ* sous le contrôle du promoteur de SMb23331 (WT + pCZ962-PSMb23331-*lacZ*). Après une culture de nuit réalisée en milieu de Vincent contenant du glutamate comme source d'azote, les cultures en phase exponentielle de croissance ($OD_{600nm} = 0,2 - 0,3$, T = 0) ont été placées en condition aérobie ou microaérobie pendant 4h (T = 4h) avec ou sans source d'azote (NH₄⁺ : NH₄Cl 18,7 mM ; NO₃⁻ : KNO₃ 20 mM ; NO₂⁻ : NaNO₂ 5 mM). Les valeurs présentées ici correspondent à la moyenne des valeurs obtenues avec 2 répétitions techniques.

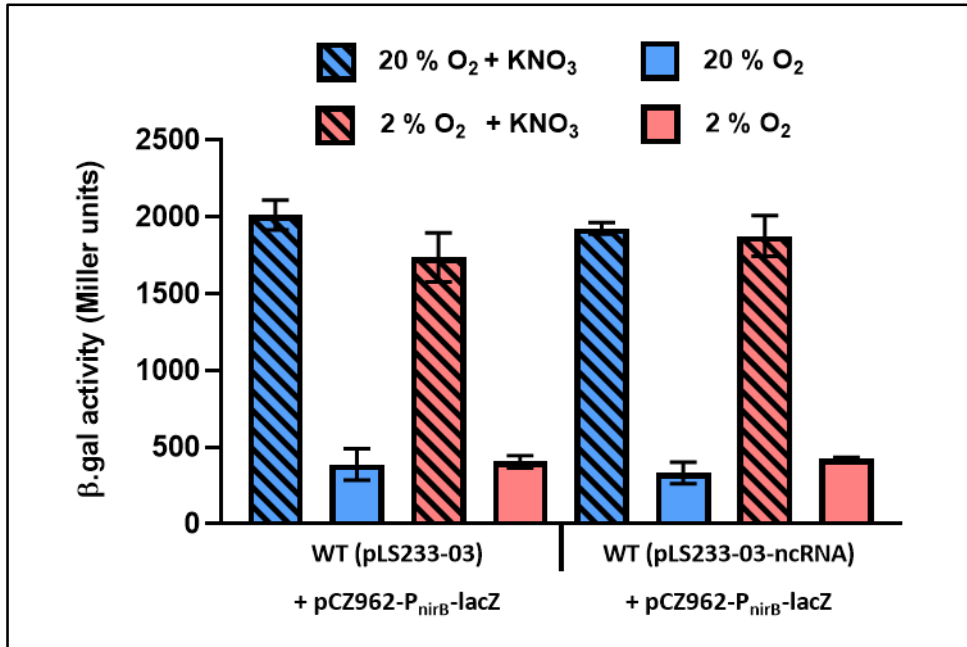


Figure 30 : Effet de la surexpression de l'ARN non codant SMb23331 sur l'activité du promoteur de l'opéron *nirBD narB cysG*.

Les souches d'*E. meliloti* ont été cultivées dans du milieu de Vincent en présence de glutamate comme source d'azote jusqu'en début de phase exponentielle ($OD_{600nm} = 0,2$ à $0,3$) avant d'être placées soit en aérobie, soit en microaérobie, avec ou sans ajout de nitrate (KNO_3 20 mM). L'activité β -galactosidase a été mesurée au bout de 4h dans des souches WT renfermant soit le plasmide pLS233-03, soit ce même plasmide portant l'ARNnc (pLS233-03-ncRNA). Chaque valeur représentée sur ce graphique correspond à la moyenne de quatre valeurs obtenues lors de 2 expérimentations indépendantes avec 2 répétitions techniques. Les barres d'erreurs correspondent à l'erreur standard de la moyenne.

et al., 2010; Schlüter et al., 2013). Une étude a montré la présence d'un certain nombre d'ARNnc anti-sens sur des gènes impliqués dans la fixation d'azote (pSymA). De plus, une diminution de la fixation d'azote a été observée avec une souche d'*E. meliloti* surexprimant l'ARNnc anti-sens SmelA031 (Robledo et al., 2015; Robledo et al., 2020). Ces données nous ont conduit à nous intéresser à l'ARNnc SMb23331 présent en anti-sens du gène *narB* en faisant l'hypothèse qu'il pourrait s'agir d'un mécanisme original de régulation de la voie assimilatrice du nitrate et donc potentiellement de régulation de la synthèse de NO.

Dans un premier temps, nous avons voulu vérifier l'existence du transcrite de SMb23331 et rechercher son niveau d'expression dans nos conditions de culture. Pour cela, nous avons réalisé des expériences de Northern blotting sur des extraits totaux d'ARNs provenant de différentes cultures liquides. Les résultats sont présentés sur la Figure 28. La sonde utilisée (oligonucléotide OCB2010 phosphorylé avec de l'ATP[γ -32]) a permis de détecter la présence de SMb23331 dans nos échantillons de manière spécifique. Aucun signal n'a été détecté pour les échantillons d'ARNs extraits à partir du mutant de délétion de l'opéron *nirBD narB*. Cet opéron étant régulé par la composition en azote du milieu, des ARNs issus de cultures réalisées sans ou avec différentes sources d'azote ont été déposés. Contrairement à ce que nous avons pu observer pour la régulation de l'opéron *nirBD narB*, la transcription de l'ARNnc antisens localisé sur la région de *narB* présente un niveau de transcription constant quelle que soit la condition de culture utilisée ici (en absence d'azote, avec ajout d'ammonium, de nitrate, ou des 2 simultanément). Ces informations suggèrent que cet ARNnc ne serait pas régulé de la même façon que l'opéron codant pour les gènes de la voie assimilatrice. Pour confirmer cela, nous avons construit une fusion transcriptionnelle rapportrice constituée du gène codant pour la β -galactosidase (*lacZ*) placé sous le contrôle du promoteur supposé de SMb23331 pour suivre l'activité de ce promoteur dans différentes conditions de culture. Ces résultats sont représentés sur la Figure 29. Des cultures en phase exponentielle ont été lavées et reprise en milieu sans azote avant d'être placées en aérobie ou microaérobie, puis maintenue ainsi plusieurs heures avec ou sans addition d'ammonium, de nitrate ou de nitrite. Comme présenté ici, nous n'avons pas observé de différence significative de l'activité du promoteur de SMb23331 entre ces différentes conditions, que ce soit en fonction de la teneur en oxygène du milieu ou en fonction des sources d'azote présentes. Des résultats similaires ont été obtenus avec 1h30 et 7h d'incubation (non montrés). Cette expérience n'ayant été réalisées

que 2 fois, elle devra être répétée afin de consolider ces résultats. Toutefois, ces résultats préliminaires sont en accord avec ceux observés précédemment par Northern blot. En conclusion, l'activité promotrice de SMb23331 ne serait pas régulée par la concentration en O₂ ou par les différentes sources d'azote. Ainsi SMb23331 ne serait pas soumis au même schéma de régulation que l'opéron *nirBD narB cysG*.

Afin de pouvoir étudier l'effet de cet ARNnc sur la régulation de la voie assimilatrice, nous avons réalisé une construction permettant de surexprimer cet ARNnc chez *E. meliloti*. Pour vérifier cette construction, nous avons réalisé les mêmes expériences de Northern blot que précédemment (Figure 28). La taille du fragment observé dans les échantillons issus de la souche contenant le plasmide surexprimeur (souche WT + pLS233-03-ncRNA) est similaire à celle observée dans les échantillons issus de la souche WT, ce qui nous permet de valider la construction et la production de cet ARNnc. De plus, la forte différence d'intensité de signal entre la souche WT et la souche contenant le plasmide surexprimeur permet de conclure sur l'efficacité de cette construction. Nous nous sommes alors penchés sur sa potentielle implication dans la régulation de l'opéron codant pour la voie assimilatrice. Dans un premier temps, nous nous sommes posés la question de savoir si la surexpression de cet ARNnc pouvait réguler le promoteur de l'opéron *nirBD narB cysG*. Nous avons donc introduit la fusion transcriptionnelle constituée du gène *lacZ* placé sous le contrôle du promoteur supposé de l'opéron *nirBD narB cysG* dans la souche surexprimant l'ARNnc. Les résultats sont présentés dans la Figure 30. Dans la souche portant le plasmide vide, nous pouvons observer le profil d'activation habituel du promoteur de l'opéron *nirBD narB cysG*, avec une activité *LacZ* élevée, uniquement en présence de nitrate, que ce soit en aérobie ou en microaérobie. La quantification de l'activité *LacZ* dans ces conditions avec la souche surexprimant l'ARNnc a donné des résultats tout à fait similaires. Cette expérience montre que la surexpression de l'ARNnc ne régule pas l'activité promotrice de l'opéron *nirBD narB cysG*, que ce soit en aérobie ou en microaérobie, et cela dans un milieu contenant ou non du NO₃⁻.

Dans un second temps, nous avons voulu connaître le rôle de SMb23331 sur la régulation de la voie assimilatrice de nitrate. Ainsi, nous avons recherché un effet de cet ARNnc sur la croissance d'une souche cultivée en présence de nitrate comme seule source d'azote. L'expérience repose sur l'hypothèse que si SMb23331 a un rôle régulateur sur la voie assimilatrice, la surexpression de l'ARNnc doit réduire l'expression de *narB* et conduire à une

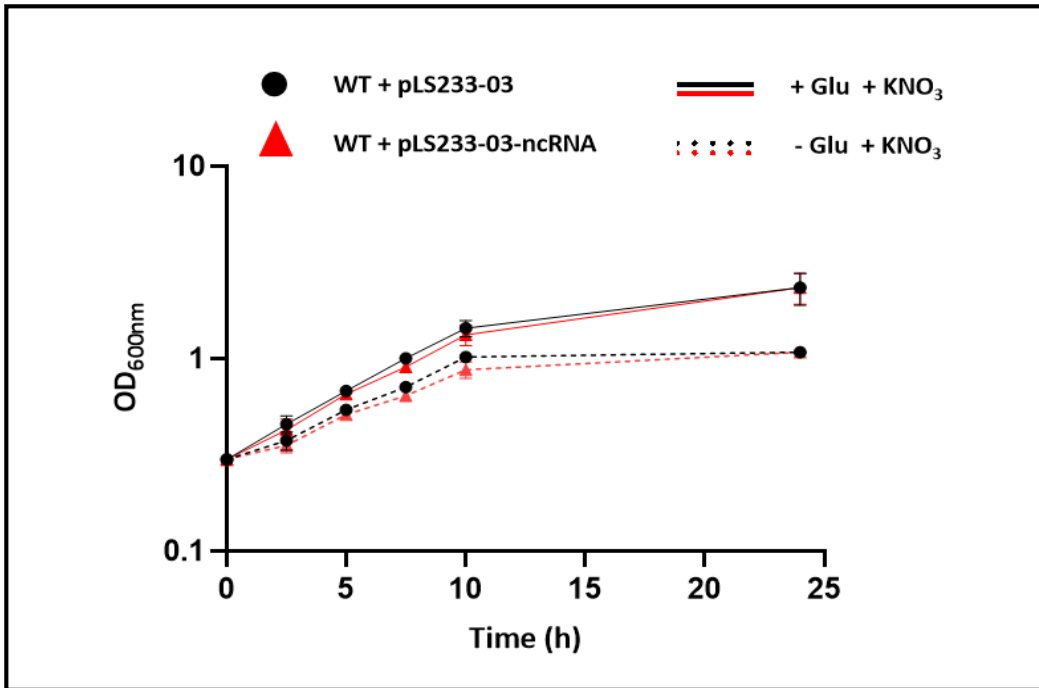


Figure 31 : Effet de la surexpression de l'ARN non codant SMb23331 sur la croissance d'*E. meliloti* en présence de nitrate.

Les souches sauvage (WT + pLS233-03) ou surexprimant SMb23331 (WT + pLS233-03-ncRNA) ont été cultivées en milieu de Vincent contenant du glutamate comme seule source d'azote jusqu'en début de phase exponentielle (OD_{600nm} = 0,2 à 0,3). Les cultures ont alors été centrifugées et les cellules ont été ressuspendues dans le milieu de Vincent contenant soit du glutamate (Glu 10 mM) et du nitrate (KNO₃ 20 mM) soit uniquement du nitrate (KNO₃ 20 mM) comme source d'azote. La croissance de chaque souche a été mesurée sur une période de 24h. Chaque valeur correspond à la moyenne de 3 mesures réalisées lors de 3 expérimentations indépendantes. Les barres d'erreurs correspondent à l'erreur standard de la moyenne.

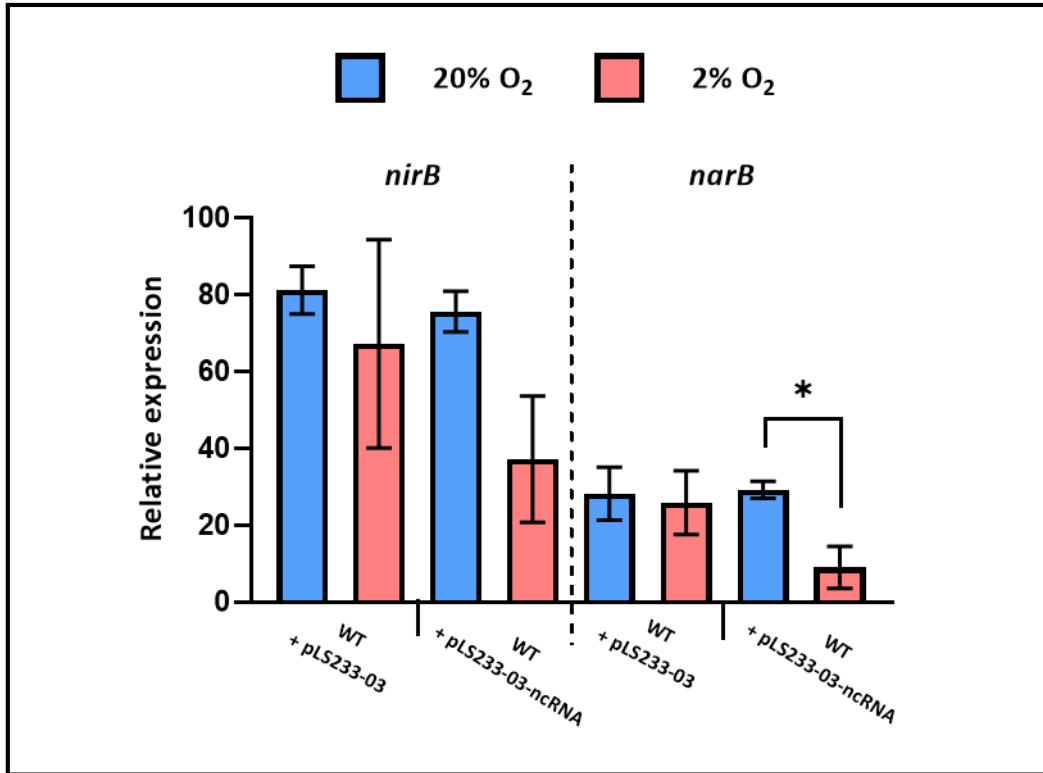


Figure 32 : Effet de la surexpression de l'ARN non codant SMb23331 sur le niveau de transcrits des gènes *nirB* et *narB*.

Les souches ont été cultivées en milieu de Vincent contenant du NH₄Cl (18,7 mM) comme seule source d'azote jusqu'en début de phase exponentielle (OD_{600nm} = 0,2 à 0,3). Les cultures ont alors été centrifugées et les cellules ont été reprises dans le milieu Vincent contenant seulement du nitrate (KNO₃ 20 mM) comme source d'azote. Les cultures ont été placées 1h30 en aérobie ou microaérobie, puis les bactéries ont été collectées par filtration. Les filtres ont été congelés immédiatement dans de l'azote liquide avant de réaliser une extraction d'ARN. Les transcrits des gènes *nirB* et *narB* ont été quantifiés par qRT-PCR. Chaque valeur représente la moyenne des valeurs obtenues pour 3 expérimentations indépendantes avec 2 répétitions techniques par expérimentation. Les barres d'erreurs correspondent à l'erreur standard de la moyenne. Le test statistique utilisé est un test de Student (*, $p < 0,05$).

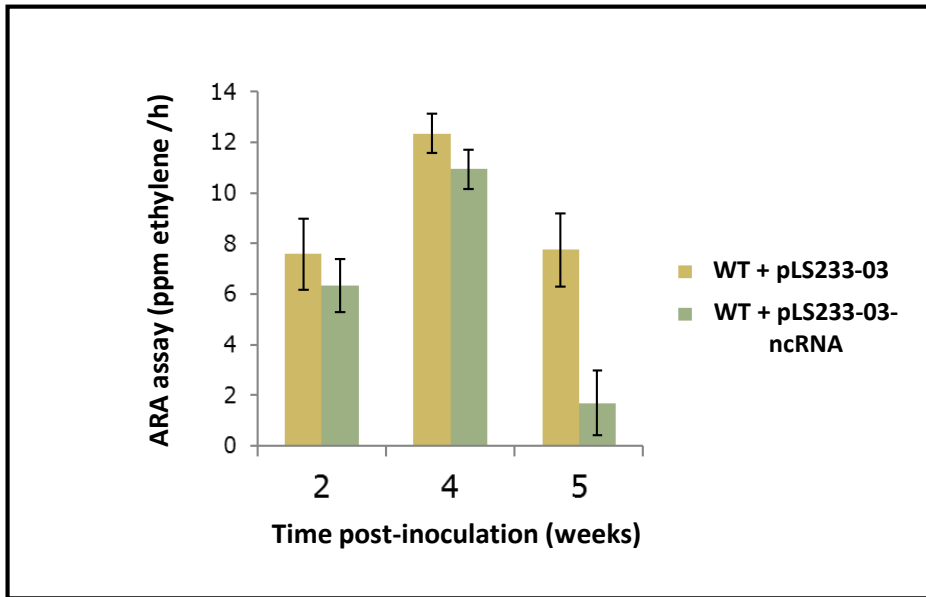


Figure 33 : Effet de la surexpression de l'ARN non codant SMb23331 sur la fixation d'azote.

Les mesures de l'activité de fixation d'azote ont été réalisées par la méthode ARA de réduction de l'acétylène (mesure de l'éthylène produit à partir d'acétylène). Pour cela, nous avons utilisé des plantes entières en interaction symbiotique avec la souche sauvage (WT + pLS233-03) ou surexprimant l'ARN non codant SMb23331 (WT + pLS233-03-ncRNA). Les mesures de fixation ont été réalisées à différents temps après inoculation (2, 4 et 5 semaines après inoculation). Chaque valeur représentée sur l'histogramme correspond à la moyenne de l'activité de fixation d'azote mesurée sur 8 à 9 plantes issues d'une même expérience. Les barres d'erreurs correspondent à l'erreur standard de la moyenne.

diminution de la croissance en présence de NO_3^- comme seule source d'azote. Nous avons comparé la croissance d'une souche sauvage portant le plasmide vide (WT + pLS233-03) avec une souche surexprimant l'ARNnc (souche WT + pLS233-03-ncRNA) dans un milieu contenant du glutamate (10 mM) et du NO_3^- (20 mM) ou seulement du NO_3^- (20 mM) comme source d'azote en condition d'aérobie. Les résultats sont présentés dans la figure 31. Comme attendu, la souche sauvage portant le plasmide vide est capable de pousser avec du nitrate comme seule source d'azote. Dans cette condition, sa vitesse de croissance est légèrement réduite et la phase stationnaire est atteinte à une DO600nm inférieure à celle observable en présence de glutamate. Les courbes de croissances obtenues avec la souche surexprimant l'ARNnc sont parfaitement superposables. Ces résultats montrent donc que ces deux souches ont une croissance similaire. Ainsi, il semblerait que la surexpression de l'ARNnc n'ait pas d'effet sur l'activité de la voie assimilatrice en condition aérobie.

Nous avons ensuite recherché une éventuelle régulation transcriptionnelle des gènes *narB* et *nirB* par l'ARNnc dans différentes conditions (aérobie ou microaérobie). Pour cela nous avons mesuré l'expression par RTq-PCR des gènes *narB* et *nirB* dans une souche WT contenant le plasmide permettant la surexpression de l'ARNnc. La souche WT contenant le plasmide vide a été utilisée comme contrôle. Les résultats sont présentés sur la Figure 32. Les résultats ne montrent pas d'effet significatif de la surexpression de l'ARNnc sur le niveau de transcrite du gène *nirB*, que ce soit en aérobie ou en microaérobie. De même, on n'observe pas d'effet significatif de la surexpression de SMb23331 sur le niveau de transcrite du gène *narB* en condition aérobie. Ce résultat est en accord avec celui observé lors des croissances en aérobie. De façon intéressante, on observe une diminution significative de la quantité de transcrite du gène *narB* lorsqu'on surexprime SMb23331 et cela uniquement en condition de microaérobie. Ces résultats préliminaires suggèrent donc une potentielle régulation négative de *narB* par cet ARNnc uniquement en microaérobie chez *E. meliloti*.

Enfin, nous avons recherché un rôle éventuel de cet ARNnc SMb23331 durant l'interaction symbiotique. Pour cela nous avons inoculé des plantules de *M. truncatula* avec la souche sauvage portant le plasmide surexpresseur vide (WT + pLS233-03) ou la souche surexprimant l'ARNnc (WT + pLS233-03-ncRNA) et avons observé différents paramètres : le nombre de nodules, le pourcentage de nodules sénescents ainsi que la fixation d'azote. La cinétique de nodulation et le pourcentage de nodules sénescents étaient similaires pour les

deux souches en interaction avec *M. truncatula* (non montré). Les résultats obtenus pour les mesures de la fixation d'azote sont présentés sur la Figure 33. Le niveau de fixation n'est pas apparu différent entre la souche portant le plasmide vide et la souche surexprimant l'ARNc sur les premiers points réalisés, à 2 et 4 semaines post-inoculation. En revanche, les nodules renfermant la souche surexprimant l'ARNc montrent une fixation d'azote réduite par rapport à celle mesurée sur des nodules contenant la souche WT portant le plasmide vide 5 semaines après inoculation. Cependant la différence observée n'est pas statistiquement significative. La répétition de cette expérience préliminaire sera nécessaire pour valider ou non l'effet négatif de la surexpression de SMb23331 sur la fixation d'azote.

En conclusion, *E. meliloti* possède une voie fonctionnelle d'assimilation du nitrate (codée par l'opéron *nirBD narB cysB*). Cette voie lui permet de pouvoir utiliser uniquement le NO_3^- pour synthétiser du NH_4^+ nécessaire à sa croissance. De plus, cette voie participe indirectement à la synthèse de NO en microaérobie en permettant probablement la production d'une quantité plus importante de nitrite. Afin d'être réduit en NO par NirK, le nitrite doit être transporté du cytoplasme vers le périplasma par l'intermédiaire d'un transporteur de nitrate/nitrite. Le produit du gène SMb20436 serait impliqué dans le transport de nitrite et pourrait donc avoir une fonction similaire à celle du transporteur NarK de *B. diazoefficiens*. Ce transporteur putatif pourrait aussi être impliqué dans le transport du nitrate périplasmique vers le cytoplasme, un prérequis pour la réduction du NO_3^- en ammonium dans le cytoplasme. La voie assimilatrice serait soumise à plusieurs systèmes de régulation dont la répression par l'ammonium et l'induction par le NO_3^- . La régulation spécifique par le NO_3^- serait effectuée par le régulateur à deux composants NasS-NasT. De plus, cette voie pourrait être également régulée par un mécanisme peu étudié, impliquant un ARNc en anti-sens de la séquence du gène *narB*. Cet ARNc serait potentiellement impliqué dans la régulation de l'expression ou la dégradation du transcrit *narB* en microaérobie. Dans le nodule, cet ARNc a un profil de régulation inverse à *narB* (Figure 27), avec une expression élevée en zone II et une forte baisse en zone III. Il est possible que dans le nodule en zone III, où les bactéries se trouvent dans un environnement pauvre en oxygène, la surexpression de SMb23331 ait un impact négatif sur l'expression de *narB* qui est normalement induit en zone III. Il sera intéressant de quantifier l'expression de ces 2 gènes dans des nodules infectés par la souche surexprimant SMb23331 en effectuant les mesures sur des nodules coupés en deux,

permettant une séparation de la zone distale I/II de la zone proximale III/IV. De façon intéressante, cet ARNnc pourrait participer à la régulation de la fixation d'azote dans des nodules matures au cours de l'interaction entre *M. truncatula* et *E. meliloti*. Ce phénotype reste à confirmer mais il soulève la question du mode d'action de la surexpression de SMb23331 sur le niveau de fixation d'azote à des temps tardifs.

2. Une NO synthase est-elle impliquée dans la synthèse du NO chez *E. meliloti* ?

Publication N°2: Rhizobia: highways to NO. Ruiz B, Frostegård Å, Bruand C, Meilhoc E. Biochem Soc Trans. 2021.

Nous avons pu voir précédemment que chez *E. meliloti*, seule la nitrite réductase NirK (voie de dénitrification) a la capacité de synthétiser du NO, et seulement en condition microaérobie. Plus précisément, le nitrite réduit par NirK peut provenir de la réduction du NO₃⁻ par la nitrate réductase NapA (voie de dénitrification) et par la nitrate réductase NarB (voie d'assimilation). Chez les mammifères, le NO est synthétisé par des NO synthases (NOS) capables d'oxyder l'arginine en citrulline et NO. Certaines bactéries comme *Bacillus subtilis* ou *Staphylococcus aureus* possèdent des enzymes (bNOS) qui permettent la synthèse de NO à partir d'arginine. Les bNOS sont une forme tronquée mais fonctionnelle des NOS des mammifères. En effet, elles partagent avec elles une forte homologie du domaine oxygénase et un mécanisme catalytique similaire. Mais elles ne possèdent pour la plupart pas de domaine réductase propre et fonctionneraient donc grâce à une association avec d'autres réductases présentes dans la cellule (Gusarov et al. 2008).

Chez *E. meliloti*, aucun gène codant pour une bNOS n'a été détecté dans le génome (Santolini, 2019). Cependant une étude de 2007 avait montré la présence d'une activité NO synthase chez *E. meliloti* (Pii et al., 2007). Dans ces travaux, les auteurs avaient utilisé de l'arginine radio-marquée pour permettre la détection d'une activité bNOS. Pour cela, le produit de la réaction était purifié par chromatographie sur une colonne échangeuse d'ions.

Cette séparation avait pour intérêt de séparer l'arginine radio-marquée du produit de la réaction lui aussi radio-marqué. Après séparation, la radioactivité est mesurée directement par un compteur à scintillation. La spécificité de cette technique a été remise en cause du fait de l'absence de contrôle de la nature du produit récupéré. En effet, dans le cas de l'oxydation de l'arginine par une NOS, seule de la citrulline radio marquée devrait être présente au moment du dosage, cependant d'autres produits pourraient être présents et fausser les résultats de l'analyse. Des expériences ont permis de démontrer que l'activité détectée par cette technique chez *Arabidopsis* était un artefact réactionnel (Tischner et al., 2007). En effet, les auteurs ont montré que le produit de la réaction était de l'arginosuccinate et non de la citrulline, probablement produit à partir de fumarate par la plante. En effet, chez la bactérie *E. coli* où aucune activité bNOS n'est détectée, l'ajout de fumarate permet ainsi la détection d'un produit radio marqué (Tischner et al., 2007). Au vu des problématiques engendrées par l'utilisation de cette technique et dans le but d'explorer tous les systèmes permettant à *E. meliloti* de synthétiser du NO, nous avons donc voulu vérifier si une bNOS pouvait permettre la synthèse de NO dans nos conditions de culture.

Review Article

Rhizobia: highways to NO

Bryan Ruiz¹, Åsa Frostegård², Claude Bruand¹ and Eliane Meilhoc¹

¹Laboratoire des Interactions Plantes-Microbes-Environnement (LIPME), Université de Toulouse, INRA, CNRS, INSA, 31326 Castanet-Tolosan, France; ²Faculty of Chemistry, Biotechnology and Food Sciences, Norwegian University of Life Sciences, Ås, Norway

Correspondence: Eliane Meilhoc (Eliane.Meilhoc@inrae.fr)

The interaction between rhizobia and their legume host plants conduces to the formation of specialized root organs called nodules where rhizobia differentiate into bacteroids which fix atmospheric nitrogen to the benefit of the plant. This beneficial symbiosis is of importance in the context of sustainable agriculture as legumes do not require the addition of nitrogen fertilizer to grow. Interestingly, nitric oxide (NO) has been detected at various steps of the rhizobium–legume symbiosis where it has been shown to play multi-faceted roles. Both bacterial and plant partners are involved in NO synthesis in nodules. To better understand the role of NO, and in particular the role of bacterial NO, at all steps of rhizobia–legumes interaction, the enzymatic sources of NO have to be elucidated. In this review, we discuss different enzymatic reactions by which rhizobia may potentially produce NO. We argue that there is most probably no NO synthase activity in rhizobia, and that instead the NO₂⁻ reductase *nirK*, which is part of the denitrification pathway, is the main bacterial source of NO. The nitrate assimilation pathway might contribute to NO production but only when denitrification is active. The different approaches to measure NO in rhizobia are also addressed.

Introduction

Rhizobia is a common term for bacteria capable of forming a nitrogen-fixing symbiosis with leguminous plants, but they are also commonly found as free-living organisms in soils. They are Gram-negative bacteria belonging to the alpha- and beta-proteobacteria. Currently, 18 genera of rhizobia have been described, including *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* and *Sinorhizobium* [1,2]. Under nitrogen-limiting conditions, the legume–rhizobia symbiosis improves the growth capacity of the plants as the rhizobial microsymbiont reduces atmospheric dinitrogen to ammonia, which can be assimilated by the plant. In exchange, the plant provides an ecological niche to the bacteria, which obtain protection from predation, desiccation and energy in the form of photosynthates. The amounts of N fixed by the legume–rhizobial symbiosis were estimated to 115 kg N per ha per year for legume crops and 110–227 kg N per ha per year for pastures and fodder legumes. For comparison, the amounts fixed by endophytic, associative and free-living bacteria in crop lands, including sugar cane cultivations but excluding legume and rice fields, were estimated to <30 kg N per ha per year [3]. Thus, intercropping practices or the inclusion of legumes in crop rotations have the potential to substantially reduce the dependence on fertilizer in crop production [4]. This is one reason why this symbiosis has been the focus of many studies aiming both at understanding the sophisticated molecular mechanisms underlying the complex interactions between bacteria and legumes, and at improving and expanding these interactions in the frame of sustainable agriculture.

The nitrogen fixation takes place inside specialized nodules that are formed on the root or, in some cases, on the stems of the host plants. Nodule formation is induced by the rhizobia and involves a highly specialized signalling system, followed by morphological changes both in the plant tissue and in the rhizobial microsymbiont, recently reviewed by Poole et al. [5]. The symbiotic interaction starts with the production of flavonoids by the plant, which attract specific rhizobia. In response, the bacteria produce nodulation factors (Nod factors) which, if recognized by the partner plant, lead to infection of the plant and the development of new nodule primordia on the roots. Once delivered in this

Received: 16 October 2020
 Revised: 6 January 2021
 Accepted: 7 January 2021

Version of Record published:
 5 February 2021

newly formed organ the rhizobia proliferate and part of the population starts to differentiate into bacteroids. Bacteroids differ in their morphology compared with their free-living counterpart, and are able to fix N owing to their production of nitrogenase, an enzyme complex that catalyzes the reduction of N₂ to NH₃. The nodule displays a microaerobic environment which prevents the nitrogenase from being denatured by oxygen. This is made possible by the presence of an oxygen barrier in the outer cell layers of the nodule and of the plant leghe-moglobin, a major hemoprotein with a high oxygen affinity. Bacteroids possess respiratory oxidases with high affinity for oxygen, which allow respiration and energy production even in conditions of oxygen limitation.

In both lifestyles, i.e. free in the soil or as bacteroids within the nodules, rhizobia are exposed to nitric oxide (NO) [6–9]. NO is a ubiquitous gasotransmitter which is involved in many processes in animal and plant cells, including their responses to pathogens [10–14]. The presence of NO during the legume–rhizobium symbiosis has been reported for about 15 years. Part of the NO present in the nodule is produced by rhizobia thanks to the denitrification pathway which converts nitrate to dinitrogen, with NO as an intermediary reaction product [15,16]. NO is a potent inhibitor of diverse cellular processes including cell growth and as such it is part of the arsenal of defense mechanisms that animal cells use against pathogens [12]. Hence, it was intriguing to discover that several bacterial species such as rhizobia, but also pathogenic bacteria, produce NO. In Gram-positive pathogenic bacteria, NO production is catalyzed by enzymes called bacterial NO synthases (bNOs). Although their structure is different, bNOs function as mammalian NOS and can convert arginine to citrulline and NO [17,18]. Emerging functions of endogenous NO in pathogens include its ability to respond as cellular antioxidant, modulate bacterial respiration and post-translationally regulate the function of several bacterial and host proteins [17,19–23]. These functions have significant consequences on host–pathogen interactions in addition to affecting bacterial physiology [17].

Even though we start to have some clues about the role of NO of bacterial origin in pathogenic interactions, its role in symbiotic interactions is still enigmatic. This short review aims at examining the sources of NO in rhizobia and discuss the possible roles of this molecule during the symbiotic interactions.

How to assess NO production in bacteria?

The unique chemical and physical properties of NO, such as its rapid diffusion, short half-life and high reactivity, impose challenges for analytical techniques for monitoring NO in any type of cell or tissue. Furthermore, NO concentrations may vary by several orders of magnitude, from pM to μM, implying that techniques with wide dynamic response ranges have to be used. Each approach has advantages and pitfalls, and usually, several techniques for NO quantification must be used in a single study to achieve the best possible accuracy. In addition, the peculiarity of rhizobia is to live either as free-living organisms or inside plant root nodules, which brings an even more complex scenario as not all the approaches can be used to detect NO in both lifestyles.

Among the most common techniques for the detection of NO are those based on fluorescence detection, and a range of fluorescence-based probes are available. They are particularly useful for monitoring the spatial and temporal aspects of NO production. Diaminofluoresceins (DAFs), first described by Kojima et al. [24] in 1998, are among the most widely employed NO-sensitive fluorescent probes. Upon reaction with a byproduct of NO (i.e. N₂O₃), the fluorescence intensity of the DAF probes increases by ~100-fold. The NO produced by bacteria can be quantified using the fluorescent non-permeable probe DAF-2 or the permeable DAF-FM diacetate [25,26]. Fluorescence emitted is then measured with a spectrofluorimeter and generally expressed as fluorescence/cell number (OD₆₀₀). Different controls are required to evaluate the non-specific fluorescence signal, such as using a NO scavenger (cPTIO) or a bacterial strain that overexpresses a NO degrading enzyme (Hmp), since lack of specificity is described as a drawback of this technique. Chemiluminescence based techniques are also widely used [27,28]. They are based on the reaction of NO with ozone (O₃) to produce excited state nitrogen dioxide. The emitted light, of which the intensity is proportional to the amount of NO in the reaction cell, is measured with a photomultiplier tube (PMT). The analysis range for solutions, the excellent sensitivity and near-real-time monitoring of NO have resulted in chemiluminescence being widely employed for NO detection in the bacterial culture medium. A sophisticated version is a robotized incubation system [29] which includes a chemiluminescence based NO analyzer and a gas chromatograph for quantification of several other gases including O₂, N₂O, N₂, CO₂, H₂ and CH₄. The system, which measures NO at low nM concentrations, provides high-resolution gas kinetics from growing bacterial cultures, and can also be used for studies of soil or wastewater microcosms [30–32]. Another common approach for real-time monitoring of NO in bacterial cultures is based on electrochemical measurements using NO sensors. One advantage with this technique, which has been successfully used to assess NO production in rhizobia, is its amenability to miniaturization which allows

measurements in small volumes of cell culture [33,34]. Moreover, the selectivity and sensitivity of the measurements can be enhanced via electrode modification. The major challenge when using electrochemical NO sensors is to reduce the signal generated by common interferences such as oxygen, nitrite and carbon monoxide.

Finally, genetics-based approaches using reporter genes have been employed to assess the amount of NO produced by bacteria. This has been used both for *Sinorhizobium meliloti* and *Bradyrhizobium japonicum*, into which a plasmid was inserted carrying the *lacZ* reporter gene (encoding β -galactosidase) placed under the control of promoters known to be specifically induced by NO [33,35]. Even though this is an indirect approach it is a simple and reproducible method which does not require sophisticated equipment and can be used in free-living cells and in the bacteria located inside legumes nodules. Also, this approach is of great interest to analyze the spatio-localization of NO-producing rhizobia inside the nodule [36].

