



HAL
open science

Les systèmes Toxine-Antitoxine VapBC : des régulateurs de la symbiose fixatrice d'azote Rhizobium-Légumineuse

Camille Syska

► To cite this version:

Camille Syska. Les systèmes Toxine-Antitoxine VapBC : des régulateurs de la symbiose fixatrice d'azote Rhizobium-Légumineuse. Biologie moléculaire. Université Côte d'Azur, 2020. Français. NNT : 2020COAZ6029 . tel-03435883

HAL Id: tel-03435883

<https://theses.hal.science/tel-03435883>

Submitted on 19 Nov 2021

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

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

THÈSE DE DOCTORAT

Les systèmes Toxine-Antitoxine VapBC : des régulateurs de la symbiose fixatrice d'azote Rhizobium- Légumineuse

Camille SYSKA

Institut Sophia Agrobiotech (ISA) – Equipe Symbiose

**Présentée en vue de l'obtention
du grade de docteur en**

**Interactions moléculaires et cellulaires
d'Université Côte d'Azur**

Dirigée par : Geneviève Alloing

Co-encadrée par : Laurence Dupont

Isabelle Garcia

Soutenue le : 18/11/2020

Devant le jury, composé de :

Sophie Helaine,

Associate Professor, Harvard Medical School, Boston

Patricia Bordes,

Chargée de recherche, CNRS, Toulouse

Emanuele Biondi,

Directeur de recherche, CNRS, Marseille

Marc Lepetit,

Directeur de recherche INRAE, Montpellier

Les systèmes Toxine-Antitoxine VapBC : des régulateurs de la symbiose fixatrice d'azote Rhizobium-Légumineuse

Composition du Jury :

Président de Jury :

Marc Lepetit, Directeur de recherche, INRAE, Montpellier

Rapporteurs :

Patricia Bordes, Chargée de recherche, CNRS, Toulouse

Emanuele Biondi, Directeur de recherche, CNRS, Marseille

Examinatrice :

Sophie Helaine, Associate Professor, Harvard Medical School, Boston

Directrices de thèse :

Geneviève Alloing, Chargée de recherche, CNRS, Sophia-Antipolis

Laurence Dupont, Maître de conférences, Université Côte d'Azur, Sophia-Antipolis

Isabelle Garcia, Maître de conférences, Université Côte d'Azur, Sophia-Antipolis

Les systèmes Toxine-Antitoxine VapBC : des régulateurs de la symbiose fixatrice d'azote Rhizobium-Légumineuse

Résumé de la thèse :

Lors de la symbiose fixatrice d'azote entre la légumineuse modèle *Medicago truncatula* et la rhizobiacée *Sinorhizobium meliloti*, les bactéries, différenciées en bactéroïdes dans la nodosité, réduisent l'azote atmosphérique (N₂) en ammoniac (NH₃), directement assimilable par la plante. En contrepartie, la plante fournit à son symbiote une niche écologique et des substrats carbonés. Tout au long de l'interaction, la bactérie est confrontée à des microenvironnements changeants depuis la vie libre dans le sol, l'infection et l'invasion des cellules végétales, la différenciation en bactéroïde fixateur et finalement la rupture symbiotique.

Afin de mieux comprendre les mécanismes d'adaptation rapide développés par *S. meliloti* lors de la symbiose, nous nous sommes intéressées au rôle des systèmes Toxine-Antitoxine (TA) bactériens de type VapBC dans ce processus. Ces modules, composés d'une toxine et de son antitoxine apparentée, sont associés chez les bactéries pathogènes à la réponse aux stress et à l'adaptation à la vie intracellulaire. La toxine, de par son activité RNase site-spécifique, permet une inhibition globale ou partielle de la traduction. Chez *S. meliloti*, 11 systèmes VapBC chromosomiques putatifs ont été identifiés et deux seulement (VapC4 et VapC5) ont été caractérisés en interaction symbiotique.

Au cours de cette thèse, nous avons tout d'abord démontré, par une approche de validation fonctionnelle, que **les neuf systèmes VapBC prédits sont des modules Toxine/Antitoxine**. Puis, afin d'évaluer le rôle de chaque système dans la symbiose, des mutants d'inactivation du gène de la toxine VapC ont été construits et analysés en interaction avec *M. truncatula*. Trois mutants (*vapC3*, *vapC7* et *vapC10*) présentent, à 6 semaines post-inoculation, une **amélioration de la capacité fixatrice d'azote des nodosités** par rapport au sauvage. Les mutants *vapC3* et *vapC7* présentent également un nombre et une taille de nodosités supérieurs. Ces mutants, en augmentant l'apport azoté global de la plante, conduisent à une augmentation du rendement végétal. Le mutant *vapC10*, quant à lui, présente une amélioration de la viabilité bactérienne associée à une sénescence retardée, sans amélioration du rendement végétal en raison d'un nombre inférieur de nodosités par plante. Ainsi, nous démontrons que la bactérie, par l'intermédiaire des systèmes VapBC, participe à la **régulation de l'interaction symbiotique**. Les toxines VapC3 et VapC7, dans un contexte sauvage, limitent la prolifération et/ou l'infection bactérienne tandis que la toxine VapC10 diminue la viabilité bactéroïdienne.

Afin d'identifier les cibles moléculaires des ribonucléases VapC7 et VapC10, nous avons développé une analyse de MORE RNA-seq (Mapping by Overexpression of an RNase in *E. coli*). Cette technique permet de déterminer, par leur extrémité 5', les ARN clivés après surexpression chez *E. coli* des toxines de *S. meliloti*. Les toxines VapC7 et VapC10, **clivent respectivement l'ARNt^{fMet} et deux ARNt^{Ser} d'*E. coli*** permettant ainsi, une **inhibition globale ou partielle de la traduction**. Des ARNt homologues ont été identifiés chez *S. meliloti* par analyse bio-informatique. Il en résulte que le gène spécifiant l'ARNt^{fMet} initiateur de la traduction, jusqu'alors non formellement identifié chez *S. meliloti*, serait présent en trois copies sur les trois loci *rnn* chromosomiques.

En conclusion, les toxines VapC7 et VapC10 de *S. meliloti* sont des tRNases impliquées dans la **reprogrammation métabolique** de *S. meliloti* lors de la symbiose et intervenant dans la régulation de l'interaction symbiotique, probablement en réponse aux besoins azotés, énergétiques et spécifiques de sa plante hôte.

Mots-clés : Toxine-Antitoxine, VapBC, *Sinorhizobium meliloti*, tRNase, Symbiose, *Medicago truncatula*

The VapBC Toxin-Antitoxin systems : regulators of the nitrogen-fixing symbiosis Rhizobium-Legume

Abstract of the manuscript :

During the nitrogen-fixing symbiosis between the model legume *Medicago truncatula* and the *Rhizobiaceae Sinorhizobium meliloti*, bacteria, differentiated into bacteroids within the nodule, reduce atmospheric nitrogen (N₂) into ammonia (NH₃), directly available by the plant. In exchange, the plant provides to its symbiont an ecological niche and carbohydrate substrates. Throughout the interaction, bacteria are faced with changing microenvironments from the soil free-living, the infection, the invasion of plant cells, the fixing-bacteroid differentiation and lastly the symbiotic rupture.

To better understand the fast adaptation mechanisms developed by *S. meliloti* during the symbiosis, we were interested in the role of bacterial Toxin-Antitoxin (TA) systems in this process. These systems that are composed of a toxin and its cognate antitoxin, are associated with pathogenic bacteria to stress response and intracellular lifestyle adaptation. Through its site-specific RNase activity, the toxin allows a global or partial inhibition of the translation. In *S. meliloti*, 11 putative chromosomic VapBC systems have been identified and only two (VapC4 et VapC5) have been characterized in symbiotic interaction.

During this PhD, using a functional validation approach, we have first demonstrated that **the nine predicted VapBC systems are Toxin/Antitoxin modules**. Then, to assess the role of each system in the symbiosis, mutants were constructed by the invalidation of the VapC toxin gene and analyzed in interaction with *M. truncatula*. Three mutants (*vapC3*, *vapC7* et *vapC10*) show, at 6 weeks post-inoculation, a **nitrogen fixation capacity improved within the nodules** compared to the wild type. The ***vapC3*** and ***vapC7*** mutants also display a higher number and size of nodules. By increasing the global nitrogen supply of the plant, these mutants lead to an improved plant yield. The ***vapC10*** mutant, for its part, enhances bacterial viability associated to a delayed senescence, without a plant yield improvement due to a lower number of nodules per plant. Hence, we have demonstrated that bacteria, through VapBC systems, take part in the symbiotic interaction regulation. While VapC3 and VapC7 toxins limit the bacterial proliferation and/or infection in a wild type context, VapC10 toxin decreases bacteroid viability.

Then, to identify molecular targets of VapC7 and VapC10 ribonucleases, we have developed a MORE RNA-seq analysis (Mapping by Overexpression of an RNase in *E. coli*). This technic allows to determine, by their 5'-end, cleaved RNA after the *S. meliloti* toxins overexpression in *E. coli*. The VapC7 and VapC10 toxins, **cleave respectively tRNA^{fMet} et two tARN^{Ser}** in *E. coli*, therefore allowing, a **global o partial inhibition of translation**. Homologous tRNA have been identified in *S. meliloti* by a bioinformatic analysis. As a result, the gene specifying the initiator tRNA^{fMet} of translation, until now not formally identified in *S. meliloti*, would be present in three copies in the three chromosomic *rrn* loci.

In conclusion, the VapC7 and VapC10 toxins are tRNases involved in the metabolic **reprogramming** of *S. meliloti* during the symbiosis and taking place in the symbiotic interaction regulation, probably in response to energy and specific nitrogen needs of its host plant.

Key words : Toxin-Antitoxin, VapBC, *Sinorhizobium meliloti*, tRNase, Symbiosis, *Medicago truncatula*

« Ma devise, c'est d'abord de se faire plaisir dans tout ce qu'on fait, d'être sincère et déterminé, et d'avoir l'amour du travail bien fait. »

Philippe Etchebest, Meilleur ouvrier de France

Remerciements

Cette partie est la plus importante du manuscrit car elle permet d'apprécier une dimension fondamentale de la thèse : l'esprit d'équipe, le soutien et surtout les souvenirs partagés pendant ces 4 années de thèse, mais également ceux depuis mon premier stage en 2^{ème} année de Licence à l'Institut Sophia Agrobiotech, et plus particulièrement dans l'équipe symbiose. Donc j'espère n'oublier personne, et pour les personnes qui liront cette page, sachez que l'ordre d'apparition n'est pas un indicateur d'appréciation 😊

Je remercie d'abord Sophie Helaine, Patricia Bordes, Emanuele Biondi et Marc Lepetit, les membres de mon jury, d'avoir accepté de participer à ce qui correspond, aujourd'hui, au jour le plus important de ma vie : ma défense de thèse. Sachez que vous étiez un premier choix et je suis ravie que vous ayez accepté. Je remercie Sophie Helaine d'avoir été là depuis le début de la thèse, dans le cadre des comités de thèse, avec Benjamin Gourion, où vos remarques ont été très pertinentes et m'ont guidé dans mes travaux, et également dans le cadre de congrès. C'est d'ailleurs en congrès que j'ai pu rencontrer Emanuele Biondi, et je vous remercie pour tous vos conseils. Enfin, Patricia Bordes et Marc Lepetit, j'espère que vous apprécierez mon travail que vous connaissez sans doute déjà en partie au travers des présentations de Laurence.