Denitrification: the major NO-producing process in rhizobia

Denitrification is an alternative form of respiration in bacteria which consists in the reduction of nitrate (NO_3^-) to nitrogen gas (N_2) under oxygen limiting conditions. Denitrification is widely distributed within the domain of bacteria and the majority of denitrifiers are found in the phylum Proteobacteria [36,37]. The denitrification process requires four separate enzymatically catalyzed reactions, and NO is produced as an intermediate of this pathway (Figure 1). In the two model rhizobia *B. japonicum* and *S. meliloti*, which are probably the best-documented rhizobia, the first reaction of denitrification is catalyzed by a periplasmic nitrate reductase (NapA, part of the heteromeric NapAB complex encoded by *napAB*), which reduces nitrate to nitrite [38–41]. *S. meliloti* has for long been considered as an incomplete denitrifier due to its inability to grow anoxically using nitrate as respiratory substrate to produce ATP. It was shown recently that this inability is attributable to a limitation in the expression of the periplasmic nitrate reductase Nap, which was compensated by overexpressing the *napEFDABC* operon in the cells [34]. The second step of the denitrification process is the reduction in

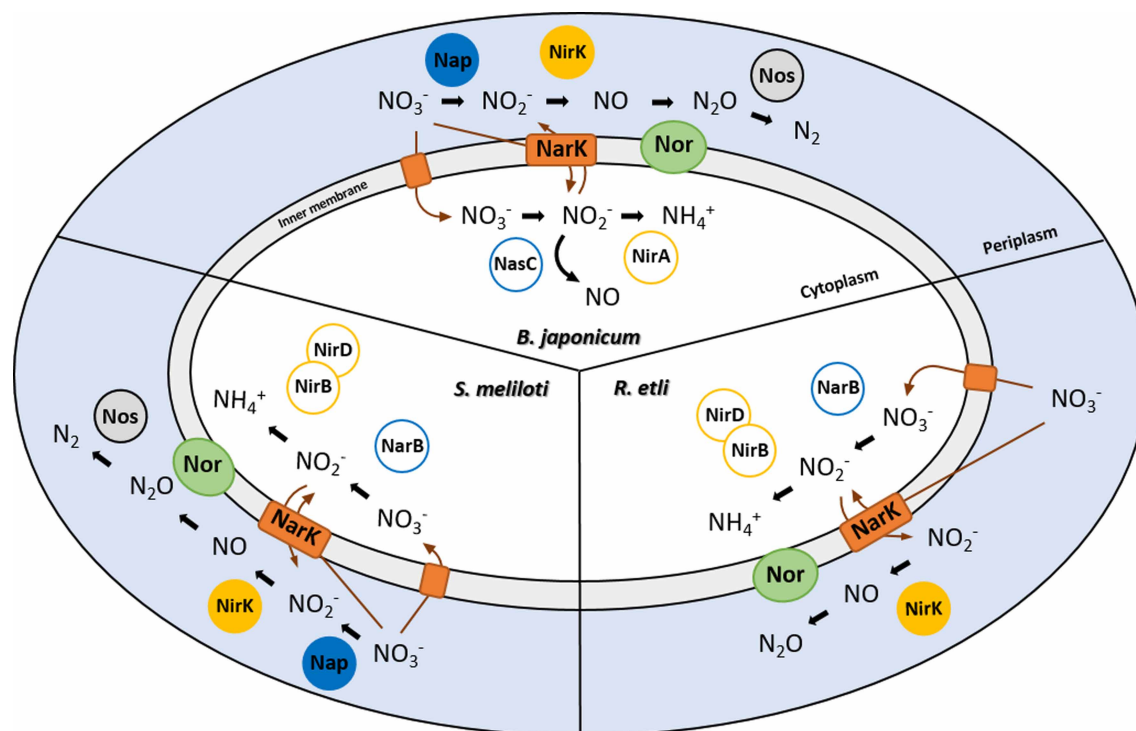


Figure 1. Schematic representation of NO production pathways in different rhizobia.

NO synthesis is shown in *B. japonicum*, *S. meliloti*, *R. etli*. The denitrification pathway is located in the periplasm (blue). The nitrate assimilation pathway is located in the cell cytoplasm. The different enzymes are shown in the circles: nitrate reductases (blue), nitrite reductase (yellow), nitric oxide reductase (green) and nitrous oxide reductase (black). Circles are fully coloured or empty for the denitrification or assimilation enzymes, respectively. The nitrate/nitrite transporter (NarK) is shown in orange.

nitrite to NO, catalyzed by the periplasmic, copper-containing nitrite reductase NirK. Recently, the cytochrome *cd1* nitrite reductase (*cdNiR*) encoded by *nirS* was found in the genome of two *Bradyrhizobium* strains (*B. nitroreducens* TSA1 and *B. oligotrophicum* S58) [42,43]. This finding was rather unexpected as denitrifiers generally carry either NirK or NirS but seldom both types. In *B. oligotrophicum* S58, both genes were activated by low oxygen conditions, probably via FNR-like regulators. The expression of *nirS* was markedly higher in microaerobic conditions as compared with *nirK* and, interestingly, *nirS* was also expressed in aerobiosis. In *B. oligotrophicum* S58, a redundant role for *nirK* and *nirS* genes has been shown in denitrification [42]. In that particular strain, NO production has not been tested but if NirS is expressed it might also contribute to NO production.

In the third enzymatic step of the pathway, NO is reduced to nitrous oxide (N₂O) by the cytochrome *c* dependent NO reductase NorB (part of the NorCB complex encoded by *norCB*). The final step is the reduction of N₂O to dinitrogen gas performed by the nitrous oxide reductase (Nos), a periplasmic copper-containing soluble protein encoded by *nosZ*. The detection of measurable amounts of NO in the cells suggests that degradation of NO by the NO reductase, or by other degrading enzymes such as the flavohemoglobin Hmp, is less effective than its synthesis. The NO reductase Nor permits the complete degradation of NO in denitrifying bacteria [44]. We recently analyzed the denitrification kinetics of *S. meliloti* 2011 cultures (Figure 2). A robotized incubation system was used to allow frequent gas measurements [29]. The procedure was as described by Bueno et al. [45] and Mania et al. [46]. NO production took place upon inoculation into micro-oxic vials, thus in the presence of 15 μM O₂, and reached a maximum of 340 nM after which the NO levels decreased gradually while N₂O increased. This was followed by N₂ production which reached a plateau when all available N-oxides had been reduced. The NO produced by chemical decomposition of NO₂⁻ was only ca 1% of the total NO production, meaning that enzymatic activity led to substantial NO production. Interestingly, Bueno *et al.* [45] reported that the closely related strain *S. meliloti* 1021 showed a different denitrification phenotype under similar conditions, and was unable to perform the efficient transition from aerobic respiration. This strain started to produce NO when O₂ reached 3 μM and then showed a low linear NO production but with no detectable reduction of this NO, as seen from lack of N₂O and N₂ production [45].

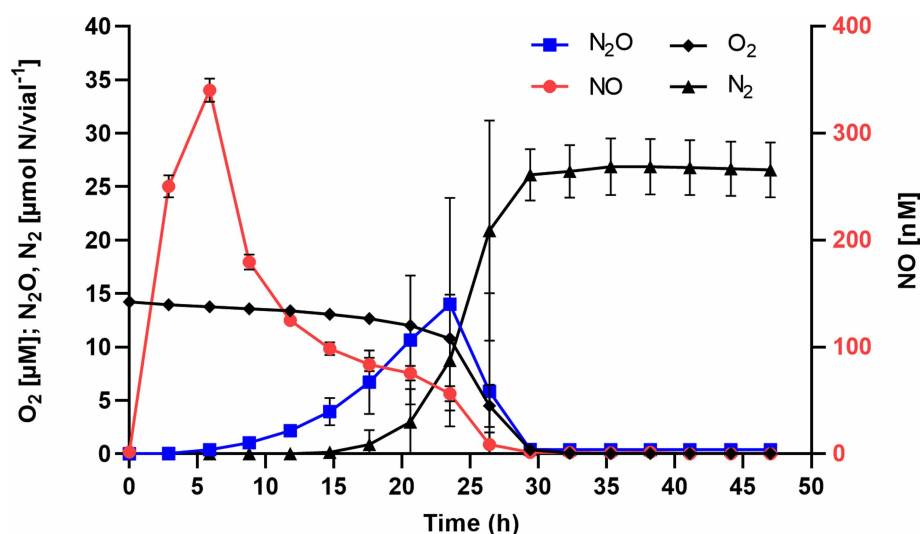


Figure 2. Kinetics of NO production in *S. meliloti* 2011.

Denitrification kinetics of *S. meliloti* 2011 (WT) during the transition from aerobic to anaerobic respiration were evaluated. A robotized incubation system was used that allowed frequent gas measurements. NO was measured using a chemiluminescence based NO analyzer, while O₂, N₂O and N₂ were quantified using a gas chromatograph [29]. The procedure was as described by Bueno et al. [45] and Mania et al. [46]. Briefly, the cultures were raised aerobically, then transferred to sealed vials (initial OD₆₀₀ 0.01) containing He and 0.5% O₂ in headspace (15 μM O₂ in the medium) and 50 ml medium supplemented with 0.5 mM NO₂⁻. The cultures were vigorously stirred at 700 rpm to optimize gas exchange. Average values (*n* = 3) are shown; bars indicate standard deviation.

Though NO is just an intermediate in the pathway, several reports suggest that rhizobial denitrification is the main driver to NO production. Indeed a genetic approach using *S. meliloti* mutant strains showed that the amount of NO dropped to almost zero in a *nirK* mutant showing that NO is mainly produced by the reduction of nitrite. Also, NO was not detectable in *S. meliloti* cultivated in the absence of nitrate or nitrite [25].

Denitrification is also a source of NO in symbiotic conditions. Even though both plant and bacteroids participate in NO production, the relative contribution of each partner varies between different legume-rhizobium models. In the *S. meliloti*–*Medicago truncatula* symbiosis the bacteria produce ~35% of the detected amount of NO, while reduction of nitrate by *B. japonicum* bacteroids contributes to ~90% of NO production within soybean nodules in response to hypoxia [16,47,48]. For both rhizobia, these results were obtained by measuring the NO level in nodules infected by bacterial strains with a disrupted denitrification pathway (*napA* or *nirK* deficient mutants). Hence the bacterial contribution in NO production could have been underestimated if other sources of NO exist in these bacteria.

Maximal expression levels of the genes involved in denitrification require both low oxygen and the presence of nitrate [40,49]. Hence denitrification depends on transcriptional regulators which are able to perceive and integrate these environmental signals into regulatory networks which might be organized slightly differently in various rhizobia. In *S. meliloti* NO production via denitrification is mainly controlled by FixLJ/FixK (which respond to oxygen depletion) and by NnrR which responds to the presence of NO [50,51].

The nitrate assimilatory pathway contributes to NO production in rhizobia

As described above, denitrification is most likely the unique source of NO found in rhizobia. However, Sanchez and colleagues have shown that in bacteroids of a *B. japonicum nirK* mutant a high nitrate reductase activity was still detected, suggesting that there is an alternative way to reduce nitrite since nitrite is highly toxic for bacteria [48]. From this observation emerged the idea that the nitrate assimilation pathway, and in particular the assimilatory nitrite reductase, could be functional in bacteroids. The assimilation pathway is found in many heterotrophic bacteria [52]. Several studies have recently been carried out in rhizobia to understand the implication of the nitrate assimilation in NO synthesis [25,33,53]. The contribution of the nitrate assimilation pathway to NO production was first studied in *B. japonicum*. In these bacteria, the assimilation pathway is principally composed of the NAD(P)H-dependent cytoplasmic nitrate reductase (NasC), reducing nitrate to nitrite and the periplasmic ferredoxin (Fd)-dependent nitrite reductase (NirA), reducing nitrite to ammonium. This pathway allows the cells to grow with nitrate as the sole nitrogen source. M. Delgado's group described a new model where NasC could be involved in NO production in two possible ways: either producing NO itself by a yet unknown mechanism or generating nitrite feeding the denitrification pathway [33]. This last hypothesis requires a nitrate/nitrite transporter (NarK) to deliver the nitrite from the cytoplasm to the periplasm. In *B. japonicum*, *nasC* and *nirA* genes are present in two different operons separated by ~2 Mb. This organization is different in *S. meliloti* and *Rhizobium etli* where the assimilation genes are located in the same operon [25]. Indeed, the assimilatory pathway of these two bacteria is composed of a NAD(P)H-dependent nitrate reductase (NarB) and a siroheme-dependent assimilatory nitrite reductase (NirBD). Additionally, in *R. etli*, the *narK* transporter gene is located in the same operon.

Recently, the nitrate assimilation pathway was shown to also be involved in NO production in both these model bacteria [25,53]. In *S. meliloti*, the assimilation pathway contributes to NO production by providing nitrite from nitrate reduction (NarB) to the denitrification pathway (NirK). The assimilation pathway produces nitrite in aerobic or microaerobic condition, however, NO production only occurs in microaerobic conditions when denitrification is active. The contribution of the nitrate assimilation pathway to NO production in association with the denitrification pathway in *R. etli* is of special importance as *R. etli* does not have *nap* genes (Figure 1). Hence, the nitrate reductase NarB is necessary to generate nitrite as substrate for the nitrite reductase NirK. NO produced by NirK is then reduced to N₂O by the NO reductase NorCB [53].

In *B. japonicum*, the assimilation pathway (including *nasC*) is regulated by a two-component system composed of a nitrate binding sensor NasS and an ANTAR-Family protein NasT [33,54,55]. In the absence of nitrate, NasST is a heterotetrameric complex. When nitrate is present, it will bind to NasS and allow the release of NasT which, in turn, will activate the transcription of assimilatory genes. NasST also regulates *nap* and *nos* genes in *B. japonicum* [56]. Homologues of *B. japonicum* NasS and NasT were found in the *S. meliloti* genome, and they were shown to be involved in the regulation of *narB* expression (B. Ruiz, unpublished). The contribution of the assimilation pathway to NO production appears now as a common feature in rhizobia.

Nevertheless, the assimilation pathway is unlikely to produce NO on its own, but rather through a coupling with the denitrification pathway [25].

Is there a NO synthase in rhizobia?

It has long been known that NO synthases (NOS) are the enzymatic sources of NO in mammals [18]. These enzymes catalyze two sequential oxidation reactions of L-arginine into NO and citrulline. With the rapid evolution of sequencing technologies, the presence of genes encoding putative NOS-like proteins has been identified in many other genomes. Homologous sequences were found at first in many bacteria such as *Bacillus subtilis* or *Staphylococcus aureus* [57–59]. This new protein family was labelled ‘bacterial NOS-like proteins’ as they corresponded to a severely truncated form of the mammalian NOS. The pattern in plants has been more puzzling. Indeed, a NO synthase has been searched for during more than two decades [60,61]. First, several studies provided evidence that protein extracts from plants display a NOS-like activity [62]. In 2007, it was then reported that the L-citrulline-based assay commonly used to measure a NOS activity in plant extracts was likely to cause artefacts [63]. This assay measures the conversion of radiolabelled arginine to radiolabelled L-citrulline. Cation exchange chromatography is used to separate the labelled substrate from the labelled product. Radioactivity in the eluate is measured in a scintillation counter assuming it contains the positively charged citrulline without verifying the identity of the product. Hence any other labelled arginine derivative found in the unbound fraction will give a signal causing a possible artefact in the method. A recent work closed the debate about the existence of a plant NOS as the data revealed that land plants do not possess animal NOS-like enzymes, while a few algal species do [64].

To date, the only work describing the measurement of NOS activity in rhizobia is the work of Pii and co-workers [65]. Their results were based on the citrulline assay described above, and the identity of the product was thus not examined. As the presence of a NO synthase activity is still recalled in the recent literature based on this unique work, we decided to revisit the existence of a NO synthase activity in *S. meliloti* in light of our present knowledge. The bacteria were cultured under aerobic or microaerobic conditions, in the presence of arginine, and production of NO was determined by using the NO-specific fluorescence probe (DAF-FM). No significant amount of fluorescence was detected in any of the conditions tested (Figure 3). There is some consensus that tetrahydrofolate (FH4), a molecule that is closely related to BH4, may be used as a cofactor for bNOS *in vivo*. However, it has also been suggested that these molecules may not necessarily be the physiological cofactors of bNOS [17]. Hence, although we cannot completely exclude that a cofactor might be limiting in our experimental conditions, *S. meliloti* most likely does not possess a NO synthase activity. Furthermore, a recent screening for NOS-like proteins in the Eubacteria and Archaea kingdoms showed that NOS were rarely found in Proteobacteria and that only few NOS-like enzymes were detected in some members of this group, such as Sphingomonadales, Rhodospirillales, Sneathiellales and Rhodobacterales. NO synthase was not found in *S. meliloti* nor in other Rhizobiales ([18] and J. Santolini, Personal communication). Taken together, it seems unlikely that rhizobia possess a NO synthase activity.

Concluding remarks

NO is an important and ubiquitous molecule which has been studied for more than 30 years in a wide range of organisms. Even though NO was first mostly considered as a weapon of the plant or mammal cells against invading bacteria we now have evidence that NO is also produced via a NO synthase enzyme by some pathogenic organisms themselves, which is intriguing as NO induces bacteriostasis (for a review see [17]). Diverse roles of this bacterial NO have emerged such as a cytoprotective effect against oxidative stress or a role in the transition of cells from oxygen to nitrate-dependent respiration [17,19,20]. Production of endogenous NO derived from bacterial NOS activity has also been linked to post-translational modifications (S-nitrosylation and nitration) of proteins. Endogenous NO from *Bacillus* species is thought to S-nitrosylate bacterial and host proteins and modify their activity [22,23]. Hence b-NOS may not only influence the bacterial physiology but also the host biology to facilitate host infection.

Detection of NO in legume–rhizobium symbiotic interactions was intriguing as rhizobia are friendly microbes for their hosts. The finding that rhizobia could participate to NO production during the symbiotic interaction is puzzling as well. In addition, it is astonishing that NO can be detected in the nodules as several NO degrading enzymes exist in the bacteria, such as Nor (part of the denitrification pathway) and the flavohaemoglobin Hmp, as well as in the plant, which possesses several phytohemoglobins [36,50,66–68].

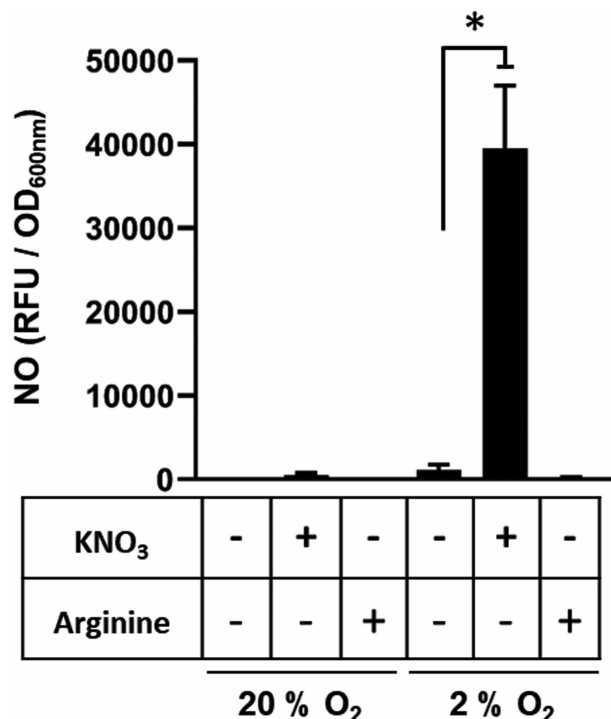


Figure 3. Nitric oxide production by *S. meliloti* in the presence of different substrates.

S. meliloti WT 2011 strain was grown exponentially at 28°C in VMM containing NH₄Cl (OD₆₀₀ = 0.2–0.3). KNO₃ (20 mM) or arginine (5 mM) was added to the cultures. Cultures were either kept at 28°C under agitation (aerobic conditions, 20% oxygen) or left without agitation under 2% oxygen (microaerobic conditions) for 1.5 h. Samples were collected to measure NO production. The amount of NO produced by the bacteria and released in the culture medium was quantified using the fluorescent non-permeable probe DAF-FM. Fluorescence was measured using a fluorimeter (excitation wavelength 485 nm/ emission wavelength 520 nm). NO produced is expressed as relative fluorescence unit (RFU)/OD₆₀₀ nm. Average values obtained from four independent experiments are shown, bars indicate standard error. Statistical analysis was performed by means of a Welch's t-test. * Indicates a significant difference ($P < 0.05$) with the wild-type strain (WT) in absence of nitrate or arginine.

Unlike many pathogenic bacteria, rhizobia do not possess b-NOS encoding genes [18]. NO is produced mostly through the denitrification pathway, which is functional when cells are grown in culture under microaerobic conditions in the presence of nitrate or nitrite, in soils or inside nodules. On the other hand, NO production through denitrification is not confined to friendly microbes. Indeed, NO is also produced via denitrifying enzymes in *Brucella abortus*, a Gram-negative pathogen belonging to α -Proteobacteria. Interestingly, it has been shown that NO can be used by these bacteria to modulate IL-1 β secretion in infected murine macrophages [69].

The nitrate assimilation pathway has been shown to contribute to NO production in several rhizobia, probably by producing nitrite which can be used by the periplasmic nitrite reductase to produce NO [25,33,53]. However, it is not known whether it works the same way in nodules. In *B. japonicum* it has been shown that the nitrate reductase activity is reduced by 90% in bacteroids carrying a *napA* mutation, which suggests that the contribution of the assimilatory nitrate reductase could be minor in *B. japonicum* nodules. It is unlikely that rhizobia have a bNOS activity and NO is probably only produced under conditions of oxygen deprivation in the presence of nitrate or nitrite. The origin of nitrate in nodules remains an open question to address.

What could be the role of the bacterial NO production in symbiosis? It has been shown that NO is necessary at the first steps of the interaction for efficient nodulation [35]. Whether NO is produced by the bacteria at this step could be answered by testing mutants affected in NO production (i.e. *nirK*) for their capacity to infect plants. A possible role of NO during the initial steps of the infection could be to weaken the production of reactive oxygen species (ROS) by the plant, or the effects of ROS.

On the other hand, there is evidence for a negative role of bacterial NO during late symbiotic stages, particularly at the nitrogen fixation step. Indeed, NO produced by rhizobia in nodules is involved in a reduced nitrogenase activity and enhanced contents of nitrosylated leghemoglobin, as shown both in *Phaseolus vulgaris* and in Glycine max nodules, and of tyrosine-nitrated glutamine synthetase as shown in *M. truncatula* nodules [48,70–74]. Hence bacterial NO, when produced, seems to reduce symbiotic efficiency.

These negative effects do not preclude other positive but yet speculative roles of bacterially produced NO during symbiosis. Further investigations will be needed to better understand how bacterial NO affects the symbiosis. Experimental challenges can be expected since NO diffuses freely in and out of the bacteria/bacteroids, which makes it difficult to distinguish which is the main source of NO in this interaction and the role of the bacterial NO.

Perspectives

- *Importance of the field:* Nitrogen-fixing symbiosis between rhizobia and legumes are of major importance in the frame of sustainable agriculture. Complex molecular mechanisms underlie this interaction and we expect that the gas NO, which is known as a ubiquitous signalling molecule, plays a crucial role that needs to be further elucidated.
- *Current thinking:* Both partners, rhizobia and legumes, contribute to NO production in root nodules. Denitrification is the main way to produce NO in rhizobia with possible contribution of the nitrate assimilation pathway. There is currently no evidence that NO production by rhizobia involves any NO synthase.
- *Future directions:* The production of NO by rhizobia inside legume root nodules raises the questions of the efficiency and regulation of the NO degrading systems and, more generally, of a putative role of this bacterial NO in symbiotic interactions. The knowledge of all sources of NO in rhizobia will allow to decipher its role at each step of the symbiotic interaction.

Competing Interests

The authors declare that there are no competing interests associated with the manuscript.

Acknowledgements

This work was supported by the French Laboratory of Excellence project ‘TULIP’ (ANR-10-LABX-41) and the ‘Agence Nationale de la Recherche’ (STAYPINK-ANR-15-CE20-0005). We thank INSA-Toulouse for its financial support to E.M. for performing NO production experiments in A. Frostegård group in Norway. The funders had no role in the study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication. We thank Kedir Woliy Jillo and all members of Å. Frostegård group for their help in performing NO measurements. We thank Lars Bakken for his help to analyze the data. B.R., E.M., A.F. designed and performed the experiments. E.M., A.F., C.B. analyzed the corresponding results and wrote the paper. The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

Abbreviations

bNOs, bacterial NO synthases; DAFs, diamino fluoresceins; NO, nitric oxide; NOS, NO synthases.

References

- 1 Lindström, K. and Mousavi, S.A. (2020) Effectiveness of nitrogen fixation in rhizobia. *Microb. Biotechnol.* **13**, 1314–1335 <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13517>
- 2 de Lajudie, P. and Young, J.P.W. (2020) International committee on systematics of prokaryotes subcommittee on the taxonomy of rhizobia and agrobacteria minutes of the closed meeting by videoconference, 17 July 2019. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **70**, 3563–3571 <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004157>
- 3 Herridge, D.F., Peoples, M.B. and Boddey, R.M. (2008) Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant Soil* **311**, 1–18 <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9668-3>

- 4 Foyer, C.H., Lam, H.-M., Nguyen, H.T., Siddique, K.H., Varshney, R.K., Colmer, T.D. et al. (2016) Neglecting legumes has compromised human health and sustainable food production. *Nat. Plants* **2**, 16112 <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.112>
- 5 Poole, P., Ramachandran, V. and Terpolilli, J. (2018) Rhizobia: from saprophytes to endosymbionts. *Nat. Rev. Microbiol.* **16**, 291–303 <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.171>
- 6 Signorelli, S., Sainz, M., Tabares-da Rosa, S. and Monza, J. (2020) The role of nitric oxide in nitrogen fixation by legumes. *Front. Plant Sci.* **11**, 521 <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00521>
- 7 Berger, A., Boscardi, A., Frendo, P. and Brouquisse, R. (2019) Nitric oxide signaling, metabolism and toxicity in nitrogen-fixing symbiosis. *J. Exp. Bot.* **70**, 4505–4520 <https://doi.org/10.1093/jxb/erz159>
- 8 Hichri, I., Meilhoc, E., Boscardi, A., Bruand, C., Frendo, P. and Brouquisse, R. (2016) Chapter ten - nitric oxide: jack-of-all-trades of the nitrogen-fixing symbiosis? In *Advances in Botanical Research* (Wendehenne, D., ed), pp. 193–218, Academic Press, Cambridge, MA <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2015.10.014>
- 9 Hichri, I., Boscardi, A., Meilhoc, E., Catalá, M., Barreno, E., Bruand, C. et al. (2016) Nitric oxide: a multitask player in plant–microorganism symbioses. In *Gasotransmitters in Plants: The Rise of a New Paradigm in Cell Signaling*, (Lamattina, L., Garcia-Mata, C. eds), pp. 239–268, Springer International Publishing, Cham https://doi.org/10.1007/978-3-319-40713-5_12
- 10 Domingos, P., Prado, A.M., Wong, A., Gehring, C. and Feijo, J.A. (2015) Nitric oxide: a multitasked signaling gas in plants. *Mol. Plant* **8**, 506–520 <https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.12.010>
- 11 Bellin, D., Asai, S., Delledonne, M. and Yoshioka, H. (2013) Nitric oxide as a mediator for defense responses. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **26**, 271–277 <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-12-0214-CR>
- 12 Fang, F.C. and Vázquez-Torres, A. (2019) Reactive nitrogen species in host–bacterial interactions. *Curr. Opin. Immunol.* **60**, 96–102 <https://doi.org/10.1016/j.coi.2019.05.008>
- 13 Porrini, C., Ramarao, N. and Tran, S.-L. (2020) Dr. NO and Mr. toxic - the versatile role of nitric oxide. *Biol. Chem.* **401**, 547–572 <https://doi.org/10.1515/hsz-2019-0368>
- 14 Arasimowicz-Jelonek, M. and Floryszak-Wieczorek, J. (2014) Nitric oxide: an effective weapon of the plant or the pathogen? *Mol. Plant Pathol.* **15**, 406–416 <https://doi.org/10.1111/mpp.12095>
- 15 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 <https://doi.org/10.1094/MPMI-19-0970>
- 16 Horchani, F., Prévot, M., Boscardi, A., Evangelisti, E., Meilhoc, E., Bruand, C. et al. (2011) Both plant and bacterial nitrate reductases contribute to nitric oxide production in *Medicago truncatula* nitrogen-fixing nodules1[WJ]OA. *Plant. Physiol.* **155**, 1023–1036 <https://doi.org/10.1104/pp.110.166140>
- 17 Hutfless, E.H., Chaudhari, S.S. and Thomas, V.C. (2018) Emerging roles of nitric oxide synthase in bacterial physiology. *Adv. Microb. Physiol.* **72**, 147–191 <https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2018.01.006>
- 18 Santolini, J. (2019) What does “NO-Synthase” stand for? *Front. Biosci. (Landmark Ed)* **24**, 133–171 <https://doi.org/10.2741/4711>
- 19 Gusarov, I. and Nudler, E. (2005) NO-mediated cytoprotection: instant adaptation to oxidative stress in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 13855–13860 <https://doi.org/10.1073/pnas.0504307102>
- 20 Kinkel, T.L., Ramos-Montañez, S., Pando, J.M., Tadeo, D.V., Strom, E.N., Libby, S.J. et al. (2016) An essential role for bacterial nitric oxide synthase in *Staphylococcus aureus* electron transfer and colonization. *Nat. Microbiol.* **2**, 16224 <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.224>
- 21 Chaudhari, S.S., Kim, M., Lei, S., Razvi, F., Alqarzaee, A.A., Hutfless, E.H. et al. (2017) Nitrite derived from endogenous bacterial nitric oxide synthase activity promotes aerobic respiration. *mBio* **8**, e00887-17 <https://doi.org/10.1128/mBio.00887-17>
- 22 Chung, M.-C., Narayanan, A., Popova, T.G., Kashanchi, F., Bailey, C.L. and Popov, S.G. (2013) Bacillus anthracis-derived nitric oxide induces protein S-nitrosylation contributing to macrophage death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **430**, 125–130 <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.11.042>
- 23 Chung, M.-C., Alem, F., Hamer, S.G., Narayanan, A., Shatalin, K., Bailey, C. et al. (2017) S-nitrosylation of peroxiredoxin 1 contributes to viability of lung epithelial cells during *Bacillus anthracis* infection. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **1861**, 3019–3029 <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.09.006>
- 24 Kojima, H., Nakatsubo, N., Kikuchi, K., Kawahara, S., Kirino, Y., Nagoshi, H. et al. (1998) Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. *Anal. Chem.* **70**, 2446–2453 <https://doi.org/10.1021/ac9801723>
- 25 Ruiz, B., Le Scornet, A., Sauviac, L., Rémy, A., Bruand, C. and Meilhoc, E. (2019) The nitrate assimilatory pathway in *Sinorhizobium meliloti*: contribution to NO production. *Front. Microbiol.* **10**, 1526 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01526>
- 26 Lewis, A.M., Matzdorf, S.S. and Rice, K.C. (2016) Fluorescent detection of intracellular nitric oxide in *Staphylococcus aureus*. *Bio Protoc.* **6**, e1878 <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.1878>
- 27 Goshi, E., Zhou, G. and He, Q. (2019) Nitric oxide detection methods in vitro and in vivo. *Med. Gas Res.* **9**, 192–207 <https://doi.org/10.4103/2045-9912.273957>
- 28 Vishwakarma, A., Wany, A., Pandey, S., Bulle, M., Kumari, A., Kishorekumar, R. et al. (2019) Current approaches to measure nitric oxide in plants. *J. Exp. Bot.* **70**, 4333–4343 <https://doi.org/10.1093/jxb/erz242>
- 29 Molstad, L., Dörsch, P. and Bakken, L.R. (2007) Robotized incubation system for monitoring gases (O₂, NO, N₂O, N₂) in denitrifying cultures. *J. Microbiol. Methods* **71**, 202–211 <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.08.011>
- 30 Bergaust, L., Mao, Y., Bakken, L.R. and Frostegård, A. (2010) Denitrification response patterns during the transition to anoxic respiration and posttranscriptional effects of suboptimal pH on nitrous [corrected] oxide reductase in *Paracoccus denitrificans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 6387–6396 <https://doi.org/10.1128/AEM.00608-10>
- 31 Liu, B., Mørkved, P.T., Frostegård, A. and Bakken, L.R. (2010) Denitrification gene pools, transcription and kinetics of NO, N₂O and N₂ production as affected by soil pH. *FEMS Microbiol. Ecol.* **72**, 407–417 <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00856.x>
- 32 Liu, B., Frostegård, Å. and Bakken, L.R. (2014) Impaired reduction of N₂O to N₂ in acid soils is due to a posttranscriptional interference with the expression of nosZ. *mBio* **5**, e01383-14 <https://doi.org/10.1128/mBio.01383-14>
- 33 Cabrera, J.J., Salas, A., Torres, M.J., Bedmar, E.J., Richardson, D.J., Gates, A.J. et al. (2016) An integrated biochemical system for nitrate assimilation and nitric oxide detoxification in *Bradyrhizobium japonicum*. *Biochem. J.* **473**, 297–309 <https://doi.org/10.1042/BJ20150880>
- 34 Torres, M.J., Avila, S., Bedmar, E.J. and Delgado, M.J. (2018) Overexpression of the periplasmic nitrate reductase supports anaerobic growth by *Ensifer meliloti*. *FEMS Microbiol. Lett.* **365**, 1–6 <https://doi.org/10.1093/femsle/fny041>

- 35 del Giudice, J., Cam, Y., Damiani, I., Fung-Chat, F., Meilhoc, E., Bruand, C. et al. (2011) Nitric oxide is required for an optimal establishment of the *Medicago truncatula*–*Sinorhizobium meliloti* symbiosis. *New Phytol.* **191**, 405–417 <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03693.x>
- 36 Cam, Y., Pierre, O., Boncompagni, E., Hérouart, 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 <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04282.x>
- 37 Shapleigh, J.P. (2006) The denitrifying prokaryotes. In *The Prokaryotes: Volume 2: Ecophysiology and Biochemistry*, (Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E., eds), pp. 769–792, Springer, New York, NY https://doi.org/10.1007/0-387-30742-7_23
- 38 Torres, M.J., Rubia, M.I., de la Peña, T.C., Pueyo, J.J., Bedmar, E.J. and Delgado, M.J. (2014) Genetic basis for denitrification in *Ensifer meliloti*. *BMC Microbiol.* **14**, 142 <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-142>
- 39 Torres, M.J., Rubia, M.I., Bedmar, E.J. and Delgado, M.J. (2011) Denitrification in *Sinorhizobium meliloti*. *Biochem. Soc. Trans.* **39**, 1886–1889 <https://doi.org/10.1042/BST20110733>
- 40 Bueno, E., Robles, E.F., Torres, M.J., Krell, T., Bedmar, E.J., Delgado, M.J. et al. (2017) Disparate response to microoxia and nitrogen oxides of the *Bradyrhizobium japonicum* napEDABC, nirK and norCBQD denitrification genes. *Nitric Oxide* **68**, 137–149 <https://doi.org/10.1016/j.niox.2017.02.002>
- 41 Torres, M.J., Bueno, E., Mesa, S., Bedmar, E.J. and Delgado, M.J. (2011) Emerging complexity in the denitrification regulatory network of *Bradyrhizobium japonicum*. *Biochem. Soc. Trans.* **39**, 284–288 <https://doi.org/10.1042/BST0390284>
- 42 Sánchez, C. and Minamisawa, K. (2018) Redundant roles of *Bradyrhizobium oligotrophicum* Cu-type (NirK) and cd1-type (NirS) nitrite reductase genes under denitrifying conditions. *FEMS Microbiol. Lett.* **365**, fny015 <https://doi.org/10.1093/femsle/fny015>
- 43 Jang, J., Ashida, N., Kai, A., Isobe, K., Nishizawa, T., Otsuka, S. et al. (2018) Presence of Cu-Type (NirK) and cd1-Type (NirS) nitrite reductase genes in the denitrifying bacterium *Bradyrhizobium nitroreducens* sp. nov. *Microbes Environ.* **33**, 326–331 <https://doi.org/10.1264/j sme2.ME18039>
- 44 Poole, R.K. (2020) Flavohaemoglobin: the pre-eminent nitric oxide-detoxifying machine of microorganisms. *F1000Res* **9** <https://doi.org/10.12688/f1000research.20563.1>
- 45 Bueno, E., Mania, D., Frostegard, Å., Bedmar, E.J., Bakken, L.R. and Delgado, M.J. (2015) Anoxic growth of *Ensifer meliloti* 1021 by N₂O-reduction, a potential mitigation strategy. *Front. Microbiol.* **6**, 537 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00537>
- 46 Mania, D., Wolny, K., Degefu, T. and Frostegård, Å. (2020) A common mechanism for efficient N₂O reduction in diverse isolates of nodule-forming bradyrhizobia. *Environ. Microbiol.* **22**, 17–31 <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14731>
- 47 Calvo-Beguería, L., Rubio, M.C., Martínez, J.L., Pérez-Rontomé, C., Delgado, M.J., Bedmar, E.J. et al. (2018) Redefining nitric oxide production in legume nodules through complementary insights from electron paramagnetic resonance spectroscopy and specific fluorescent probes. *J. Exp. Bot.* **69**, 3703–3714 <https://doi.org/10.1093/jxb/ery159>
- 48 Sánchez, C., Gates, A.J., Meakin, G.E., Uchiumi, T., Girard, L., Richardson, D.J. et al. (2010) Production of nitric oxide and nitrosylleghemoglobin complexes in soybean nodules in response to flooding. *Mol. Plant Microbe Interact.* **23**, 702–711 <https://doi.org/10.1094/MPMI-23-5-0702>
- 49 Bedmar, E.J., Robles, E.F. and Delgado, M.J. (2005) The complete denitrification pathway of the symbiotic, nitrogen-fixing bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. *Biochem. Soc. Trans.* **33**, 141–144 <https://doi.org/10.1042/BST0330141>
- 50 Meilhoc, E., Cam, Y., Skapski, A. and Bruand, C. (2010) The response to nitric oxide of the nitrogen-fixing symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *MPMI* **23**, 748–759 <https://doi.org/10.1094/MPMI-23-6-0748>
- 51 Bobik, C., Meilhoc, E. and Batut, J. (2006) Fixj: a major regulator of the oxygen limitation response and late symbiotic functions of *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **188**, 4890–4902 <https://doi.org/10.1128/JB.00251-06>
- 52 Richardson, D.J., Berks, B.C., Russell, D.A., Spiro, S. and Taylor, C.J. (2001) Functional, biochemical and genetic diversity of prokaryotic nitrate reductases. *Cell Mol. Life Sci.* **58**, 165–178 <https://doi.org/10.1007/PL00000845>
- 53 Hidalgo-García, A., Torres, M.J., Salas, A., Bedmar, E.J., Girard, L. and Delgado, M.J. (2019) *Rhizobium etli* produces nitrous oxide by coupling the assimilatory and denitrification pathways. *Front. Microbiol.* **10**, 980 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00980>
- 54 Luque-Almagro, V.M., Lyall, V.J., Ferguson, S.J., Roldán, M.D., Richardson, D.J. and Gates, A.J. (2013) Nitrogen oxyanion-dependent dissociation of a two-component complex that regulates bacterial nitrate assimilation. *J. Biol. Chem.* **288**, 29692–29702 <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.459032>
- 55 Shu, C.J. and Zhulin, I.B. (2002) ANTAR: an RNA-binding domain in transcription antitermination regulatory proteins. *Trends Biochem. Sci.* **27**, 3–5 [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(01\)02036-9](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(01)02036-9)
- 56 Sánchez, C., Itakura, M., Okubo, T., Matsumoto, T., Yoshikawa, H., Gotoh, A. et al. (2014) The nitrate-sensing NasST system regulates nitrous oxide reductase and periplasmic nitrate reductase in *Bradyrhizobium japonicum*. *Environ. Microbiol.* **16**, 3263–3274 <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12546>
- 57 Pant, K., Bilwes, A.M., Adak, S., Stuehr, D.J. and Crane, B.R. (2002) Structure of a nitric oxide synthase heme protein from *Bacillus subtilis*. *Biochemistry* **41**, 11071–11079 <https://doi.org/10.1021/bi0263715>
- 58 Adak, S., Aulak, K.S. and Stuehr, D.J. (2002) Direct evidence for nitric oxide production by a nitric-oxide synthase-like protein from *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **277**, 16167–16171 <https://doi.org/10.1074/jbc.M201136200>
- 59 Choi, W.S., Chang, M.S., Han, J.W., Hong, S.Y. and Lee, H.W. (1997) Identification of nitric oxide synthase in *Staphylococcus aureus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **237**, 554–558 <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.7189>
- 60 Kolbert, Z., Barroso, J.B., Brouquisse, R., Corpas, F.J., Gupta, K.J., Lindermayr, C. et al. (2019) A forty year journey: The generation and roles of NO in plants. *Nitric Oxide* **93**, 53–70 <https://doi.org/10.1016/j.niox.2019.09.006>
- 61 Fröhlich, A. and Durner, J. (2011) The hunt for plant nitric oxide synthase (NOS): is one really needed? *Plant Sci.* **181**, 401–404 <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.07.014>
- 62 Astier, J., Gross, I. and Durner, J. (2017) Nitric oxide production in plants: an update. *J. Exp. Bot.* **69**, 3401–3411 <https://doi.org/10.1093/jxb/erx420>
- 63 Tischner, R., Galli, M., Heimer, Y.M., Bielefeld, S., Okamoto, M., Mack, A. et al. (2007) Interference with the citrulline-based nitric oxide synthase assay by argininosuccinate lyase activity in Arabidopsis extracts. *FEBS J.* **274**, 4238–4245 <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05950.x>
- 64 Jeandroz, S., Wipf, D., Stuehr, D.J., Lamattina, L., Melkonian, M., Tian, Z. et al. (2016) Occurrence, structure, and evolution of nitric oxide synthase-like proteins in the plant kingdom. *Sci. Signal.* **9**, re2 <https://doi.org/10.1126/scisignal.aad4403>
- 65 Pii, Y., Crimi, M., Cremonese, G., Spena, A. and Pandolfini, T. (2007) Auxin and nitric oxide control indeterminate nodule formation. *BMC Plant Biol.* **7**, 21 <https://doi.org/10.1186/1471-2229-7-21>
- 66 Berger, A., Brouquisse, R., Pathak, P.K., Hichri, I., Singh, I., Bhatia, S. et al. (2018) Pathways of nitric oxide metabolism and operation of phytooglobins in legume nodules: missing links and future directions. *Plant Cell Environ.* **41**, 2057–2068 <https://doi.org/10.1111/pce.13151>

- 67 Berger, A., Guinand, S., Boscardi, A., Puppo, A. and Brouquisse, R. (2020) *Medicago truncatula* phytohemoglobin 1.1 controls symbiotic nodulation and nitrogen fixation via the regulation of nitric oxide concentration. *New Phytol.* **227**, 84–98 <https://doi.org/10.1111/nph.16462>
- 68 Fukudome, M., Calvo-Begueria, L., Kado, T., Osuki, K., Rubio, M.C., Murakami, E. et al. (2016) Hemoglobin LjGlb1-1 is involved in nodulation and regulates the level of nitric oxide in the *Lotus japonicus*-*Mesorhizobium loti* symbiosis. *J. Exp. Bot.* **67**, 5275–5283 <https://doi.org/10.1093/jxb/erw290>
- 69 Campos, P.C., Gomes, M.T.R., Marinho, F.A.V., Guimarães, E.S., de Moura Lodi Cruz, M.G.F. and Oliveira, S.C. (2019) Brucella abortus nitric oxide metabolite regulates inflammasome activation and IL-1 β secretion in murine macrophages. *Eur. J. Immunol.* **49**, 1023–1037 <https://doi.org/10.1002/eji.201848016>
- 70 Meakin, G.E., Bueno, E., Jepson, B., Bedmar, E.J., Richardson, D.J. and Delgado, M.J. (2007) The contribution of bacteroidal nitrate and nitrite reduction to the formation of nitrosylhaemoglobin complexes in soybean root nodules. *Microbiology (Reading, Engl)* **153**, 411–419 <https://doi.org/10.1099/mic.0.2006/000059-0>
- 71 Gómez-Hernández, N., Reyes-González, A., Sánchez, C., Mora, Y., Delgado, M.J. and Girard, L. (2011) Regulation and symbiotic role of nirK and norC expression in *Rhizobium etli*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **24**, 233–245 <https://doi.org/10.1094/MPMI-07-10-0173>
- 72 Puppo, A., Pauly, N., Boscardi, A., Mandon, K. and Brouquisse, R. (2012) Hydrogen peroxide and nitric oxide: key regulators of the legume—rhizobium and mycorrhizal symbioses. *Antioxid. Redox Signal.* **18**, 2202–2219 <https://doi.org/10.1089/ars.2012.5136>
- 73 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 Physiol.* **157**, 1505–1517 <https://doi.org/10.1104/pp.111.186056>
- 74 Blanquet, P., Silva, L., Catrice, O., Bruand, C., Carvalho, H. and Meilhoc, E. (2015) *Sinorhizobium meliloti* controls nitric oxide-mediated post-translational modification of a *medicago truncatula* nodule protein. *Mol. Plant Microbe Interact.* **28**, 1353–1363 <https://doi.org/10.1094/MPMI-05-15-0118-R>

Dans cet article de revue focalisé sur la synthèse de NO chez les rhizobia, nous avons tout d'abord fait une comparaison des voies de synthèse connues chez certaines rhizobia comme *B. diazoefficiens* ou *E. meliloti*, mais aussi des techniques permettant actuellement de détecter ou de localiser du NO chez ces bactéries. Malgré les nombreuses techniques existantes, il reste actuellement encore très difficile de quantifier de façon reproductible et précise le NO au sein d'une cellule et plus encore dans un organe comme le nodule. Cela est dû d'une part à l'instabilité du NO et au fait que cette molécule gazeuse qui diffuse rapidement. D'autre part, les sondes actuellement disponibles pour la détection ou la quantification manquent encore de spécificité pour le NO, ainsi que de stabilité. Suite aux travaux de Pii et collaborateurs (2007) décrivant une activité NO synthase chez *E. meliloti*, nous nous sommes demandé si cette activité était réellement attribuable à une bNOS capable de synthétiser du NO à partir d'arginine chez *E. meliloti*. Un premier élément de réponse a été apporté par une étude bio-informatique récente qui rapporte l'absence de séquence codant pour une NO synthase dans le génome de *E. meliloti* et des rhizobia en général (Santolini, 2019). Nous avons poursuivi la recherche d'une éventuelle activité de type bNOS en réalisant des cultures en aérobie et en anaérobie, en présence d'arginine, afin de rechercher une production de NO. Aucune de nos conditions n'a permis de détecter de production de NO à partir d'arginine. Il est toujours possible que nos conditions de culture en milieu synthétique minimum soient limitantes pour un cofacteur essentiel à l'activité bNOS (Hutfless et al., 2018). Mais l'ensemble de ces éléments nous amènent à écarter l'hypothèse proposée par Pii en 2007, selon laquelle il y aurait une synthèse de NO à partir d'une bNOS chez *E. meliloti*. En conclusion, *E. meliloti* semble ne pas posséder de bNOS, ce qui laisse la dénitrification comme seule voie capable de synthétiser du NO chez cette bactérie.

3. Identification de nouveaux gènes impliqués dans la dégradation du NO chez *E. meliloti*.

Après avoir étudié la synthèse du NO chez *E. meliloti*, nous nous sommes intéressés aux voies permettant à cette bactérie de dégrader ou détoxifier le NO présent dans la cellule. En effet, tout comme les voies de synthèse, les voies de dégradation participent au maintien de l'homéostasie du NO au sein des cellules.

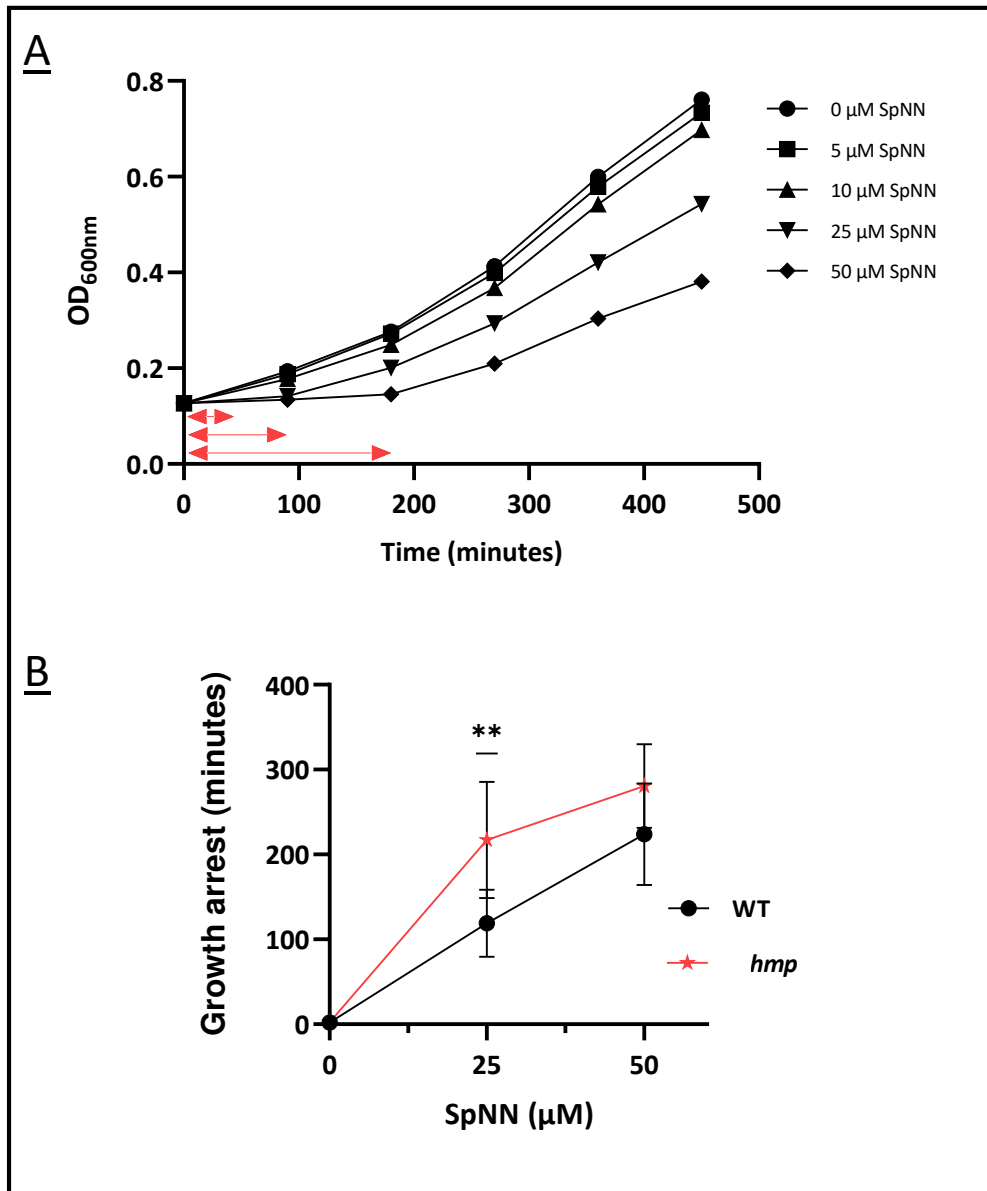


Figure 34 : Etude de la sensibilité au NO pour différentes souches d'*E. meliloti*.

Les souches ont été cultivées dans du milieu de Vincent. (A) La souche sauvage d'*E. meliloti* a été cultivée en présence de différentes concentrations de donneur de NO (SpNN : spermine NONOate) et la croissance a été mesurée pendant plusieurs heures. Les flèches rouges montrent le temps de latence provoqué par l'addition de NO sur la croissance. Les données présentées sont issues d'une expérience représentative. (B) Courbes représentant les temps de latence de la souche sauvage (WT) et du mutant Δhmp en fonction de la concentration en spermine NONOate (SpNN 0, 25 et 50 μM). Chaque point correspond à la moyenne de 6 valeurs de temps de latence calculées à partir de 6 expériences indépendantes. Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type standard. Le test statistique utilisé est un Mann-Whitney (** : $p < 0.01$).

Chez *E. meliloti*, deux systèmes majeurs capables de dégrader le NO en vie libre et durant l'interaction symbiotique ont été décrits. Tout d'abord, il existe une NO réductase Nor, impliquée dans la voie de dénitrification et qui a pour fonction de réduire le NO en N₂O en condition microaérobie. Chez *E. meliloti*, il a été montré qu'une mutation du gène *norB* entraîne une sensibilité accrue au NO par rapport à une souche sauvage (Meilhoc et al., 2013; Blanquet et al., 2015). *E. meliloti* possède aussi une flavohémoglobine Hmp impliquée dans la dégradation du NO en vie libre et dans le nodule. Les flavohémoglobines sont généralement capables de réduire le NO en N₂O en microaérobie et de l'oxyder en NO₃⁻ en aérobie (Forrester and Foster, 2012). Des expérimentations précédemment effectuées dans l'équipe d'accueil ont permis de mettre en évidence le rôle de Hmp dans le métabolisme du NO au sein de la nodosité. En effet, l'inoculation de plantules de *M. truncatula* avec une souche surexprimant *hmp* entraîne une diminution de la quantité de NO au sein de la nodosité, une meilleure fixation d'azote et un retard dans la mise en place de la sénescence des nodules (Cam et al., 2012).

Une étude bio-informatique récente sur les globines de rhizobia a permis de mettre en évidence dans le génome d'*E. meliloti* plusieurs gènes codant pour des globines putatives autres que Hmp. Il s'agit d'une globine senseur (SMc03004) et de 2 globines tronquées putatives (THB1 : SMc01520; THB2 : SMc02351) (Gesto-Borroto et al., 2015). Les hémoglobines tronquées (aussi appelées trHbs) ne possèdent pas de domaine réductase et sont plus courtes de 20 à 40 acides aminés. Il a été montré chez différents organismes comme *M. tuberculosis* ou *M. bovis*, que la mutation des gènes codants pour les trHbs entraînait une diminution de la dégradation du NO (Ouellet et al., 2002; Pathania et al., 2002b). Les gènes de globines tronquées putatives d'*E. meliloti* sont exprimés dans les nodules, et l'un des deux (tHb2) est particulièrement exprimé dans la zone de fixation (Roux et al., 2014). Nous avons donc décidé d'étudier le rôle des 2 hémoglobines tronquées putatives d'*E. meliloti*. Pour ce faire, nous avons réalisé des mutants de délétion pour chacune d'elles. Notre premier objectif a été d'évaluer leur capacité à détoxifier et dégrader le NO en culture.

Nous avons tout d'abord réalisé des tests de sensibilité au NO des différentes souches. La sensibilité d'une souche au NO se mesure par un retard de croissance de la souche lorsqu'un donneur de NO est ajouté au milieu, d'autant plus important que la concentration en donneur de NO est élevée (Figure 34A). Une sensibilité accrue d'une souche par rapport à

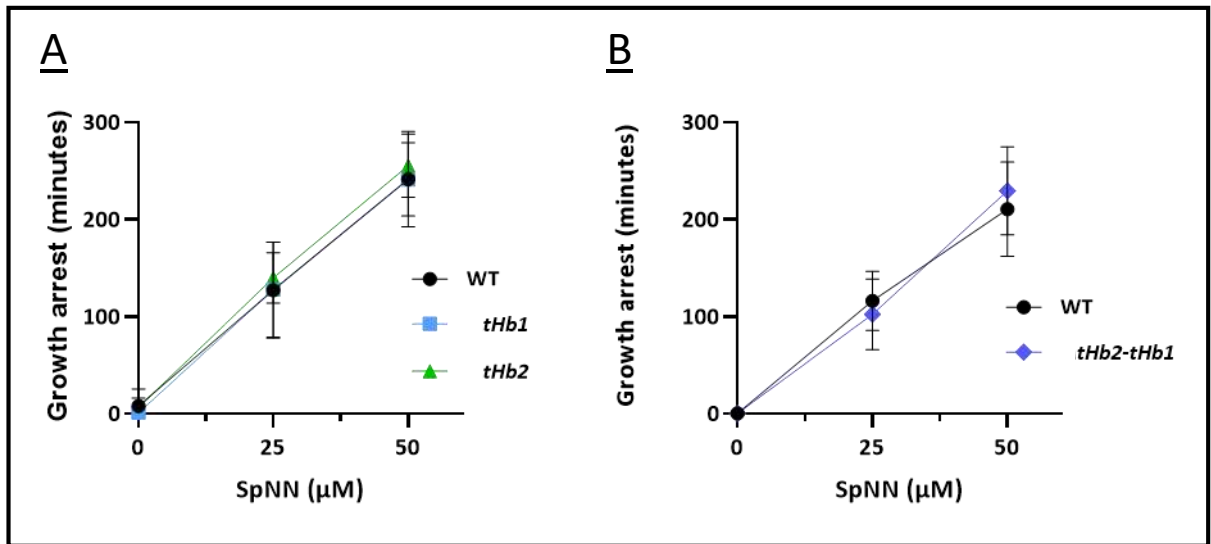


Figure 35 : Etude de la sensibilité au NO des mutants *tHb1* et *tHb2* d'*E. meliloti*.

Les souches ont été cultivées en absence ou en présence de différentes concentrations de donneur de NO (SpNN : spermine NONOate, 0, 25 et 50 μM) dans du milieu de Vincent. (A) Représentation des différents temps de latence de la souche sauvage (WT) et des simples mutants *tHb1* et *tHb2*. Chaque valeur correspond à la moyenne des résultats de 5 expérimentations indépendantes. Les barres d'erreurs correspondent à l'écart-type standard. (B) Représentation des temps de latence de la souche sauvage (WT) et du double mutant *tHb1 tHb2*. Chaque valeur correspond à la moyenne des résultats de 3 expérimentations indépendantes. Les barres d'erreurs correspondent à l'écart-type standard.

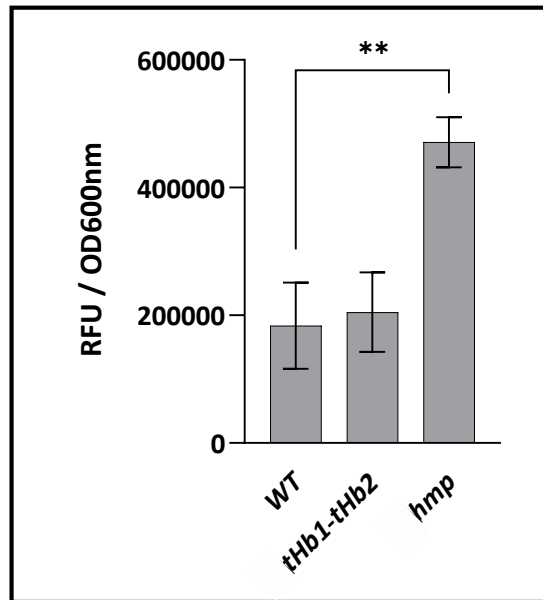


Figure 36 : Dégradation du NO exogène par différentes souches d'*E. meliloti*.

La quantité de NO restante dans les milieux de culture des différentes souches a été dosée 4h après incubation avec 30 μ M de spermine NONOate. Le dosage a été effectué en ajoutant une sonde émettant spécifiquement de la fluorescence en présence de NO (DAF-FM, longueur d'onde d'excitation = 495 nm, longueur d'onde d'émission = 515 nm). Le résultat est exprimé en RFU (Relative fluorescence intensity) divisée par la DO à 600nm. Chaque valeur représentée sur ce graphique correspond à la moyenne des résultats obtenus lors de 6 expérimentations indépendantes. Les barres d'erreurs correspondent à l'écart-type standard. Le test statistique utilisé est un test de Student (** : $p < 0.01$).

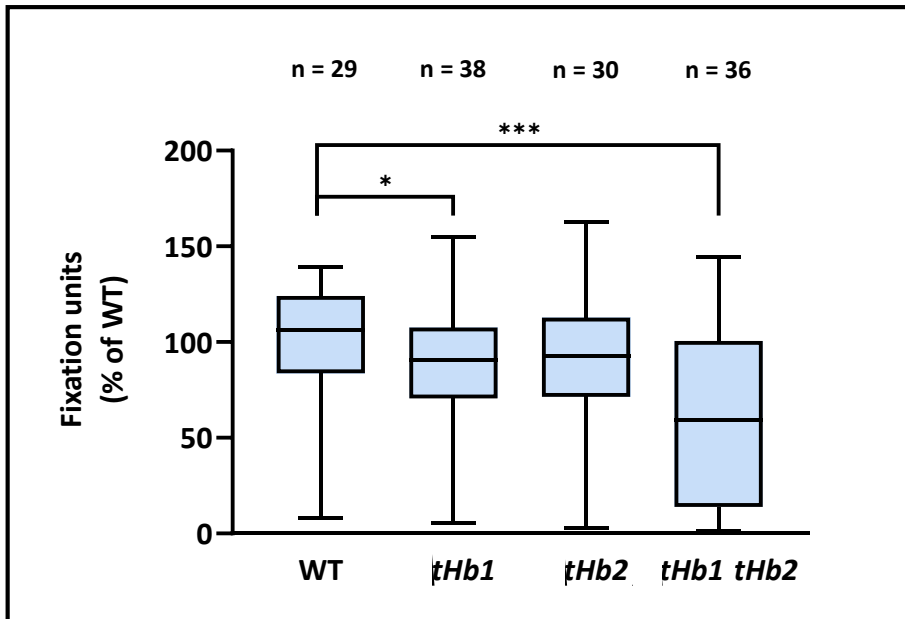


Figure 37 : Effet de la délétion des globines tronquées sur la fixation d'azote.

La fixation d'azote a été mesurée par la méthode ARA de réduction de l'acétylène (mesure de l'éthylène produit à partir d'acétylène) sur des plantes inoculées soit avec la souche sauvage (WT), soit avec des souches portant une délétion des gènes *tHb1*, *tHb2* ou *tHb1 tHb2*. Les mesures de fixation ont été effectuées 17 jours après inoculation par les différentes souches bactériennes. Chaque box plot représente la compilation de 3 séries indépendantes de mesures de fixation comprenant environ 10 plantes par série. Un test statistique Mann-Whitney a été réalisé (* : $p < 0.05$, *** : $p < 0,001$).

une autre se traduit par un retard de croissance plus important pour une même concentration de NO. Dans un premier temps, nous avons utilisé comme contrôle dans cette expérience un mutant du gène *hmp* codant la flavohémoglobine. Les résultats sont présentés sur la Figure 34B. Chez cette bactérie, une délétion de *hmp* entraîne une sensibilité au NO accrue par rapport à une souche sauvage. En effet, la souche mutée pour le gène *hmp* présente un temps de latence 2 fois plus important que la souche WT lorsqu'un donneur de NO (Spermine NONOate, 25µM) est ajouté dans la culture. Ces mêmes expériences ont été réalisées en utilisant les simples mutant *tHb1* ou *tHb2* (Figure 35A) et le double mutant *tHb1-tHb2* (Figure 35B). Quel que soit le mutant testé, aucune différence de temps de latence n'a été observée en comparaison avec la souche sauvage. L'utilisation de concentrations plus élevées de donneur de NO a conduit à des temps de latence plus longs, mais identiques à la souche sauvage pour toutes les souches mutantes (données non montrées).

Dans un second temps, nous avons testé la capacité du double mutant à dégrader du NO ajouté de façon exogène sous la forme d'un donneur de NO (spermine NONOate). Les résultats sont présentés sur la Figure 36. Après 4h d'incubation avec 30 µM de Spermine NONOate, le milieu de culture du mutant *hmp* contient 2,5 fois plus de NO que le WT. Cela est dû à une baisse de la capacité de dégradation du NO de la souche mutée pour Hmp. Pour le double mutant *tHb1-tHb2*, la quantité de NO est similaire à ce qui est observé pour la souche WT, indiquant que ce mutant n'est pas affecté dans sa capacité à dégrader le NO. Ces résultats préliminaires suggèrent donc que ces globines tronquées ne sont pas impliquées dans la dégradation du NO.

En parallèle, nous avons testé ces mutants *in planta* afin de déterminer si ces globines bactériennes putatives pourraient avoir un rôle durant la symbiose. Pour cela, nous avons mesuré la fixation d'azote 17 jours après inoculation de plantules de *M. truncatula* avec une souche WT, *tHb1*, *tHb2* ou *tHb1-tHb2*. Les résultats sont présentés sur la Figure 37. Une diminution significative d'environ 20 % de la fixation d'azote a été observée chez les plantes inoculées avec le simple mutant *tHb1* par rapport aux plantes inoculées avec la souche sauvage. En revanche, la fixation d'azote mesurée chez les plantes inoculées avec la souche mutante *tHb2* n'est pas significativement différente du WT. De façon intéressante, un double mutant *tHb1-tHb2* présente un phénotype symbiotique plus marqué que le simple mutant *tHb1* avec une fixation d'azote inférieure d'environ 40% par rapport au sauvage.

En conclusion, les différentes expérimentations menées sur des cellules en vie libre semblent indiquer que THb1 et THb2 n'ont pas de rôle dans la dégradation du NO en vie libre. De ce fait, d'autres expériences seraient nécessaires pour caractériser le rôle de ces globines en vie libre. En revanche, les expériences *in planta* ont permis de montrer un rôle important de ces deux globines tronquées dans l'efficacité de l'interaction symbiotique. D'autres travaux seront nécessaires pour déterminer si le rôle joué par THb1 et THb2 en symbiose est dû à des modifications du niveau de NO dans les nodules ou bien si le rôle de ces protéines est indépendant du NO.

II. Rôle du NO d'origine bactérienne au cours de l'interaction symbiotique entre *E. meliloti* et *M. truncatula*

Publication N°3: Role of NO of bacterial origin in the *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium meliloti* symbiosis. Ruiz B, Sauviac L, Brouquisse R, Bruand C, Meilhoc E. 2022.

Dans les interactions plantes-pathogènes, le NO est utilisé par les plantes pour induire des réactions de défense, mais aussi par les bactéries comme facteur de virulence ou pour déclencher des voies spécifiques de lutte contre le stress nitrosatif (Arasimowicz-Jelonek and Floryszak-Wieczorek, 2014). Au cours de l'interaction symbiotique entre *M. truncatula* et *E. meliloti*, du NO a été détecté à chaque étape de l'interaction : rencontre plante-microsymbionte, courbure du poil absorbant, infection, développement du nodule (10 dpi) et nodule mature (30 dpi) (Berger et al., 2021). Chez *M. truncatula*, le NO est majoritairement synthétisé à partir de NO_3^- via des NR couplées à la chaîne de transport d'électrons mitochondriale, et de façon secondaire par d'autres voies comme celle des xanthine oxydases (Berger et al., 2020a). Chez *M. truncatula*, une diminution ou une augmentation de la quantité de NO de l'ordre de 30 % par des approches génétiques affectant la phyto-globine phyto-gb1 entraînent une diminution significative du nombre de nodules. De plus, cette diminution de la quantité de NO entraîne une baisse de l'expression du marqueur d'infection symbiotique *Enod20* et une surexpression de *Cre1*, un marqueur de l'organogénèse du nodule. Ces données indiquent que le NO aurait un rôle important durant l'interaction symbiotique avec des actions

précises comme la régulation négative de l'infection ou la régulation positive de l'organogenèse (Berger et al., 2020b). Au vu des rôles attribués au NO bactérien durant les interactions plante-pathogènes et de l'implication du NO dans la symbiose, on peut se demander quel est le rôle du NO produit par *E. meliloti* durant l'interaction symbiotique. Nos travaux précédents ont décrit que la dénitrification est la seule voie responsable de la synthèse de NO chez *E. meliloti*. Cette bactérie possède également une voie assimilatrice du NO_3^- capable de contribuer à la synthèse de NO en vie libre par un apport supplémentaire en nitrite dans le cytoplasme. Afin de déterminer quel est le rôle du NO produit par *E. meliloti* dans l'interaction symbiotique avec *M. truncatula*, nous avons utilisé une approche génétique en générant différents mutants des voies de dénitrification et d'assimilation afin de suivre différents caractéristiques phénotypiques de la plante comme la nodulation et la fixation d'azote. Cette approche a pour avantage de cibler directement la production de NO bactérienne et non la production de NO totale comme pourrait le faire une approche pharmacologique utilisant une molécule piègeuse de NO ou un inhibiteur enzymatique.

**Role of Nitric Oxide (NO) of bacterial origin in the *Medicago truncatula*-
Sinorhizobium meliloti symbiosis**

Bryan Ruiz¹, Laurent Sauviac¹, Renaud Brouquisse², Claude Bruand¹ and
Eliane Meilhoc¹

¹Laboratoire des Interactions Plantes-Microbes-Environnement (LIPME), Université de
Toulouse, INRAE, CNRS, INSA, Castanet-Tolosan, France

²Institut Sophia Agrobiotech (ISA), INRAE, CNRS, Université côte d'Azur, 06903 Sophia
Antipolis Cedex, France

Corresponding author: eliane.meilhoc@inrae.fr

Abstract:

Nitric oxide (NO) is a small ubiquitous gaseous molecule which has been found in many host-pathogen interactions. NO has been evidenced as part of the defense arsenal of animal cells and more recently of plant cells. To fight this molecular weapon, pathogens have evolved responses consisting in adaptation to NO or degradation of this toxic molecule. More recently, it was shown that NO could also be produced by the pathogen and contributes likewise to the success of the host cell infection. NO is also present during symbiotic interactions. Despite the growing knowledge about the role of NO during friendly interactions, data on the specificity of action of NO produced by each partner are scarce, partly due to the multiplicity of NO production systems. In the nitrogen fixing symbiosis between the soil bacterium *Sinorhizobium meliloti* and the model legume *Medicago truncatula*, NO has been detected at all steps of the interaction where it displays various roles. Both partners contribute to NO production inside the legume root nodules where nitrogen fixation occurs. The study focuses on the role of bacterial NO in this interaction. We used a genetic approach to identify bacterial NO sources in the symbiotic context and test the phenotype *in planta* of bacterial mutants affected in NO production. Our results show that only denitrification is a source of bacterial NO in *Medicago* nodules and give an insight on the role of bacteria-derived NO at different steps of the symbiotic interaction.

Keywords: rhizobia, symbiosis, legumes, nitric oxide, denitrification

Nitric oxide (NO) is a signaling molecule found in almost all living organisms (Kolbert et al. 2019). Its small size and gaseous properties allow an easy and rapid diffusion of the molecule across cell membranes. When present in high concentration, NO is a toxic molecule and has been described for long as a host defense in pathogenic interactions (Fang and Vázquez-Torres 2019). Mammalian cells can generate large quantities of NO in response to inflammatory stimuli and this molecule triggers many detrimental effects on bacterial metabolism, DNA replication and repair as well as modification of regulatory proteins that coordinate bacterial virulence gene expression (for a review see Porrini et al., 2020). About twenty years ago, similar data were obtained on plants, where NO was proved to be a regulating agent during plant defense (Delledonne et al. 1998; Durner et al. 1998). Since then, the importance of NO in plant resistance has been well documented. Pharmacological, biochemical and genetic approaches have provided evidence that an early NO burst in plant cells after pathogen attack functions as a messenger in gene expression for developing a defense response and as a general key factor associated with basal resistance in various plant-pathogens systems (for a review Bellin et al., 2013).

The main way to synthesize NO in mammalian cells is well defined and consists in a NO synthase (NOS), generating NO and citrulline from arginine, whereas the situation is more complex in higher plants where NOS genes have not been found (Jeandroz et al., 2016). Instead, NO production is dependent upon several enzymatic pathways such as nitrate reductase (NR), mitochondrial electron transport chain (mETC)-dependent nitrite reductase activity, polyamine oxidases (Jeandroz et al. 2016; Astier et al. 2017; Kolbert et al. 2019). This diversity of NO sources in plants increases the difficulty for researchers to impair NO production with the goal to study the impact of NO on plant-microbe interactions. In bacteria, NO is produced by at least two different ways, depending upon the considered species. NO is an intermediate of the denitrification pathway which involves the dissimilatory reduction of nitrate (NO_3^-) to dinitrogen, through a series of intermediates that include nitrite (NO_2^-), NO and nitrous oxide (N_2O) (Shapleigh 2006; Ruiz et al.

2021). Also, several bacterial species, primarily Gram+, harbor a gene encoding a simple form of NO synthase (bNOS) (Choi et al. 1997; Adak et al. 2002; Crane et al. 2010; Hutfless et al. 2018; Santolini 2019). While eukaryotic NOS possess an oxygenase and a reductase domain within the same polypeptide the bacterial NOS are truncated and contain only an oxygenase domain. Despite this difference, they function as mammalian NOS and can catalyze the conversion of arginine into citrulline and NO.

In the combat between pathogens and host, the speed of response of the foes is a major component. Microbes infecting other organisms have selected NO in highly effective defensive/offensive strategies. These mechanisms can involve enzymes responsible for resistance to nitrosative stress by mean of the expression of detoxifying systems, such as nitric oxide reductases or flavohemoglobins (Hmp) involved in NO degradation (Fang and Vázquez-Torres 2019). More recently, NO production by pathogens was also described as an emerging strategy for successful infection (Chung et al. 2013; Kinkel et al. 2016; Mogen et al. 2017; Campos et al. 2019). Emerging functions of NO synthesized by bacteria include its ability to respond as a cellular antioxidant, to modulate bacterial respiration once inside the host and to post-transcriptionally regulate the function of several bacterial or host proteins. NO production has been also demonstrated in many diverse plant pathogens including bacteria, fungi and oomycetes and there is increasing evidence that the pathogen-derived NO is an important regulatory molecule involved in pathogen virulence and its survival in the host (Samalova et al. 2013; Arasimowicz-Jelonek and Floryszak-Wieczorek 2014; Martínez-Medina et al. 2019; Jedelská et al. 2021). This is an interesting challenge to understand, as the same molecule could favor both the invader and the host.