Je vais tenter de remercier de manière concise mes directrices de thèse Laurence et Isabelle. Je ne vous cache pas que c'est avec beaucoup d'émotions que j'écris ces lignes, car c'est le début de la fin de notre aventure. Bien sûr que j'ai envie de valider mon diplôme et de voler de mes propres ailes, mais après 4 ans et demi passés avec vous au labo, et bien plus à l'université, vous allez terriblement me manquer. Je tiens d'abord à vous remercier de m'avoir donné une chance de faire mon stage de M2 puis la thèse avec vous. En effet, j'ai un sacré caractère mais grâce à vous j'ai pu évoluer tout au long de ces années et j'ai apprécié que vous m'ayez toujours laissé m'exprimer, que ce soit au laboratoire avec mes idées saugrenues ou dans mon acharnement, à faire de l'enseignement, effectuer mon DUPI et encadrer autant de stagiaires qui étaient moteurs à mes yeux, et surtout dans la vie de tous les jours. En effet, pour moi une thèse ce n'est pas uniquement des expériences de recherches mais c'est un long parcours, très dur émotionnellement, surtout à la fin à cause de la fatigue, et ce que je trouve génial et qui résume bien nos relations c'est qu'on arrive encore à avoir des fous rires la veille de l'envoi du manuscrit. Je ne dis pas que tout a été rose, mais ce que j'ai apprécié c'est qu'on a toujours pu discuter, de ce qui allait ou pas, et grâce à vous j'ai pu évoluer et grandir à tous les niveaux. Donc un grand merci pour tout ce que vous avez fait pour moi.

Je remercie également Geneviève Alloing, directrice officielle de ma thèse. Tu as toujours là été également, que ce soit dans les manip ou dans les discussions. Tu m'as porté pendant ces 4 ans et a toujours été bienveillante. Ton aide a vraiment été précieuse pour mener à bien ma thèse, tu as été le pilier de notre groupe Toxine-Antitoxine.

Je tiens également à remercier mes quatre techniciens porte-bonheur : Aurélie Kiers, Marie Pacoud, Marc Bosseno et Camille DURAJ. Aurélie, j'ai adoré passer mes trois premières années de thèse à tes côtés. Je trouve qu'on avait un bon équilibre, que ce soit à la paillasse ou dans nos discussions. Ton départ du labo a été très dur moralement pour moi car tu étais vraiment un pilier à mes yeux, toujours là quoi qu'il arrive, toujours avec le sourire et tu m'as toujours soutenu et appris à avoir plus confiance en moi. Marie, comme tu le sais ce n'est pas parce que je pars de l'équipe que je ne te verrais plus. Tu es vraiment une personne exceptionnelle, sincère et franche, que ça fasse plaisir ou non, ce que j'adore, on peut vraiment compter sur toi. Cette dernière année tu as été très présente et ça m'a extrêmement touché. En plus, tu as des enfants adorables et tu es une cuisinière hors pair, donc que demander de plus ? :) Marc, on se connaît depuis mon premier stage de Master, tu vas aussi énormément me manquer, j'ai trop pris l'habitude de faire quasiment toutes mes pauses avec toi, à regarder les gens se garer, écouter de la musique, parler de tout et de rien. Tu es la force tranquille incarnée et ça tamponne mon caractère stressé de la vie. Et t'inquiètes pas, comme Marie j'adore ta cuisine et tes enfants, pas de jaloux ! Camille, la dernière arrivée, pleine d'enthousiasme et de motivation qui permettront de faire avancer le sujet. Même si cela ne fait pas longtemps que l'on se connaît, je suis ravie de travailler avec toi et espère pouvoir être plus présente car avec l'envoi de mon manuscrit tu as été un peu mise de côté, mais tu as quand même gardé le sourire et cela a été très important pour mon moral 😊

Bien entendu, je remercie tous les doctorants qui étaient dans l'équipe, c'est dur d'être la dernière à soutenir haha. Martina, pétillante et très carrée, et Antoine, sacrée force motrice de l'équipe, vous étiez là quand j'ai commencé, vous m'avez beaucoup appris, j'ai apprécié nos échanges et vous m'avez initiée à l'oxyde nitreux, qui l'eut crû ? Gaurav et Li on a évolué tous les trois depuis le début, on a partagé nos bons moments, nos souffrances et on a même organisé un congrès pour doctorants, donc j'ai énormément de souvenirs à vos côtés. Li, tu es géniale, on a partagé le même bureau, je te voyais plus que mes amis extra-recherche. Le souvenir que j'apprécie le plus est celui où on s'allongeait dans l'herbe, à écouter du Louis Armstrong et qu'on avait notre petit havre de paix pour quelques minutes. Pareil, tu as toujours été là pour moi et j'espère qu'on se reverra bientôt <3 Et Fanny Nazaret, future doctorante de l'équipe que je connais depuis le Master 2, et qui déjà m'aidait à la réalisation des figures et a toujours été une bonne oreille ; un grand merci. Je suis triste de ne pas avoir pu partager un bout de ma thèse en ta compagnie.

Ensuite je tiens à remercier Éric Boncompagni et Olivier Pierre, car c'est en partie grâce à vous que j'en suis là aujourd'hui. Je pensais arrêter mes études après la Licence et finalement 7 ans plus tard

je vais enfin ne plus être étudiante ! Vous avez su me passionner pour la recherche et me donner l'envie de poursuivre cette voie. Éric je te remercie pour tout ce que tu as fait pour moi, que tu m'apprennes à enseigner, que tu m'accueilles dans ton bureau, qu'on le transforme en jungle et qu'on se sente bien, comme à la maison, ventilateur l'été si la clim ne marche pas, radiateur l'hiver si le chauffage est en panne, tous tes cadeaux ramenés de tes voyages, tu as vraiment tout fait pour qu'on se sente comme en famille.

Je tiens également à remercier Alexandre Boscari, co-adjoint de l'équipe, qui m'a toujours soutenu, m'a permis d'avoir une revue en premier auteur et d'avoir déguster de délicieux whisky aux grandes occasions 😊 De toute façon, tu es forcément quelqu'un de super vu que Marie Larousse t'a choisi. En effet, Marie aussi je tiens à te remercier car c'est toi qui m'a appris toutes les bases en M1 pour mener à bien une thèse : avoir un cahier de laboratoire complet, avoir une bonne organisation, créer ses plannings, me former à pleins de techniques que j'ai pu réutiliser pendant ma thèse et savoir m'approprier un sujet. En plus, tu as continué à m'apporter tes conseils tout au long de ma thèse et cela a été plus qu'utile, donc merci également.

Je remercie bien entendu tous les autres membres de l'équipe, Pierre Frendo (chef d'équipe), Renaud Brouquisse, Claude Castella, Karine Mandon et Pascale Bonin, pour tous les moments qu'on a partagés ensemble, aux symbionades, en congrès, au labo, en pause-café, le weekend pour les fêtes de la Science etc. Pierre tu m'as accompagnée pendant ces 4 ans, et as toujours pris le temps pour moi quand j'en avais besoin.

Je remercie également toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à ma progression en thèse. Je pense notamment à Corine Rancurel et Marc Bailly-Bechet qui ont collaboré sur notre projet et nous ont permis de présenter les résultats les plus ambitieux de ma thèse. En effet, ce n'était pas gagné car on a vraiment dû développer pas à pas tout le projet et finalement le résultat est vraiment top. Je pense également à Eric Galiana, mon premier encadrant en M1, qui m'a apporté énormément de réflexion scientifique et m'a appris à me poser les bonnes (j'espère) questions, Cathy Mura pour sa gentillesse et les bons moments passés au labo et Benoit Industri pour tout son soutien et l'aide apportée, même après mon stage de M1.

Un grand merci à tous les stagiaires que j'ai encadrés, et plus particulièrement Quentin Simmonot, Irène Pezzati et Clémence Ondet. Vous avez été des vrais rayons de soleil, soif d'apprendre, motivés et c'était agréable de partager tous ces moments avec vous, à progresser dans mon travail tout en prenant du plaisir. Et Victor Dietrich, que je n'ai pas encadré, mais avec qui j'ai partagé d'excellents moments durant son stage de Master, qui malheureusement fût écourté par le confinement. Hâte de te revoir !

Je souhaite également apporter toute ma reconnaissance pour Béatrice Bussinger. Car faisant de l'enseignement, ma thèse ne s'est pas résumée au laboratoire, et ton aide a été fondamentale dans toutes mes démarches administratives, mes services d'enseignement et dans ta vision de la vie 😊

Enfin, je voudrais finir par remercier mes proches. Jérémy, tu m'as beaucoup apporté pendant ces deux années, tu m'as permis d'être moins stressée, de prendre les choses avec plus de sérénité ce qui m'a quand même bien aidé dans la réalisation de ma thèse, et tu as même participé à la réalisation de certaines de mes expériences, notamment via les dénodés ou quand tu m'accompagnais à l'INRA le weekend. Je remercie particulièrement mon père, depuis toute petite tu m'as toujours poussé à faire des études, m'a poussé dans mes retranchements, m'a fait comprendre qu'il ne fallait jamais rien abandonner et ce quoiqu'il arrive et c'est vraiment grâce à toutes les valeurs que tu m'as inculquées que j'en suis là aujourd'hui malgré les embuches de la vie. Je remercie également ma Grand-mère qui a toujours été là quand j'en avais besoin, m'a toujours écoutée, toujours soutenue, et surtout j'ai toujours pu compter sur toi. Et je vais terminer mes remerciements avec mes meilleurs amis, Joffrey et Mariem. Joffrey, on se connaît depuis la L1, on est amis depuis le M1, on a partagé tellement de choses ensemble... Je ne sais pas quoi sélectionner de nos souvenirs pour le manuscrit le plus long que j'ai pu rédiger. En tout cas, on aura tout fait : partager nos connaissances pour les révisions des examens, s'entraîner aux oraux, être en compétition pour le financement de thèse, exprimer notre joie avec les expériences comme notre dégoût quand rien ne marche malgré le(s) weekend(s) passé(s) à l'INRA, partager nos pauses avec Marc la plupart du temps, parler des difficultés à enseigner, organiser un congrès et la liste est encore longue ! Et bien sûr, à mes yeux notre amitié ne se résume pas qu'au boulot, je te remercie de m'avoir supportée à chaque fois que je me plaignais de tout et de rien, des soirées qu'on a passées ensemble et de m'avoir accompagnée à Albi quand il le fallait. Mariem, on se connaît aussi depuis la L1 même si après nos parcours ont divergé, on ne s'est jamais quittées depuis. Tu es la personne la plus importante dans ma vie, j'ai toujours pu compter sur toi, tu as toujours été là pour moi et aux moments où j'en avais le plus besoin. Je ne peux pas écrire ces remerciements sur ton canapé sans te remercier de m'avoir accueillie pour finir la rédaction au mieux, n'avoir rien eu à penser car tu te t'occupes de tout et te dire que si tu n'avais pas été là, ma vie serait tellement triste ! Donc merci d'être toi, tu es une vraie source d'inspiration dans la vie 😊