For about 15 years, the presence of NO has also been evidenced in mutualistic plant-microbe interactions, such as the legume-rhizobium symbioses or mycorrhizal symbioses (Baudouin et al., 2006; Nagata et al., 2008; Sánchez et al., 2010; del Giudice et al., 2011; Calcagno

et al., 2012; Hichri et al., 2016; Berger et al., 2019; Martínez-Medina et al., 2019; Berger et al., 2020a; Signorelli et al., 2020). The establishment of the legume-rhizobium symbiosis requires the recognition between the rhizobia and the legume and the formation of nodules, new plant organs hosting the rhizobia and where the nitrogen fixation takes place thanks to a bacterial nitrogenase (for reviews see Oldroyd et al., 2011; Lindström and Mousavi, 2019; Schwember et al., 2019). Following the recognition step, rhizobia induce a curl on the plant root hair and the bacteria enter the root and will be delivered in the cortical cells of the developing nodule thanks to a tubular structure called infection thread. Once inside the plant cells, the bacteria will differentiate into bacteroids which will fix nitrogen to the benefit of the plant. Reactive oxygen species (ROS), such as hydrogen peroxide, and reactive nitrogen species (RNS), particularly NO, are known to play an important role in the establishment and functioning of the rhizobium-legume symbiosis (Pauly et al. 2006; Puppo et al. 2013). NO is present at every step of the interaction: plant–rhizobium recognition, root hair curling, along the infection thread, in the developing and in the mature nodules (Berger et al. 2021). During symbiosis, either successively or simultaneously, NO has been shown to regulate gene expression (Sánchez et al., 2010; Boscari et al., 2013; Berger et al., 2020b), and to act as a metabolic intermediate in energy regeneration processes via phytoglobin-NO respiration (Horchani et al., 2011; Berger et al., 2020a,b, 2021). It has also been shown that NO can modulate enzyme activities by mean of post-translational modifications (Kato et al. 2010; Melo et al. 2011; Sainz et al. 2015) and that *S. meliloti* could control these modifications by modulating NO level inside nodules (Blanquet et al. 2015). In addition, proteins from *S. meliloti* have also been found to be possible targets of NO-mediated post-translational modifications (Cazalé et al. 2020).

It has been demonstrated that NO is necessary for the establishment of the symbiosis (Leach et al., 2010; del Giudice et al., 2011; Berger et al., 2020b), for the nitrogen fixation (Berger

et al. 2020a,b, 2021) and it was also observed to locally induce nodule senescence in *M. truncatula* or *Lotus japonicas* (Cam et al. 2012; Sun 2018; Bruand and Meilhoc 2019; Fukudome et al. 2019).

Interestingly NO is also produced by rhizobia during their interaction with legumes. Indeed, inside *Medicago* nodules, *Sinorhizobium meliloti* contributes to about 30% of NO production while it can reach up to 90% in other symbiotic interactions such as *Bradyrhizobium* and the soybean when grown in presence of nitrate (Sánchez et al. 2010; Horchani et al. 2011; Salas et al. 2019). These data raised the burning question of what could be the role played by the NO originated from the bacteria in a friendly interaction?

The strategy to answer this question was to generate bacterial mutants which do not produce NO and observe the phenotype *in planta* of these mutants to determine whether they have a role at early or/and late steps of the symbiotic interaction. We have shown that *S. meliloti* does not possess a bNOS gene or NOS activity (Ruiz et al. 2021) and that the main way to produce NO in this bacterium is via the denitrification pathway (Ruiz et al. 2019). Nitrate is reduced into nitrite and into NO thanks to the successive actions of a nitrate reductase encoded by *nap* genes (*napEFDABC* operon) and a nitrite reductase encoded by *nir* genes (*nirKV* operon). The nitrate assimilation pathway composed of a nitrate reductase NarB and a nitrite reductase NirBD contributes to NO production in free-living *S. meliloti*, but only in conditions where denitrification is active (i.e. oxygen limitation and presence of nitrate).

Previous studies have shown that *narB* and *nirBD* genes were expressed in the nitrogen fixation zone of *M. truncatula* nodules (Roux et al. 2014; Ruiz et al. 2019). To determine whether the nitrate assimilation pathway is involved in NO production inside nodules, we made use of a *nirBD narB S. meliloti* mutant strain and we constructed multiple mutants where the *napEFDABC* operon (referred as *nap* mutant), *nirKV* operon (referred as *nir* mutant) and *nap* and/or *nir* and *nirBD narB* operons have been deleted. We inoculated *M. truncatula* plantlets with these mutants or the wild type (WT) strain and quantified NO inside the nodules 3 weeks post-inoculation. As

controls, we also constructed and tested mutants where only *nap* or *nir* operons have been deleted. The NO content was compared to that obtained with a WT strain and the results are shown in Figure 1.

A 22 to 36 % decrease in NO production was measured in nodules occupied by *nap*, *nir*, or *nap nir* mutants relative to nodules occupied by the WT strain. This level is in the same order of magnitude as that measured previously in nodules induced by *napA* or *nirK* transposon insertion mutant (30%; (Horchani et al. 2011)), thus confirming that *S. meliloti* contributes to NO production through denitrification in nodules. Interestingly, when the *nirBD narB* operon involved in the nitrate assimilation pathway was deleted there was no significant difference in the NO level measured in the nodules as compared to a WT strain. Also, deletion of *nirBD narB* in the *nap* or *nir* mutant strains did not further reduce the NO content of nodules induced by these strains. Altogether, these results indicate that the nitrate assimilation pathway encoded by *nirBD narB* does not play any detectable role in NO production in nodules unlike what was described in free-living cells (Ruiz et al., 2019). Therefore, denitrification remains the main way to produce NO in mature nodules.

NO is required for an optimal establishment of the interaction between rhizobia and legumes. The treatment of soybean roots inoculated with *Bradyrhizobium japonicum* with a NOS inhibitor resulted in a 70% reduction of the nodule number suggesting the contribution of a plant NOS-like enzyme (Leach et al., 2010). A second study performed on *M. truncatula* showed that two nitrate reductases MtNR1 and MtNR2 might have a specific role as NO sources during symbiosis establishment (Berger et al. 2020a). Interestingly NO is present in the root hair curl of *M. truncatula* where a *S. meliloti* microcolony is entrapped, as well as along the infection thread (del Giudice et al. 2011). We made the hypothesis that if *S. meliloti* cells were responsible for NO production at these steps, a mutant strain which does not produce NO would be less competitive than the WT strain to infect plant cells and occupy a nodule. To test this hypothesis, we made use

of the mutant deleted for both *nap* and *nir* operons. *M. truncatula* plants were inoculated with a mixture (1:1) of the WT and mutant strains. Two to three weeks post-inoculation, nodules occupied either with the WT or the mutant strain were counted. To differentiate nodules occupied by each strain, one strain displayed a constitutive and strong green fluorescence from a GFP protein, while the second strain displayed a red fluorescence from a RFP protein, both plasmid-encoded. If both strains are similarly competitive, half of the nodules are expected to be occupied by each strain. To avoid a bias due to the expression of different fluorescent proteins, the experiments were also performed after swapping the fluorescent proteins produced by the strains. The results are presented in Figure 2.

When the competition experiment was performed with two WT strains carrying each a different fluorescent protein, half of the nodules counted were occupied by each strain confirming the validity of the experiment (competitiveness index (CI) equal to 1). Interestingly when the competition assay was made with a WT strain and a *nap nir* mutant, no significant difference in the strain competitiveness was observed suggesting that a strain which does not produce NO is as competitive as a WT strain for nodule occupancy. At this stage we can conclude that at early steps of the interaction either NO is produced by the plant, or NO is produced by the bacteria but is not important for bacterial infection. In a previous work, inoculation of *Medicago truncatula* plantlets with a *S. meliloti* strain overexpressing *hmp* (involved in NO degradation) resulted in delayed nodulation and reduced competitiveness indicating that NO was important at the first steps of the interaction (del Giudice et al. 2011). The apparent discrepancy between both sets of results can be explained by a drastic effect of *hmp* overexpression on the global level of NO including NO from plant origin. Interestingly, a recent study (Achouak et al. 2019) found that denitrification and *nirK* expression on the root system of *M. truncatula* were both very low, which could support indirectly the idea that NO is not produced by rhizobia on *M. truncatula* roots.

In addition, we performed a new set of experiments where nitrate, the substrate of denitrification pathway, at concentrations not inhibiting nodulation (0.5, 1, 1.5 mM) was added on the roots. The results obtained were comparable to those obtained in the absence of nitrate (data not shown), indicating that the presence of low nitrate concentrations does not modify the competitiveness of the *nap nir* mutant as compared to the WT strain.

We also tested the competitiveness for nodule occupancy of a *nirBD narB* mutant strain. Surprisingly the WT strain was outcompeted by the mutant strain as it occupied only about 30% of the nodules (CI= 2.79) (Figure 2). The nitrate assimilation pathway does not contribute to NO production in nodules which makes unlikely that a decrease of NO would be responsible for this increased competitiveness. But the absence of assimilation likely makes more nitrate available as substrate for denitrification, which may contribute to more NO synthesis, and could make the strain more competitive. However, a similar competitiveness was measured with a strain in which both pathways are inactivated (Figure 2), showing that bacterial NO synthesis is not involved in the observed phenotype. Although this finding is interesting, it remains puzzling. As the main reaction product of the nitrate assimilation pathway is ammonium (NH_4^+) it is tempting to speculate that NH_4^+ could have a negative effect on the first steps of the symbiotic interaction as it has been suggested before (Dusha 2002; Patriarca et al. 2002).

Finally, to test whether bacterial NO has a role in late steps of the interaction, we inoculated *M. truncatula* plantlets either with the WT or with the mutant strain deleted for all the genes encoding the nitrate (*napEFDABC*) and nitrite reductases (*nirKV*). We tested the nitrogen fixation efficiency by mean of the acetylene reduction assay (ARA) and we assessed the plant fitness by measuring the dry weight of the plant shoots at 17, 34- and 60-days post-inoculation. The results shown on the Figure 3 indicate that neither the plant fitness nor the nitrogen fixation efficiency is affected by inactivation of the bacterial NO sources. Addition of nitrate in the plant culture medium at a concentration not affecting nodulation (0.5 mM) did not change the observation. Nodule

senescence was also assessed by monitoring a color shift from pink to green at the basis of the nodules over a period of 60 days post-inoculation (Blanquet et al. 2015). The senescence kinetics of both WT and mutant strains were comparable, with all nodules being senescent at 60 days post-inoculation (Figure S1). Altogether, these results indicate that there is no major and/or specific biological function affected by bacterial NO which could affect the late steps of symbiosis.

In summary, we have shown that the denitrification pathway is the main source of NO synthesis by *S. meliloti* during its symbiotic life but that NO of bacterial origin does not have a specific and /or major role neither at early stages of the plant microbe-interaction nor at later stages when nitrogen fixation occurs. Recent research has suggested that beneficial and pathogenic associations share common molecular mechanisms underlying the way the microbes function with their hosts. In this line, NO is a key signal in the establishment and the fine-tuning of both mutualistic and pathogenic interactions. NO was described as being a weapon for the host but there is also growing evidence that NO produced by pathogenic bacteria and fungi is essential for a successful infection of plants. Our work suggests that microbial NO production might not have such a role in beneficial interactions. NO is also a component in the establishment of plant fungal mutualistic interaction such as the arbuscular mycorrhizal (AM) symbiosis (Martínez-Medina et al. 2019) or in another type of symbiosis (i.e. *Vibrio fischerii* and the little Squid *Euprymna scolopes* (Davidson et al. 2004; Mandel and Dunn 2016). However, data concerning the production of NO by these mutualistic microbes and its role in these interactions are still too scarce and further work will be necessary to develop accurate models.

Another conclusion from our work is that the denitrification pathway does not have a major role during the symbiosis between *S. meliloti* and *M. truncatula*. As the genes encoding the different enzymes in this pathway have been shown to be expressed in the nodules and the enzymes shown to be functional, it was suspected that denitrification might have a role in respiration and/or energy production in the oxygen-limiting conditions prevailing inside the nodules. Our results lead

to the conclusion that denitrification is not determinant in the symbiotic life style of *S. meliloti*. These results are also supported by a recent work whose aim was to determine the minimal gene set from *S. meliloti* required for efficient symbiosis with *Medicago*. In that study, only 58 genes located on the megaplasmid pSymA were found to be essential, excluding genes involved in denitrification (Geddes et al. 2021).

One of the denitrification enzymes, i.e. the NO reductase, involved in the reduction of NO into N₂O displays a moderate role in symbiosis. Indeed, a mutant deleted for the *nor* operon, or a mutant deleted for the *nap nir* and *nor* operons, displayed a small decrease in nitrogen fixation efficiency (Figure S2) and an increase of the number of nodules on the plant roots (significant in the *nor* mutant), This is in accordance with a role of Nor in limiting the whole amount of NO found in the nodule. However, a decrease in N₂O and/ or a decrease in energy production linked to this reaction could also explain the observed phenotype.

Denitrification is also involved in NO production in free-living *S. meliloti* bacteria (Ruiz et al. 2019). Our findings do not exclude that denitrification and bacterial NO might have a role in plant-microbe communications underground. The rhizosphere is not only a source of nutrients and support for the plants; it is rather an ecosystem with diverse groups of microorganisms that are useful or harmful for the plants. Plant-microbe interactions occur via intricate communication networks comprising complex mechanisms of recognition of friends and foes. In this context, NO might play a role in mediating the communication between plants and microbes in the rhizosphere (Pande et al. 2021). Pedospheric NO production mostly originates from denitrification (Hu et al. 2021). Interestingly high denitrification rates were reported in the legume rhizosphere (Kilian and Werner 1996; Achouak et al. 2019). Mechanisms governing plant-microbe interactions in the rhizosphere have gained interest in the last decade and the exact role of NO will have to be looked at deeper in the future.

Acknowledgments: We thank Christian Chervin (ENSAT-Toulouse) for giving us access to a gas chromatograph used in this study. We thank Benjamin Gourion for helpful discussions.

BR, RB, LS designed, performed the experiments and analyzed the corresponding results.

EM analyzed the results and drafted the manuscript with help from RB, CB, BR and LS

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

- Achouak, W., Abrouk, D., Guyonnet, J., Barakat, M., Ortet, P., Simon, L., Lerondelle, C., Heulin, T., and Haichar, F. E. Z. 2019. Plant hosts control microbial denitrification activity. *FEMS Microbiol Ecol.* 95(3):fiz021.
- Adak, S., Aulak, K. S., and Stuehr, D. J. 2002. Direct evidence for nitric oxide production by a nitric-oxide synthase-like protein from *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* 277:16167–16171.
- Arasimowicz-Jelonek, M., and Floryszak-Wieczorek, J. 2014. Nitric oxide: an effective weapon of the plant or the pathogen? *Mol. Plant Pathol.* 15:406–416.
- Astier, J., Gross, I., and Durner, J. 2018. Nitric oxide production in plants: an update. *J. Exp. Bot.* 69(14):3401-3411.
- 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.
- Bellin, D., Asai, S., Delledonne, M., and Yoshioka, H. 2013. Nitric oxide as a mediator for defense responses. *Mol. Plant Microbe Interact.* 26:271–277.
- Berger, A., Boscari, A., Frendo, P., and Brouquisse, R. 2019. Nitric oxide signaling, metabolism and toxicity in nitrogen-fixing symbiosis. *J. Exp. Bot.* 70 (17):4505-4520.
- Berger, A., Boscari, A., Horta Araújo, N., Maucourt, M., Hanchi, M., Bernillon, S., Rolin, D., Puppo, A., and Brouquisse, R. 2020a. Plant nitrate reductases regulate Nitric Oxide production and nitrogen-fixing metabolism during the *Medicago truncatula–Sinorhizobium meliloti* symbiosis. *Front Plant Sci.* 11:1313.
- Berger, A., Boscari, A., Puppo, A., and Brouquisse, R. 2021. Nitrate reductases and hemoglobins control nitrogen-fixing symbiosis by regulating nitric oxide accumulation. *J Exp Bot.* 72:873–884.
- Berger, A., Guinand, S., Boscari, A., Puppo, A., and Brouquisse, R. 2020b. *Medicago truncatula* Phytoglobin 1.1 controls symbiotic nodulation and nitrogen fixation via the regulation of nitric oxide concentration. *New Phytol.* 227:84–98.
- Blanquet, P., Silva, L., Catrice, O., Bruand, C., Carvalho, H., and Meilhoc, E. 2015. *Sinorhizobium meliloti* controls Nitric Oxide-mediated post-translational modification of a *Medicago truncatula* nodule protein. *Mol. Plant Microbe Interact.* 28:1353–1363.
- Boscari, A., Meilhoc, E., Castella, C., Bruand, C., Puppo, A., and Brouquisse, R. 2013. Which role for nitric oxide in symbiotic N₂-fixing nodules: toxic by-product or useful signaling/metabolic intermediate? *Front Plant Sci.* 4:384.

- Bruand, C., and Meilhoc, E. 2019. NO in plants: pro or anti senescence. *J. Exp. Bot.* 70(17):4419–4427.
- Calcagno, C., Novero, M., Genre, A., Bonfante, P., and Lanfranco, L. 2012. The exudate from an arbuscular mycorrhizal fungus induces nitric oxide accumulation in *Medicago truncatula* roots. *Mycorrhiza*. 22:259–269.
- Cam, Y., Pierre, O., Boncompagni, E., Hérouart, 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.
- Campos, P. C., Gomes, M. T. R., Marinho, F. A. V., Guimarães, E. S., Cruz, M. G. F. de M. L., and Oliveira, S. C. 2019. *Brucella abortus* nitric oxide metabolite regulates inflammasome activation and IL-1 β secretion in murine macrophages. *European Journal of Immunology*. 49:1023–1037.
- Cazalé, A.-C., Blanquet, P., Henry, C., Pouzet, C., Bruand, C., and Meilhoc, E. 2020. Tyrosine nitration of flagellins: a response of *Sinorhizobium meliloti* to nitrosative stress. *Appl Environ Microbiol.* 87:e02210-20.
- Choi, W. S., Chang, M. S., Han, J. W., Hong, S. Y., and Lee, H. W. 1997. Identification of nitric oxide synthase in *Staphylococcus aureus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 237:554–558.
- Chung, M.-C., Narayanan, A., Popova, T. G., Kashanchi, F., Bailey, C. L., and Popov, S. G. 2013. *Bacillus anthracis*-derived nitric oxide induces protein S-nitrosylation contributing to macrophage death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 430:125–130.
- Crane, B. R., Sudhamsu, J., and Patel, B. A. 2010. Bacterial Nitric Oxide synthases. *Annual Review of Biochemistry*. 79:445–470.
- Davidson, S. K., Koropatnick, T. A., Kossmehl, R., Sycuro, L., and McFall-Ngai, M. J. 2004. NO means ‘yes’ in the squid-vibrio symbiosis: nitric oxide (NO) during the initial stages of a beneficial association. *Cellular Microbiology*. 6:1139–1151.
- Delledonne, M., Xia, Y., Dixon, R. A., and Lamb, C. 1998. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature*. 394:585–588.
- Durner, J., Wendehenne, D., and Klessig, D. F. 1998. Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:10328–10333.
- Dusha, I. 2002. Nitrogen control of bacterial signal production in *Rhizobium meliloti-alfalfa* symbiosis. *Indian J Exp Biol.* 40:981–988.
- Fang, F. C., and Vázquez-Torres, A. 2019. Reactive nitrogen species in host-bacterial interactions. *Curr. Opin. Immunol.* 60:96–102.

- Ferroni, F. M., Rivas, M. G., Rizzi, A. C., Lucca, M. E., Perotti, N. I., and Brondino, C. D. 2011. Nitrate reduction associated with respiration in *Sinorhizobium meliloti* 2011 is performed by a membrane-bound molybdoenzyme. *Biometals*. 24:891–902.
- Fukudome, M., Watanabe, E., Osuki, K.-I., Imaizumi, R., Aoki, T., Becana, M., and Uchiumi, T. 2019. Stably Transformed *Lotus japonicus* Plants Overexpressing Phytoglobin LjGlb1-1 Show Decreased Nitric Oxide Levels in Roots and Nodules as Well as Delayed Nodule Senescence. *Plant Cell Physiol*. 60:816–825.
- Geddes, B. A., Kearsley, J. V. S., Huang, J., Zamani, M., Muhammed, Z., Sather, L., Panchal, A. K., diCenzo, G. C., and Finan, T. M. 2021. Minimal gene set from *Sinorhizobium (Ensifer) meliloti* pSymA required for efficient symbiosis with *Medicago*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 118:e2018015118.
- 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.
- Hichri, I., Boscari, A., Meilhoc, E., Catalá, M., Barreno, E., Bruand, C., Lanfranco, L., and Brouquisse, R. 2016. Nitric Oxide: A Multitask Player in Plant–Microorganism Symbioses. Pages 239–268 in: *Gasotransmitters in Plants: The Rise of a New Paradigm in Cell Signaling, Signaling and Communication in Plants*. L. Lamattina and C. García-Mata, eds. Springer International Publishing, Cham.
- Horchani, F., Prévot, M., Boscari, A., Evangelisti, E., Meilhoc, E., Bruand, C., Raymond, P., Boncompagni, E., Aschi-Smiti, S., Puppo, A., and Brouquisse, R. 2011. Both Plant and Bacterial nitrate reductases contribute to nitric oxide production in *Medicago truncatula* nitrogen-fixing nodules. *Plant Physiol*. 155:1023–1036.
- Hu, B., Flemetakis, E., and Rennenberg, H. 2021. Pedospheric Microbial Nitric Oxide Production Challenges Root Symbioses. *Trends Plant Sci*. 26:104–107.
- Hutfless, E. H., Chaudhari, S. S., and Thomas, V. C. 2018. Emerging Roles of Nitric Oxide Synthase in Bacterial Physiology. *Adv. Microb. Physiol*. 72:147–191.
- Jeandroz, S., Wipf, D., Stuehr, D. J., Lamattina, L., Melkonian, M., Tian, Z., Zhu, Y., Carpenter, E. J., Wong, G. K.-S., and Wendehenne, D. 2016. Occurrence, structure, and evolution of nitric oxide synthase-like proteins in the plant kingdom. *Sci Signal*. 1;9(417):re2.
- Jedelská, T., Luhová, L., and Petřivalský, M. 2021. Nitric oxide signalling in plant interactions with pathogenic fungi and oomycetes. *J Exp Bot*. 72:848–863.
- 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.

- Kilian, S., and Werner, D. 1996. Enhanced denitrification in plots of N₂-fixing faba beans compared to plots of a non-fixing legume and non-legumes. *Biology and fertility of soils*. 21: 77-83.
- Kinkel, T. L., Ramos-Montañez, S., Pando, J. M., Tadeo, D. V., Strom, E. N., Libby, S. J., and Fang, F. C. 2016. An essential role for bacterial nitric oxide synthase in *Staphylococcus aureus* electron transfer and colonization. *Nat Microbiol*. 2:16224.
- Kolbert, Z., Barroso, J. B., Brouquisse, R., Corpas, F. J., Gupta, K. J., Lindermayr, C., Loake, G. J., Palma, J. M., Petřivalský, M., Wendehenne, D., and Hancock, J. T. 2019. A forty year journey: The generation and roles of NO in plants. *Nitric Oxide*. 93:53–70.
- Leach, J., Keyster, M., Du Plessis, M., and Ludidi, N. 2010. Nitric oxide synthase activity is required for development of functional nodules in soybean. *J Plant Physiol*. 167:1584–1591.
- Lindström, K., and Mousavi, S. A. 2019. Effectiveness of nitrogen fixation in rhizobia. *Microb Biotechnol*. 13(5):1314-1335.
- Mandel, M. J., and Dunn, A. K. 2016. Impact and influence of the natural Vibrio-Squid symbiosis in understanding bacterial–animal interactions. *Front Microbiol*. 7: 1982.
- Martínez-Medina, A., Pescador, L., Terrón-Camero, L. C., Pozo, M. J., and Romero-Puertas, M. C. 2019. Nitric oxide in plant-fungal interactions. *J Exp Bot*. 70:4489–4503.
- 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 Physiol*. 157:1505–1517.
- Mogen, A. B., Carroll, R. K., James, K. L., Lima, G., Silva, D., Culver, J. A., Petucci, C., Shaw, L. N., and Rice, K. C. 2017. *Staphylococcus aureus* nitric oxide synthase (saNOS) modulates aerobic respiratory metabolism and cell physiology. *Mol. Microbiol*. 105:139–157.
- Nagata, M., Murakami, E., Shimoda, Y., Shimoda-Sasakura, F., Kucho, K., Suzuki, A., Abe, M., Higashi, S., and Uchiumi, T. 2008. Expression of a class I hemoglobin gene and production of nitric oxide in response to symbiotic and pathogenic bacteria in *Lotus japonicus*. *Mol. Plant Microbe Interact*. 21:1175–1183.
- Oldroyd, G. E. D., 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.
- Pande, A., Mun, B.-G., Lee, D.-S., Khan, M., Lee, G.-M., Hussain, A., and Yun, B.-W. 2021. NO Network for Plant-Microbe Communication Underground: A Review. *Front Plant Sci*. 12:658679.

- Patriarca, E. J., Tatè, R., and Iaccarino, M. 2002. Key role of bacterial NH₄(⁺) metabolism in Rhizobium-plant symbiosis. *Microbiol Mol Biol Rev.* 66:203–222.
- Pauly, N., Pucciariello, C., Mandon, K., Innocenti, G., Jamet, A., Baudouin, E., Hérouart, D., Frendo, P., and Puppo, A. 2006. Reactive oxygen and nitrogen species and glutathione: key players in the legume-Rhizobium symbiosis. *J Exp Bot.* 57:1769–1776.
- Porrini, C., Ramarao, N., and Tran, S.-L. 2020. Dr. NO and Mr. Toxic - the versatile role of nitric oxide. *Biol. Chem.* 401:547–572.
- 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.
- Roux, B., Rodde, N., Jardinaud, M.-F., Timmers, T., Sauviac, L., Cottret, L., Carrère, S., Sallet, E., Courcelle, E., Moreau, S., Debellé, F., Capela, D., de Carvalho-Niebel, F., Gouzy, J., Bruand, C., and Gamas, P. 2014. An integrated analysis of plant and bacterial gene expression in symbiotic root nodules using laser-capture microdissection coupled to RNA sequencing. *Plant J.* 77:817–837.
- Ruiz, B., Frostegård, Å., Bruand, C., and Meilhoc, E. 2021. Rhizobia: highways to NO. *Biochem Soc Trans.* 49:495–505.
- Ruiz, B., Le Scornet, A., Sauviac, L., Rémy, A., Bruand, C., and Meilhoc, E. 2019. The Nitrate Assimilatory Pathway in *Sinorhizobium meliloti*: Contribution to NO Production. *Front Microbiol.* 10:1526.
- Sainz, M., Calvo-Begueria, L., Pérez-Rontomé, C., Wienkoop, S., Abián, J., Staudinger, C., Bartesaghi, S., Radi, R., and Becana, M. 2015. Leghemoglobin is nitrated in functional legume nodules in a tyrosine residue within the heme cavity by a nitrite/peroxide-dependent mechanism. *Plant J.* 81:723–735.
- Salas, A., Tortosa, G., Hidalgo-García, A., Delgado, A., Bedmar, E. J., Richardson, D. J., Gates, A. J., and Delgado, M. J. 2019. The Hemoglobin Bjgb from *Bradyrhizobium diazoefficiens* controls NO homeostasis in soybean nodules to protect symbiotic nitrogen fixation. *Front Microbiol.* 10:2915.
- Samalova, M., Johnson, J., Illes, M., Kelly, S., Fricker, M., and Gurr, S. 2013. Nitric oxide generated by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* drives plant infection. *New Phytol.* 197:207–222.
- Sánchez, C., Gates, A. J., Meakin, G. E., Uchiumi, T., Girard, L., Richardson, D. J., Bedmar, E. J., and Delgado, M. J. 2010. Production of Nitric Oxide and nitrosylleghemoglobin complexes in soybean nodules in response to flooding. *MPMI.* 23:702–711.

- Santolini, J. 2019. What does “NO-Synthase” stand for? *Front Biosci (Landmark Ed)*. 24:133–171.
- Schwember, A. R., Schulze, J., Del Pozo, A., and Cabeza, R. A. 2019. Regulation of symbiotic nitrogen fixation in legume root nodules. *Plants (Basel)*. 8(9):333.
- Shapleigh, J. P. 2006. The denitrifying prokaryotes. in: *The Prokaryotes: Volume 2: Ecophysiology and Biochemistry*, M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, and E. Stackebrandt, eds. Springer, New York, NY. 769–792.
- Signorelli, S., Sainz, M., Tabares-da Rosa, S., and Monza, J. 2020. The Role of Nitric Oxide in nitrogen fixation by legumes. *Front Plant Sci*. 11:521.
- Sun, A. 2018. The EPR Method for detecting Nitric Oxide in plant senescence. *Methods Mol. Biol*. 1744:119–124.

Figure legends

Figure 1: NO production in *Medicago truncatula* nodules occupied by a *Sinorhizobium meliloti* WT or different mutant strains. The fluorescence intensity of the NO production by nodules was measured 3 weeks post-inoculation by using the 4,5-diaminofluorescein probe (DAF-2; Sigma-Aldrich). Four independent series of plants were analyzed. The mean of values obtained for the WT strain was calculated for each series. In a same series, each value obtained for a WT or a mutant is normalized with this WT mean value. Data are means +/- Standard Deviation ($n = 4$). Letters above bars indicate statistically significant differences according to one-way ANOVA and Tuckey post-hoc test ($n=4$; $p<0.05$).

nap: *napEFDABC* deletion, *nir*: *nirKV* deletion, *nap nir*: *napEFDABC* and *nirKV* deletions, *nir nirBD narB*: *nirKV* and *nirBD narB* deletions, *nap nir nirBD narB*: *nap EFDABC*, *nirKV* and *nirBD narB* deletions.

Figure 2: Nodulation competitiveness of *S. meliloti* wild type (WT) and different mutant strains. Each plant was inoculated with a mixture of two strains, i.e. a WT and a mutant strain (50 μ l, 1:1 strain mixture, OD600=0.01). Each strain contains a plasmid carrying either a GFP or a RFP encoding gene. Two to three weeks post-inoculation, nodules stained in red and green were counted. For each series of plants, a competitiveness index was calculated (CI). CI is defined as the ratio of nodule number occupied by a mutant to the nodule number occupied by a WT strain, divided by the ratio of mutant CFU (Colony Forming Unit) to WT CFU in the inoculum. Data are means \pm SEM from 3 to 9 independent series. A CI not significantly different of 1 indicates that the competitiveness of both strains is identical. Statistical analysis was performed by a one sample t-test. *, ** indicate significant difference when compared to 1, ($p < 0.05$, 0.01 respectively).
n= total number of plants tested.

nap nir: napEFDABC and *nirKV* deletions, *nap nir nirBD narB: nap EFDABC, nirKV* and *nirBD narB* deletions.

Figure 3: Nitrogenase activity and shoot dry weight of *M. truncatula* plants inoculated with a WT or a mutant *S. meliloti* strain. Plants were tested at the indicated time points (in days post inoculation-dpi) for nitrogen fixation efficiency using an acetylene reduction assay (ARA) and dry weight of the aerial part of the plants. The mean of values obtained for ARA from the WT strain was calculated for each series. In a same series, each value obtained for a WT or a mutant is normalized with this WT mean value. Each value obtained is represented on the graph. Two to four independent series were performed. Statistical analysis was performed by an unpaired t test followed by Welch's correction if necessary. The mean and standard deviation for the dry weight of the shoots and the number of nodules per plant is shown in the table. When indicated, plants were grown in presence of KNO₃ (0.5 mM).

nap nir: napEFDABC and *nirKV* deletions

Table S1: List of strains and plasmids used in this study**Table S2: List of oligonucleotides used in this study****Figure S1: Nodule senescence kinetics of *M. truncatula* inoculated with *S. meliloti* WT or *nap nir* mutant strain**

M. truncatula plantlets were inoculated either with a *S. meliloti* WT strain or with a strain where the *nap* operon (*napEFDABC*) and *nir* operon (*nirKV*) have been deleted. At each time point, total and senescent nodules, characterized by the appearance of a visible green zone, were counted for each plant. The percentage of senescent nodules was determined for each plant. Two independent series of 10 and 20 plants were analyzed. The mean and standard deviation obtained from the 30 plants is shown on the graph.

Figure S2: Nitrogenase activity and shoot dry weight of *M. truncatula* plants inoculated with a WT or mutant *S. meliloti* strains. Plants were inoculated either with a WT strain, a mutant where the entire *nor* operon has been deleted or a mutant where *nap*, *nir* and *nor* operons have been deleted. Nitrogen fixation efficiency was measured using an acetylene reduction assay (ARA) and dry weight of the aerial part of the plants were measured about 30 days post inoculation. The mean of values obtained for ARA from the WT strain was calculated for each series. In a same series, each value obtained for a WT or a mutant is normalized with this WT mean value. Each value obtained is represented on the graph. 3 independent series were performed. Statistical analysis was performed by a Mann-Whitney test. ** indicate significant difference ($p < 0.01$). The mean and standard deviation for the dry weight of the shoots and the number of nodules per plant are shown in the table.

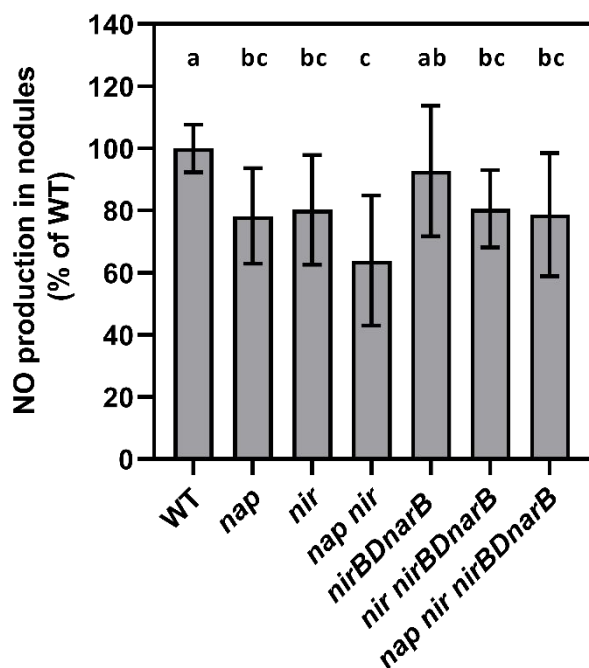


Figure 1: NO production in *Medicago truncatula* nodules occupied by a *Sinorhizobium meliloti* WT or different mutant strains. The fluorescence intensity of the NO production by nodules was measured 3 weeks post-inoculation by using the 4,5-diaminofluorescein probe (DAF-2; Sigma-Aldrich). Four independent series of plants were analyzed. The mean of values obtained for the WT strain was calculated for each series. In a same series, each value obtained for a WT or a mutant is normalized with this WT mean value. Data are means +/- Standard Deviation ($n = 4$). Letters above bars indicate statistically significant differences according to one-way ANOVA and Tuckey post-hoc test ($n=4$; $p<0.05$).

nap: *napEFDABC* deletion, *nir*: *nirKV* deletion, *nap nir*: *napEFDABC* and *nirKV* deletions, *nir nirBD narB*: *nirKV* and *nirBD narB* deletions, *nap nir nirBD narB*: *nap EFDABC*, *nirKV* and *nirBD narB* deletions.

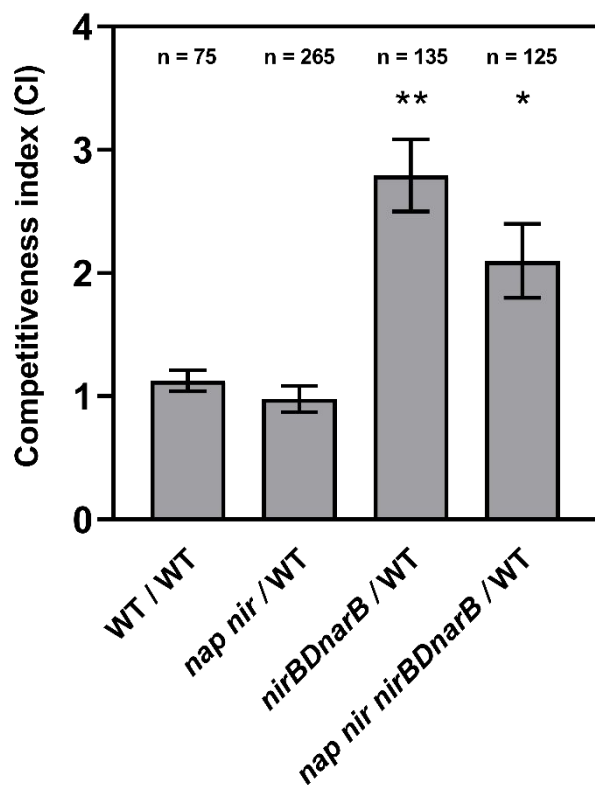


Figure 2: Nodulation competitiveness of *S. meliloti* wild type (WT) and different mutant strains. Each plant was inoculated with a mixture of two strains, i.e. a WT and a mutant strain (50 μ l, 1:1 strain mixture, OD600=0.01). Each strain contains a plasmid carrying either a GFP or a RFP encoding gene. Two to three weeks post-inoculation, nodules stained in red and green were counted. For each series of plants, a competitiveness index was calculated (CI). CI is defined as the ratio of nodule number occupied by a mutant to the nodule number occupied by a WT strain, divided by the ratio of mutant CFU (Colony Forming Unit) to WT CFU in the inoculum. Data are means \pm SEM from 3 to 9 independent series. A CI not significantly different of 1 indicates that the competitiveness of both strains is identical. Statistical analysis was performed by a one sample t-test. *, ** indicate significant difference when compared to 1, ($p < 0.05$, 0.01 respectively). n= total number of plants tested. *nap nir*: *napEFDABC* and *nirKV* deletions, *nap nir nirBD narB*: *nap EFDABC*, *nirKV* and *nirBD narB* deletions.

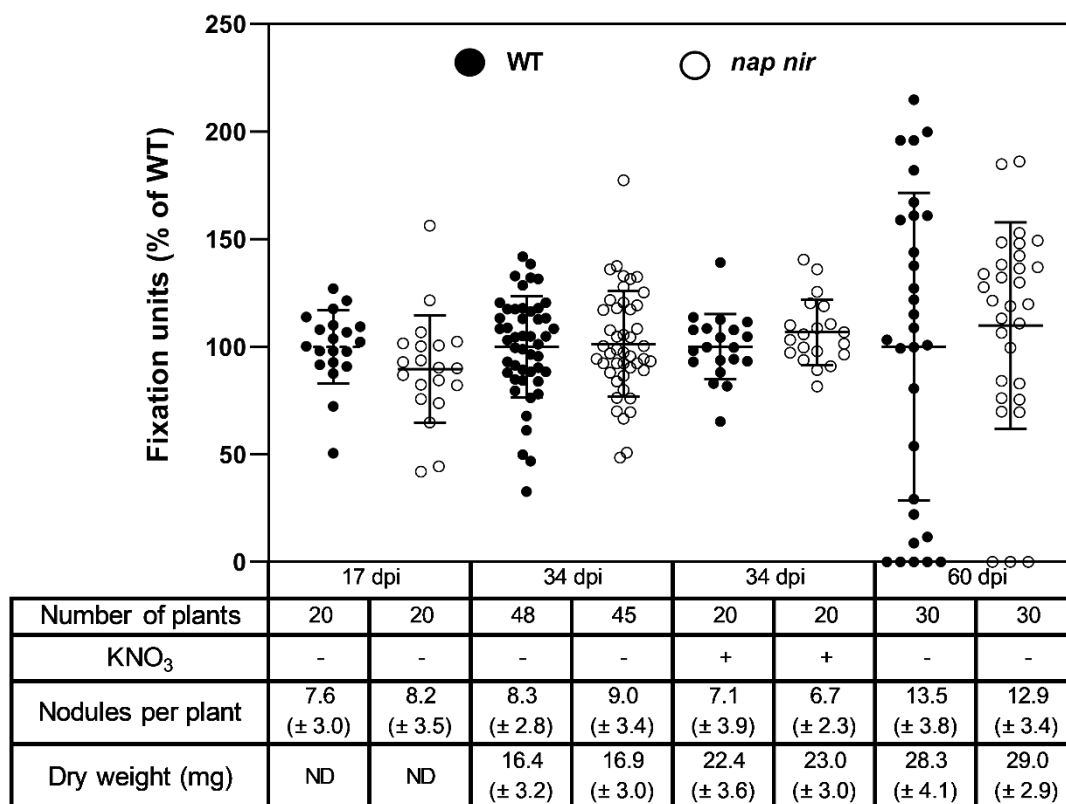


Figure 3: Nitrogenase activity and shoot dry weight of *M. truncatula* plants inoculated with a WT or a mutant *S. meliloti* strain. Plants were tested at the indicated time points (in days post inoculation-dpi) for nitrogen fixation efficiency using an acetylene reduction assay (ARA) and dry weight of the aerial part of the plants. The mean of values obtained for ARA from the WT strain was calculated for each series. In a same series, each value obtained for a WT or a mutant is normalized with this WT mean value. Each value obtained is represented on the graph. Two to four independent series were performed. Statistical analysis was performed by an unpaired t test followed by Welch's correction if necessary. The mean and standard deviation for the dry weight of the shoots and the number of nodules per plant is shown in the table. When indicated, plants were grown in presence of KNO₃ (0.5 mM). *nap nir*: *napEFDABC* and *nirKV* deletions.

Role of Nitric Oxide (NO) of bacterial origin in the *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium meliloti* symbiosis

Bryan Ruiz¹, Laurent Sauviac¹, Renaud Brouquisse², Claude Bruand¹ and

Eliane Meilhoc¹

¹Laboratoire des Interactions Plantes-Microbes-Environnement (LIPME), Université de Toulouse, INRAE, CNRS, INSA, Castanet-Tolosan, France

²Institut Sophia Agrobiotech (ISA), INRAE, CNRS, Université côte d'Azur, 06903 Sophia Antipolis Cedex, France

Supplementary Materials and methods

Bacterial Strains and Growth Conditions

The bacterial strains and plasmids used are listed in **Table S1**.

The wild type bacterial strain *Sinorhizobium meliloti* 2011 was used for the different experimentations and construction of mutants. *S. meliloti* cells were grown under aerobic conditions at 28 C° in Luria Bertani medium supplemented with 2.5 mM MgSO₄ and 2.5 mM CaCl₂ (LBMC). When a selection was needed, antibiotics were added in the medium at the following concentrations: 100 µg/ml streptomycin (Sm), 40 or 80 µg/ml gentamycin (Gm), 10 µg/ml tetracyclin (Tc).

Construction of *S. meliloti* Mutant Strains

The oligonucleotides used for plasmid construction and verification of deletions are shown in **Table S2**. All plasmid constructions were performed in *Escherichia coli* DH5α.

To delete the *nap* (*napEFDABC*), *nir* (*nirKV*) or *nor* (*norECBDQ*) operon, the 5' and 3' flanking regions of the operons were amplified by PCR by using genomic DNA of the strain GMI11495 (CBT707) as template and the oligonucleotides OCB1984/1985 to amplify the 5' flanking region (5'UTR*napE*) and OCB1986/1987 to amplify the 3' flanking region (3' UTR *napC*) of the *nap* operon, OCB1976/1977 (5'UTR*nirK*) and OCB1978/1979 (3'UTR*nirV*) for the *nir* operon and OCB2253/2254 (3'UTR*norD*) and OCB2255/2256 (5'UTR*norE*) for the *nor* operon.

For *nap* and *nir* operons, PCR products were individually cloned into the pGEM-T vector to generate the plasmids pBRC-4-5-3 and pBRC-4-6-10 for *napE* and *napC* fragments respectively and pBRC-4-1-3 and pBRC-4-2-4 for *nirK* and *nirV* fragments respectively (Table S1). The absence of mutations in the cloned *S. meliloti* regions was verified by DNA sequencing. The plasmids were digested with either BamHI/Sall or BamHI/SacI to isolate the 5' and 3' UTR, respectively. The UTRs were purified by agarose gel electrophoresis and gel purification kit (Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System) and ligated with pJQ200mp19 digested with Sall/SacI yielding pBRC-5-1-3 (for *nap* operon deletion) and the pBRC-5-3-3 (for *nir* operon deletion).

For *nor* operon, PCR products (5'UTR*norE* and 3' UTR*norD*) were purified by agarose gel electrophoresis and gel purification kit (Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System) and directly cloned into Sall/SacI digested pJQ200mp19 using the In-Fusion HD Cloning Plus CE

kit (Takara), giving pBRC-10-1. The absence of mutations in the cloned *S. meliloti* region was verified by DNA sequencing.

The plasmids were introduced into *S. meliloti* by electroporation to give the mutant strains CBT2663 (*nap*), CBT2659 (*nir*) and CBT2767 (*nor*) respectively (Table S1) (Dupuy et al., 2017). For this, first a single crossing over genomic integration was selected by Gm resistance. The resulting strain was then grown in the absence of antibiotics and cells having lost the plasmid following a second recombination event were selected by plating on LBMC medium supplemented with 5% sucrose as the plasmid carries the *sacB* gene which is lethal for *S. meliloti* in the presence of sucrose. A Gm sensitive clone that grew on sucrose containing medium was selected and the deletion was verified by PCR using the primers OCB2065/2066 and OCB885/886 (*nap* operon), OCB2061/2062 and OCB887/888 (*nir* operon), OCB2257/2258 (*nor* operon) and by sequencing the products.

To construct the mutant deleted for both *nap* and *nir* operons, the plasmid pBRC-5-3-3 was transformed in the strain CBT2663 by electroporation to give the strain CBT2697. The strain CBT2473, where the whole *nirBD-narB* region has been deleted, was used to generate the strains CBT2696 where the *nir* operon was deleted using the plasmid pBRC-5-3-3. The strain CBT2696 was used to generate the strain CBT2698 where the *nap* operon was deleted using the plasmid pBRC-5-1-3. As many genes were sequentially deleted in the strain CBT 2698, we decided to sequence the whole genome of this strain to verify the mutations. Sequencing was performed on Pacbio SMRTCell Sequel II system at the GENTYANE sequencing platform (INRAE Clermont-Ferrand, France ; <https://www.france-genomique.org/platforms-and-equipments/sequencing-platform-gentyane-clermont-ferrand/?lang=en>).

To construct the mutant deleted for *nap*, *nir* and *nor* operon the plasmid pBRC-10-1 was transformed in the strain CBT2697 by electroporation to give the strain CBT2768.

The deletions were verified with the same oligonucleotide pairs as described above and by sequencing the product.

Plant Assays

Medicago truncatula cv Jemalong A17 was used in all experiments. The seeds were first scarified using a few milliliters of anhydrous sulphuric acid for about 10 minutes, rinsed with sterile water and then sterilized with a bleach solution (3 %) for 2 minutes. The seeds were then rinsed several times with sterile water and placed on plates containing 1 % agar. The plates were incubated at 4°C for at least 20 hours and then at 20°C for another 24 hours in the dark to

allow seeds to germinate. Plantlets were placed in tubes (1 plant) or square plates (5 plants) containing 15 or 50 ml of nitrogen-free Fahraeus medium, respectively (0.132 g/L CaCl₂, 0.12 g/L MgSO₄·7H₂O, 0.1 g/L KH₂PO₄, 0.075 g/L Na₂HPO₄·2H₂O, 5 mg/L Fe-citrate, and 0.07 mg/L of each: MnCl₂·4H₂O, CuSO₄·5H₂O, ZnCl₂, H₃BO₃, Na₂MoO₄·2H₂O, adjusted to pH 7.5 before sterilization) (<https://www.noble.org/globalassets/docs/medicago-handbook>). Plants were then placed for 48h in the culture room (23 °C, 16h light and 8h dark photoperiod) before inoculation with the different *S. meliloti* strains.

For inoculation, *S. meliloti* cells were cultivated on LBMC plates supplemented with Sm. A few colonies were then resuspended in sterile distilled water to a final optical density at 600nm (OD₆₀₀) of 0.001. The suspension (100 µl) was used to inoculate plants grown in tubes. The first nodules appeared about 5-7 days post-inoculation. Nodules were counted every two days. Senescent nodules displaying a green color at their basis were also counted (Cam et al., 2012).

At 17, 34- and 69-days post-inoculation, plants were tested for nitrogen fixation by mean of an ARA assay and the shoot dry weight of the plants was measured.

ARA test was performed on each plant grown in tube. Each tube was fitted with a rubber stopper. After removing 1 ml of the gas phase content, 1 ml of acetylene was added to each tube. Plants were then incubated in the growth chamber for 4 h (linear phase of ethylene production). 400 µl of each tube gas phase was injected in a gas chromatograph (7820A, Agilent) equipped with a hydrogen flame ionization detector (FID) detector and an Agilent column 115-3552. Hydrogen (flow 30 ml/min, column pressure 9.57 psi) was used as vector gaz. Air and Makeup nitrogen were used with flow of 400ml/min and 20ml/min respectively. Oven and FID detector temperatures were set at 30°C and 200°C respectively. Samples were injected using a pulsed splitless mode (pressure: 30 psi for 0.75 min).

The amount of ethylene produced by each plant was assessed by measuring the peak area. In a series, 10 to 15 plants were tested for the WT strain and each bacterial mutant tested. The mean of values obtained for the WT strain was calculated. Each value obtained for a mutant is expressed as a percentage of this WT mean value. Two to four independent series were performed. In total, for each mutant the mean of values obtained for 20 to 49 plants total was calculated. Statistical analysis was performed by an unpaired t test followed by Welch's correction if necessary.

Once the ARA test has been performed, each plant shoot was cut and incubated at 65°C for 48h before measuring its dry weight. The mean value was calculated at each time point. Statistical analysis was performed by a Mann-Whitney test.

For competition assays, seeds of *M. truncatula* were prepared as described above. 5 plantlets were placed on a square plate containing 50 ml of nitrogen free Fahraeus medium. Each plant on a plate was inoculated with a mixture of two strains, i.e a WT and a mutant strain (50 μ l, 1:1 strain mixture, OD₆₀₀=0.01). Each strain contained a plasmid carrying either a GFP or a RFP encoding gene. To verify that the mixture contained equivalent amounts of each strain, dilutions of each strain inoculum were spread out on LBMC plates supplemented with Sm and Tc and CFUs were determined. Two to three weeks post-inoculation, nodules were observed with a fluorescence stereo zoom microscope (Microscope: Axio Zoom.V16, Zeiss; Source: HXP 200C; Filter GFP long pass Emission 485/12 Excitation 515LP, GFP band pass Emission 470/40 Excitation 525/50, RFP Emission 546/12 Excitation 607/86). Nodules stained in red and green were counted. A series contained either 15 to 40 plants inoculated with a WT containing the GFP reporter gene and a mutant strain containing the RFP reporter gene or 15 to 40 plants with inverted reporter plasmids. For each series of plants, a competitiveness index was calculated (CI). CI is defined as the ratio of nodule number occupied by a mutant to the nodule number occupied by a WT strain, divided by the ratio of mutant CFU (Colony Forming Unit) to WT CFU in the inoculum. Three to 9 independent series were performed. A control series containing only WT cells with either the RFP or the GFP reporter gene was used to verify that there was no fluorescence bias. Statistical analysis was performed by a one sample t-test.

Measurement of NO production

NO detection was essentially performed as in Horchani et al. (2011) using the 4,5-diaminofluorescein probe (DAF-2, Sigma-Aldrich). Briefly, nodules (20-30 mg fresh weight) were incubated in 1 ml of detection buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 10 mM KCl) in the presence of 10 μ M DAF-2. The production of NO was measured using a microplate reader spectrofluorimeter (Xenius, SAFAS, Monaco), with excitation at 495 nm and emission at 515 nm. As a control, NO production was measured in the same experimental system through the use of the Cu(II) fluorescein (CuFL) fluorescent probe (Strem Chemicals) instead of DAF-2 in the detection buffer as described in (Horchani et al., 2011). Similar results were obtained with

both probes. Data are expressed as a percentage of the value obtained with nodules occupied by a WT strain in the same series. The experiment was repeated four times.

Supplementary references

- Cam, Y., Pierre, O., Boncompagni, E., Hérouart, 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.
- Cheng, H.-P., and Walker, G. C. (1998). Succinoglycan is required for initiation and elongation of infection threads during nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 180, 5183–5191.
- Dupuy, P., Gourion, B., Sauviac, L., and Bruand, C. (2017). DNA double-strand break repair is involved in desiccation resistance of *Sinorhizobium meliloti*, but is not essential for its symbiotic interaction with *Medicago truncatula*. *Microbiology*, 163, 333–342.
- Horchani, F., Prévot, M., Bosdari, A., Evangelisti, E., Meilhoc, E., Bruand, C., et al. (2011). Both plant and bacterial nitrate reductases contribute to Nitric Oxide production in *Medicago truncatula* nitrogen-fixing nodules. *Plant Physiol* 155, 1023–1036.
- Pobigaylo, N., Wetter, D., Szymczak, S., Schiller, U., Kurtz, S., Meyer, F., et al. (2006). Construction of a large signature-tagged mini-Tn5 transposon library and its application to mutagenesis of *Sinorhizobium meliloti*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 4329–4337.
- Quandt, J., and Hynes, M. F. (1993). Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in gram-negative bacteria. *Gene* 127, 15–21.
- Ruiz, B., Le Scornet, A., Sauviac, L., Rémy, A., Bruand, C., and Meilhoc, E. (2019). The nitrate assimilatory pathway in *Sinorhizobium meliloti*: contribution to NO production. *Front Microbiol* 10, 1526.
- Smit, P., Raedts, J., Portyanko, V., Debellé, F., Gough, C., Bisseling, T., et al. (2005). NSP1 of the GRAS protein family is essential for rhizobial Nod factor-induced transcription. *Science* 308, 1789–1791.

Strains and plasmids	Description	Reference or source
<i>Sinorhizobium meliloti</i>		
GMI11495 (CBT707)	<i>S. meliloti</i> 2011, Sm ^R	Pobigaylo et al., 2006
CBT2473	CBT707 Δ nirBDnarB, Sm ^R	Ruiz et al., 2019
CBT2663	CBT707 Δ napEFDABC, Sm ^R	This study
CBT2659	CBT707 Δ nirKV, Sm ^R	This study
CBT2767	CBT707 Δ norECBQD, Sm ^R	This study
CBT2697	CBT2663 (Δ napEFDABC) Δ nirKV, Sm ^R	This study
CBT2768	CBT2697 (Δ napEFDABC Δ nirKV) Δ norECBQD, Sm ^R	This study
CBT2696	CBT2473 (Δ nirBDnarB) Δ nirKV, Sm ^R	This study
CBT2698	CBT2696 (Δ nirBDnarB Δ nirKV) Δ napEFDABC, Sm ^R	This study
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	F– endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20 ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK–mK+), λ –	Invitrogen
Plasmids		
pGEM-T	Cloning vector, Amp ^R	Promega
pBRC-4-5-3	5' UTR <i>napE</i> (487 pb) ligated with pGEM-T	This study
pBRC-4-6-10	3' UTR <i>napC</i> (489 pb) ligated with pGEM-T	This study
pBRC-4-1-3	5' UTR <i>nirK</i> (464 pb) ligated with pGEM-T	This study
pBRC-4-2-4	3' UTR <i>nirV</i> (460 pb) ligated with pGEM-T	This study
pJQ200-mp19	Suicide vector, Gm ^R	Quandt and Hynes, 1993
pBRC-5-1-3	5' 3' UTRs <i>napEFDABC</i> ligated with pJQ200-mp19, Gm ^R	This study
pBRC-5-3-3	5' 3' UTRs <i>nirKV</i> ligated with pJQ200-mp20, Gm ^R	This study
pBRC-10-1	5' 3' UTRs <i>norECBQD</i> ligated with pJQ200-mp20, Gm ^R	This study
pHC60	Constitutive expression of GFP, Tet ^R	Cheng and Walker, 1998
pBHR-mRFP	Constitutive expression of RFP, Tet ^R	Smit et al., 2005

Table S1: List of strains and plasmids used in this study

Oligonucleotides	Sequences 5'-3'	Description
Deletion mutant construct		
OCB1984	GGATCCTCGGTATCGGGCATTCAAG	fw 5' UTR <i>napE</i>
OCB1985	GTCGACTGACTTTCGACGTGCCAGG	rev 5' UTR <i>napE</i>
OCB1986	GAGCTCACTCGACCATCGAGTCCGC	fw 3' UTR <i>napC</i>
OCB1987	GGATCCTCATGGACGAGGCTCACAG	rev 3' UTR <i>napC</i>
OCB1976	GGATCCGGAACCTCTCCTTGAGAAG	fw 5' UTR <i>nirK</i>
OCB1977	GAGCTCGAAGCCGAACAGCATCTCG	rev 5' UTR <i>nirK</i>
OCB1978	GTCGACCTCAGTACCATGGCGCAATG	fw 3' UTR <i>nirV</i>
OCB1979	GGATCCGAGCCGACGCTTGAGATCG	rev 3' UTR <i>nirV</i>
OCB2253	ATGCCTGCAGGTTCGAGCATCAAGCTGAGAACAG	fw 3' UTR <i>norD</i>
OCB2254	ATTGGGTGCGGATCGAGA	rev 3' UTR <i>norD</i>
OCB2255	CGATCCGCACCCAATGCGGAATAGGAGAAAGGCG	fw 5' UTR <i>norE</i>
OCB2256	CGGCCAGTGAATTCGCTGACGTCCAAGGCGAAT	rev 5' UTR <i>norE</i>
Deletion screening		
OCB2065	CCTGCTCGCTGCGAATCTC	fw <i>napEFDABC</i>
OCB2066	ATGTTCGAGACGATCAAGGAC	rev <i>napEFDABC</i>
OCB885	CCGTTCGAGCAGGACCGAAT	fw <i>napEFDABC</i>
OCB886	GAACAGGCCTTTCTGGATGTA	rev <i>napEFDABC</i>
OCB2061	TACGACACTCCGGTTCGATC	fw <i>nirKV</i>
OCB2062	GCCAGCCAGAGCGTGAACA	rev <i>nirKV</i>
OCB887	CGACGGCAAAGGCAATTCAA	fw <i>nirKV</i>
OCB888	CGGGCTGCTCGAAGGTGTA	rev <i>nirKV</i>
OCB1606	CGTCATCCTTGACCAGGGTC	fw <i>nirB / nirBDnarB</i>
OCB1607	CTGCCGAAATTGGCGGGATG	rev <i>nirB</i>
OCB1611	CCTATTTTCGACCGCTTCGTC	fw <i>narB</i>
OCB1612	CGGATCGCCTGTGCCAGG	rev <i>narB / nirBDnarB</i>
OCB2257	GAGATGCTGCTCCGCGG	fw <i>norECBQD</i>
OCB2258	GCGGGATGTGGTCAACATC	rev <i>norECBQD</i>

Table S2: List of oligonucleotides used in this study

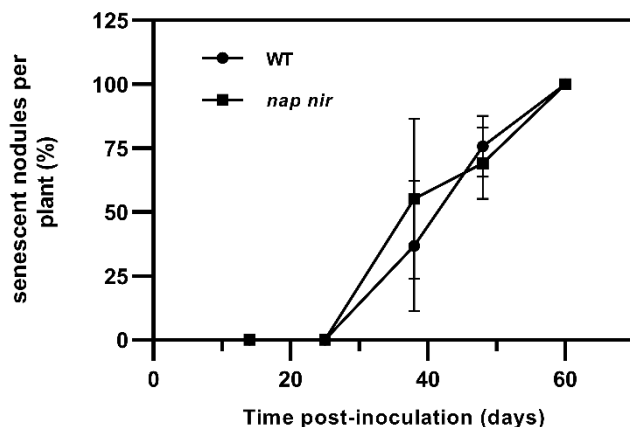


Figure S1: Nodule senescence kinetics of *M. truncatula* inoculated with *S. meliloti* WT or *nap nir* mutant strain

M. truncatula plantlets were inoculated either with a *S. meliloti* WT strain or with a strain where the *nap* operon (*napEFDABC*) and *nir* operon (*nirKV*) have been deleted. At each time point, total and senescent nodules, characterized by the appearance of a visible green zone, were counted for each plant. The percentage of senescent nodules was determined for each plant. Two independent series of 10 and 20 plants were analyzed. The mean and standard deviation obtained from the 30 plants is shown on the graph.

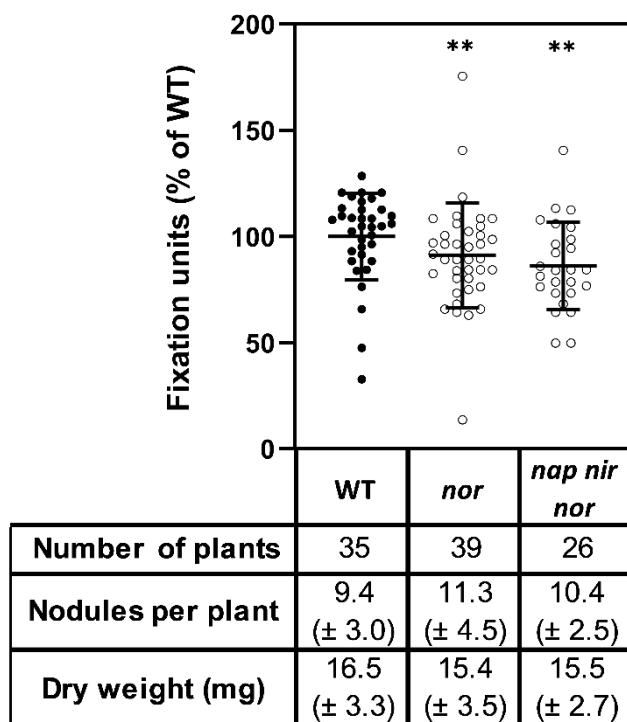


Figure S2: Nitrogenase activity and shoot dry weight of *M. truncatula* plants inoculated with a WT or mutant *S. meliloti* strains. Plants were inoculated either with a WT strain, a mutant where the entire *nor* operon has been deleted or a mutant where *nap*, *nir* and *nor* operons have been deleted. Nitrogen fixation efficiency was measured using an acetylene reduction assay (ARA) and dry weight of the aerial part of the plants were measured about 30 days post inoculation. The mean of values obtained for ARA from the WT strain was calculated for each series. In a same series, each value obtained for a WT or a mutant is normalized with this WT mean value. Each value obtained is represented on the graph. 3 independent series were performed. Statistical analysis was performed by a Mann-Whitney test. ** indicate significant difference ($p < 0.01$). The mean and standard deviation for the dry weight of the shoots and the number of nodules per plant are shown in the table.

Les premières expériences ont consisté à déterminer l'implication de la voie de dénitrification dans la synthèse de NO au sein des nodosités. La délétion des opérons *nap* (*napEFDABC*) et *nir* (*nirKV*) a entraîné une diminution de 23 % et 21.5 % respectivement de la quantité de NO dans le nodule en comparaison avec une souche sauvage. Les gènes de la voie d'assimilation *narB* et *nirB* sont particulièrement exprimés dans la zone III du nodule (zone de fixation d'azote), suggérant un rôle possible de cette voie pendant l'interaction symbiotique. Pour tester cette hypothèse, nous avons inoculé des plantules de *M. truncatula* avec des souches mutantes pour la nitrate réductase *narB* ou un double mutant *nirBD narB*. Aucun phénotype n'a été observé en comparaison avec des plantes inoculées avec une souche sauvage. Ces résultats nous ont permis de suggérer que la voie d'assimilation du nitrate n'est pas essentielle pour la symbiose. Cependant, nous n'avons pas d'information sur l'implication de cette voie dans la synthèse de NO au sein de la nodosité. L'inoculation de plantes avec le mutant de l'opéron *nirBD narB* a permis de montrer que cette voie ne participe pas à la synthèse de NO dans le nodule. En conclusion, la dénitrification est la seule voie bactérienne permettant de synthétiser du NO au sein des nodosités.

Nous avons effectué des expériences de compétition pour la nodulation entre les mutants affectés dans les voies de synthèse de NO et une souche WT. Ces expériences ont permis de montrer qu'il n'y avait pas de différence de compétitivité entre les souches ne produisant pas de NO et une souche WT, suggérant que le NO produit par la bactérie n'est pas impliqué dans l'initiation de l'interaction symbiotique et que seul le NO produit par la plante est nécessaire à ces étapes précoces. Cela n'exclut pas que la synthèse de NO par la plante puisse compenser le défaut de synthèse de NO bactérien. De façon intéressante, nous avons observé durant ces expériences qu'un mutant de la voie assimilatrice du nitrate était plus compétitif que la souche sauvage, suggérant que l'assimilation du nitrate pourrait inhiber l'initiation de l'interaction symbiotique entre *M. truncatula* et *E. meliloti*.

Enfin, pour connaître l'implication du NO d'origine bactérienne au cours de l'interaction symbiotique, nous avons utilisé le mutant *nap nir* de la voie de dénitrification pour suivre à différents temps (17, 34 et 69 dpi) des caractéristiques phénotypiques telles que la fixation d'azote ou le poids sec des plantes. Les résultats ne montrent aucune différence de ces différentes caractéristiques en comparaison avec des plantes inoculées avec une souche WT, écartant ainsi un rôle essentiel de la synthèse bactérienne du NO dans le maintien de

l'interaction symbiotique. Le corollaire de cette conclusion est que les premières étapes de la dénitrification n'ont pas un rôle essentiel en symbiose. Pour aller plus loin, nous avons aussi muté la NO réductase *Nor*, enzyme qui permet la réduction du NO en N₂O. La mutation de *nor* entraîne une augmentation du nombre de nodules et une diminution significative de la fixation d'azote à 34 dpi par rapport aux plantes inoculées avec la souche WT, suggérant que la NO réductase est impliquée dans le maintien de l'interaction symbiotique. Ces résultats sont en accord avec d'autres études montrant le rôle négatif d'une augmentation de la concentration en NO au sein de la nodosité (Cam et al., 2012; Meilhoc et al., 2013; Blanquet et al., 2015). À ce stade, il n'est pas possible de déterminer si l'effet négatif de l'absence de *Nor* est dû à l'augmentation de la quantité de NO ou à l'absence de cette étape qui pourrait entraîner un manque d'énergie. Malgré cela, nous pouvons conclure que la dénitrification ne semble pas être essentielle pour la symbiose.

Conclusions et perspectives

L'oxyde nitrique est une petite molécule gazeuse présente chez divers organismes et impliquée dans de nombreux processus biologiques. Cette molécule peut avoir plusieurs rôles au sein d'un même organisme en fonction de sa localisation et de sa concentration. Dans les interactions plante-pathogènes, le NO représente à la fois l'épée et le bouclier pour les deux organismes. En effet, le NO peut-être essentiel à la plante pour assurer ses défenses, mais il peut être tout aussi essentiel aux bactéries pathogènes pour leur permettre de se défendre contre le stress nitrosatif, pour mettre en œuvre leurs fonctions de virulence ou adapter leur respiration (Arasimowicz-Jelonek Magdalena and Floryszak-Wieczorek Jolanta, 2014). Au cours de la symbiose fixatrice d'azote entre la légumineuse *M. truncatula* et le rhizobium *E. meliloti*, du NO a été détecté à toutes les étapes de l'interaction. Plusieurs études ont montré que les deux partenaires participent à la production de NO dans la nodosité. La modulation de la concentration en NO par des approches pharmacologiques ou génétiques ont permis de montrer l'importance du NO à plusieurs étapes de la symbiose, de l'infection des poils racinaires jusqu'au déclenchement de la sénescence des nodosités (Berger et al., 2021). Malgré ces nombreuses connaissances, il est difficile de distinguer le rôle et la spécificité d'action du NO produit par la bactérie par rapport à celui produit par la plante. Au cours de ces travaux de thèse, nous nous sommes intéressés au rôle du NO synthétisé par la bactérie *E. meliloti* pendant l'interaction symbiotique avec la plante *M. truncatula*. Pour cela, nous avons dans un premier temps identifié et caractérisé chez *E. meliloti* la totalité des voies de synthèse de NO actives en vie libre. Dans un second temps, nous nous sommes intéressés aux rôles du NO synthétisé par *E. meliloti* pendant l'interaction symbiotique.

1. *E. meliloti* ne possède pas de NO synthase bactérienne (bNOS)

Chez les rhizobia, une seule étude datant de 2007 a émis l'hypothèse de la présence d'une bNOS chez *E. meliloti* (Pii et al., 2007). Dans cette étude, les auteurs ont utilisé une approche permettant de détecter une activité bNOS en suivant l'apparition d'un produit radio-maqué à partir d'arginine radio-maquée. Des études ont remis en question la spécificité de ce type d'expérimentation pour détecter la présence de NOS chez les bactéries ou chez les plantes. Plus récemment, une étude bio-informatique visant à détecter la présence de NOS dans le génome de nombreuses plantes a révélé que seules quelques espèces d'algues possèdent des NOS proches de NOS de mammifères dans leurs génomes (Jeandroz et al.,

2016). Une étude similaire réalisée chez les bactéries a montré que seulement quelques protéobactéries, comme par exemple certaines espèces de Sphingomonadales ou de Rhodospirillales, possèdent dans leur génome une bNOS (Santolini, 2019). Pour trancher la question de l'éventuelle présence d'une bNOS chez *E. meliloti*, nous avons recherché une activité NOS dans cette bactérie par une approche expérimentale différente de celle de l'étude de 2007. Dans nos conditions, nous n'avons pas détecté de production de NO à partir d'arginine comme substrat, ce qui nous amène à écarter la présence de bNOS chez *E. meliloti*.

Chez de nombreux pathogènes, la bNOS est nécessaire pour synthétiser spécifiquement du NO lors de l'infection. C'est le cas chez *Bacillus anthracis* où le NO est impliqué dans la résistance bactérienne au stress oxydatif et dans la modification par S-nitrosylation de protéines de macrophage (Shatalin et al., 2008; Chung et al., 2013). Chez *Staphylococcus aureus*, la production de NO par une bNOS est importante pour la virulence et pour la régulation de la respiration cellulaire (James et al., 2019). Chez *Streptomyces turgidiscabies*, une mutation du gène *nos* entraîne une absence de NO et donc la nitrification d'une phytotoxine, la thaxtamine (Johnson et al., 2008). Ces exemples montrent l'importance d'une voie dédiée à la synthèse de NO pour effectuer certaines réactions essentielles, dépendantes de la présence de NO d'origine bactérienne. On peut donc se questionner sur l'absence de bNOS chez les rhizobia, alors que le NO est nécessaire à l'établissement de l'interaction symbiotique (del Giudice et al., 2011). En effet, la dénitrification (réduction du NO_3^- en N_2) est une voie respiratoire utilisée uniquement en microaérobie, dont le NO est un intermédiaire. De ce fait, elle pourrait se révéler inefficace dans des conditions où l'oxygène n'est pas limitant, ou bien si une quantité importante de NO est nécessaire. Il serait donc intéressant d'exprimer une bNOS chez *E. meliloti* comme cela a été fait chez *E. coli* (Crane et al., 2010). Cela rendrait *E. meliloti* capable de produire du NO en aérobie, et permettrait d'observer les effets de cette synthèse sur la physiologie de cette bactérie en vie libre et au cours de l'interaction symbiotique.

2. La dénitrification est la voie principale de synthèse de NO chez *E. meliloti* en vie libre

Chez les bactéries, les bNOS ne sont pas les seules enzymes impliquées dans la synthèse de NO. Chez les procaryotes, le NO est principalement synthétisé à partir de voies respiratoires comme la dénitrification, l'oxydation de l'ammonium en anaérobie ou d'autres voies respiratoires associées (Maia and Moura, 2015). La dénitrification est présente chez de nombreuses bactéries, tout particulièrement chez les protéobactéries (Shapleigh, 2006), où elle contribue à la synthèse de NO grâce à la réduction du NO_2^- par les nitrite réductases NirK ou NirS (van Spanning, 2011). Avant le début de ces travaux, seule la voie de dénitrification avait été identifiée chez *E. meliloti* comme étant capable de synthétiser du NO en vie libre et au sein de la nodosité. En vie libre, cette voie permet à *E. meliloti* de pouvoir respirer à partir de NO_3^- en condition limitante en oxygène (microaérobie). Chez *E. meliloti*, les deux réductases permettant la synthèse de NO sont la NR NapABC et la NiR NirKV (Sánchez et al., 2011; Torres et al., 2014b). Nos résultats montrent qu'*E. meliloti* en vie libre en aérobie n'est pas capable de produire du NO. Pour synthétiser du NO, *E. meliloti* doit être placée en microaérobie et disposer de NO_3^- ou NO_2^- . De plus, la délétion des gènes codant pour la nitrite réductase NirK entraîne une absence totale de synthèse de NO dans ces conditions. Ces observations nous amènent donc à conclure que seule la dénitrification est responsable de la synthèse de NO chez *E. meliloti*. En revanche, la délétion des gènes *nap* entraîne une diminution de la synthèse de NO mais ne la supprime pas totalement, suggérant qu'une autre source de réduction du NO_3^- en NO_2^- existe chez *E. meliloti*.

3. L'assimilation du nitrate contribue à la production de NO en vie libre

Dans le génome d'*E. meliloti*, en plus des gènes codant pour la voie de dénitrification, il existe un opéron (*nirBD narB cysG*) codant pour une Nar NADPH-dépendante putative (NarB) et une NiR sirohème-dépendante putative (NirBD). CysG serait une uroporphyrin-III-C-méthyltransférase putative impliquée dans la synthèse du sirohème nécessaire au fonctionnement de NirB (Luque-Almagro et al., 2011). Chez *E. meliloti*, une première étude sur l'utilisation du

NO_3^- avait montré l'existence de deux activités nitrate réductases dans des extraits bruts, dont l'une serait attribuée à l'assimilation du nitrate et l'autre à la dissimilation du nitrate (Sekiguchi and Maruyama, 1988). Par la suite, une seconde étude a montré la présence d'activités NR et NiR en présence de $\text{NO}_3^- / \text{NO}_2^-$ uniquement dans du milieu contenant du glutamate et non du NH_4^+ (Kumar Halder and Chakrabarty, 2015). Nous avons d'abord mis en évidence le rôle de NarB et NirBD dans l'assimilation du NO_3^- en aérobic et en microaerobic. Nos résultats montrent que cette voie permet la croissance d'*E. meliloti* avec du NO_3^- comme unique source d'azote. De ce fait, *E. meliloti* possède deux voies capables de réduire le NO_3^- . D'autres rhizobia comme *B. diazoefficiens* ou *R. etli* possèdent aussi une voie assimilatrice du nitrate en plus de la voie de dénitrification pour réduire le NO_3^- (Cabrera et al., 2016; Hidalgo-García et al., 2019). Cette voie permet aux rhizobia de réduire le NO_3^- en NO_2^- puis en NH_4^+ qui servira de source d'azote pour la synthèse des molécules biologiques (Luque-Almagro et al., 2011).