Table des matières

Remerciements	7
Liste des Figures	17
Liste des Tableaux	21
Liste des Abréviations.....	22
Section : Introduction générale.....	27
Partie 1. Les systèmes Toxine-Antitoxine (TA) bactériens	27
I. Classification des systèmes Toxine-Antitoxine.....	27
1) Les différents types de systèmes TA	31
a) L'antitoxine est un ARN : Type I et III	31
a.1 Type I	31
a.2 Type III :	33
b) L'antitoxine est une protéine	34
b.1 Type II :	34
b.3 Type V.....	37
b.4 Type VI :	38
2) Distribution des systèmes TA chez les procaryotes	39
II. Les systèmes TA de type II.....	41
1) Classification des toxines de type II.....	41
2) Voies de signalisation associées aux systèmes TA de type II	44
a) La réponse stringente et l'alarmone (p)ppGpp.....	44
b) La réponse SOS -lésion/réparation de l'ADN.....	46
3) Inactivation des systèmes TA : modèle « OFF »	49
a) Autorégulation négative des opérons TA.....	49
a.1 Classification des antitoxines appartenant aux systèmes TA de type II.....	49
a.2 Mécanismes de régulation transcriptionnelle des systèmes TA	52
b) Neutralisation de la toxine par l'antitoxine.....	57
b.1 Neutralisation par modification conformationnelle de la toxine.....	57
b.2 Neutralisation de la toxine par blocage du site actif.....	59
b.3 Neutralisation de la toxine par blocage du site de liaison à la cible	60
b.4 Neutralisation de la toxine favorisée par un chaperon : cas des systèmes TAC.....	60
4) Activation des systèmes TA de type II par protéolyse de l'antitoxine (modèle « ON »).....	63
a) Signaux d'activation des systèmes TA	63
b) Nature des protéases	65
III. Mécanismes d'action des toxines de type II ciblant la traduction	68
1) Les acteurs de la traduction	69
2) Les toxines Doc, HipA, HipT : activités kinases inhibitrices de la traduction.....	71

a)	Toxine Doc : kinase inhibitrice de l'élongation de la traduction	71
b)	Toxines HipA/HipT : kinases inhibitrices de la synthèse d'ARNt	71
3)	Les toxines à activité acétyltransférase ciblant les ARNt	73
a)	TacT	73
b)	ItaT.....	73
c)	AtaT	75
4)	Les toxines à activité RNase	76
a)	RNases ribosome-dépendantes ciblant l'ARNm : RelE, RelE-like (HigB, YoeB, YafQ, YafO et l'exception MqsR).....	76
b)	RNases ribosome-indépendantes : HicA, MazF, VapC	78
b.1	HicA.....	78
b.1	MazF	78
b.3	VapC.....	81
IV.	Conclusion : les systèmes TA , outils d'adaptation bactérienne	86
	Section : Introduction générale	91
	Partie 2 : La symbiose fixatrice d'azote : Rhizobia-Légumineuses	91
I.	Les partenaires de l'interaction.....	92
1)	Les légumineuses (<i>Fabaceae</i>).....	92
2)	Les Rhizobia	94
II.	Mise en place et fonctionnement de la nodosité	96
1)	Reconnaissance et dialogue moléculaire	96
2)	Infection et formation du primordium nodositaire	97
a)	L'infection bactérienne.....	97
b)	Formation du primordium nodositaire	97
3)	Organogénèse de la nodosité indéterminée.....	99
a)	Zone I méristématique	99
b)	Zone II d'Infection bactérienne	99
c)	Interzone II-III : différenciation du bactéroïde	101
d)	Zone III de fixation de l'azote	103
	Section : Introduction générale	115
	Partie 3 : Les objectifs de thèse.....	115
	Section Résultats	121
	Partie I : Etude globale des systèmes VapBC de <i>S. meliloti</i>	121
III.	Les systèmes VapBC de <i>S. meliloti</i>	121
1)	Analyse des séquences nucléotidiques et protéiques	121
2)	Analyse des données transcriptomiques des gènes <i>vapBC</i>	127
a)	Expression des gènes <i>vapBC</i> en culture pure : phase stationnaire versus phase exponentielle de croissance	127

b)	Expression des gènes <i>vapBC</i> dans les différentes zones de la nodosité fixatrice	129
c)	Expression des gènes <i>vapBC</i> dans des nodosités sénescents	132
IV.	Validation fonctionnelle des systèmes VapBC	134
1)	Démonstration de la toxicité des protéines VapC.....	134
2)	Démonstration de l'effet antidote des protéines VapB	139
V.	Caractérisation phénotypique des mutants d'inactivation des toxines VapC en interaction avec <i>M. truncatula</i>	143
1)	Construction des mutants d'inactivation des gènes <i>vapC</i>	143
2)	Phénotype des mutants d'inactivation des toxines VapC en culture pure	144
3)	Capacité fixatrice d'azote des mutants d'inactivation des toxines VapC en symbiose.....	146
4)	Analyse du phénotype symbiotique des mutants d'inactivation des toxines VapC3 et VapC7.....	149
a)	Analyse histologique des nodosités induites par les souches sauvage ou mutantes <i>vapC3</i> et <i>vapC7</i>	152
b)	Comparaison de l'expression génique au sein de nodosités induites par la souche WT ou par les souches mutantes <i>vapC3</i> et <i>vapC7</i>	158
	Section Résultats	162
	Partie 2 : Article scientifique en préparation	162
	The VapBC10 Toxin Antitoxin system of <i>Sinorhizobium meliloti</i> targets a tRNA ^{Ser} and contributes to microsymbiote intracellular lifestyle.....	163
	Abstract	164
	Introduction.....	165
	Methods	167
	Results	174
	Supplementary information	192
	References.....	208
	Section Résultats	214
	Partie 3 : Identification de la cible de VapC7	214
	VapC7 cible la boucle anticodon de l'ARNt ^{fMet} chez <i>E. coli</i>	214
	Section Discussion et Perspectives	220
I.	VapC7 et VapC10, des tRNases inhibitrices de la traduction	220
II.	Les systèmes VapBC3, VapBC7 et VapBC10 limitent l'efficacité symbiotique	223
1)	Phénotypes des mutants <i>vapC</i> et stades symbiotiques affectés	223
2)	Pourquoi limiter l'efficacité symbiotique ?	227
a)	Quel bénéfice pour la plante ?	227
a.1	Retour sur investissement pour la plante : coût versus bénéfice !	227
a.2	Immunité et interaction symbiotique	228
b)	Quel bénéfice pour la bactérie ?	231
3)	Pourquoi multiplier les systèmes VapBC?	232

a)	Adaptation à différents microenvironnements.....	232
b)	Activation des toxines par la protéolyse des antitoxines VapB	233
c)	Diversité des cibles moléculaires des toxines	234
III.	Perspectives.....	236
1)	Validation des cibles de VapC7 et VapC10 identifiées par MORE RNA-seq	236
2)	Etude du mécanisme d'activation des systèmes VapBC de <i>S. meliloti</i> ?.....	238
3)	Les systèmes VapBC : un outil pour l'amélioration de l'interaction symbiotique	240
4)	Autres systèmes TA à caractériser pour le développement d'outils d'amélioration de l'interaction Rhizobia-Légumineuses ?	241
	Conclusion générale du travail de thèse	246
	Section Matériel et Méthodes	249
I.	Matériel biologique	249
a)	Matériel végétal	249
b)	Matériel bactérien.....	249
c)	Matériel plasmidique	251
II.	Tests de viabilité bactérienne chez <i>E. coli</i>	253
a)	Clonage des gènes <i>vapC</i> dans le vecteur d'expression pBAD24	253
b)	Test de viabilité bactérienne des toxines VapC.....	253
2)	Test d'antitoxicité des systèmes VapBC2, VapBC3, VapBC6, VapBC7, VapBC8, VapBC9, VapBC10 et VapBC11 de <i>S. meliloti</i> chez <i>E. coli</i>	254
a)	Clonage des gènes <i>vapB</i> dans le vecteur d'expression pRSF1b	254
b)	Test de viabilité bactérienne des modules VapBC	255
III.	Analyse phénotypique de la capacité fixatrice d'azote lors de l'interaction entre <i>M. truncatula</i> et les mutants d'inactivation <i>vapC1</i> , <i>vapC2</i> , <i>vapC3</i> , <i>vapC6</i> , <i>vapC7</i> , <i>vapC8</i> , <i>vapC9</i> , <i>vapC10</i> et <i>vapC11</i> ..	255
1)	Construction des mutants <i>vapC2</i> , <i>vapC3</i> et <i>vapC9</i> chez <i>S. meliloti</i>	255
a)	Clonage des gènes <i>vapC2</i> et <i>vapC9</i>	255
b)	Recombinaison homologue par conjugaison triparentale	256
2)	Test de croissance de l'ensemble des mutants <i>vapC</i> chez <i>S. meliloti</i>	257
3)	Mesure de la capacité fixatrice d'azote pour l'ensemble des interactions.....	257
4)	Rendement végétal des plantes en interaction avec les mutants <i>vapC3</i> , <i>vapC7</i> et <i>vapC10</i> ..	257
5)	Analyses statistiques de la caractérisation phénotypique des mutants <i>vapC</i> en interaction avec <i>M. truncatula</i>	258
IV.	Caractérisation histologique et moléculaire des nodosités de <i>M. truncatula</i> induites par les mutants d'inactivation <i>vapC3</i> , <i>vapC7</i> et <i>vapC10</i>	259
1)	Phénotype macroscopique des nodosités.....	259
2)	Analyse statistique des phénotypes macroscopiques des nodosités	259
3)	Estimation de la viabilité bactéroïdienne par la technique du Live/Dead	259
4)	Analyse de l'expression de gènes marqueurs de la nodosité	260

a)	Extraction des ARNs totaux	260
b)	Reverse Transcription et PCR quantitative.....	260
V.	Identification des cibles des toxines VapC7 et VapC10 par MORE RNA-seq.....	263
1)	Expression des toxines en BW25113Δ6 et extraction des ARNs pour le MORE RNA-seq.....	263
2)	MORE RNA-seq : préparation des banques d'ADNc pour le séquenceur Illumina	263
3)	Traitement bioinformatique : nettoyage, alignement et table de comptage des "reads"	265
4)	Analyse statistique	265
	Annexe 1 – Plasmide pBAD24	267
	Annexe 2-Plasmide pRSF1b.....	268
	Annexe 3-Recombinaison homologue par le plasmide pK19mob2ΩHMB.....	269
	Annexe 4-Etude du mutant <i>vapC2::miniTn5</i>	270
	Références.....	274
	Annexe 5- Revue "Molecular Weapons Contribute to Intracellular Rhizobia Accommodation Within Legume Host Cell."	298
	Annexe 6- Revue "Involvement of proteases during nodule senescence in leguminous plant"	306