Chez les bactéries, la dénitrification n'est pas la seule voie connue capable de produire du NO à partir de NO_3^- . En effet, il peut être aussi synthétisé de façon non-respiratoire à partir de molybdoenzymes comme les Nap (NR périplasmiques), les Nar (NR respiratoires membranaires) ou les Nas (NR assimilatrices) (Maia and Moura 2015; Cabrera et al. 2016). C'est le cas de *Salmonella enterica* où il a été suggéré que la production de NO pouvait être réalisée par des NR et plus particulièrement par NarG. Cette synthèse de NO représenterait environ 20% du nitrate réduit chez *S. enterica* (Gilberthorpe and Poole, 2008; Rowley et al., 2012). Cette réaction serait dépendante d'une combinaison de facteurs comme l'anaérobic, la présence de NO_3^- en concentration suffisante, et une accumulation de NO_2^- (Maia and Moura 2015). Chez *B. diazoefficiens*, l'assimilation de nitrate a été caractérisée comme une voie capable de produire du NO par un mécanisme encore inconnu. Il est tout à fait probable que d'autres espèces de rhizobia disposant d'une voie assimilatrice de NO_3^- possèdent ce type de mécanisme (Cabrera et al. 2016).

Chez *E. meliloti*, nous avons voulu savoir si cette voie nouvellement caractérisée permettrait aussi la synthèse de NO. Pour cela, nous avons effectué des dosages de NO couplés à des dosages de NO_2^- (précurseur du NO) dans différents mutants des voies de dénitrification et d'assimilation du nitrate. Nous avons montré que l'assimilation permet de synthétiser du NO_2^- qui peut être transporté dans le périplasma pour être réduit en NO par la voie de dénitrification. Ainsi, l'assimilation participe indirectement à la synthèse de NO en

venant augmenter la quantité de NO_2^- disponible pour la dénitrification. Ce mécanisme est commun à *R. etli* qui possède aussi une voie assimilatrice de NO_3^- , mais possède une voie de dénitrification partielle avec seulement une NiR périplasmique et une Nor. *R. etli* utilise la NR NarB pour réduire le NO_3^- en NO_2^- et permettre à la dénitrification de synthétiser du NO en microaérobie, malgré l'absence de NR Nap (Hidalgo-García et al., 2019). *E. meliloti* possède l'ensemble des gènes codant pour la dénitrification mais n'est pas capable de respirer en anoxie avec du NO_3^- comme peut le faire *B. diazoefficiens* (Torres et al., 2011; Bedmar et al., 2013; Torres et al., 2014b). De ce fait, la voie de dénitrification d'*E. meliloti* est considérée comme partielle. Cependant, l'addition de N_2O comme accepteur final d'électron dans le milieu de culture permet à *E. meliloti* 1021 de croître en anoxie (Bueno et al., 2015). Par ailleurs, il a été montré que la surexpression de la NR NapEFDABC permet à *E. meliloti* de croître en anoxie avec du NO_3^- (Torres et al., 2018). Ainsi, l'impossibilité d'*E. meliloti* à croître en utilisant le NO_3^- comme source d'azote proviendrait probablement d'un manque d'expression ou d'efficacité de la NR periplasmique Nap (Torres et al., 2018). En combinant ces résultats avec les nôtres, il est possible de conclure que l'assimilation du nitrate pourrait compléter la faible activité de NapA en apportant une quantité supplémentaire en NO_2^- grâce à NarB.

Cette hypothèse est possible seulement s'il existe un transporteur de NO_2^- du cytoplasme vers le périplasme. Chez *B. diazoefficiens*, un transporteur de $\text{NO}_3^- / \text{NO}_2^-$ (NarK) codé en opéron avec la NR NasC (*nark bjgb flp nasC*) serait impliqué dans l'export de NO_2^- (Cabrera et al. 2016). *R. etli* possède aussi un transporteur NarK non caractérisé dans l'opéron de la voie assimilatrice (*nark nirBD narB*) (Hidalgo-García et al., 2019). Chez *E. meliloti*, l'opéron *nirBD narB cysG* ne contient pas de gène codant un transporteur membranaire. Nos travaux se sont donc orientés vers un transporteur de type MFS, codé par le gène SMb20436. Nous avons montré que la mutation de ce gène diminue la capacité de croissance des cellules avec du NO_3^- comme unique source d'azote. De plus, cette mutation diminue la quantité de NO_2^- détectable dans le milieu de culture, donc excrété par la bactérie. Ainsi, SMb20436 pourrait être impliqué dans le transport de NO_3^- et/ou de NO_2^- chez *E. meliloti*. Il est difficile en l'absence de structure 3D et de données biochimiques, de déterminer s'il s'agit d'un transporteur de type NarK1 (nitrate/proton symport) généralement associé à l'assimilation, ou de type NarK2 (nitrate/nitrite antiport) généralement associé à la respiration (Goddard et

al., 2017; Alvarez et al., 2019). La mutation de ce transporteur n'empêche pas totalement le fonctionnement de l'assimilation, laissant penser que d'autres transporteurs de nitrate/nitrite de type MFS ou ABC seraient présents chez *E. meliloti*. On retrouve un opéron codant pour un transporteur Nrt-ABC putatif sur le mégaplasmide pSymA (SMa0583 SMa0584 SMa0585). Il serait intéressant de le caractériser pour affiner la compréhension du métabolisme du NO_3^- chez *E. meliloti*.

En parallèle, nous nous sommes intéressés à la régulation de la voie assimilatrice. Nos premiers résultats montrent que l'opéron *nirBD narB cysG* est induit en présence de nitrate, et réprimé par la présence d'ammonium. Ces résultats sont caractéristiques de la régulation de l'assimilation du nitrate chez les bactéries (Moreno-Vivián and Flores, 2007; Kumar Halder and Chakrabartty, 2015). De plus, cette voie n'est pas régulée par l'oxygène comme c'est le cas de la dénitrification. Chez *B. diazoefficiens* ou *P. denitrificans*, l'assimilation est régulée par l'intermédiaire du régulateur à deux composants NasST où NasS est un senseur de $\text{NO}_3^- / \text{NO}_2^-$ et NasT un anti-terminateur de transcription (Luque-Almagro et al., 2013; Cabrera et al., 2016; Sánchez and Minamisawa, 2019). Nos expériences préliminaires ont montré que la mutation du gène SMb21114 codant un senseur NasS putatif d'*E. meliloti*, permet l'activation de la transcription de *nirBD narB cysG*. On peut supposer que cette activation de la transcription est médiée par la libération de la protéine NasT putative codée par SMb21115. Pour compléter ces observations, il serait nécessaire d'étudier l'effet de la mutation du gène SMb21115 pour vérifier son activité sur la transcription de l'opéron *nirBD narB cysG*. Chez *B. diazoefficiens*, NasST est impliqué dans la régulation des gènes *nas*, mais aussi des gènes *nos* et *nap* en condition dénitrifiante (Sánchez et al., 2014). Récemment, une étude transcriptomique réalisée en condition dénitrifiante avec une souche de *B. diazoefficiens* mutante pour NasT a permis de montrer que cette protéine participe à la régulation d'un groupe de 77 gènes impliqués dans le métabolisme de l'azote (Sánchez et al., 2019). Chez *E. meliloti*, l'opéron SMb21114/SMb21115, codant potentiellement pour NasST, n'est pas localisé à proximité de l'opéron de la voie assimilatrice, suggérant qu'il pourrait réguler d'autres voies impliquées dans le métabolisme du nitrate (Luque-Almagro et al., 2011). Une étude transcriptomique utilisant des mutants de ce régulateur chez *E. meliloti* permettrait d'avoir une vue d'ensemble de la régulation de NasST.

Chez les alpha-protéobactéries, *E. meliloti* est un modèle pour l'étude des ARN non-codants (ARNnc). Plusieurs études impliquant des approches bio-informatiques couplées à des confirmations moléculaires ont permis de valider un nombre important d'ARNnc dans cette bactérie (Ulvé et al., 2007; del Val et al., 2007; Valverde et al., 2008). En observant l'opéron *nirBD narB cysG*, nous nous sommes intéressés à la présence d'un ARN non-codant de 159 nucléotides (SMb23331) en anti-sens du gène *narB* (Sallet et al., 2013). Cet ARNnc a été identifié plusieurs fois sous le nom de SmelB113 (156 nt) ou SMb_asRNA_2841 (78 nt) dans des études transcriptomiques dénombant plus de 2500 ARNnc anti-sens au sein du génome d'*E. meliloti* 1021 (Schlüter et al., 2013). Les ARNnc anti-sens possèdent une complémentarité totale avec leur cible et donc ne nécessitent pas forcément l'implication d'une protéine chaperonne tel que Hfq. Cela serait le cas de SMb23331 qui n'a pas été détecté dans une étude génomique visant à rechercher les cibles de Hfq chez *E. meliloti* (Torres-Quesada et al., 2014). Au cours de nos expériences, nous avons pu valider l'existence de SMb23331 par northern blotting. De plus, nos analyses de l'expression de cet ARNnc nous ont indiqué que SMb23331 et l'opéron *nirBD narB cysG* n'étaient pas régulés de la même façon. Ces résultats sont en accord avec le profil d'expression de ces différents gènes durant l'interaction symbiotique (Roux et al., 2014). Ces résultats doivent être vérifiés par d'autres approches plus quantitatives. En effet, nous ne pouvons pas exclure que l'activité promotrice observée ne soit pas celle du promoteur de SMb23331 mais plutôt la conséquence d'un clonage d'une région trop grande. Une connaissance plus précise des conditions régulant la transcription de SMb23331 sera nécessaire avant d'entreprendre une caractérisation de sa fonction. La régulation effectuée par un ARNnc anti-sens peut dépendre de sa position sur le gène cible (3' chevauchant, interne, 5' chevauchant). Les ARNnc comme SMb23331 (localisation interne) seraient susceptibles d'agir via un mécanisme de co-dégradation et non pas par des mécanismes d'interférence transcriptionnelle (Georg and Hess, 2018). Ce type de mécanisme a été décrit chez *Synechocystis* sp. PCC 6803 avec la protéine IsiA (iron stress-induced protein A) qui est régulée par *isiR*, un ARNnc anti-sens de type 2 entraînant la dégradation de l'ARNm d'*isiA* par co-dégradation sous certaines conditions (Dühning et al., 2006). D'autres études ont montré l'importance des ARNnc dans la régulation d'enzymes impliquées dans la dénitrification et le métabolisme du NO. C'est le cas chez *P. denitrificans* où l'ARNnc *denR* peut réguler 53 gènes et joue un rôle dans l'inhibition de la nitrate réductase se traduisant par une réduction du niveau de NO et de N₂O (Gaimster et al., 2016; Gaimster et al., 2019). Chez

Agrobacterium fabrum C58, l'ARNnc anti-sens *norR* est un régulateur de la dénitrification et plus particulièrement de la NO réductase NorCBQ. En condition anoxique, *norR* interagirait avec l'extrémité 3' de l'ARNm de *norQ*, provoquant une stabilisation et une accumulation de celui-ci et donc une augmentation de N₂O (Lecomte et al., 2020). Pour déterminer le rôle de SMb23331 sur l'opéron *nirBD narB cysG*, nous avons réalisé une série d'expériences qui se sont malheureusement révélées peu concluantes. En effet, seule une analyse par RT-qPCR permettant de suivre l'effet de la surexpression de SMb23331 sur les gènes *narB* et *nirB* a permis d'observer une potentielle diminution de la quantité de transcrite de *narB* en microaérobie. Cet effet répresseur de SMb23331 sur *narB* en microaérobie doit être confirmé avec l'utilisation d'un mutant de SMb23331 ou par d'autres approches, comme des mesures de l'activité enzymatique de la NR NarB.

De manière intéressante, dans le nodule, cet ARNnc est exprimé de façon inversement corrélée à celle de *narB*, indiquant un rôle potentiel dans la régulation de l'assimilation *in planta* (Roux et al., 2014). Nous avons donc regardé l'effet de la surexpression de SMb23331 sur l'interaction symbiotique avec la plante *M. truncatula*. Une diminution de la fixation d'azote associée à la surexpression de l'ARNnc SMb23331 a été observée. Il est cependant nécessaire d'approfondir ces expériences pour déterminer l'effet de la surexpression de SMb23331. Nous pouvons écarter l'hypothèse que l'effet de la surexpression de SMb23331 sur la fixation d'azote est dû à une régulation de *narB*, car la mutation de *narB* n'entraîne pas de phénotype *in planta*. Il sera intéressant de déterminer si cet effet négatif sur la fixation d'azote est non spécifique, simplement lié à une trop forte accumulation de cet ARNnc dans les cellules, ou si cet ARNnc joue un rôle spécifique sur d'autres gènes d'*E. meliloti* impliqués dans la fixation d'azote.

4. La synthèse de NO par le partenaire bactérien ne joue pas de rôle essentiel durant l'interaction symbiotique

Au cours de l'interaction symbiotique entre *E. meliloti* et *M. truncatula*, le NO peut être impliqué à chaque étape, depuis l'établissement de l'interaction jusqu'au déclenchement de la sénescence nodulaire (del Giudice et al., 2011; Cam et al., 2012). Connaissant toutes les voies permettant à *E. meliloti* de synthétiser du NO en vie libre, nous avons pu les inactiver

par des approches génétiques afin de connaître leur éventuelle implication dans l'interaction symbiotique. En comparaison à des approches utilisant des inhibiteurs biochimiques, ce type d'approche permet de supprimer de manière spécifique le NO d'un seul des deux partenaires symbiotiques. Une première étude réalisée sur des nodosités induites par des mutants d'insertion de mini-transposon Tn5 dans des gènes impliqués dans la dénitrification, comme *napA* ou *nirK*, avait montré une diminution de 30 % de la quantité de NO dans les nodules (Horchani et al., 2011). Nous avons reconstruit ces mutants en délétant les opérons *nap* et *nir*. Les dosages de NO dans les nodosités inoculées avec ces mutants ont permis d'observer une diminution de la quantité de NO d'environ 20 % pour les simples mutants *nap* ou *nir* et d'environ 35 % pour le double mutant comprenant l'opéron *nap* et *nir*. Ces résultats sont donc en accord avec ceux de l'étude effectuée par Horchani et ses collègues (2011), même si les mutants sont très différents entre les deux études. Dans le nodule, la plante participe à la production de NO principalement via des nitrate réductases, mais aussi d'autres enzymes comme les xanthine déshydrogénases (XDH) (Chamizo-Ampudia et al., 2017; Bender and Schwarz, 2018). Récemment, une étude des NR de *M. truncatula* présentes dans les nodosités (*MtNR1*, *MtNR2* et *MtNR3*) a montré leur importance pour la synthèse de NO (Berger et al., 2021). L'inhibition de ces NR par du tungstate a permis d'observer une diminution de la quantité de NO dans la nodosité mature allant de 60 à 90 %, impliquant les NR comme un des principaux systèmes de synthèse de NO (Berger et al., 2020a). Ces résultats sont en accord avec nos observations indiquant que la bactérie *E. meliloti* serait responsable d'un tiers de la production de NO dans des nodosités matures.

Une étude transcriptomique réalisée sur des nodules de *M. truncatula* en interaction avec *E. meliloti* a permis d'observer une forte expression des gènes *narB* et *nirB* dans la zone III du nodule (zone de fixation d'azote) (Roux et al., 2014). Nous nous sommes donc demandés si cette voie assimilatrice du NO_3^- pouvait participer à la synthèse de NO pendant l'interaction symbiotique comme c'est le cas en vie libre. Des dosages de NO sur des nodules induits par un mutant *nirBD narB* et un mutant *nirKV narB nirBD* ont permis de montrer que cette voie ne participe pas à la synthèse de NO au sein des nodosités. En conclusion, la dénitrification est la seule voie bactérienne qui permet la synthèse de NO pendant l'interaction symbiotique entre *E. meliloti* et *M. truncatula*. Il serait intéressant de connaître l'implication de la voie assimilatrice chez d'autres bactéries comme *B. diazoefficiens* ou *R. etli* afin de voir s'il est

possible d'étendre la conclusion de notre étude à d'autres interactions Rhizobium-Légumineuse. Etonnamment, *B. diazoefficiens* participe à 90 % de la production de NO dans la nodosité contre environ 30 % pour *E. meliloti* (Sánchez et al., 2010b). Cette différence pourrait provenir du fait que *B. diazoefficiens* possède une dénitrification plus efficace, mais aussi une voie assimilatrice capable de produire du NO de façon indépendante.

Dans les interactions entre rhizobia et légumineuses, le NO s'est révélé être important pour la mise en place de l'interaction. Une étude d'inhibition de la synthèse de NO par traitement pharmacologique sur des racines durant l'interaction entre le soja et *B. diazoefficiens* a permis d'observer une inhibition de 70 % du nombre de nodules, indiquant un rôle important du NO au cours des étapes précoces de l'interaction (Leach et al., 2010). Chez *M. truncatula*, l'ajout de cPTIO sur des racines inoculées retarde la nodulation. De plus, un mutant surexprimant la flavohémoglobine Hmp est moins compétitif qu'une souche sauvage pour la nodulation (del Giudice et al., 2011). D'autre part, un mutant surexprimant Hmp induit la formation d'un nombre réduit de nodules par rapport à la souche sauvage (M. Pichon, résultats non publiés). Tous ces résultats montrent l'importance du NO au moment de l'infection par le microsymbionte. Plusieurs études ont montré une élévation de la quantité de NO, lors de l'ajout de NO_3^- et NO_2^- dans des nodosités de *M. truncatula* ou de Soja (Horchani et al., 2011; Calvo-Begueria et al., 2018). Ces expérimentations laissent penser à une possible implication d'une voie utilisant le NO_3^- telle que la dénitrification bactérienne. Pour déterminer si la synthèse de NO par le partenaire bactérien était importante pour les étapes précoces de la symbiose, nous avons réalisé des compétitions entre le double mutant *nap nir* (déficient en synthèse de NO) et une souche sauvage. Aucune différence de compétitivité n'a été observée entre la souche mutante et la souche sauvage, suggérant que le NO d'origine bactérienne ne participe pas à la mise en place de l'interaction symbiotique. De façon surprenante, une diminution ou une augmentation d'environ 30 % de la quantité de NO par différentes approches génétiques (sur ou sous-expression du gène de la phytoglobine *phytgb1*) chez *M. truncatula* entraîne une diminution du nombre de nodules (Berger et al., 2020b). La dénitrification permet à *E. meliloti* de produire 30 % de NO dans le nodule, mais nécessite des conditions de faible concentration en oxygène pour fonctionner correctement. De plus, une étude récente a montré que la dénitrification, plus précisément le gène de la NiR NirK, était très peu exprimé chez les rhizobia présents à la surface du système racinaire de *M.*

truncatula (Achouak et al., 2019). Ainsi deux hypothèses peuvent être proposées : Soit seul le NO d'origine végétale est important pour le déroulement des étapes précoces, soit les bactéries ne produisent pas de NO à ces étapes. Des expériences supplémentaires sont nécessaires pour trancher, cependant il est à noter que la quantification du NO produit par la bactérie lors de ces étapes n'est pour l'instant pas technologiquement envisageable.

En parallèle de ces expériences, nous avons inoculé des plantules avec un double mutant *nap nir* pour observer l'effet de l'absence de synthèse de NO bactérien de manière plus globale avec des critères essentiels comme la nodulation et la fixation d'azote. Nos résultats ont montré que l'absence de NO bactérien n'affecte pas la nodulation, la fixation d'azote, ni l'aspect général de la plante. En conclusion, la synthèse de NO par le partenaire bactérien n'est pas essentielle à la mise en place, au fonctionnement ou au maintien de l'interaction symbiotique. Malgré cette conclusion, nous ne pouvons pas exclure une action du NO d'origine bactérienne à des étapes où du NO a été co-localisé en présence de cellules bactériennes et végétales (Baudouin et al., 2006; del Giudice et al., 2011; Calvo-Begueria et al., 2018). Il est possible que l'absence de synthèse de NO par le partenaire bactérien soit compensé par une augmentation de la quantité de NO produit par la plante à des étapes cruciales comme la formation de la microcolonie ou pour maintenir une fixation d'azote efficace. Il serait intéressant de tester l'implication du NO d'origine bactérienne à différentes étapes clés de la symbiose en suivant l'expression de gènes de plante connus pour être marqueurs de ces étapes, comme *cre1* pour l'organogénèse du nodule ou *cp6* pour la sénescence du nodule et cela dans des nodules de *M. truncatula* inoculés par le double mutant *nap nir*. Cette approche pourrait permettre de mettre évidence une implication du NO bactérien à certaines étapes de la symbiose.

5. La dénitrification et l'assimilation du nitrate ne sont pas des voies essentielles pour l'interaction symbiotique

L'assimilation du NO_3^- permet aux rhizobia d'utiliser le NO_3^- comme précurseur métabolique afin de produire du NH_4^+ . L'expression de cette voie dans des nodules fixateurs laisse penser qu'elle pourrait participer au métabolisme des bactéroïdes en venant compléter la fixation d'azote pour alimenter la synthèse de glutamine. Mais la délétion de *nirBD narB*

n'affecte ni la nodulation, ni la fixation d'azote, ni le fitness de la plante. Ces observations indiquent donc que l'assimilation du NO_3^- n'est pas essentielle pour l'interaction symbiotique dans nos conditions de culture.

La dénitrification permet la respiration en anaérobie et microaérobie à partir de NO_3^- . Dans le nodule, la microoxie est nécessaire à l'induction de gènes essentiels à la symbiose (*nif* et *fix*) et au bon fonctionnement de la nitrogénase qui est sensible à l'oxygène (Rutten and Poole, 2019). Pour respirer dans ces conditions, la bactérie possède des oxygénases à haute affinité codées par des gènes *fix*, qui sont essentiels au fonctionnement de la symbiose. La dénitrification pourrait être un atout supplémentaire des rhizobia pour produire de l'énergie à partir de NO_3^- ou NO_2^- . Chez certains pathogènes comme *Ralstonia solanacearum*, la dénitrification est importante pour la virulence et la respiration dans des conditions limitante en oxygène au moment de la colonisation de l'hôte (Dalsing et al., 2015). Au cours de nos expériences visant à étudier le rôle du NO, nous avons observé que les différents mutants affectés dans la dénitrification n'empêchaient pas la nodulation. Ces résultats sont en accord avec une étude récente visant à identifier le set minimal de gènes du plasmide pSymA d'*E. meliloti* nécessaires à la nodulation. Dans cette étude, les gènes codant pour la dénitrification ne faisaient pas partie des 58 gènes essentiels à la symbiose, incluant principalement des gènes *nod*, *nif* et *fix* (Geddes et al., 2021). Ces observations nous amènent à conclure que la dénitrification ne joue pas de rôle majeur durant l'interaction symbiotique. Néanmoins, l'inoculation de plantules avec un simple mutant de la NO réductase *nor*, ou avec la souche portant une triple délétion des opérons *nap*, *nir* et *nor*, entraîne une baisse de l'efficacité de fixation d'azote par des nodules matures et une augmentation du nombre de nodules en comparaison avec une souche sauvage ou avec un mutant *nap nir*. Dans des conditions de vie libre, la délétion des gènes codant pour la NO réductase Nor entraîne une augmentation de la quantité de NO. Ainsi, deux hypothèses peuvent être formulées.

Premièrement, la diminution de l'efficacité de fixation d'azote pourrait être la conséquence d'une accumulation de NO due à l'absence de NO réductase (qui est impliquée dans la dégradation du NO). Un effet délétère d'une accumulation de NO sur l'efficacité de la fixation d'azote a été également observé dans des nodules de *L. japonicus* où une mutation de la phytoglobine *LjGlb1.1*, responsable de la détoxification du NO, entraîne une augmentation de la quantité de NO et une diminution de l'efficacité de fixation d'azote

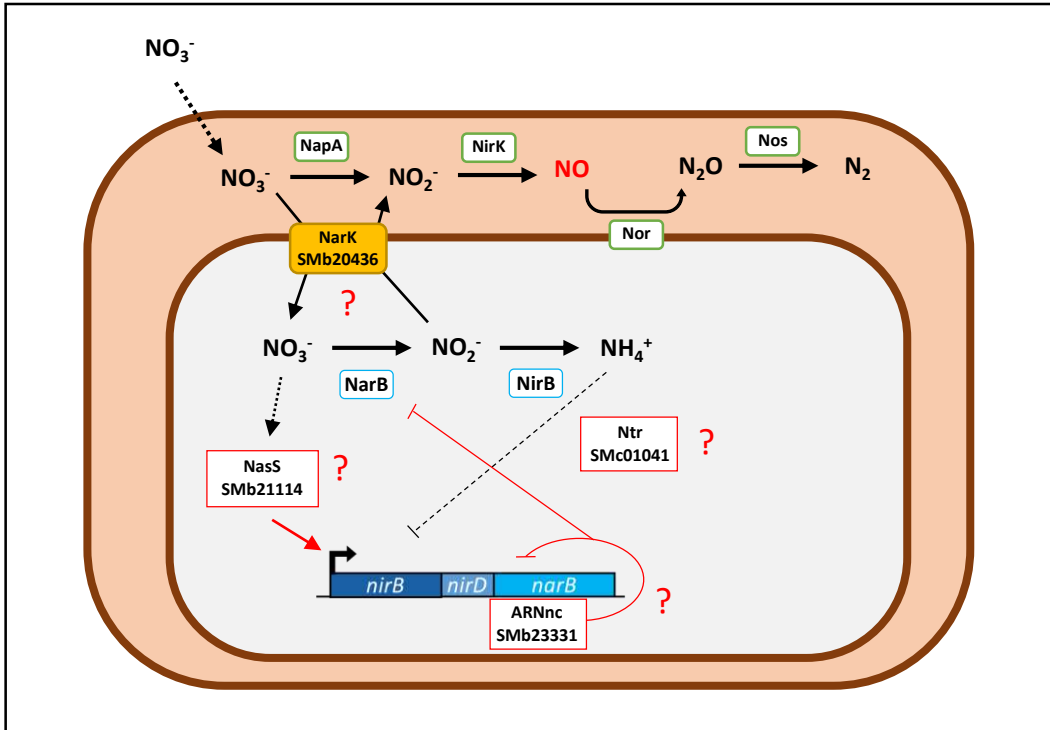


Figure 38 : Modèle montrant les voies de synthèse du NO et la régulation possible de la voie assimilatrice du nitrate chez *E. meliloti*.

(Fukudome et al., 2016). À l'inverse, des effets positifs sur la fixation d'azote ont été observés lors de la surexpression de la phytoglobine *Phytogb1* chez *M. truncatula* ou *LjGlb1.1* chez *L. japonicus* (Shimoda et al., 2009; Fukudome et al., 2019b; Berger et al., 2020b). Des résultats similaires ont été observés dans des nodules de *M. truncatula* induits par une souche d'*E. meliloti* en surexprimant le gène de la flavohémoglobine *Hmp*, impliquée dans la dégradation du NO chez *E. meliloti* (Cam et al., 2012). Outre l'effet négatif sur la fixation d'azote d'un excès de NO, le stress nitrosatif engendré au cours de la symbiose peut avoir un impact sur le devenir des bactéries dans le nodule. Ainsi, la souche commerciale *E. meliloti* B399 portant une mutation de la flavohémoglobine *HmpA* présente une inhibition de la croissance et de nombreuses cassures double-brin de l'ADN en condition de stress nitrosatif en culture. De manière intéressante, de larges délétions génomiques ont été observées uniquement après un cycle de nodulation, et non en vie libre dans le sol, de manière dépendante de l'absence de *HmpA* (Frare et al., 2021). Ces résultats montrent qu'il est important pour la bactérie symbiotique de posséder un moyen de lutter contre le NO durant l'interaction symbiotique.

Une deuxième hypothèse pourrait être que la diminution de la fixation soit due à un manque d'énergie provoqué par une diminution de la quantité de N_2O . En effet, *E. meliloti* 1021 ou 2011 et *B. diazoefficiens* sont capables de croître en anaérobie en utilisant uniquement du N_2O comme accepteur final d'électron, faisant de la dernière étape de réduction une étape importante pour la respiration (Sánchez et al., 2013b; Bueno et al., 2015). De façon surprenante, les deux souches commerciales d'*Ensifer meliloti* (B399 / B401) dérivées de *E. meliloti* 1021 et largement utilisées comme inoculum pour les cultures d'alfalfa (luzerne fourragère) possèdent tous les gènes de la dénitrification sauf ceux codant pour la N_2O réductase *Nos* (*nosRZDFYLX*) (Brambilla et al., 2018). De ce fait, malgré leur utilisation agricole, ces souches posent un problème écologique dû au relargage de N_2O par rapport à des souches qui possèdent une N_2O fonctionnelle. On peut se poser la question du rôle de cette dernière étape de réduction sur la fixation d'azote et le maintien de l'activité symbiotique. Des études supplémentaires sur le rôle de *Nor* et de *Nos* seront nécessaires pour déterminer leurs implications dans le maintien de la fixation d'azote.

En conclusion, l'ensemble de ces travaux de thèse nous ont permis d'établir un modèle de la synthèse de NO chez *E. meliloti* présenté en figure 38. Chez la bactérie symbiotique *E. meliloti*, la dénitrification est la seule voie permettant la synthèse de NO en vie libre ou durant

l'interaction symbiotique avec la légumineuse *M. truncatula*. En vie libre, *E. meliloti* possède une voie d'assimilation du nitrate qui lui permet de croître avec du NO_3^- comme seule source d'azote, mais aussi d'assister la dénitrification en fournissant une activité de réduction du NO_3^- en NO_2^- en complément de celle de Nap. Nos travaux démontrent également que le NO synthétisé par *E. meliloti* n'est pas essentiel à l'établissement et au maintien de l'interaction symbiotique. Ainsi, la situation semble être très différente sur ce point avec les interactions plantes-pathogènes où le NO produit par les microorganismes peut être essentiel dans certaines de ces interactions. Une hypothèse serait que le NO produit par *E. meliloti* ne soit pas spécifiquement produit pour répondre à une fonction symbiotique, mais plutôt une conséquence de l'utilisation de la dénitrification liée aux conditions présentes dans le nodule favorisant son expression. Nous disposons actuellement de trop peu d'informations pour établir un modèle général du rôle du NO produit par des microorganismes symbiotiques au cours de l'interaction avec leurs hôtes. Dans notre cas, si le NO produit par *E. meliloti* n'est pas essentiel pour l'interaction symbiotique, peut-on en déduire que celui produit par *M. truncatula* l'est ? En effet, comme évoqué plus haut on ne peut pas exclure que l'absence de production de NO par la bactérie soit compensée par la plante. Qu'en serait-il dans le cas contraire ? Il serait donc intéressant d'étudier le rôle du NO d'une façon plus précise, en intégrant à la fois un système de synthèse de plantes et de bactéries, pour comprendre si la plante et les bactéries participent de façon coordonnée à l'homéostasie du NO pour maintenir durablement l'interaction symbiotique. Enfin, même si nos travaux montrent que la dénitrification et le NO d'origine bactérienne ne sont pas essentiels pour la mise en place et le fonctionnement de la symbiose entre *E. meliloti* et *M. truncatula*, il est toujours possible qu'ils soient nécessaires dans la rhizosphère. En effet, le NO pourrait jouer un rôle dans la communication entre plantes et bactéries rhizosphériques, et le NO pédosphérique est connu pour être principalement produit par la dénitrification bactérienne (Hu et al., 2021). Au vu des nombreux mécanismes moléculaires pouvant impliquer le NO, des études sont encore nécessaires pour comprendre les multiples rôles joués par le NO au cours des interactions plantes-microorganismes.

Références

- Abello N, Kerstjens HAM, Postma DS, Bischoff R** (2009) Protein tyrosine nitration: selectivity, physicochemical and biological consequences, denitration, and proteomics methods for the identification of tyrosine-nitrated proteins. *J Proteome Res* **8**: 3222–3238
- Achouak W, Abrouk D, Guyonnet J, Barakat M, Ortet P, Simon L, Lerondelle C, Heulin T, Haichar FEZ** (2019) Plant hosts control microbial denitrification activity. *FEMS Microbiol Ecol* **95**: fiz021
- Aichi M, Takatani N, Omata T** (2001) Role of NtcB in activation of nitrate assimilation genes in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J Bacteriol* **183**: 5840–5847
- Akiyama H, Hoshino YT, Itakura M, Shimomura Y, Wang Y, Yamamoto A, Tago K, Nakajima Y, Minamisawa K, Hayatsu M** (2016) Mitigation of soil N₂O emission by inoculation with a mixed culture of indigenous *Bradyrhizobium diazoefficiens*. *Sci Rep* **6**: 32869
- Alvarez L, Sanchez-Hevia D, Sánchez M, Berenguer J** (2019) A new family of nitrate/nitrite transporters involved in denitrification. *Int Microbiol Off J Span Soc Microbiol* **22**: 19–28
- Andersen J, Forst SA, Zhao K, Inouye M, Delihans N** (1989) The function of micF RNA. micF RNA is a major factor in the thermal regulation of OmpF protein in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **264**: 17961–17970
- Andrews M, Andrews ME** (2017) Specificity in Legume-Rhizobia Symbioses. *Int J Mol Sci*. doi: 10.3390/ijms18040705
- Appleby CA** (1992) The origin and functions of haemoglobin in plants. *Sci Prog* 1933- **76**: 365–398
- Arasimowicz-Jelonek Magdalena, Floryszak-Wieczorek Jolanta** (2014) Nitric oxide: an effective weapon of the plant or the pathogen? *Mol Plant Pathol* **15**: 406–416
- Astier J, Kulik A, Koen E, Besson-Bard A, Bourque S, Jeandroz S, Lamotte O, Wendehenne D** (2012) Protein S-nitrosylation: what's going on in plants? *Free Radic Biol Med* **53**: 1101–1110
- Azani N, Babineau M, Bailey CD, Banks H, Barbosa AR, Pinto RB, Boatwright JS, Borges LM, Brown GK, Bruneau A, et al** (2017) A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. *Taxon* **66**: 44–77
- Bakken LR, Bergaust L, Liu B, Frostegård Å** (2012) Regulation of denitrification at the cellular level: a clue to the understanding of N₂O emissions from soils. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* **367**: 1226–1234

- Baptista J, Justino M, Melo A, Teixeira M, Saraiva L** (2012) Oxidative Stress Modulates the Nitric Oxide Defense Promoted by *Escherichia coli* Flavorubredoxin. *J Bacteriol* **194**: 3611–7
- Barloy-Hubler F, Capela D, Barnett MJ, Kalman S, Federspiel NA, Long SR, Galibert F** (2000) High-Resolution Physical Map of the *Sinorhizobium meliloti* 1021 pSyma Megaplasmid. *J Bacteriol* **182**: 1185–1189
- Barraud N, Hassett DJ, Hwang S-H, Rice SA, Kjelleberg S, Webb JS** (2006) Involvement of nitric oxide in biofilm dispersal of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **188**: 7344–7353
- Batut J, Boistard P** (1994) Oxygen control in *Rhizobium*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **66**: 129–150
- Baudouin E, Pieuchot L, Engler G, Pauly N, Puppo A** (2006) Nitric Oxide Is Formed in *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium meliloti* Functional Nodules. *Mol Plant-Microbe Interactions*® **19**: 970–975
- Becker A, Bergès H, Krol E, Bruand C, Rüberg S, Capela D, Lauber E, Meilhoc E, Ampe F, de Bruijn FJ, et al** (2004) Global changes in gene expression in *Sinorhizobium meliloti* 1021 under microoxic and symbiotic conditions. *Mol Plant-Microbe Interact MPMI* **17**: 292–303
- Bedmar EJ, Bueno E, Correa-Galeote D, Torres M, Delgado M, Mesa S** (2013) Ecology of Denitrification in Soils and Plant-Associated Bacteria. pp 165–182
- Bender D, Schwarz G** (2018) Nitrite-dependent nitric oxide synthesis by molybdenum enzymes. *FEBS Lett* **592**: 2126–2139
- Benhar M, Forrester MT, Hess DT, Stamler JS** (2008) Regulated protein denitrosylation by cytosolic and mitochondrial thioredoxins. *Science* **320**: 1050–1054
- Berger A, Boscari A, Horta Araújo N, Maucourt M, Hanchi M, Bernillon S, Rolin D, Puppo A, Brouquisse R** (2020a) Plant Nitrate Reductases Regulate Nitric Oxide Production and Nitrogen-Fixing Metabolism During the *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium meliloti* Symbiosis. *Front Plant Sci* **11**: 1313
- Berger A, Boscari A, Puppo A, Brouquisse R** (2021) Nitrate reductases and hemoglobins control nitrogen-fixing symbiosis by regulating nitric oxide accumulation. *J Exp Bot* **72**: 873–884
- Berger A, Brouquisse R, Pathak PK, Hichri I, Singh I, Bhatia S, Boscari A, Igamberdiev AU, Gupta KJ** (2018) Pathways of nitric oxide metabolism and operation of phytoglobins in legume nodules: missing links and future directions. *Plant Cell Environ.* doi: 10.1111/pce.13151
- Berger A, Guinand S, Boscari A, Puppo A, Brouquisse R** (2020b) *Medicago truncatula* Phytoglobin 1.1 controls symbiotic nodulation and nitrogen fixation via the regulation of nitric oxide concentration. *New Phytol* **227**: 84–98