Liste des Figures

Introduction : Les systèmes Toxine-Antitoxine (p-27-88)

Figure 1 : Post-segregational killing et infection abortive, adaptés de Harms et al., 2018

Figure 2 : Fonctions cellulaires ciblées par les toxines de systèmes TA

Figure 3 : Mécanisme d'action des systèmes TA de type I

Figure 4 : Mécanisme d'action des systèmes TA de type III

Figure 5 : Mécanisme d'action des systèmes TA de type II

Figure 6 : Mécanisme d'action des systèmes TA de type IV

Figure 7 : Mécanisme d'action des systèmes TA de type V : le modèle GhoST

Figure 8 : Mécanisme d'action des systèmes TA de type VI - Cas de SocAB chez *C. crescentus*

Figure 9 : Distribution des systèmes TA de type I, II, III et AbiE (type IV)

Figure 10 : La réponse stringente bactérienne chez *E. coli*

Figure 11 : La réponse SOS

Figure 12 : Lien entre signaux activateurs des systèmes TA, réponse stringente et réponse SOS issu de Gollan et al., 2019

Figure 13 : Structure des domaines de liaison à l'ADN des antitoxines de type II

Figure 14 : Modes de régulation transcriptionnelle et traductionnelle des systèmes TA de type II, issus de Deter et al., 2017

Figure 15 : Particularités de régulation des systèmes TAC

Figure 16 : Changement conformationnel de la toxine par liaison de l'antitoxine

Figure 17 : Site actif de la toxine bloqué par liaison de l'antitoxine : Cas des VapBC

Figure 18 : Mécanisme d'addiction au chaperon chez les systèmes Toxine-Antitoxine issu de Bordes and Genevax, 2017

Figure 19 : Parallèles entre les réponses aux stress de l'hôte et les signaux auxquels les TA répondent, issus de Lobato-Márquez et al., 2016

Figure 20 : Structure des protéases AAA+ issue de Yang et al., 2020a

Figure 21 : Initiation de la traduction procaryote

Figure 22 : Elongation de la traduction procaryote

Figure 23 : Mécanisme d'inhibition de la traduction par les kinases Doc et Hip

Figure 24 : Structure et mécanisme de TacT

Figure 25 : Mécanisme d'action de la toxine AtaT

Figure 26 : Cibles de MazF et réponses biologiques, issues de Schifano and Woychik, 2017

Figure 27 : Conservation des acides aminés acides du site actif et de la structure 3D des VapC

Figure 28 : Les systèmes TA au cœur d'un événement infectieux

Introduction : La symbiose fixatrice d'azote (p91-118)

Figure 29 : Représentation schématique de la symbiose fixatrice d'azote Rhizobium- Légumineuse, issue de Lindström and Mousavi, 2020.

Figure 30 : Classification des sous-familles de légumineuses, issue de Domergue, 2019.

Figure 31 : Arbre phylogénétique simplifié des rhizobiacea de l'ADNr.

Figure 32 : Le génome à trois composants de *S. meliloti* : un chromosome et deux mégaplasmides, issu de Downie and Young, 2001

Figure 33 : Infection bactérienne et formation du primordium nodositaire, issues de Suzaki et al., 2015.

Figure 34 : Organogénèse de la nodosité de *Medicago*

Figure 35 : Complexe enzymatique de la nitrogénase issu de Rascio and La Rocca, 2013.

Figure 36 : Schéma et photo d'une nodosité indéterminée, adaptés de Dupont et al., 2012.

Figure 37 : Analyse microscopique de la sénescence nodositaire chez *M. truncatula* issue de Timmers et al., 2000; Van De Velde et al., 2006

Figure 38 : Processus majeurs impliqués dans la sénescence nodositaire en réponse à des contraintes environnementales.

Figure 39 : Implication et connexion des ROS, du NO, des peptides NCR et des modules TA dans les symbiosomes des nodosités racinaires de *Medicago*, issues de Syska et al., 2019.

Figure 40 : Distribution des systèmes TA de *S. meliloti* et état de l'art des systèmes VapBC

Figure 41 : Mindmap des objectifs de thèse

Résultats : Etude globale des systèmes VapBC chez *S. meliloti* (p121-159)

Figure 42 : Environnement génique des opérons *vapBC1*, *vapBC3* et *vapBC11*

Figure 43 : Prédictions des domaines protéiques (InterPro) et des homologues (SwissProt) des antitoxines VapB et des toxines VapC

Figure 44 : Alignement des antitoxines VapB (PROMALS 3D)

Figure 45 : Alignement des toxines VapC (PROMALS 3D)

Figure 46 : Analyse de l'expression différentielle des gènes *vapBC* de *S. meliloti* entre la phase stationnaire et la phase exponentielle de croissance.

Figure 47 : Analyse de l'expression différentielle des gènes *vapBC* de *S. meliloti* dans les différentes zones de la nodosité fonctionnelle âgée de 15 jpi.

Figure 48 : Analyse des fold change de l'expression différentielle des gènes *vapBC* de *S. meliloti* dans les différentes zones nodosité fonctionnelle âgée de 15 jpi.

Figure 49 : Analyse de l'expression différentielle des gènes *vapBC* de *S. meliloti* dans des nodosités à différents âges, soumises ou non à des stress salins et nitrates

Figure 50 : Expression hétérologue chez *E. coli* DH5 α des toxines VapC2, VapC6, VapC7, VapC8 et VapC10 de *S. meliloti*.

Figure 51 : Expression hétérologue chez *E. coli* DH5 α des toxines VapC1, VapC3, VapC9 et VapC11 de *S. meliloti*.

Figure 52 : Cinétique de croissance des souches d'*E. coli* BL21 (DE3) pLysS co-exprimant les toxines VapC2, VapC6, VapC7, VapC8, VapC9 et VapC10 de *S. meliloti*, et leurs antitoxines respectives.

Figure 53 : Test de viabilité des souches d'*E. coli* BL21 (DE3) pLysS exprimant la toxine VapC11 seule ou en présence de l'antitoxine VapB11.

Figure 54 : Cinétique de croissance des mutants *vapC* de *S. meliloti* en milieu riche.

Figure 55 : Capacité fixatrice d'azote à 6 spi des mutants invalidés pour la toxine en interaction avec *M. truncatula*.

Figure 56 : Poids des nodosités par plante des mutants invalidés pour la toxine en interaction avec *M. truncatula*, à 6 spi.

Figure 57 : Nombre de nodosités et poids moyen des nodosités induites par les mutants *vapC3* et *vapC7*, à 6 spi.

Figure 58 : Rendement végétal des plantes de *M. truncatula* inoculées par *vapC3* et *vapC7*, à 6 spi.

Figure 59 : Analyse à 6 spi de la sénescence de nodosités de *M. truncatula* induites par les souches mutantes invalidées pour les toxines VapC3 (*vapC3*) et VapC7 (*vapC7*) ou sauvage (WT)

Figure 60 : Analyse de la taille totale ou des zones de fixation et de sénescence des nodosités de *M. truncatula* induites par les souches mutantes invalidées pour les toxines VapC3 (*vapC3*) et VapC7 (*vapC7*) ou sauvage (WT), à 6 spi.

Figure 61 : Comparaison de la viabilité des bactéroïdes de nodosités sauvages ou invalidées pour les toxines VapC3 et VapC7 à 6 spi.

Figure 62 : Expression relative de gènes marqueurs de la fixation et de la sénescence dans des nodosités sauvages (WT) ou mutantes *vapC3* et *vapC7*, à 6 spi.

Résultats : Identification de la cible de VapC7 (p214-218)

Figure 63 : VapC7 clive l'ARNt^{fMet CAU} dans le site CAUAA^C au niveau de la jonction tige-boucle de l'anticodon chez *E. coli*.

Figure 64 : VapC7 ne clive pas le site CAUAA^U au niveau de la jonction tige-boucle de l'anticodon des ARNt^{Met} transcrits par *metU* et *metT* chez *E. coli*.

Figure 65 : Les gènes SMC02455, SMC02623 et SMC03075 de *S. meliloti* sont les meilleurs homologues des gènes *metZ/metW/metV* et *metY* d'*E. coli*.

Discussion et Perspectives (p200-245)

Figure 66 : Comparaison des séquences d'ARNt^{(f?)Met}, de la localisation des gènes d'ARNt^{(f?)Met} et des loci *rrn* chez *E. coli* et *S. meliloti*.

Figure 67 : Rôle des toxines VapC3 et VapC7 dans la symbiose.

Figure 68 : Rôle de la toxine VapC10 dans la symbiose.

Figure 69: Rapport bénéfice/coût de la symbiose pour la plante, issu de Sachs et al., 2018.

Figure 70 : La balance entre la réponse immunitaire et la symbiose au cours du développement de la nodosité, issue de Cao et al., 2017

Figure 71: Validation des ARNt cibles des toxines VapCs : stratégie de co-expression cible/toxine (adaptée de Walling and Butler, 2018)

Figure 72: Validation des ARNt cibles des toxines VapCs : test de l'activité RNase des toxines sur les ARNt cibles produits par transcription *in vitro*

Figure 73 : Distribution totale des systèmes TA classés en fonction de la famille de la toxine chez 30 espèces rhizobiennes.

Matériel et Méthodes (p249-265)

Figure 74 : Exemple de l'invalidation de la toxine VapC2 obtenue par conjugaison triparentale

Figure 75 : Contrôle qualité des extractions d'ARNs après traitement DNase mesuré par le Bioanalyzer.

Annexe Mutant Tn5-*vapC2* (p269-272)

Figure 76: Rendement végétal des plantes de *M. truncatula* inoculées par *vapC2::Tn5* à 3 spi.

Figure 77: Comparaison de la viabilité des bactéroïdes de nodosités sauvages ou invalidées pour la toxine VapC2 à 3 spi.

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Classification des toxines de type II adaptée de Jurénas et al., 2017

Tableau 2 : Bilan des interactions TA et régulation transcriptionnelle

Tableau 3 : Bilan des interactions TA et neutralisation de la toxine par l'antitoxine

Tableau 4 : Protéolyse des antitoxines de type II par les protéases AAA+

Tableau 5 : Liste non exhaustive des cibles ARN des toxines MazF (ChpBK et PemK)

Tableau 6 : Liste non exhaustive des cibles ARN de la toxine VapC

Tableau 7: Généralités sur les toxines de systèmes TA de type II

Tableau 8 : Les gènes *nif* and *fix* identifiés chez *S. meliloti*, et leur fonction connue ou proposée, adapté de Fischer, 1994.

Tableau 9 : Bilan de toxicité des protéines VapC de *S. meliloti* exprimées chez *E. coli*.

Tableau 10 : Résumé de l'analyse à 6 spi de la sénescence de nodosités de *M. truncatula* induites par les souches mutantes invalidées pour les toxines VapC3 (*vapC3*) et VapC7 (*vapC7*) ou sauvage (WT).

Tableau 11 : Reconnaissance des 6 codons sérine par les 4 ARNt^{Ser} et fréquence des codons sérine chez *E. coli* et *S. meliloti*.

Tableau 12: Comparaison des phénotypes symbiotiques des mutants *vapC3*, *vapC7* et *vapC10* en interaction avec *M. truncatula* à 6 spi.

Tableau 13 : Résumé des interactions entre les antitoxines VapB et les sous-unités des protéases AAA+ ClpXP et ClpYQ (Ogden et al., 2019)

Tableau 14 : Expression relative des protéases de la famille AAA+ dans les différentes zones de la nodosité.

Tableau 15 : Distribution des systèmes TA dans les espèces du genre *Rhizobium*

Tableau 16 : Souches bactériennes utilisées dans cette étude

Tableau 17 : Plasmides utilisés dans cette étude

Tableau 18 : Amorces utilisées dans cette étude

Tableau 19 : Liste des amorces utilisées pour les expériences de RTqPCR

Tableau 20: Résumé du nombre de reads séquencés obtenus dans les conditions contrôle et d'induction de la toxine VapC7 lors de l'analyse du MORE RNA-seq, pour chaque réplicat.

Liste des Abréviations

AAA+	ATPase Associated with different cellular Activities
Ac-CoA	Acétyl-Coenzyme A
ADN(c/g)	Acide Desoxyribonucléique (complémentaire/ génomique)
A.R.A	Acetylene Reduction Assay
ara	arabinose
ARN(m/r/t)	Acide Ribonucléique (messager/ribosomique/transfert)
ATGCU	Adénine Thymine Guanine Cytosine Uridine
ATP	Adénosine tri-phosphate
BET	Bromure d'éthidium
CFU	Colony Forming Unit
CRAC	UV-induced RNA-protein crosslinking and analysis of cDNA
C-ter	C-terminale
db/sb	double brin/simple brin
DEPC	Diéthyl pyrocarbonate
dNTPs	Desoxynucleotides TriPhosphate
DO	Densité optique
EF	Elongation Facteur
EPS	ExoPolySaccharide
FN	Facteur Nod
Hmp	Flavohémoglobine bactérienne
HTH	Helix Turn Helix
IF	Initiation factor
jpi	jour(s) post-inoculation
Lb	Léghemoglobine
LB _(MC)	Luria-Bertani broth (MgSO ₄ CaCl ₂)
MAMP	Microbe Associated Molecular Pattern
MoCo	Cofacteur au molybdène
MORE RNA-seq	Mapping by Overexpression of an RNase in E. coli RNA-seq
MTI	MAMP Triggered Immunity
N-ter	N-terminale
N ₂	Diazote
NaPi	Tampon Phosphate de Sodium
NCR	Nodule cystein-rich peptide
NO	Monoxyde d'azote
O ₂	Dioxygène
ON	Overnight
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern
PRR	PAMP Recognition Receptor
PSK	Post-Segregational Killing
PTI	PAMP Triggered Immunity
RHH	Ribbon Helix Helix
RNS/ROS	Reactive Nitrogen Species / Reactive Oxygen Species
rpm	round per minute
RTqPCR	Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction
spi	semaine(s) post-inoculation
Système TA(C)	Système Toxine/Antitoxine/Chaperon
TADB2	Toxin Antitoxin DataBase 2
TAE	Tris- Acétate-EDTA
TBD	Terminal Bacteroid Differentiation
Vap	Virulence associated protein

Introduction au travail

Les plantes de la famille des légumineuses représentent un enjeu économique majeur. Cultivées pour leurs grains riches en protéines ou leur fourrage, elles constituent la deuxième famille agronomique la plus cultivée dans le monde. Grâce à leur capacité à établir une symbiose fixatrice d'azote avec les bactéries du genre *Rhizobium*, les légumineuses permettent de plus un enrichissement des sols en azote. Ainsi, leur culture limite l'usage d'intrants azotés polluants et favorise une agriculture durable et respectueuse de l'environnement. La compréhension des mécanismes régissant la mise en place, l'efficacité et la durabilité de la symbiose fixatrice d'azote, constitue donc un défi majeur.

A chaque étape de l'interaction symbiotique depuis l'établissement, la différenciation de la bactérie en bactéroïde fixateur jusqu'à la rupture, les rhizobia doivent s'adapter à des microenvironnements changeants associés à de multiples stress. Les systèmes Toxine-Antitoxine (TA) bactériens sont décrits comme des acteurs de la résistance au stress et de la reprogrammation métabolique nécessaire à l'adaptation et la survie des bactéries pathogènes. Aussi, dans le cadre de cette thèse, nous avons choisi d'étudier le rôle des systèmes TA de type VapBC de *S. meliloti* dans la symbiose fixatrice d'azote avec la plante modèle *Medicago truncatula*.

S. meliloti possède 11 systèmes TA chromosomiques de type VapBC. A mon arrivée au laboratoire, l'équipe avait démontré l'implication d'un système VapBC, VapBC5 (Lipuma et al., 2014), dans la symbiose fixatrice d'azote. Mon premier objectif de thèse a alors consisté à poursuivre l'analyse du rôle des systèmes VapBC de *S. meliloti* dans l'interaction symbiotique avec *M. truncatula*, pour l'ensemble de ces systèmes. Puis, les toxines VapC étant des RNases site-spécifique, mon second objectif de thèse a été de déterminer les cibles de deux toxines par une approche de MORE RNA-seq afin de corrélérer leur activité moléculaire à leur fonction symbiotique.

Dans une première partie, le manuscrit introduit les concepts afférant aux systèmes Toxine-Antitoxine, en présentant notamment les différentes familles, modes d'action et rôles biologiques des TA suivis d'une présentation synthétique de la symbiose fixatrice d'azote. Après cette introduction, un premier chapitre est consacré aux résultats obtenus pendant la thèse sur l'analyse globale des systèmes VapBC. Un second chapitre, sur l'étude approfondie de 3 mutants invalidés pour la toxine présentant un phénotype symbiotique, sera présenté en trois parties : (1) caractérisation des mutants *vapC3* et *vapC7* (2) un article scientifique en cours de rédaction concernant l'analyse du phénotype symbiotique obtenu avec le mutant invalidé pour la toxine VapC10 et identification de la cible de cette toxine et (3) identification de la cible de la toxine VapC7. L'ensemble des résultats obtenus seront discutés dans une section Discussion commune, ce qui permettra d'avoir une vision plus large quant aux perspectives du sujet.

Section Introduction générale



➤ **Partie 1** : Les systèmes Toxine-Antitoxine

➤ **Partie 2** : La symbiose fixatrice d'azote

➤ **Partie 3** : Les objectifs de thèse

Section : Introduction générale

Partie 1. Les systèmes Toxine-Antitoxine (TA) bactériens

I. Classification des systèmes Toxine-Antitoxine

Les systèmes Toxine-Antitoxine (TA) sont des modules génétiques, le plus souvent organisés en opéron de deux gènes de petite taille (<0.5 kb), codant une toxine et son antitoxine associée. L'antitoxine a pour rôle de diminuer voire supprimer l'expression ou l'activité de la toxine.

La présence des systèmes TA a été initialement décrite sur des plasmides bactériens. Le premier module TA identifié a été le système CcdAB, présent sur le plasmide F d'*E. coli*. Son rôle est de maintenir le plasmide dans les cellules filles lors de la division bactérienne, en conduisant à la mort des bactéries n'ayant pas hérité du système TA, donc du plasmide F (Ogura and Hiraga, 1983). Ce mécanisme a été nommé « Post-segregational killing » ou PSK (Figure 1A). Depuis ces quinze dernières années, les systèmes TA, ont été retrouvés dans l'ensemble du règne procaryote (bactéries et archées), portés par des plasmides mais également par le chromosome bactérien (Pandey and Gerdes, 2005) et jouant un rôle dans de nombreuses fonctions biologiques autres que celle du PSK.

En ciblant des processus cellulaires essentiels tels que la réplication, la traduction, l'intégrité membranaire ou la synthèse de la paroi, les toxines impactent la croissance bactérienne, allant de la mise en dormance (effet bactériostatique) à la mort (effet bactéricide) des cellules bactériennes (Figure 2). Les toxines de systèmes TA jouent également le rôle de régulateurs post-transcriptionnels (globaux ou spécifiques) de l'expression génique. Ils favorisent ainsi l'adaptation bactérienne en réponse à des stress ou à de nouveaux environnements rencontrés par la bactérie. Ils ont été montrés comme impliqués dans la persistance antibiotique¹ (Moyed and Bertrand, 1983; Ronneau and Helaine, 2019), la virulence (Lobato-Márquez et al., 2016), la formation de biofilm (Sun et al., 2017), la survie/adaptation intracellulaire (Lobato-Márquez et al., 2016), et dans l'infection abortive de bactériophages (suicide altruiste) (Harms et al., 2018) (Figure 1B). Les systèmes TA pourraient également avoir un rôle évolutif dans la stabilisation de régions génomiques (Hayes and Kędzierska, 2014; Yang and Walsh, 2017).

¹ La persistance antibiotique correspond à un comportement hétérogène d'une population bactérienne, où seule une sous-population (cellules persistantes) est capable de survivre, par arrêt de la croissance transitoire, en présence de concentrations en antibiotiques létales pour le reste de la population (Gollan et al., 2019).