- Blanquet P, Silva L, Catrice O, Bruand C, Carvalho H, Meilhoc E** (2015) Sinorhizobium meliloti Controls Nitric Oxide-Mediated Post-Translational Modification of a Medicago truncatula Nodule Protein. *Mol Plant-Microbe Interact MPMI* **28**: 1353–1363
- 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* **188**: 4890–4902
- Boccaro M, Mills CE, Zeier J, Anzi C, Lamb C, Poole RK, Delledonne M** (2005) Flavohaemoglobin HmpX from Erwinia chrysanthemi confers nitrosative stress tolerance and affects the plant hypersensitive reaction by intercepting nitric oxide produced by the host. *Plant J Cell Mol Biol* **43**: 226–237
- De Boer AP, van der Oost J, Reijnders WN, Westerhoff HV, Stouthamer AH, van Spanning RJ** (1996) Mutational analysis of the nor gene cluster which encodes nitric-oxide reductase from Paracoccus denitrificans. *Eur J Biochem* **242**: 592–600
- Boscari A, del Giudice J, Ferrarini A, Venturini L, Zaffini A-L, Delledonne M, Puppo A** (2013) Expression Dynamics of the Medicago truncatula Transcriptome during the Symbiotic Interaction with Sinorhizobium meliloti: Which Role for Nitric Oxide? *Plant Physiol* **161**: 425–439
- Boudes M, Lazar N, Graille M, Durand D, Gaidenko TA, Stewart V, van Tilbeurgh H** (2012) The structure of the NasR transcription antiterminator reveals a one-component system with a NIT nitrate receptor coupled to an ANTAR RNA-binding effector. *Mol Microbiol* **85**: 431–444
- Brambilla S, Frare R, Soto G, Jozefkowicz C, Ayub N** (2018) Absence of the Nitrous Oxide Reductase Gene Cluster in Commercial Alfalfa Inoculants Is Probably Due to the Extensive Loss of Genes During Rhizobial Domestication. *Microb Ecol* **76**: 1–4
- Brundrett MC, Tedersoo L** (2018) Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity. *New Phytol* **220**: 1108–1115
- Bueno E, Bedmar EJ, Richardson DJ, Delgado MJ** (2008) Role of Bradyrhizobium japonicum cytochrome c550 in nitrite and nitrate respiration. *FEMS Microbiol Lett* **279**: 188–194
- Bueno E, Gómez-Hernández N, Girard L, Bedmar EJ, Delgado MJ** (2005) Function of the Rhizobium etli CFN42 nirK gene in nitrite metabolism. *Biochem Soc Trans* **33**: 162–163
- Bueno E, Mania D, Frostegard A, Bedmar EJ, Bakken LR, Delgado MJ** (2015) Anoxic growth of Ensifer meliloti 1021 by N₂O-reduction, a potential mitigation strategy. *Front Microbiol* **6**: 537
- Bueno E, Mesa S, Sanchez C, Bedmar EJ, Delgado MJ** (2010) NifA is required for maximal expression of denitrification genes in Bradyrhizobium japonicum. *Environ Microbiol* **12**: 393–400

- Bueno E, Robles EF, Torres MJ, Krell T, Bedmar EJ, Delgado MJ, Mesa S** (2017) Disparate response to microoxia and nitrogen oxides of the *Bradyrhizobium japonicum* napEDABC, nirK and norCBQD denitrification genes. *Nitric Oxide* **68**: 137–149
- Buscot F** (2015) Implication of evolution and diversity in arbuscular and ectomycorrhizal symbioses. *J Plant Physiol* **172**: 55–61
- Bush M, Ghosh T, Tucker N, Zhang X, Dixon R** (2011) Transcriptional regulation by the dedicated nitric oxide sensor, NorR: a route towards NO detoxification. *Biochem Soc Trans* **39**: 289–293
- Cabrera JJ, Salas A, Torres MJ, Bedmar EJ, Richardson DJ, Gates AJ, Delgado MJ** (2016) An integrated biochemical system for nitrate assimilation and nitric oxide detoxification in *Bradyrhizobium japonicum*. *Biochem J* **473**: 297–309
- Cabrera JJ, Sánchez C, Gates AJ, Bedmar EJ, Mesa S, Richardson DJ, Delgado MJ** (2011) The nitric oxide response in plant-associated endosymbiotic bacteria. *Biochem Soc Trans* **39**: 1880–1885
- Calcagno C, Novero M, Genre A, Bonfante P, Lanfranco L** (2012) The exudate from an arbuscular mycorrhizal fungus induces nitric oxide accumulation in *Medicago truncatula* roots. *Mycorrhiza* **22**: 259–269
- Calvo-Begueria L, Rubio MC, Martínez JI, Pérez-Rontomé C, Delgado MJ, Bedmar EJ, Becana M** (2018) Redefining nitric oxide production in legume nodules through complementary insights from electron paramagnetic resonance spectroscopy and specific fluorescent probes. *J Exp Bot* **69**: 3703–3714
- Cam Y, Pierre O, Boncompagni E, Hérouart D, Meilhoc E, Bruand C** (2012) Nitric oxide (NO): a key player in the senescence of *Medicago truncatula* root nodules. *New Phytol* **196**: 548–560
- Capela D, Barloy-Hubler F, Gouzy J, Bothe G, Ampe F, Batut J, Boistard P, Becker A, Boutry M, Cadieu E, et al** (2001) Analysis of the chromosome sequence of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti* strain 1021. *Proc Natl Acad Sci* **98**: 9877–9882
- Castella C, Mirtziou I, Seassau A, Boscari A, Montrichard F, Papadopoulou K, Rouhier N, Puppo A, Brouquisse R** (2017) Post-translational modifications of *Medicago truncatula* glutathione peroxidase 1 induced by nitric oxide. *Nitric Oxide Biol Chem* **68**: 125–136
- Catalá M, Gasulla F, Pradas del Real AE, García-Breijo F, Reig-Armiñana J, Barreno E** (2010) Fungal-associated NO is involved in the regulation of oxidative stress during rehydration in lichen symbiosis. *BMC Microbiol* **10**: 297
- Cecconi D, Orzetti S, Vandelle E, Rinalducci S, Zolla L, Delledonne M** (2009) Protein nitration during defense response in *Arabidopsis thaliana*. *Electrophoresis* **30**: 2460–2468

- Chai W, Stewart V** (1999) RNA sequence requirements for NasR-mediated, nitrate-responsive transcription antitermination of the *Klebsiella oxytoca* M5al nasF operon leader. *J Mol Biol* **292**: 203–216
- Chamizo-Ampudia A, Sanz-Luque E, Llamas A, Galvan A, Fernandez E** (2017) Nitrate Reductase Regulates Plant Nitric Oxide Homeostasis. *Trends Plant Sci* **22**: 163–174
- Chamizo-Ampudia A, Sanz-Luque E, Llamas Á, Ocaña-Calahorro F, Mariscal V, Carreras A, Barroso JB, Galván A, Fernández E** (2016) A dual system formed by the ARC and NR molybdoenzymes mediates nitrite-dependent NO production in *Chlamydomonas*. *Plant Cell Environ* **39**: 2097–2107
- Charpentier M, Oldroyd G** (2010) How close are we to nitrogen-fixing cereals? *Curr Opin Plant Biol* **13**: 556–564
- Chen J, Vandelle E, Bellin D, Delledonne M** (2014a) Detection and function of nitric oxide during the hypersensitive response in *Arabidopsis thaliana*: where there's a will there's a way. *Nitric Oxide Biol Chem* **43**: 81–88
- Chen P, Reitzer LJ** (1995) Active contribution of two domains to cooperative DNA binding of the enhancer-binding protein nitrogen regulator I (NtrC) of *Escherichia coli*: stimulation by phosphorylation and the binding of ATP. *J Bacteriol* **177**: 2490–2496
- Chen Y, Chen W, Li X, Jiang H, Wu P, Xia K, Yang Y, Wu G** (2014b) Knockdown of LjIPT3 influences nodule development in *Lotus japonicus*. *Plant Cell Physiol* **55**: 183–193
- Choi G, Kim D, Im H, Choi SH** (2021) A Nitric Oxide-Responsive Transcriptional Regulator NsrR Cooperates With Lrp and CRP to Tightly Control the hmpA Gene in *Vibrio vulnificus*. *Front Microbiol* **12**: 681196
- Chung M-C, Narayanan A, Popova TG, Kashanchi F, Bailey CL, Popov SG** (2013) *Bacillus anthracis*-derived nitric oxide induces protein S-nitrosylation contributing to macrophage death. *Biochem Biophys Res Commun* **430**: 125–130
- Coats V, Schwintzer C, Tjepkema J** (2009) Truncated hemoglobins in *Frankia Ccl3*: Effects of nitrogen source, oxygen concentration, and nitric oxide. *Can J Microbiol* **55**: 867–73
- Coelho C, Romão MJ** (2015) Structural and mechanistic insights on nitrate reductases. *Protein Sci Publ Protein Soc* **24**: 1901–1911
- Cole J** (1996) Nitrate reduction to ammonia by enteric bacteria: redundancy, or a strategy for survival during oxygen starvation? *FEMS Microbiol Lett* **136**: 1–11
- Cole JA, Richardson DJ** (2008) Respiration of Nitrate and Nitrite. *EcoSal Plus*. doi: 10.1128/ecosal.3.2.5
- Corpas FJ, Barroso JB, Carreras A, Quirós M, León AM, Romero-Puertas MC, Esteban FJ, Valderrama R, Palma JM, Sandalio LM, et al** (2004) Cellular and Subcellular Localization of Endogenous Nitric Oxide in Young and Senescent Pea Plants. *Plant Physiol* **136**: 2722–2733

- Corpas FJ, Barroso JB, Carreras A, Valderrama R, Palma JM, León AM, Sandalio LM, del Río LA** (2006) Constitutive arginine-dependent nitric oxide synthase activity in different organs of pea seedlings during plant development. *Planta* **224**: 246–254
- Corpas FJ, Chaki M, Leterrier M, Barroso JB** (2009a) Protein tyrosine nitration: a new challenge in plants. *Plant Signal Behav* **4**: 920–923
- Corpas FJ, Palma JM, Del Río LA, Barroso JB** (2009b) Evidence supporting the existence of L-arginine-dependent nitric oxide synthase activity in plants. *New Phytol* **184**: 9–14
- Crack JC, Stapleton MR, Green J, Thomson AJ, Le Brun NE** (2013) Mechanism of [4Fe-4S](Cys)₄ cluster nitrosylation is conserved among NO-responsive regulators. *J Biol Chem* **288**: 11492–11502
- Cramm R, Pohlmann A, Friedrich B** (1999) Purification and characterization of the single-component nitric oxide reductase from *Ralstonia eutropha* H16. *FEBS Lett* **460**: 6–10
- Crane BR, Sudhamsu J, Patel BA** (2010) Bacterial Nitric Oxide Synthases. *Annu Rev Biochem* **79**: 445–470
- Daims H, Lebedeva EV, Pjevac P, Han P, Herbold C, Albertsen M, Jehmlich N, Palatinszky M, Vierheilig J, Bulaev A, et al** (2015) Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria. *Nature* **528**: 504–509
- Dalsing BL, Truchon AN, Gonzalez-Orta ET, Milling AS, Allen C** (2015) *Ralstonia solanacearum* Uses Inorganic Nitrogen Metabolism for Virulence, ATP Production, and Detoxification in the Oxygen-Limited Host Xylem Environment. *mBio* **6**: e02471-14
- David M, Daveran M-L, Batut J, Dedieu A, Domergue O, Ghai J, Hertig C, Boistard P, Kahn D** (1988) Cascade regulation of *nif* gene expression in *Rhizobium meliloti*. *Cell* **54**: 671–683
- Deeb RS, Nuriel T, Cheung C, Summers B, Lamon BD, Gross SS, Hajjar DP** (2013) Characterization of a cellular denitrase activity that reverses nitration of cyclooxygenase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **305**: H687-698
- Déjean G, Blanvillain-Baufumé S, Boulanger A, Darrasse A, de Bernonville TD, Girard A-L, Carrère S, Jamet S, Zischek C, Lautier M, et al** (2013) The xylan utilization system of the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv *campestris* controls epiphytic life and reveals common features with oligotrophic bacteria and animal gut symbionts. *New Phytol* **198**: 899–915
- Delgado M, Sergio C, Bedmar E** (2007) Denitrification in Rhizobia-Legume Symbiosis. *Biol. Nitrogen Cycle*. pp 83–IV
- Delgado MJ, Bedmar EJ, Downie JA** (1998) Genes Involved in the Formation and Assembly of Rhizobial Cytochromes and their Role in Symbiotic Nitrogen Fixation. *In* RK Poole, ed, *Adv. Microb. Physiol.* Academic Press, pp 191–231

- Delgado MJ, Bonnard N, Tresierra-Ayala A, Bedmar EJ, Müller P** (2003) The Bradyrhizobium japonicum napEDABC genes encoding the periplasmic nitrate reductase are essential for nitrate respiration. *Microbiology* **149**: 3395–3403
- Delledonne M, Xia Y, Dixon RA, Lamb C** (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* **394**: 585–588
- Donald Nicholas DJ, Nason A** (1957) [144] Determination of nitrate and nitrite. *Methods Enzymol.* Academic Press, pp 981–984
- DREYFUS B, GARCIA JL, GILLIS MY 1988** (1988) Characterization of Azorhizobium caulinodans gen. nov., sp. nov., a Stem-Nodulating Nitrogen-Fixing Bacterium Isolated from Sesbania rostrata. *Int J Syst Evol Microbiol* **38**: 89–98
- Dühning U, Axmann IM, Hess WR, Wilde A** (2006) An internal antisense RNA regulates expression of the photosynthesis gene isiA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 7054–7058
- Durner J, Wendehenne D, Klessig DF** (1998) Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 10328–10333
- Fahey RC** (2013) Glutathione analogs in prokaryotes. *Biochim Biophys Acta* **1830**: 3182–3198
- Favey S, Labesse G, Vouille V, Boccara M** (1995) Flavohaemoglobin HmpX: a new pathogenicity determinant in Erwinia chrysanthemi strain 3937. *Microbiol Read Engl* **141 (Pt 4)**: 863–871
- Feechan A, Kwon E, Yun B-W, Wang Y, Pallas JA, Loake GJ** (2005) A central role for S-nitrosothiols in plant disease resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 8054–8059
- Ferguson BJ, Indrasumunar A, Hayashi S, Lin M-H, Lin Y-H, Reid DE, Gresshoff PM** (2010) Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *J Integr Plant Biol* **52**: 61–76
- Fernández N, Cabrera JJ, Varadarajan AR, Lutz S, Ledermann R, Roschitzki B, Eberl L, Bedmar EJ, Fischer H-M, Pessi G, et al** (2019) An Integrated Systems Approach Unveils New Aspects of Microoxia-Mediated Regulation in Bradyrhizobium diazoefficiens. *Front Microbiol* **10**: 924
- 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. *Mol Plant-Microbe Interact MPMI* **21**: 781–790
- Ferri L, Gori A, Biondi EG, Mengoni A, Bazzicalupo M** (2010) Plasmid electroporation of Sinorhizobium strains: The role of the restriction gene hsdR in type strain Rm1021. *Plasmid* **63**: 128–135
- Floryszak-Wieczorek J, Arasimowicz M, Milczarek G, Jelen H, Jackowiak H** (2007) Only an early nitric oxide burst and the following wave of secondary nitric oxide generation enhanced effective defence responses of pelargonium to a necrotrophic pathogen. *New Phytol* **175**: 718–730

- Forchhammer K, Selim KA** (2019) Carbon/nitrogen homeostasis control in cyanobacteria. *FEMS Microbiol Rev* **44**: 33–53
- Ford PC** (2010) Reactions of NO and nitrite with heme models and proteins. *Inorg Chem* **49**: 6226–6239
- Forrester MT, Foster MW** (2012) Protection from nitrosative stress: a central role for microbial flavohemoglobin. *Free Radic Biol Med* **52**: 1620–1633
- Foyer CH, Nguyen HT, Lam H-M** (2018) A seed change in our understanding of legume biology from genomics to the efficient cooperation between nodulation and arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Cell Environ* **41**: 1949–1954
- Franche C, Lindström K, Elmerich C** (2009) Franche C, Lindstrom K, Elmerich C.. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant and Soil* **321**: 35–59. *Plant Soil* **321**: 35–59
- Franck WL, Qiu J, Lee H-I, Chang W-S, Stacey G** (2015) DNA microarray-based identification of genes regulated by NtrC in *Bradyrhizobium japonicum*. *Appl Environ Microbiol* **81**: 5299–5308
- Frare R, Pascuan C, Galindo-Sotomonte L, McCormick W, Soto G, Ayub N** (2021) Exploring the Role of the NO-Detoxifying Enzyme HmpA in the Evolution of Domesticated Alfalfa Rhizobia. *Microb Ecol*. doi: 10.1007/s00248-021-01761-4
- Fukuda M, Takeda H, Kato HE, Doki S, Ito K, Maturana AD, Ishitani R, Nureki O** (2015) Structural basis for dynamic mechanism of nitrate/nitrite antiport by NarK. *Nat Commun* **6**: 7097
- Fukudome M, Calvo-Begueria L, Kado T, Osuki K-I, Rubio MC, Murakami E-I, Nagata M, Kucho K-I, Sandal N, Stougaard J, et al** (2016) Hemoglobin LjGlb1-1 is involved in nodulation and regulates the level of nitric oxide in the *Lotus japonicus*-*Mesorhizobium loti* symbiosis. *J Exp Bot* **67**: 5275–5283
- Fukudome M, Shimokawa Y, Hashimoto S, Maesako Y, Uchi-Fukudome N, Niihara K, Osuki K-I, Uchiumi T** (2021) Nitric Oxide Detoxification by *Mesorhizobium loti* Affects Root Nodule Symbiosis with *Lotus japonicus*. *Microbes Environ*. doi: 10.1264/jsme2.ME21038
- Fukudome M, Watanabe E, Osuki K-I, Imaizumi R, Aoki T, Becana M, Uchiumi T** (2019a) Stably Transformed *Lotus japonicus* Plants Overexpressing Phytoglobin LjGlb1-1 Show Decreased Nitric Oxide Levels in Roots and Nodules as Well as Delayed Nodule Senescence. *Plant Cell Physiol* **60**: 816–825
- Fukudome M, Watanabe E, Osuki K-I, Imaizumi R, Aoki T, Becana M, Uchiumi T** (2019b) Stably Transformed *Lotus japonicus* Plants Overexpressing Phytoglobin LjGlb1-1 Show Decreased Nitric Oxide Levels in Roots and Nodules as Well as Delayed Nodule Senescence. *Plant Cell Physiol* **60**: 816–825

- Gage DJ** (2004) Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR* **68**: 280–300
- Gage DJ** (2002) Analysis of Infection Thread Development Using Gfp- and DsRed-Expressing *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **184**: 7042–7046
- Gaimster H, Chalklen L, Alston M, Munnoch JT, Richardson DJ, Gates AJ, Rowley G** (2016) Genome-Wide Discovery of Putative sRNAs in *Paracoccus denitrificans* Expressed under Nitrous Oxide Emitting Conditions. *Front Microbiol* **7**: 1806
- Gaimster H, Hews CL, Griffiths R, Soriano-Laguna MJ, Alston M, Richardson DJ, Gates AJ, Rowley G** (2019) A Central Small RNA Regulatory Circuit Controlling Bacterial Denitrification and N₂O Emissions. *mBio* **10**: e01165-19
- Gangeswaran R, Eady RR** (1996) Flavodoxin 1 of *Azotobacter vinelandii*: characterization and role in electron donation to purified assimilatory nitrate reductase. *Biochem J* **317 (Pt 1)**: 103–108
- Gangeswaran R, Lowe DJ, Eady RR** (1993) Purification and characterization of the assimilatory nitrate reductase of *Azotobacter vinelandii*. *Biochem J* **289 (Pt 2)**: 335–342
- Gardette M, Daniel J, Loukiadis E, Jubelin G** (2020) Role of the Nitric Oxide Reductase NorVW in the Survival and Virulence of Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* during Infection. *Pathog Basel Switz* **9**: E683
- Gates AJ, Luque-Almagro VM, Goddard AD, Ferguson SJ, Roldán MD, Richardson DJ** (2011) A composite biochemical system for bacterial nitrate and nitrite assimilation as exemplified by *Paracoccus denitrificans*. *Biochem J* **435**: 743–753
- Geddes BA, Kearsley JVS, Huang J, Zamani M, Muhammed Z, Sather L, Panchal AK, diCenzo GC, Finan TM** (2021) Minimal gene set from *Sinorhizobium (Ensifer) meliloti* pSymA required for efficient symbiosis with *Medicago*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **118**: e2018015118
- Gell DA** (2018) Structure and function of haemoglobins. *Blood Cells Mol Dis* **70**: 13–42
- Georg J, Hess WR** (2011) cis-Antisense RNA, Another Level of Gene Regulation in Bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR* **75**: 286–300
- Georg J, Hess WR** (2018) Widespread Antisense Transcription in Prokaryotes. *Microbiol Spectr*. doi: 10.1128/microbiolspec.RWR-0029-2018
- Gilberthorpe NJ, Poole RK** (2008) Nitric oxide homeostasis in *Salmonella typhimurium*: roles of respiratory nitrate reductase and flavohemoglobin. *J Biol Chem* **283**: 11146–11154
- Gilles-Gonzalez M-A, Gonzalez G, Sousa EHS, Tuckerman J** (2008) Oxygen-sensing histidine-protein kinases: assays of ligand binding and turnover of response-regulator substrates. *Methods Enzymol* **437**: 173–189

- del Giudice J, Cam Y, Damiani I, Fung-Chat F, Meilhoc E, Bruand C, Brouquisse R, Puppo A, Boscari A** (2011a) Nitric oxide is required for an optimal establishment of the *Medicago truncatula*–*Sinorhizobium meliloti* symbiosis. *New Phytol* **191**: 405–417
- Goddard AD, Bali S, Mavridou DAI, Luque-Almagro VM, Gates AJ, Dolores Roldán M, Newstead S, Richardson DJ, Ferguson SJ** (2017) The *Paracoccus denitrificans* NarK-like nitrate and nitrite transporters-probing nitrate uptake and nitrate/nitrite exchange mechanisms. *Mol Microbiol* **103**: 117–133
- Goddard AD, Moir JWB, Richardson DJ, Ferguson SJ** (2008) Interdependence of two NarK domains in a fused nitrate/nitrite transporter. *Mol Microbiol* **70**: 667–681
- Gómez-Hernández N, Reyes-González A, Sánchez C, Mora Y, Delgado MJ, Girard L** (2011) Regulation and symbiotic role of nirK and norC expression in *Rhizobium etli*. *Mol Plant-Microbe Interact MPMI* **24**: 233–245
- González PJ, Correia C, Moura I, Brondino CD, Moura JGG** (2006a) Bacterial nitrate reductases: Molecular and biological aspects of nitrate reduction. *J Inorg Biochem* **100**: 1015–1023
- González V, Santamaría RI, Bustos P, Hernández-González I, Medrano-Soto A, Moreno-Hagelsieb G, Janga SC, Ramírez MA, Jiménez-Jacinto V, Collado-Vides J, et al** (2006b) The partitioned *Rhizobium etli* genome: Genetic and metabolic redundancy in seven interacting replicons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 3834–3839
- Goodson JR, Zhang C, Trettel D, Ailinger HE, Lee PE, Spirito CM, Winkler WC** (2020) An autoinhibitory mechanism controls RNA-binding activity of the nitrate-sensing protein NasR. *Mol Microbiol* **114**: 348–360
- Gough C, Cullimore J** (2011) Lipo-chitooligosaccharide signaling in endosymbiotic plant-microbe interactions. *Mol Plant-Microbe Interact MPMI* **24**: 867–878
- Graf DRH, Jones CM, Hallin S** (2014) Intergenomic Comparisons Highlight Modularity of the Denitrification Pathway and Underpin the Importance of Community Structure for N₂O Emissions. *PLOS ONE* **9**: e114118
- Gupta KJ, Fernie AR, Kaiser WM, van Dongen JT** (2011) On the origins of nitric oxide. *Trends Plant Sci* **16**: 160–168
- Gusarov I, Nudler E** (2005) NO-mediated cytoprotection: instant adaptation to oxidative stress in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 13855–13860
- Gusarov I, Shatalin K, Starodubtseva M, Nudler E** (2009) Endogenous Nitric Oxide Protects Bacteria Against a Wide Spectrum of Antibiotics. *Science* **325**: 1380–1384
- Hara S, Morikawa T, Wasai S, Kasahara Y, Koshiba T, Yamazaki K, Fujiwara T, Tokunaga T, Minamisawa K** (2019) Identification of Nitrogen-Fixing *Bradyrhizobium* Associated With Roots of Field-Grown Sorghum by Metagenome and Proteome Analyses. *Front. Microbiol.* **10**:

- Harfouche L, Haichar F el Z, Achouak W** (2015) Small regulatory RNAs and the fine-tuning of plant–bacteria interactions. *New Phytol* **206**: 98–106
- Harrison J, Jamet A, Muglia CI, Van de Sype G, Aguilar OM, Puppo A, Frendo P** (2005) Glutathione plays a fundamental role in growth and symbiotic capacity of *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **187**: 168–174
- Hayatsu M, Tago K, Saito M** (2008) Various players in the nitrogen cycle: Diversity and functions of the microorganisms involved in nitrification and denitrification. *Soil Sci Plant Nutr* **54**: 33–45
- Hein S, Simon J** (2019) Bacterial nitrous oxide respiration: electron transport chains and copper transfer reactions. *Adv Microb Physiol* **75**: 137–175
- Hemmens B, Mayer B** (1998) Enzymology of nitric oxide synthases. *Methods Mol Biol Clifton NJ* **100**: 1–32
- Herold MB, Giles ME, Alexander CJ, Baggs EM, Daniell TJ** (2018) Variable response of *nirK* and *nirS* containing denitrifier communities to long-term pH manipulation and cultivation. *FEMS Microbiol Lett*. doi: 10.1093/femsle/fny035
- Hidalgo-García A, Torres MJ, Salas A, Bedmar EJ, Girard L, Delgado MJ** (2019) *Rhizobium etli* Produces Nitrous Oxide by Coupling the Assimilatory and Denitrification Pathways. *Front Microbiol* **10**: 980
- Hill DR, Belbin TJ, Thorsteinsson MV, Bassam D, Brass S, Ernst A, Böger P, Paerl H, Mulligan ME, Potts M** (1996) Gln (cyanoglobin) is a peripheral membrane protein that is restricted to certain *Nostoc* spp. *J Bacteriol* **178**: 6587–6598
- Hill R, Hargrove M, Arredondo-Peter R** (2016) Phytoglobin: a novel nomenclature for plant globins accepted by the globin community at the 2014 XVIII conference on Oxygen-Binding and Sensing Proteins. *F1000Research*. doi: 10.12688/f1000research.8133.1
- Hino T, Matsumoto Y, Nagano S, Sugimoto H, Fukumori Y, Murata T, Iwata S, Shiro Y** (2010) Structural basis of biological N₂O generation by bacterial nitric oxide reductase. *Science* **330**: 1666–1670
- Hoche V, Ngom M, Carré-Mlouka A, Tisseyre P, Gherbi H, Svistoonoff S** (2019) Signalling in actinorhizal root nodule symbioses. *Antonie Van Leeuwenhoek* **112**: 23–29
- Hoe C-H, Raabe CA, Rozhdestvensky TS, Tang T-H** (2013) Bacterial sRNAs: regulation in stress. *Int J Med Microbiol IJMM* **303**: 217–229
- Hoffman BM, Lukoyanov D, Yang Z-Y, Dean DR, Seefeldt LC** (2014) Mechanism of nitrogen fixation by nitrogenase: the next stage. *Chem Rev* **114**: 4041–4062
- Horchani F, Prévot 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 Nodules1[W][OA]. *Plant Physiol* **155**: 1023–1036

- Hu B, Flemetakis E, Rennenberg H** (2021) Pedospheric Microbial Nitric Oxide Production Challenges Root Symbioses. *Trends Plant Sci* **26**: 104–107
- Hussain A, Yun B-W, Kim JH, Gupta KJ, Hyung N-I, Loake GJ** (2019) Novel and conserved functions of S-nitrosoglutathione reductase in tomato. *J Exp Bot* **70**: 4877–4886
- Hutfless EH, Chaudhari SS, Thomas VC** (2018) Chapter Five - Emerging Roles of Nitric Oxide Synthase in Bacterial Physiology. *In* RK Poole, ed, *Adv. Microb. Physiol.* Academic Press, pp 147–191
- Igamberdiev AU, Hill RD** (2004) Nitrate, NO and haemoglobin in plant adaptation to hypoxia: an alternative to classic fermentation pathways. *J Exp Bot* **55**: 2473–2482
- Inaba S, Ikenishi F, Itakura M, Kikuchi M, Eda S, Chiba N, Katsuyama C, Suwa Y, Mitsui H, Minamisawa K** (2012) N₂O emission from degraded soybean nodules depends on denitrification by Bradyrhizobium japonicum and other microbes in the rhizosphere. *Microbes Environ* **27**: 470–476
- Jahnová J, Činčalová L, Sedlářová M, Jedelská T, Sekaninová J, Mieslerová B, Luhová L, Barroso JB, Petřivalský M** (2020) Differential modulation of S-nitrosoglutathione reductase and reactive nitrogen species in wild and cultivated tomato genotypes during development and powdery mildew infection. *Plant Physiol Biochem PPB* **155**: 297–310
- Jain P, von Toerne C, Lindermayr C, Bhatla SC** (2018) S-nitrosylation/denitrosylation as a regulatory mechanism of salt stress sensing in sunflower seedlings. *Physiol Plant* **162**: 49–72
- James KL, Mogen AB, Brandwein JN, Orsini SS, Ridder MJ, Markiewicz MA, Bose JL, Rice KC** (2019) Interplay of Nitric Oxide Synthase (NOS) and SrrAB in Modulation of Staphylococcus aureus Metabolism and Virulence. *Infect Immun* **87**: e00570-18
- Jamet A, Euphrasie D, Martin P, Nassif X** (2013) Identification of Genes Involved in Neisseria meningitidis Colonization. *Infect Immun* **81**: 3375–3381
- Jamet A, Sigaud S, Van de Sype G, Puppo A, Hérouart 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 MPMI* **16**: 217–225
- Jang J, Ashida N, Kai A, Isobe K, Nishizawa T, Otsuka S, Yokota A, Senoo K, Ishii S** (2018) Presence of Cu-Type (NirK) and cd1-Type (NirS) Nitrite Reductase Genes in the Denitrifying Bacterium Bradyrhizobium nitroreducens sp. nov. *Microbes Environ* **33**: 326–331
- Jeandroz S, Wipf D, Stuehr DJ, Lamattina L, Melkonian M, Tian Z, Zhu Y, Carpenter EJ, Wong GK-S, Wendehenne D** (2016) Occurrence, structure, and evolution of nitric oxide synthase-like proteins in the plant kingdom. *Sci Signal* **9**: re2

- Jia W, Cole JA** (2005) Nitrate and nitrite transport in *Escherichia coli*. *Biochem Soc Trans* **33**: 159–161
- Jiménez-Leiva A, Cabrera JJ, Bueno E, Torres MJ, Salazar S, Bedmar EJ, Delgado MJ, Mesa S** (2019) Expanding the Regulon of the *Bradyrhizobium diazoefficiens* NnrR Transcription Factor: New Insights Into the Denitrification Pathway. *Front Microbiol* **10**: 1926
- Jog R, Pandya M, Nareshkumar G, Rajkumar S** (2014) Mechanism of phosphate solubilization and antifungal activity of *Streptomyces* spp. isolated from wheat roots and rhizosphere and their application in improving plant growth. *Microbiol Read Engl* **160**: 778–788
- Johnson EG, Sparks JP, Dzikovski B, Crane BR, Gibson DM, Loria R** (2008) Plant-pathogenic *Streptomyces* species produce nitric oxide synthase-derived nitric oxide in response to host signals. *Chem Biol* **15**: 43–50
- Jones CM, Graf DRH, Bru D, Philippot L, Hallin S** (2013) The unaccounted yet abundant nitrous oxide-reducing microbial community: a potential nitrous oxide sink. *ISME J* **7**: 417–426
- Journet E-P, De Carvalho-Niebel F, Andriankaja A, Huguet T, Barker D** (2006) Rhizobial inoculation and nodulation of *Medicago truncatula*.
- Kahn ML, McDermott TR, Udvardi MK** (1998) Carbon and Nitrogen Metabolism in Rhizobia. In HP Spaink, A Kondorosi, PJJ Hooykaas, eds, *Rhizobiaceae Mol. Biol. Model Plant- Assoc. Bact.* Springer Netherlands, Dordrecht, pp 461–485
- Kato K, Kanahama K, 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
- Kayumov A, Heinrich A, Fedorova K, Ilinskaya O, Forchhammer K** (2011) Interaction of the general transcription factor TnrA with the PII-like protein GlnK and glutamine synthetase in *Bacillus subtilis*. *FEBS J* **278**: 1779–1789
- Van Kessel MAHJ, Speth DR, Albertsen M, Nielsen PH, Op den Camp HJM, Kartal B, Jetten MSM, Lüscher S** (2015) Complete nitrification by a single microorganism. *Nature* **528**: 555–559
- Kim SO, Oori Y, Lloyd D, Hughes MN, Poole RK** (1999) Anoxic function for the *Escherichia coli* flavohaemoglobin (Hmp): reversible binding of nitric oxide and reduction to nitrous oxide. *FEBS Lett* **445**: 389–394
- Kolbert Z, Feigl G, Bordé Á, Molnár Á, Erdei L** (2017) Protein tyrosine nitration in plants: Present knowledge, computational prediction and future perspectives. *Plant Physiol Biochem PPB* **113**: 56–63
- Koropatkin NM, Pakrasi HB, Smith TJ** (2006) Atomic structure of a nitrate-binding protein crucial for photosynthetic productivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 9820–9825
- Kovach ME, Elzer PH, Hill DS, Robertson GT, Farris MA, Roop RM, Peterson KM** (1995) Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**: 175–176

- Kraft B, Strous M, Tegetmeyer HE** (2011) Microbial nitrate respiration--genes, enzymes and environmental distribution. *J Biotechnol* **155**: 104–117
- Kuenen JG** (2008) Anammox bacteria: from discovery to application. *Nat Rev Microbiol* **6**: 320–326
- Kumar Halder A, Chakrabartty PR** (2015) Expression of Assimilatory Nitrate and Nitrite Reductase of *Rhizobium meliloti*. *Indian J Microbiol Res* **2**: 133
- Kuypers MMM, Marchant HK, Kartal B** (2018) The microbial nitrogen-cycling network. *Nat Rev Microbiol* **16**: 263–276
- Kuzma M, Hunt S, Layzell D** (1993) Role of Oxygen in the Limitation and Inhibition of Nitrogenase Activity and Respiration Rate in Individual Soybean Nodules. *Plant Physiol* **101**: 161–169
- Leach J, Keyster M, Du Plessis M, Ludidi N** (2010) Nitric oxide synthase activity is required for development of functional nodules in soybean. *J Plant Physiol* **167**: 1584–1591
- Leborgne-Castel N, Adam T, Bouhidel K** (2010) Endocytosis in plant-microbe interactions. *Protoplasma* **247**: 177–193
- Lecomte S, Nesme X, Franzino T, Villard C, Pivard M, Vial L, Doré J, Hommais F, Haichar FEZ** (2020) *Agrobacterium fabrum* C58 involved nitrate reductase NapA and antisense RNA NorR to denitrify. *FEMS Microbiol Ecol* **97**: fiae233
- Lecomte SM, Achouak W, Abrouk D, Heulin T, Nesme X, Haichar F el Z** (2018) Diversifying Anaerobic Respiration Strategies to Compete in the Rhizosphere. *Front. Environ. Sci.* **6**:
- Lee U, Wie C, Fernandez BO, Feelisch M, Vierling E** (2008) Modulation of nitrosative stress by S-nitrosoglutathione reductase is critical for thermotolerance and plant growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **20**: 786–802
- Li B, Sun C, Lin X, Busch W** (2021) The Emerging Role of GSNOR in Oxidative Stress Regulation. *Trends Plant Sci* **26**: 156–168
- Lin JT, Stewart V** (1998) Nitrate assimilation by bacteria. *Adv Microb Physiol* **39**: 1–30, 379
- Lindermayr C, Saalbach G, Durner J** (2005) Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **137**: 921–930
- Liu L, Hausladen A, Zeng M, Que L, Heitman J, Stamler JS** (2001) A metabolic enzyme for S-nitrosothiol conserved from bacteria to humans. *Nature* **410**: 490–494
- López MF, Cabrera JJ, Salas A, Delgado MJ, López-García SL** (2017) Dissecting the role of NtrC and RpoN in the expression of assimilatory nitrate and nitrite reductases in *Bradyrhizobium diazoefficiens*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **110**: 531–542