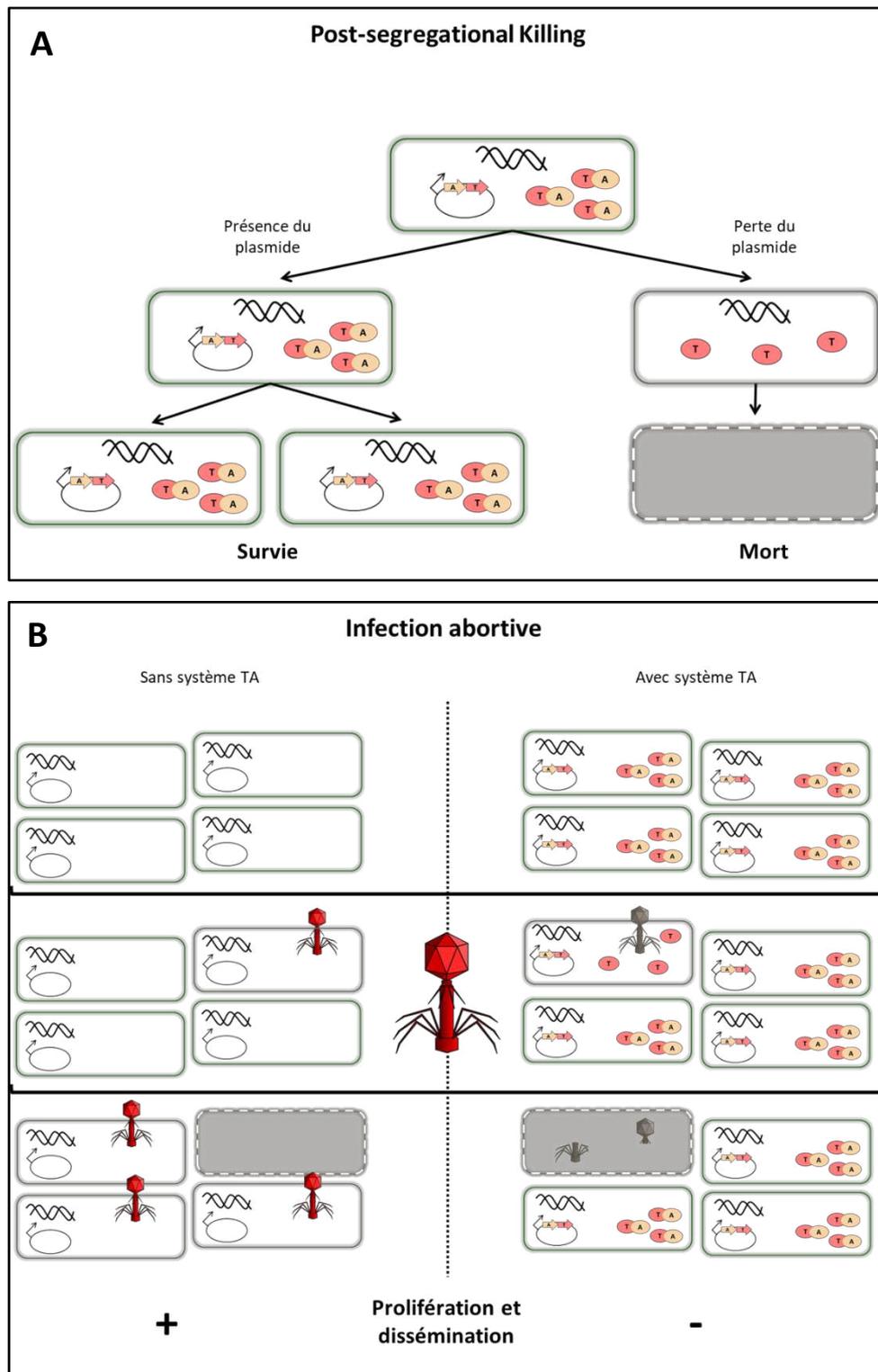


Figure 1 : Post-segregational killing et infection abortive, adaptés de Harms et al., 2018

A : Post-segregational killing. Mécanisme permettant le maintien des plasmides, au cours de la division cellulaire. Les cellules filles n'ayant pas hérité du plasmide, et donc du système TA, ne contiennent pas d'antitoxine, protéine instable nécessitant une production en continu. A l'inverse, ces cellules héritent de toxines, protéines stables qui conduisent à leur mort. Les cellules ayant maintenu le plasmide, et donc le système TA fonctionnel permettant la coexpression de la toxine et de son antitoxine pourront survivre.

B : L'infection abortive, ou suicide altruiste, est un mécanisme de défense ayant lieu lors de l'attaque par un phage. L'infection de la bactérie induit le système TA, et donc la mort de la bactérie empêchant ainsi le phage de se reproduire et de se disséminer dans la population.

Les fonctions biologiques associées aux systèmes TA dépendent toutefois de l'activation de ces systèmes, liée à la balance $[T]/[A]$. Quand $[T]/[A] < 1$, le module TA est inactif (la balance est dite «OFF»), puisque la toxine n'est pas libre mais liée à son antitoxine, alors que, quand $[T]/[A] > 1$, le module TA est actif (la balance est dite «ON ») car la toxine libre, non liée à l'antitoxine, peut exercer sa fonction cellulaire.

La multitude des processus cellulaires ciblés par les toxines est illustrée par la diversité de leur nature et de leurs mécanismes d'action (**Figure 2**). De plus, la diversité des mécanismes de neutralisation de la toxine par l'antitoxine ajoute un niveau de complexité supplémentaire à la compréhension du fonctionnement des systèmes TA.

Par conséquent, les systèmes TA sont classés en 6 types en fonction du mécanisme de neutralisation de la toxine par l'antitoxine (ARN/ARN, Protéine/Protéine, ARN/Protéine, Compétiteurs protéiques, Protéine/ARN ou Chaperon pour la dégradation). Au sein d'un même type, plusieurs familles peuvent être retrouvées en fonction de la nature de la toxine et du processus cellulaire ciblé. Enfin, les fonctions biologiques impactées ne dépendent pas toujours du type ni de la famille du système TA.

Dans un premier temps, des généralités sur chaque type de système TA seront présentées. Puis, les connaissances actuelles sur la distribution des systèmes TA dans le règne procaryote seront résumées.

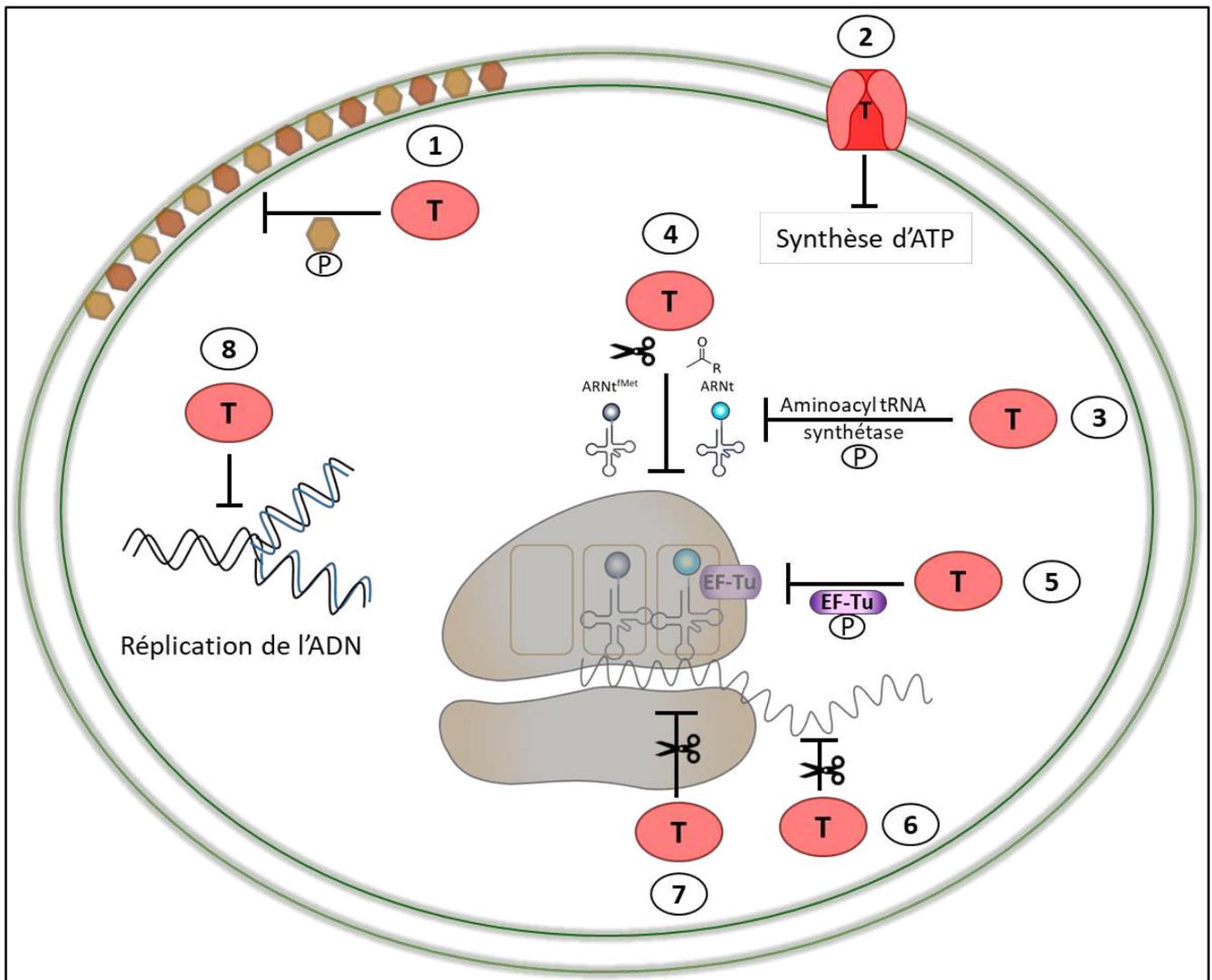


Figure 2 : Fonctions cellulaires ciblées par les toxines de systèmes TA

Schéma adapté de (Yang and Walsh, 2017) illustrant les processus cellulaires ciblés par les toxines appartenant à des systèmes TA.

1) La phosphorylation d'un composant de la paroi inhibe la synthèse du peptidoglycane et donc de la paroi.

2) La toxine crée un pore dans la membrane, ce qui inhibe la synthèse d'ATP et donc des processus ATP-dépendants.

3 à 7) La toxine inhibe la traduction. **3)** La toxine empêche la synthèse d'ARNt chargé en acide aminé en phosphorylant l' aminoacyl tRNA synthétase, qui devient alors inactive. **4)** La toxine peut acétyler ou dégrader un ARNt, elle inhibe donc la traduction de manière globale si l'ARNt touché est l'ARNt^{fMet}, initiateur de la traduction, ou partielle s'il s'agit d'un ARNt élongateur. **5)** La toxine phosphoryle le facteur d'élongation EF-Tu et empêche l'élongation de la traduction. **6)** La toxine dégrade l'ARNm indépendamment du ribosome. **7)** La toxine dégrade l'ARNm de manière ribosome-dépendante.

8) La toxine inhibe la réplication par inactivation de topoisomérases ou par dégradation de l'ADN.

1) Les différents types de systèmes TA

Les systèmes TA sont actuellement classés en six types en fonction de la nature de l'antitoxine (ARN ou protéine) et de son mode d'inactivation de la toxine. L'organisation génétique, la fonction des deux entités T et A, le mode d'inactivation de la toxine par l'antitoxine, et, lorsque la littérature le permet, les signaux d'activation de chaque type de systèmes TA seront décrits ci-dessous. Une description plus approfondie des systèmes TA de type II, sujet principal de cette thèse, sera présentée en partie II.

a) L'antitoxine est un ARN : Type I et III

a.1 Type I

L'**antitoxine** est un ARN antisens qui s'hybride (partiellement ou totalement) à l'ARNm de la toxine, formant ainsi un ARN double brin. Cet ARN double brin inhibe la production de toxine en empêchant l'accrochage du ribosome et/ou en conduisant à la dégradation de l'ARNm de la toxine (**Figure 3**). La dégradation de l'antitoxine, plus instable que la toxine de par sa nature ARN, conduit à l'activation du système TA et à la production de la toxine. Il a été montré que certains systèmes de type I sont activés par la réponse SOS (lésions d'ADN), d'autres par des stress nutritifs, thermiques, alcalins, acides ou par des conditions d'anoxie (Soutourina, 2019; Wen and Fozo, 2014).

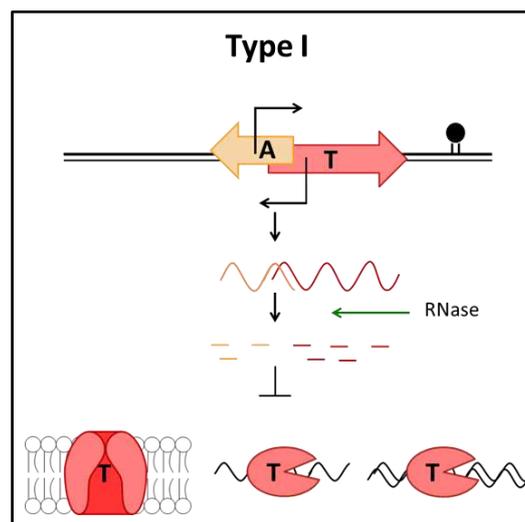


Figure 3 : Mécanisme d'action des systèmes TA de type I

L'ARN de l'antitoxine est complémentaire, partiellement ou totalement, de l'ARN de la toxine, en 5' ou en 3'. Cette complémentarité conduit à la formation d'un ARN double brin qui est dégradé par la RNase III. La dégradation de l'ARN de la toxine empêche sa traduction en protéine et donc son activité. Les toxines de type I peuvent créer des pores dans la membrane, dégrader des ARNs ou encore dégrader de l'ADN.

La toxine est le plus souvent une petite protéine hydrophobe membranaire, de moins de 60 acides aminés. Son rôle est de **créer un pore dans la membrane**, ce qui interrompt le potentiel membranaire et donc la production d'ATP. Les systèmes TA modèles sont Hok/Sok et TisB/ItsR1. Le module Hok/Sok, sur le plasmide R1 d'*E. coli*, a été le premier système TA de type I identifié (Gerdes et al., 1986). L'ARNm de la toxine Hok a une demi-vie d'environ 20 min alors que celui de l'antitoxine Sok a une demi-vie de seulement 0.5 min. Ainsi lors de la division, seules les cellules ayant maintenu le plasmide pourront produire l'antidote et donc survivre (Gerdes et al., 1988). Bien que la présence de tels systèmes de type I sur le chromosome de bactéries Gram-négatif ait été montrée, leur fonction génomique n'a toujours pas été déterminée. La famille **TisB/ItsR1** a les mêmes fonctions que Hok/Sok et les membres de cette famille TA seraient activés à la suite de la mise en place de la réponse SOS, lors de lésions importantes de l'ADN.

Certaines toxines de type I peuvent également avoir une activité **endoribonucléase (RNase)** ciblant les ARNm. La famille la plus étudiée est SymER, présente chez des bactéries à Gram-positif et Gram-négatif. La toxine SymE est régulée d'une part à l'échelle post-transcriptionnelle par l'antitoxine SymR, et d'autre part, à l'échelle post-translationnelle par la protéase Lon (Kawano et al., 2007; Unterholzner et al., 2013). Comme pour TisB/ItsR1, ce système est induit par la réponse SOS. La dégradation d'ARN par SymE permettrait uniquement de préserver de l'énergie, en inhibant la synthèse protéique puisqu'aucun lien avec un suicide altruiste (infection abortive) ou avec la persistance n'a pu être démontré (Kawano et al., 2007).

Enfin, la famille RalRA, codée par le prophage rac dans le génome d'*E. coli*, est le seul exemple de système TA de type I où la toxine RalR est une **DNase** (non-spécifique). La toxine active la réponse SOS due aux lésions de l'ADN qu'elle génère et permet ainsi d'augmenter la résistance à la fosfomycine (antibiotique inhibant la production de peptidoglycane) (Guo et al., 2014; Soutourina, 2019). Actuellement, il s'agit du seul système de type I chez *E. coli* où l'antitoxine RalA est stabilisée par Hfq, une protéine chaperon de l'ARN. Concernant l'activation de ce système par dégradation de RalA, peu d'informations sont disponibles, hormis le fait qu'une forte induction de RalR est observée dans les stades tardifs de formation de biofilm chez *E. coli* (Domka et al., 2007).

En résumé, les toxines de type I, en inhibant indirectement la synthèse d'ATP ou en dégradant directement l'ADN ou l'ARN, peuvent inhiber la répllication et la traduction, ce qui affecte la croissance voire la survie de la bactérie (dormance, persistance ou mort cellulaire) (Wen and Fozo, 2014). Certains rôles des systèmes TA de type I chromosomiques ont été évalués dans la réponse au stress chez *E. amylovora* (Peng et al., 2019) ou dans le maintien d'éléments génétiques mobiles chez *C. difficile* (Peltier et al., 2020).

a.2 Type III :

Dans les systèmes TA de type III, l'**antitoxine** est un ARN comprenant deux à cinq séquences répétées en tandem. Sous l'action de la toxine, de nature protéique, cet ARN est maturé en ARNs de petite taille. Le complexe TA correspond à l'alternance de monomères d'ARNs de l'antitoxine liés aux monomères de toxine (**Figure 4**). L'activité de la toxine séquestrée est par conséquent réprimée (Goeders et al., 2016; Kang et al., 2018; Wen and Fozo, 2014).

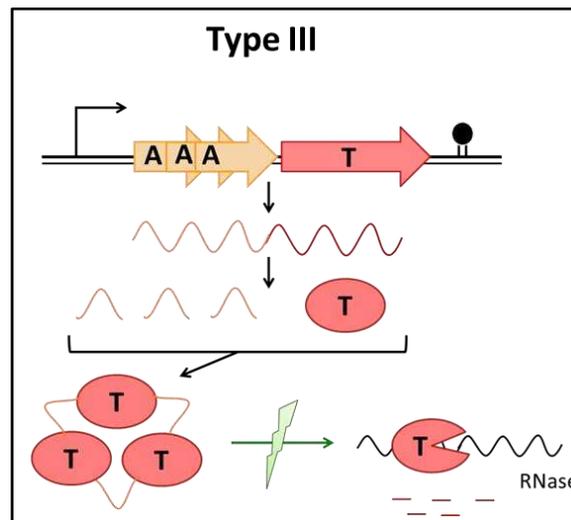


Figure 4 : Mécanisme d'action des systèmes TA de type III

L'ARN de l'antitoxine correspond à une suite de séquences répétées (ou motif) en tandem. Cet ARN est ensuite maturé au niveau de chaque motif par la toxine. Chaque motif d'ARN clivé peut alors se lier aux monomères protéiques de toxine, inhibant ainsi leur activité. Lors d'un stress, l'antitoxine est dégradée et la toxine libérée. Elle peut alors exercer sa fonction de RNase sur d'autres ARNs cellulaires.

La **toxine** de type III est une RNase qui cible l'ARN de l'antitoxine et d'autres ARNm cellulaires dans des régions riches en adénine. A ce jour, trois grandes familles ont été décrites : ToxIN, CptIN et TenpIN où « I » correspond à l'antitoxine et « N » à la toxine (Goeders et al., 2016; Kim et al., 2018). Ces complexes ont une structure soit hétérohexamérique (3 :3), comme pour ToxIN et TenpIN, soit hétérotétramérique (2 : 2) pour CptIN. Deux fonctions principales ont été identifiées pour les systèmes de type III. La première est la stabilisation de plasmides par un mécanisme de PSK (**Figure 1A**) et la seconde est l'infection abortive (**Figure 1B**) (Goeders et al., 2016; Kang et al., 2018).

Le système TA de type III modèle est **ToxIN**, identifié pour la première fois chez *Pectobacterium atrosepticum* (Ex-*Erwinia carotovora*), Gram-négatif phytopathogène. Chez un hôte hétérologue, *E. coli*, l'expression de ToxN a permis de mettre en évidence qu'elle participe à la fois au PSK et à l'infection abortive (Blower et al., 2011; Fineran et al., 2009). Depuis des homologues ont été retrouvés dans les génomes de *Ruminococcus torques*, *Bacillus thuringiensis*, *Lactococcus lactis* (nommé

AbiQ/AntiQ) (Blower et al., 2012; Samson et al., 2013; Short et al., 2013, 2018) et pour la famille **TenpIN**, chez *Photorhabdus luminescens* (Blower et al., 2012; Goeders et al., 2016). Comme ToxIN, TenpIN se retrouve majoritairement sur le chromosome mais il peut être également plasmidique. Le complexe **CptIN** n'a été identifié que chez *Coprococcus catus* et *Eubacterium rectale*, et n'interviendrait que dans le PSK (Blower et al., 2012).

En conclusion, les fonctions biologiques de ces systèmes restent imprécises, surtout au sein de leur hôte d'origine.

b) L'antitoxine est une protéine

b.1 Type II :

Parmi les six types, les systèmes TA de type II sont les plus représentés dans le règne procaryote. Une section leur est particulièrement dédiée ci-après. Brièvement, au niveau du mécanisme, **l'antitoxine** masque le site catalytique de la toxine par une interaction protéine-protéine, bloquant ainsi l'activité de la toxine. Le complexe toxine-antitoxine inhibe la transcription de l'opéron grâce à la présence de domaine de liaison à l'ADN sur l'antitoxine. Suite à un signal ou à un stress (carence nutritive, pH acide, microoxie, température, antibiotique, attaque par le système immunitaire de l'hôte...), l'antitoxine est dégradée par des protéases ATP-dépendantes et la toxine est alors libérée (**Figure 5**) (Hayes and Van Melderren, 2011; Kang et al., 2018; Lobato-Márquez et al., 2016; Shidore and Triplett, 2017; Wu et al., 2019).

Les toxines de type II sont classées en 8 superfamilles en fonction de leur activité. Elles sont majoritairement des RNases (ciblant ARNm, ARNr et ARNt), des acétyltransférases d'ARNt ou des inhibiteurs de topoisomérase et d'ADN gyrase. Ces activités conduisent à l'inhibition partielle ou globale de la traduction, de la réplication, ou encore à l'induction de la réponse SOS. Leurs activités permettent l'adaptation bactérienne à un nouvel environnement allant de la mise en dormance (préservation des ressources énergétiques, survie), à la persistance (survie en présence d'antibiotiques), la formation de biofilm (switch métabolique), la virulence, ou la mort cellulaire (maintenance plasmidique, stabilisation génomique) (Goeders and Van Melderren, 2014; Jurénas et al., 2017; Lobato-Márquez et al., 2016; Unterholzner et al., 2013).