- Lundberg JO, Weitzberg E, Gladwin MT** (2008) The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* **7**: 156–167
- Luque I, Flores E, Herrero A** (1993) Nitrite reductase gene from *Synechococcus* sp. PCC 7942: homology between cyanobacterial and higher-plant nitrite reductases. *Plant Mol Biol* **21**: 1201–1205
- Luque-Almagro VM, Gates AJ, Moreno-Vivián C, Ferguson SJ, Richardson DJ, Roldán MD** (2011) Bacterial nitrate assimilation: gene distribution and regulation. *Biochem Soc Trans* **39**: 1838–1843
- Luque-Almagro VM, Lyall VJ, Ferguson SJ, Roldán MD, Richardson DJ, Gates AJ** (2013) Nitrogen oxanion-dependent dissociation of a two-component complex that regulates bacterial nitrate assimilation. *J Biol Chem* **288**: 29692–29702
- Luque-Almagro VM, Manso I, Sullivan MJ, Rowley G, Ferguson SJ, Moreno-Vivián C, Richardson DJ, Gates AJ, Roldán MD** (2017) Transcriptional and translational adaptation to aerobic nitrate anabolism in the denitrifier *Paracoccus denitrificans*. *Biochem J* **474**: 1769–1787
- Lycus P, Bøthun K, Bergaust L, Shapleigh J, Bakken L, Frostegard A** (2017) Phenotypic and genotypic richness of denitrifiers revealed by a novel isolation strategy. *ISME J*. doi: 10.1038/ismej.2017.82
- Madhugiri R, Pessi G, Voss B, Hahn J, Sharma CM, Reinhardt R, Vogel J, Hess WR, Fischer H-M, Evguenieva-Hackenberg E** (2012) Small RNAs of the *Bradyrhizobium/Rhodopseudomonas* lineage and their analysis. *RNA Biol* **9**: 47–58
- Maeda S, Omata T** (1997) Substrate-binding Lipoprotein of the Cyanobacterium *Synechococcus* sp. Strain PCC 7942 Involved in the Transport of Nitrate and Nitrite*. *J Biol Chem* **272**: 3036–3041
- Maia LB, Moura JGG** (2015) Nitrite reduction by molybdoenzymes: a new class of nitric oxide-forming nitrite reductases. *J Biol Inorg Chem JBIC Publ Soc Biol Inorg Chem* **20**: 403–433
- Mao N, Ren H, Geng J, Ding L, Xu K** (2017) Engineering application of anaerobic ammonium oxidation process in wastewater treatment. *World J Microbiol Biotechnol* **33**: 153
- Marino SM, Gladyshev VN** (2010) Structural analysis of cysteine S-nitrosylation: a modified acid-based motif and the emerging role of trans-nitrosylation. *J Mol Biol* **395**: 844–859
- Martínez-Medina A, Fernández I, Pescador L, Romero-Puertas MC, Pozo MJ** (2019a) *Trichoderma harzianum* triggers an early and transient burst of nitric oxide and the upregulation of PHYTOGB1 in tomato roots. *Plant Signal Behav* **14**: 1640564
- Martínez-Medina A, Pescador-Azofra L, Terrón Camero L, Pozo M, Romero-Puertas M** (2019b) Nitric oxide shape plant-fungi interactions. *J Exp Bot*. doi: 10.1093/jxb/erz289

- Maskall CS, Gibson JF, Dart PJ** (1977) Electron-paramagnetic-resonance studies of leghaemoglobins from soya-bean and cowpea root nodules. Identification of nitrosyl-leghaemoglobin in crude leghaemoglobin preparations. *Biochem J* **167**: 435–445
- Mathieu C, Moreau S, Frendo P, Puppo A, Davies MJ** (1998) Direct detection of radicals in intact soybean nodules: presence of nitric oxide-leghemoglobin complexes. *Free Radic Biol Med* **24**: 1242–1249
- Meilhoc E, Blanquet P, Cam Y, Bruand C** (2013) Control of NO level in rhizobium-legume root nodules: not only a plant globin story. *Plant Signal Behav* **8**: doi: 10.4161/psb.25923
- Meilhoc E, Boscari A, Bruand C, Puppo A, Brouquisse R** (2011) Nitric oxide in legume–rhizobium symbiosis. *Plant Sci* **181**: 573–581
- Meilhoc E, Cam Y, Skapski A, Bruand C** (2010) The response to nitric oxide of the nitrogen-fixing symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Mol Plant-Microbe Interact MPMI* **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 Physiol* **157**: 1505–1517
- Mesa S, Velasco L, Manzanera ME, Delgado MAJ, Bedmar EJ** (2002) Characterization of the norCBQD genes, encoding nitric oxide reductase, in the nitrogen fixing bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. *Microbiol Read Engl* **148**: 3553–3560
- Mirnejad R, Jazi FM, Mostafaei S, Sedighi M** (2017) Molecular investigation of virulence factors of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* strains isolated from clinical and non-clinical samples. *Microb Pathog* **109**: 8–14
- Moir J, Wood N** (2001) Nitrate and nitrite transport in bacteria. *Cell Mol Life Sci CMLS* **58**: 215–24
- Moreno-Vivián C, Cabello P, Martínez-Luque M, Blasco R, Castillo F** (1999) Prokaryotic Nitrate Reduction: Molecular Properties and Functional Distinction among Bacterial Nitrate Reductases. *J Bacteriol* **181**: 6573–6584
- Moreno-Vivián C, Flores E** (2007) Chapter 17 - Nitrate Assimilation in Bacteria. *In* H Bothe, SJ Ferguson, WE Newton, eds, *Biol. Nitrogen Cycle*. Elsevier, Amsterdam, pp 263–282
- Mur LAJ, Carver TLW, Prats E** (2006) NO way to live; the various roles of nitric oxide in plant–pathogen interactions. *J Exp Bot* **57**: 489–505
- Mur LAJ, Sivakumaran A, Mandon J, Cristescu SM, Harren FJM, Hebelstrup KH** (2012) Haemoglobin modulates salicylate and jasmonate/ethylene-mediated resistance mechanisms against pathogens. *J Exp Bot* **63**: 4375–4387
- 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*. *Mol Plant-Microbe Interact MPMI* **21**: 1175–1183

- Nakano MM, Geng H, Nakano S, Kobayashi K** (2006) The nitric oxide-responsive regulator NsrR controls ResDE-dependent gene expression. *J Bacteriol* **188**: 5878–5887
- Nakano MM, Hoffmann T, Zhu Y, Jahn D** (1998) Nitrogen and Oxygen Regulation of *Bacillus subtilis* nasDEF Encoding NADH-Dependent Nitrite Reductase by TnrA and ResDE. *J Bacteriol* **180**: 5344–5350
- Nash DT, Schulman HM** (1976) The absence of oxidized leghemoglobin in soybean root nodules during nodule development. *Biochem Biophys Res Commun* **68**: 781–785
- Newcomb W, Sippell D, Peterson RL** (2011) The early morphogenesis of *Glycine max* and *Pisum sativum* root nodules. *Can J Bot.* doi: 10.1139/b79-309
- Nguyen T, Brunson D, Crespi CL, Penman BW, Wishnok JS, Tannenbaum SR** (1992) DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 3030–3034
- Nojiri M** (2016) CHAPTER 5: Structure and Function of Copper Nitrite Reductase. *Met. Denitrification.* pp 91–113
- Ogawa K, Akagawa E, Yamane K, Sun ZW, LaCelle M, Zuber P, Nakano MM** (1995) The nasB operon and nasA gene are required for nitrate/nitrite assimilation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **177**: 1409–1413
- Ohashi Y, Shi W, Takatani N, Aichi M, Maeda S, Watanabe S, Yoshikawa H, Omata T** (2011) Regulation of nitrate assimilation in cyanobacteria. *J Exp Bot* **62**: 1411–1424
- Okon Y, Labandera-Gonzalez CA** (1994) Agronomic applications of azospirillum: An evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biol Biochem* **26**: 1591–1601
- Oldroyd GED, Murray JD, Poole PS, Downie JA** (2011) The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annu Rev Genet* **45**: 119–144
- Ott T, van Dongen JT, Günther C, Krusell L, Desbrosses G, Vigeolas H, Bock V, Czechowski T, Geigenberger P, Udvardi MK** (2005) Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. *Curr Biol CB* **15**: 531–535
- Ouellet H, Ouellet Y, Richard C, Labarre M, Wittenberg B, Wittenberg J, Guertin M** (2002) Truncated hemoglobin HbN protects *Mycobacterium bovis* from nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 5902–5907
- Oulhen N, Schulz B, Carrier T** (2016) English translation of Heinrich Anton de Bary's 1878 speech, "Die Erscheinung der Symbiose" ('De la symbiose'). *Symbiosis.* doi: 10.1007/s13199-016-0409-8
- Papenfert K, Vogel J** (2010) Regulatory RNA in bacterial pathogens. *Cell Host Microbe* **8**: 116–127

- Parsonage D, Greenfield AJ, Ferguson SJ** (1985) The high affinity of *Paracoccus denitrificans* cells for nitrate as an electron acceptor. Analysis of possible mechanisms of nitrate and nitrite movement across the plasma membrane and the basis for inhibition by added nitrite of oxidase activity in permeabilised cells. *Biochim Biophys Acta BBA - Bioenerg* **807**: 81–95
- Pathania R, Navani NK, Gardner AM, Gardner PR, Dikshit KL** (2002a) Nitric oxide scavenging and detoxification by the *Mycobacterium tuberculosis* haemoglobin, HbN in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **45**: 1303–1314
- Pathania R, Navani NK, Gardner AM, Gardner PR, Dikshit KL** (2002b) Nitric oxide scavenging and detoxification by the *Mycobacterium tuberculosis* haemoglobin, HbN in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **45**: 1303–1314
- Pauleta SR, Carreira C, Moura I** (2016) CHAPTER 7: Insights into Nitrous Oxide Reductase. *Met. Denitrification*. pp 141–169
- Pecrix Y, Staton SE, Sallet E, Lelandais-Brière C, Moreau S, Carrère S, Blein T, Jardinaud M-F, Latrasse D, Zouine M, et al** (2018) Whole-genome landscape of *Medicago truncatula* symbiotic genes. *Nat Plants* **4**: 1017–1025
- Pérez 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*1[C][W][OA]. *Plant Physiol* **152**: 1574–1584
- Perret X, Staehelin C, Broughton WJ** (2000) Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR* **64**: 180–201
- Pesce A, Bolognesi M, Nardini M** (2013) The diversity of 2/2 (truncated) globins. *Adv Microb Physiol* **63**: 49–78
- Philippot L** (2002) Denitrifying genes in bacterial and Archaeal genomes. *Biochim Biophys Acta* **1577**: 355–376
- Pierre O, Hopkins J, Combier M, Baldacci F, Engler G, Brouquisse R, Hérouart D, Boncompagni E** (2014) Involvement of papain and legumain proteinase in the senescence process of *Medicago truncatula* nodules. *New Phytol* **202**: 849–863
- Pii Y, Crimi M, Cremonese G, Spena A, Pandolfini T** (2007) Auxin and nitric oxide control indeterminate nodule formation. *BMC Plant Biol* **7**: 21
- Pinchbeck BJ, Soriano-Laguna MJ, Sullivan MJ, Luque-Almagro VM, Rowley G, Ferguson SJ, Roldán MD, Richardson DJ, Gates AJ** (2019) A dual functional redox enzyme maturation protein for respiratory and assimilatory nitrate reductases in bacteria. *Mol Microbiol* **111**: 1592–1603
- Poole P, Ramachandran V, Terpolilli J** (2018) Rhizobia: from saprophytes to endosymbionts. *Nat Rev Microbiol* **16**: 291–303

- Porrini C, Ramarao N, Tran S-L** (2020) Dr. NO and Mr. Toxic - the versatile role of nitric oxide. *Biol Chem* **401**: 547–572
- Pueppke SG, Broughton WJ** (1999) *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *R. fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges. *Mol Plant-Microbe Interact MPMI* **12**: 293–318
- 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**: 683–701
- Puppo A, Pauly N, Boscari A, Mandon K, Brouquisse R** (2013a) Hydrogen peroxide and nitric oxide: key regulators of the Legume-Rhizobium and mycorrhizal symbioses. *Antioxid Redox Signal* **18**: 2202–2219
- Puppo A, Pauly N, Boscari A, Mandon K, Brouquisse R** (2013b) Hydrogen peroxide and nitric oxide: key regulators of the Legume-Rhizobium and mycorrhizal symbioses. *Antioxid Redox Signal* **18**: 2202–2219
- Quandt J, Hynes MF** (1993) Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in gram-negative bacteria. *Gene* **127**: 15–21
- Ramos F, Blanco G, Gutiérrez JC, Luque F, Tortolero M** (1993) Identification of an operon involved in the assimilatory nitrate-reducing system of *Azotobacter vinelandii*. *Mol Microbiol* **8**: 1145–1153
- Renalier MH, Batut J, Ghai J, Terzaghi B, Gherardi M, David M, Garnerone AM, Vasse J, Truchet G, Huguet T** (1987) A new symbiotic cluster on the pSym megaplasmid of *Rhizobium meliloti* 2011 carries a functional fix gene repeat and a nod locus. *J Bacteriol* **169**: 2231–2238
- Richardson DJ, Berks BC, Russell DA, Spiro S, Taylor CJ** (2001a) Functional, biochemical and genetic diversity of prokaryotic nitrate reductases. *Cell Mol Life Sci CMLS* **58**: 165–178
- Rinaldo S, Arcovito A, Giardina G, Castiglione N, Brunori M, Cutruzzolà F** (2009) New insights into the activity of *Pseudomonas aeruginosa* cd(1), nitrite reductase. *Biochem Soc Trans* **36**: 1155–9
- Rinaldo S, Giardina G, Cutruzzolà F** (2016) CHAPTER 4: Nitrite Reductase – Cytochrome cd1. *Met. Denitrification*. pp 59–90
- Rinaldo S, Giardina G, Mantoni F, Paone A, Cutruzzolà F** (2018) Beyond nitrogen metabolism: nitric oxide, cyclic-di-GMP and bacterial biofilms. *FEMS Microbiol Lett.* doi: 10.1093/femsle/fny029
- Robledo M, García-Tomsig NI, Jiménez-Zurdo JI** (2020) Riboregulation in Nitrogen-Fixing Endosymbiotic Bacteria. *Microorganisms* **8**: 384
- Robledo M, Jiménez-Zurdo JI, Becker A** (2015) Antisense transcription of symbiotic genes in *Sinorhizobium meliloti*. *Symbiosis* **67**: 55–67

- Rockel P, Strube F, Rockel A, Wildt J, Kaiser WM** (2002) Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase in vivo and in vitro. *J Exp Bot* **53**: 103–110
- Romero-Puertas MC, Campostrini N, Mattè A, Righetti PG, Perazzolli M, Zolla L, Roepstorff P, Delledonne M** (2008) Proteomic analysis of S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis thaliana* undergoing hypersensitive response. *Proteomics* **8**: 1459–1469
- Roux B, Rodde N, Jardinaud M-F, Timmers T, Sauviac L, Cottret L, Carrère S, Sallet E, Courcelle E, Moreau S, et al** (2014a) An integrated analysis of plant and bacterial gene expression in symbiotic root nodules using laser-capture microdissection coupled to RNA sequencing. *Plant J Cell Mol Biol* **77**: 817–837
- Rowe JJ, Ubbink-Kok T, Molenaar D, Konings WN, Driessen AJ** (1994) NarK is a nitrite-extrusion system involved in anaerobic nitrate respiration by *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **12**: 579–586
- Rowley G, Hensen D, Felgate H, Arkenberg A, Appia-Ayme C, Prior K, Harrington C, Field SJ, Butt JN, Baggs E, et al** (2012) Resolving the contributions of the membrane-bound and periplasmic nitrate reductase systems to nitric oxide and nitrous oxide production in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Biochem J* **441**: 755–762
- Rubio LM, Flores E, Herrero A** (2002) Purification, cofactor analysis, and site-directed mutagenesis of *Synechococcus* ferredoxin-nitrate reductase. *Photosynth Res* **72**: 13–26
- Rubio LM, Herrero A, Flores E** (1996) A cyanobacterial narB gene encodes a ferredoxin-dependent nitrate reductase. *Plant Mol Biol* **30**: 845–850
- Rubio LM, Ludden PW** (2008) Biosynthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. *Annu Rev Microbiol* **62**: 93–111
- Ruiz B, Le Scornet A, Sauviac L, Rémy A, Bruand C, Meilhoc E** (2019) The Nitrate Assimilatory Pathway in *Sinorhizobium meliloti*: Contribution to NO Production. *Front Microbiol*. doi: 10.3389/fmicb.2019.01526
- Rümer S, Kapuganti JG, Kaiser WM** (2009) Oxidation of hydroxylamines to NO by plant cells. *Plant Signal Behav* **4**: 853–855
- Russwurm M, Koesling D** (2004) NO activation of guanylyl cyclase. *EMBO J* **23**: 4443–4450
- Rustérucci C, Espunya MC, Díaz M, Chabannes M, Martínez MC** (2007) S-Nitrosoglutathione Reductase Affords Protection against Pathogens in *Arabidopsis*, Both Locally and Systemically. *Plant Physiol* **143**: 1282–1292
- Rutten PJ, Poole PS** (2019) Chapter Nine - Oxygen regulatory mechanisms of nitrogen fixation in rhizobia. *In* RK Poole, ed, *Adv. Microb. Physiol.* Academic Press, pp 325–389
- Sakamoto A, Ueda M, Morikawa H** (2002) *Arabidopsis* glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase is an S-nitrosoglutathione reductase. *FEBS Lett* **515**: 20–24

- Sallet E, Roux B, Sauviac L, Jardinaud M-F, Carrère S, Faraut T, de Carvalho-Niebel F, Gouzy J, Gamas P, Capela D, et al** (2013) Next-generation annotation of prokaryotic genomes with EuGene-P: application to *Sinorhizobium meliloti* 2011. *DNA Res Int J Rapid Publ Rep Genes Genomes* **20**: 339–354
- Samalova M, Johnson J, Illes M, Kelly S, Fricker M, Gurr S** (2013) Nitric oxide generated by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* drives plant infection. *New Phytol* **197**: 207–222
- Sánchez C, Cabrera JJ, Gates AJ, Bedmar EJ, Richardson DJ, Delgado MJ** (2011) Nitric oxide detoxification in the rhizobia-legume symbiosis. *Biochem Soc Trans* **39**: 184–188
- Sánchez C, Gates AJ, Meakin GE, Uchiumi T, Girard L, Richardson DJ, Bedmar EJ, Delgado MJ** (2010a) Production of Nitric Oxide and Nitrosylhemoglobin Complexes in Soybean Nodules in Response to Flooding. *Mol Plant Microbe Interact* **23**: 702–711
- Sánchez C, Gates AJ, Meakin GE, Uchiumi T, Girard L, Richardson DJ, Bedmar EJ, Delgado MJ** (2010b) Production of Nitric Oxide and Nitrosylhemoglobin Complexes in Soybean Nodules in Response to Flooding. *Mol Plant Microbe Interact* **23**: 702–711
- Sánchez C, Itakura M, Mitsui H, Minamisawa K** (2013a) Linked expressions of *nap* and *nos* genes in a *Bradyrhizobium japonicum* mutant with increased N(2)O reductase activity. *Appl Environ Microbiol* **79**: 4178–4180
- Sánchez C, Itakura M, Mitsui H, Minamisawa K** (2013b) Linked Expressions of *nap* and *nos* Genes in a *Bradyrhizobium japonicum* Mutant with Increased N2O Reductase Activity. *Appl Environ Microbiol* **79**: 4178–4180
- Sánchez C, Itakura M, Okubo T, Matsumoto T, Yoshikawa H, Gotoh A, Hidaka M, Uchida T, Minamisawa K** (2014) The nitrate-sensing NasST system regulates nitrous oxide reductase and periplasmic nitrate reductase in *Bradyrhizobium japonicum*. *Environ Microbiol* **16**: 3263–3274
- Sánchez C, Minamisawa K** (2018) Redundant roles of *Bradyrhizobium oligotrophicum* Cu-type (*NirK*) and *cd1*-type (*NirS*) nitrite reductase genes under denitrifying conditions. *FEMS Microbiol Lett*. doi: 10.1093/femsle/fny015
- Sánchez C, Minamisawa K** (2019) Nitrogen Cycling in Soybean Rhizosphere: Sources and Sinks of Nitrous Oxide (N2O). *Front Microbiol* **10**: 1943
- Sánchez C, Mitsui H, Minamisawa K** (2017) Regulation of nitrous oxide reductase genes by NasT-mediated transcription antitermination in *Bradyrhizobium diazoefficiens*. *Environ Microbiol Rep* **9**: 389–396
- Sánchez C, Siqueira AF, Mitsui H, Minamisawa K** (2019) Identification of Genes Regulated by the Antitermination Factor NasT during Denitrification in *Bradyrhizobium diazoefficiens*. *Microbes Environ*. doi: 10.1264/jsme2.ME19033

- Sanders DA, Gillece-Castro BL, Burlingame AL, Koshland DE** (1992) Phosphorylation site of NtrC, a protein phosphatase whose covalent intermediate activates transcription. *J Bacteriol* **174**: 5117–5122
- Santolini J** (2011) The molecular mechanism of mammalian NO-synthases: a story of electrons and protons. *J Inorg Biochem* **105**: 127–141
- Santolini J** (2019a) What does “NO-Synthase” stand for ? *Front Biosci Landmark Ed* **24**: 133–171
- Santoyo G, Urtis-Flores CA, Loeza-Lara PD, Orozco-Mosqueda Ma del C, Glick BR** (2021) Rhizosphere Colonization Determinants by Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR). *Biology* **10**: 475
- Schlüter J-P, Reinkensmeier J, Barnett MJ, Lang C, Krol E, Giegerich R, Long SR, Becker A** (2013) Global mapping of transcription start sites and promoter motifs in the symbiotic α -proteobacterium *Sinorhizobium meliloti* 1021. *BMC Genomics* **14**: 156
- Schlüter J-P, Reinkensmeier J, Daschkey S, Evgenieva-Hackenberg E, Janssen S, Jänicke S, Becker JD, Giegerich R, Becker A** (2010) A genome-wide survey of sRNAs in the symbiotic nitrogen-fixing alpha-proteobacterium *Sinorhizobium meliloti*. *BMC Genomics* **11**: 245
- Seefeldt LC, Hoffman BM, Dean DR** (2009) Mechanism of Mo-dependent nitrogenase. *Annu Rev Biochem* **78**: 701–722
- Sekiguchi S, Maruyama Y** (1988) Assimilatory reduction of nitrate in *Rhizobium meliloti*. *J Basic Microbiol* **28**: 529–539
- Seth D, Hausladen A, Wang Y-J, Stamler JS** (2012) Endogenous protein S-Nitrosylation in *E. coli*: regulation by OxyR. *Science* **336**: 470–473
- Shah VK, Brill WJ** (1977) Isolation of an iron-molybdenum cofactor from nitrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 3249–3253
- Shamseldin A, Abdelkhalek A, Sadowsky MJ** (2017) Recent changes to the classification of symbiotic, nitrogen-fixing, legume-associating bacteria: a review. *Symbiosis* **71**: 91–109
- Shapleigh JP** (2006) The Denitrifying Prokaryotes. *In* M Dworkin, S Falkow, E Rosenberg, K-H Schleifer, E Stackebrandt, eds, *Prokaryotes Vol. 2 Ecophysiol. Biochem.* Springer, New York, NY, pp 769–792
- Shatalin K, Gusarov I, Avetissova E, Shatalina Y, McQuade LE, Lippard SJ, 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
- 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 J* **57**: 254–263
- Shiro Y** (2012) Structure and function of bacterial nitric oxide reductases: Nitric oxide reductase, anaerobic enzymes. *Biochim Biophys Acta* **1817**: 1907–13
- Shu CJ, Ulrich LE, Zhulin IB** (2003) The NIT domain: a predicted nitrate-responsive module in bacterial sensory receptors. *Trends Biochem Sci* **28**: 121–124
- Shu CJ, Zhulin IB** (2002) ANTAR: an RNA-binding domain in transcription antitermination regulatory proteins. *Trends Biochem Sci* **27**: 3–5
- Silva L, Carvalho H** (2013) Possible role of glutamine synthetase in the NO signaling response in root nodules by contributing to the antioxidant defenses. *Front Plant Sci* **4**: 372
- Singh S, Varma A** (2017) Structure, Function, and Estimation of Leghemoglobin. *In* AP Hansen, DK Choudhary, PK Agrawal, A Varma, eds, *Rhizobium Biol. Biotechnol.* Springer International Publishing, Cham, pp 309–330
- Singh SK, Kaur R, Kumar A, Kaur R** (2019) Myxococcus xanthus truncated globin HbO: in silico analysis and functional characterization. *Mol Biol Rep* **46**: 2101–2110
- van Spanning RJM** (2011) Structure, function, regulation and evolution of the nitrite and nitrous oxide reductases: denitrification enzymes with a beta-propeller fold. *In* JWB Moir, ed, *Nitrogen Cycl. Bact. Mol. Anal.* Caister Academic Press, p Ch 7
- van Spanning RJM, Richardson DJ, Ferguson SJ** (2007) Introduction to the biochemistry and molecular biology of denitrification. *In* H Bothe, SJ Ferguson, WE Newton, eds, *Biol. Nitrogen Cycle.* Elsevier Science, pp 3–20
- Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J** (1992) Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* **258**: 1898–1902
- Stern AM, Liu B, Bakken LR, Shapleigh JP, Zhu J** (2013) A Novel Protein Protects Bacterial Iron-Dependent Metabolism from Nitric Oxide. *J Bacteriol* **195**: 4702–4708
- Stern AM, Zhu J** (2014a) An introduction to nitric oxide sensing and response in bacteria. *Adv Appl Microbiol* **87**: 187–220
- Stevanin TM, Ioannidis N, Mills CE, Kim SO, Hughes MN, Poole RK** (2000) Flavohemoglobin Hmp Affords Inducible Protection for *Escherichia coli* Respiration, Catalyzed by Cytochromesbo' or bd, from Nitric Oxide. *J Biol Chem* **275**: 35868–35875
- Stevanin TM, Poole RK, Demoncheaux EAG, Read RC** (2002) Flavohemoglobin Hmp Protects *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium from Nitric Oxide-Related Killing by Human Macrophages. *Infect Immun* **70**: 4399–4405
- Stougaard P, Molin S, Nordström K** (1981) RNAs involved in copy-number control and incompatibility of plasmid R1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**: 6008–6012

- Sutton MA, Oenema O, Erisman JW, Leip A, van Grinsven H, Winiwarter W** (2011) Too much of a good thing. *Nature* **472**: 159–161
- Svensson L, Poljakovic M, Säve S, Gilberthorpe N, Schön T, Strid S, Corker H, Poole RK, Persson K** (2010) Role of flavohemoglobin in combating nitrosative stress in uropathogenic *Escherichia coli*—implications for urinary tract infection. *Microb Pathog* **49**: 59–66
- Thalineau E, Truong H-N, Berger A, Fournier C, Boscari A, Wendehenne D, Jeandroz S** (2016) Cross-Regulation between N Metabolism and Nitric Oxide (NO) Signaling during Plant Immunity. *Front Plant Sci* **7**: 472
- Tischner R, Galli M, Heimer YM, Bielefeld S, Okamoto M, Mack A, Crawford NM** (2007) Interference with the citrulline-based nitric oxide synthase assay by argininosuccinate lyase activity in *Arabidopsis* extracts. *FEBS J* **274**: 4238–4245
- Toledo JC, Augusto O** (2012) Connecting the chemical and biological properties of nitric oxide. *Chem Res Toxicol* **25**: 975–989
- Tomizawa J, Itoh T, Selzer G, Som T** (1981) Inhibition of *ColE1* RNA primer formation by a plasmid-specified small RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**: 1421–1425
- Torres MJ, Argandoña M, Vargas C, Bedmar EJ, Fischer H-M, Mesa S, Delgado MJ** (2014a) The global response regulator *RegR* controls expression of denitrification genes in *Bradyrhizobium japonicum*. *PLoS One* **9**: e99011
- Torres MJ, Avila S, Bedmar EJ, Delgado MJ** (2018) Overexpression of the periplasmic nitrate reductase supports anaerobic growth by *Ensifer meliloti*. *FEMS Microbiol Lett*. doi: 10.1093/femsle/fny041
- Torres MJ, Bueno E, Jiménez-Leiva A, Cabrera JJ, Bedmar EJ, Mesa S, Delgado MJ** (2017) *FixK2* Is the Main Transcriptional Activator of *Bradyrhizobium diazoefficiens* *nosRZDYFLX* Genes in Response to Low Oxygen. *Front Microbiol* **8**: 1621
- Torres MJ, Rubia MI, Bedmar EJ, Delgado MJ** (2011) Denitrification in *Sinorhizobium meliloti*. *Biochem Soc Trans* **39**: 1886–1889
- Torres MJ, Rubia MI, de la Peña TC, Pueyo JJ, Bedmar EJ, Delgado MJ** (2014b) Genetic basis for denitrification in *Ensifer meliloti*. *BMC Microbiol* **14**: 142
- Torres MJ, Simon J, Rowley G, Bedmar EJ, Richardson DJ, Gates AJ, Delgado MJ** (2016) Nitrous Oxide Metabolism in Nitrate-Reducing Bacteria: Physiology and Regulatory Mechanisms. *Adv Microb Physiol* **68**: 353–432
- Torres-Quesada O, Reinkensmeier J, Schlüter J-P, Robledo M, Peregrina A, Giegerich R, Toro N, Becker A, Jiménez-Zurdo JI** (2014) Genome-wide profiling of Hfq-binding RNAs uncovers extensive post-transcriptional rewiring of major stress response and symbiotic regulons in *Sinorhizobium meliloti*. *RNA Biol* **11**: 563–579

- Tosha T, Shiro Y** (2016) CHAPTER 6:Structure and Function of Nitric Oxide Reductases. *Met. Denitrification*. pp 114–140
- Trinchant JC, Rigaud J** (1982) Nitrite and nitric oxide as inhibitors of nitrogenase from soybean bacteroids. *Appl Environ Microbiol* **44**: 1385–1388
- Tucker NP, Le Brun NE, Dixon R, Hutchings MI** (2010) There's NO stopping NsrR, a global regulator of the bacterial NO stress response. *Trends Microbiol* **18**: 149–156
- Tun NN, Santa-Catarina C, Begum T, Silveira V, Handro W, Floh EIS, Scherer GFE** (2006) Polyamines induce rapid biosynthesis of nitric oxide (NO) in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Cell Physiol* **47**: 346–354
- Udvardi M, Poole PS** (2013) Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses. *Annu Rev Plant Biol* **64**: 781–805
- Ulvé VM, Sevin EW, Chéron A, Barloy-Hubler F** (2007) Identification of chromosomal alpha-proteobacterial small RNAs by comparative genome analysis and detection in *Sinorhizobium meliloti* strain 1021. *BMC Genomics* **8**: 467
- Del Val C, Rivas E, Torres-Quesada O, Toro N, Jiménez-Zurdo JI** (2007) Identification of differentially expressed small non-coding RNAs in the legume endosymbiont *Sinorhizobium meliloti* by comparative genomics. *Mol Microbiol* **66**: 1080–1091
- Valverde C, Livny J, Schlüter J-P, Reinkensmeier J, Becker A, Parisi G** (2008) Prediction of *Sinorhizobium meliloti* sRNA genes and experimental detection in strain 2011. *BMC Genomics* **9**: 416
- Van De Velde W, Guerra JCP, Keyser AD, Rycke RD, 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**: 711–720
- Vasse J, de Billy F, Camut S, Truchet G** (1990) Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules. *J Bacteriol* **172**: 4295–4306
- Vega-Palas MA, Flores E, Herrero A** (1992) NtcA, a global nitrogen regulator from the cyanobacterium *Synechococcus* that belongs to the Crp family of bacterial regulators. *Mol Microbiol* **6**: 1853–1859
- Velasco L, Mesa S, Delgado MJ, Bedmar EJ** (2001) Characterization of the nirK gene encoding the respiratory, Cu-containing nitrite reductase of *Bradyrhizobium japonicum*. *Biochim Biophys Acta* **1521**: 130–134
- Velasco L, Mesa S, Xu C-A, Delgado MJ, Bedmar EJ** (2004) Molecular characterization of nosRZDFYLX genes coding for denitrifying nitrous oxide reductase of *Bradyrhizobium japonicum*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **85**: 229–235

- Vieweg MF, Hohnjec N, Küster H** (2005) Two genes encoding different truncated hemoglobins are regulated during root nodule and arbuscular mycorrhiza symbioses of *Medicago truncatula*. *Planta* **220**: 757–766
- Voisin A-S, Guéguen J, Huyghe C, Jeuffroy M-H, Magrini M-B, Meynard JM, Mougel C, Pellerin S, Pelzer E** (2013) Les légumineuses dans l'Europe du XXI^e siècle : Quelle place dans les systèmes agricoles et alimentaires actuels et futurs ? Quels nouveaux défis pour la recherche ? *Innov Agron* **30**: 283–312
- Volbeda A, Dodd EL, Darnault C, Crack JC, Renoux O, Hutchings MI, Le Brun NE, Fontecilla-Camps JC** (2017) Crystal structures of the NO sensor NsrR reveal how its iron-sulfur cluster modulates DNA binding. *Nat Commun* **8**: 15052
- Wang L, Rubio MC, Xin X, Zhang B, Fan Q, Wang Q, Ning G, Becana M, Duanmu D** (2019) CRISPR/Cas9 knockout of leghemoglobin genes in *Lotus japonicus* uncovers their synergistic roles in symbiotic nitrogen fixation. *New Phytol* **224**: 818–832
- Watts RA, Hunt PW, Hvitved AN, Hargrove MS, Peacock WJ, Dennis ES** (2001) A hemoglobin from plants homologous to truncated hemoglobins of microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 10119–10124
- Wei H-L, Zhang L-Q** (2006) Quorum-sensing system influences root colonization and biological control ability in *Pseudomonas fluorescens* 2P24. *Antonie Van Leeuwenhoek* **89**: 267–280
- Weissman L, Garty J, Hochman A** (2005) Rehydration of the lichen *Ramalina lacera* results in production of reactive oxygen species and nitric oxide and a decrease in antioxidants. *Appl Environ Microbiol* **71**: 2121–2129
- Wimalasekera R, Villar C, Begum T, Scherer GFE** (2011) COPPER AMINE OXIDASE1 (CuAO1) of *Arabidopsis thaliana* contributes to abscisic acid- and polyamine-induced nitric oxide biosynthesis and abscisic acid signal transduction. *Mol Plant* **4**: 663–678
- Wink DA, Kasprzak KS, Maragos CM, Elespuru RK, Misra M, Dunams TM, Cebula TA, Koch WH, Andrews AW, Allen JS** (1991) DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. *Science* **254**: 1001–1003
- Wittenberg JB, Bolognesi M, Wittenberg BA, Guertin M** (2002) Truncated hemoglobins: a new family of hemoglobins widely distributed in bacteria, unicellular eukaryotes, and plants. *J Biol Chem* **277**: 871–874
- Wray LV, Ferson AE, Rohrer K, Fisher SH** (1996) TnrA, a transcription factor required for global nitrogen regulation in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 8841–8845
- Wu Q, Stewart V** (1998) NasFED Proteins Mediate Assimilatory Nitrate and Nitrite Transport in *Klebsiella oxytoca* (pneumoniae) M5al. *J Bacteriol* **180**: 1311–1322
- Xue Y, Liu Z, Gao X, Jin C, Wen L, Yao X, Ren J** (2010) GPS-SNO: computational prediction of protein S-nitrosylation sites with a modified GPS algorithm. *PLoS One* **5**: e11290

- Yamasaki H, Sakihama Y** (2000) Simultaneous production of nitric oxide and peroxyxynitrite by plant nitrate reductase: in vitro evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. *FEBS Lett* **468**: 89–92
- Yan H, Huang W, Yan C, Gong X, Jiang S, Zhao Y, Wang J, Shi Y** (2013) Structure and Mechanism of a Nitrate Transporter. *Cell Rep* **3**: 716–723
- Yang L, El Msehli S, Benyamina S, Lambert A, Hopkins J, Cazareth J, Pierre O, Hérouart D, Achi-Smiti S, Boncompagni E, et al** (2020) Glutathione Deficiency in *Sinorhizobium meliloti* Does Not Impair Bacteroid Differentiation But Induces Early Senescence in the Interaction With *Medicago truncatula*. *Front Plant Sci* **11**: 137
- Yoneyama T, Terakado-Tonooka J, Minamisawa K** (2017) Exploration of bacterial N₂-fixation systems in association with soil-grown sugarcane, sweet potato, and paddy rice: a review and synthesis. *Soil Sci Plant Nutr* **63**: 578–590
- Zipfel C, Oldroyd GED** (2017) Plant signalling in symbiosis and immunity. *Nature* **543**: 328–336
- Zou Y-N, Wang P, Liu C-Y, Ni Q-D, Zhang D-J, Wu Q-S** (2017) Mycorrhizal trifoliolate orange has greater root adaptation of morphology and phytohormones in response to drought stress. *Sci Rep* **7**: 41134
- Zumft WG** (1997) Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**: 533–616
- Zumft WG** (2005) Nitric oxide reductases of prokaryotes with emphasis on the respiratory, heme-copper oxidase type. *J Inorg Biochem* **99**: 194–215
- Zumft WG** (2002) Nitric oxide signaling and NO dependent transcriptional control in bacterial denitrification by members of the FNR-CRP regulator family. *J Mol Microbiol Biotechnol* **4**: 277–286