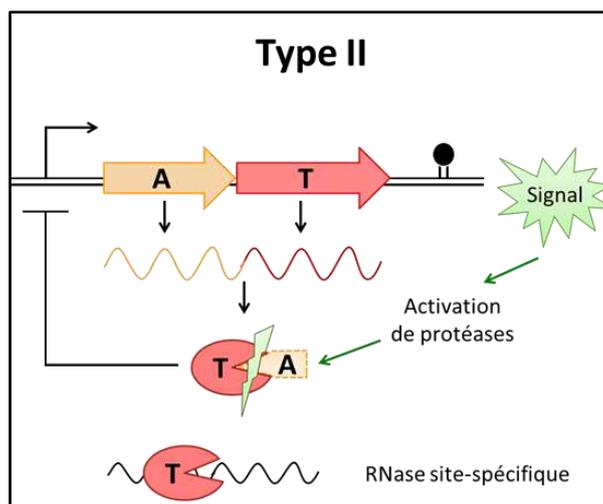


Figure 5 : Mécanisme d'action des systèmes TA de type II

L'antitoxine bloque la toxine par une interaction protéine-protéine. Ce complexe inhibe sa propre transcription. À la suite d'un signal menant à l'activation de protéases, l'antitoxine est dégradée et la toxine libérée. La toxine, majoritairement décrite comme RNase site-spécifique, va alors inhiber la traduction, de manière partielle ou globale, en dégradant ses cibles.

b.2 Type IV :

Dans les systèmes TA de type IV, l'**antitoxine** est une protéine antagoniste de la toxine (protéine), qui empêche cette dernière de se lier à sa cible en jouant le rôle de compétiteur (**Figure 6**). Dans certains cas, elle peut contenir un domaine de liaison à l'ADN permettant de réprimer la transcription de l'opéron TA. Seules deux familles de systèmes TA de type IV ont été identifiées à ce jour, CbeA/CbtA et AbiEi/AbiEii. Le mode d'action et la fonction de la toxine étant différents, les deux systèmes modèles sont décrits séparément ci-après.

Le système **CbeA/CbtA** est le premier TA de type IV à avoir été identifié, dans un prophage cryptique² chez *E. coli*. La toxine CbtA (appelée également YeeV-CptA) inhibe, directement et indépendamment, la polymérisation des protéines du cytosquelette MreB (actine-like) ou FtsZ (tubuline-like), et impacte donc, respectivement, la morphologie ou la division cellulaire. L'antitoxine CbeA (appelée également YeeU-CptB), quant à elle, favorise au contraire la polymérisation de MreB et FtsZ, et par conséquent l'expansion et la division cellulaire (**Figure 6**) (Heller et al., 2017; Masuda et al., 2012b, 2012a). Il s'agit du premier exemple identifié de double inhibiteur du cytosquelette. En terme de fonction biologique, il a été montré, dans une souche d'*E. coli* possédant trois systèmes TA de type IV dans trois prophages cryptiques, que la triple délétion des gènes des toxines diminuait la

² Un prophage correspond à la forme silencieuse d'un phage, intégré dans le génome de sa bactérie hôte. Un prophage cryptique est un prophage défectueux, ayant perdu la capacité à exciser son génome du chromosome ou bien à effectuer un cycle lytique.

résistance au stress oxydatif tandis que celle des gènes d'antitoxine anticipait la formation de biofilms (Wen et al., 2017).

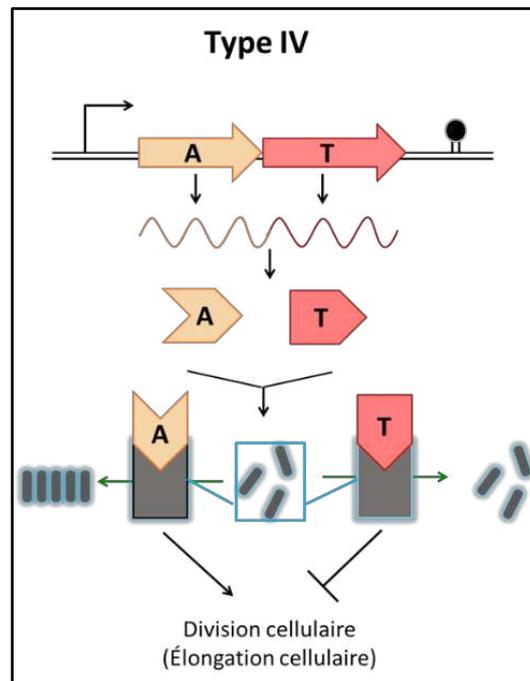


Figure 6 : Mécanisme d'action des systèmes TA de type IV

L'antitoxine est une protéine antagoniste de la toxine. Les toxines de type IV inhibent la division bactérienne en se fixant sur des protéines cibles (■) connues (MreB et FtsZ pour CbtA d'*E. coli*) ou encore inconnues (pour AbiEii de *L. lactis*). L'antitoxine a un effet antagoniste : elle annule l'effet toxique sans interagir avec la toxine. Dans le cas de CbeA, elle favorise la division et l'élongation cellulaire en promouvant la polymérisation des protéines du cytosquelette bactérien.

La famille **AbiE** (Bacterial abortive infection) est organisée en opéron bicistronique codant pour l'antitoxine AbiEi et pour la toxine AbiEii. La toxine AbiEii a été identifiée, chez *Lactococcus lactis* et *Streptococcus agalactiae*, à la suite d'une comparaison d'homologie avec la toxine ToxN (type III). Comme ToxN, AbiEii permet l'infection abortive en cas d'attaque par un phage. AbiEii est une nucléotidyltransférase (NTase) GTP-spécifique permettant le transfert nucléotidique à une cible encore inconnue et conduisant à l'inhibition de la croissance, sans impacter la morphologie (Figure 6). L'antitoxine AbiEi neutraliserait l'effet toxique de AbiEii par compétition à une cible commune non identifiée (et non par une interaction TA protéine-protéine) (Dy et al., 2014; Hampton et al., 2018).

En conclusion, les systèmes de type IV ont des toxines et antitoxines qui rentrent en compétition pour les mêmes cibles. Leurs toxines impactent le plus généralement la division bactérienne et parfois la morphologie de la cellule, et contribuent aux infections abortives.

b.3 Type V

La seule famille de systèmes TA de type V décrite est celle de la famille GhoST chez *E. coli*. La toxine de ce système, comme celles de nombreux systèmes TA de type I, cible la membrane (Wang et al., 2012).

L'antitoxine (GhoS) appartient à la famille des endoribonucléases site-spécifique de type CRISPR CAS2, qui dégrade l'ARNm de la toxine (GhoT) (Figure 7A) au niveau de régions riches en adénine et en uridine (Wang et al., 2012). L'activation du système est permise par la dégradation spécifique de l'ARNm de l'antitoxine GhoS, au niveau de site(s) GCU, absent chez la toxine GhoT, par la toxine MqsR, du système TA de type II MqsAR (Wang et al., 2013). La régulation de ce système est donc indirecte.

La toxine (GhoT) est une protéine hydrophobe membranaire créant un pore dans la membrane qui dissipe le potentiel membranaire et donc inhibe la synthèse d'ATP. Ce phénomène favorise la persistance et la formation de cellules fantômes³ chez *E. coli* (Figure 7B) (Lobato-Márquez et al., 2016; Wang et al., 2012). De plus, GhoT favorise la formation précoce de biofilm.

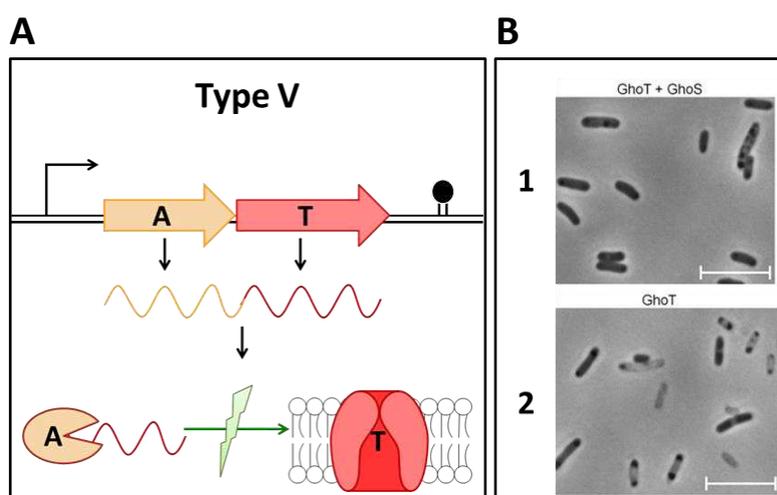


Figure 7 : Mécanisme d'action des systèmes TA de type V : le modèle GhoST

A : L'antitoxine est une RNase qui dégrade l'ARNm de la toxine. Lors d'un stress, l'antitoxine (GhoS) est dégradée et la toxine (GhoT) libérée. La toxine est une protéine qui crée un pore dans la membrane, ce qui interrompt le potentiel membranaire et la synthèse d'ATP.

B : Formation de cellules fantômes créées par la toxine GhoT en l'absence d'antitoxine (Wang et al., 2012). **1 :** La surexpression de la toxine et de l'antitoxine n'impacte pas la perméabilité membranaire. **2 :** La surexpression de la toxine entraîne l'apparition de cellules fantômes correspondant à une « transpiration/clarification » due à la lyse bactérienne.

³ Cellules présentant une « transpiration » due à des défauts d'intégrité membranaire, révélés par microscopie.

b.4 Type VI :

Dans le dernier type de systèmes TA décrits chez les procaryotes, l'antitoxine réduit la demi-vie de la toxine. Le seul membre de type VI décrit est le système SocAB chez *Caulobacter crescentus*.

L'**antitoxine** (SocA) est un adaptateur protéolytique qui conduit la toxine (SocB) à la protéase ClpXP, permettant ainsi sa dégradation constitutive (**Figure 8A**) et réduisant sa demi-vie de 20 min à 2 min (Aakre et al., 2013; Markovski and Wickner, 2013; Yang and Walsh, 2017).

La **toxine** (SocB), en l'absence de SocA, interrompt la réplication de l'ADN par liaison à une sous-unité de l'ADN polymérase III, appelée DnaN (ou pince β) (**Figure 8B**), dont le rôle est de verrouiller l'ADN polymérase sur la fourche de réplication. Cette interaction conduit à un arrêt du complexe ADN polymérase III : ADN au niveau des fourches de réplication. L'arrêt de la réplication sans inhibition de la croissance résulte en la formation de cellules filamenteuses qui n'accumulent pas d'ADN.

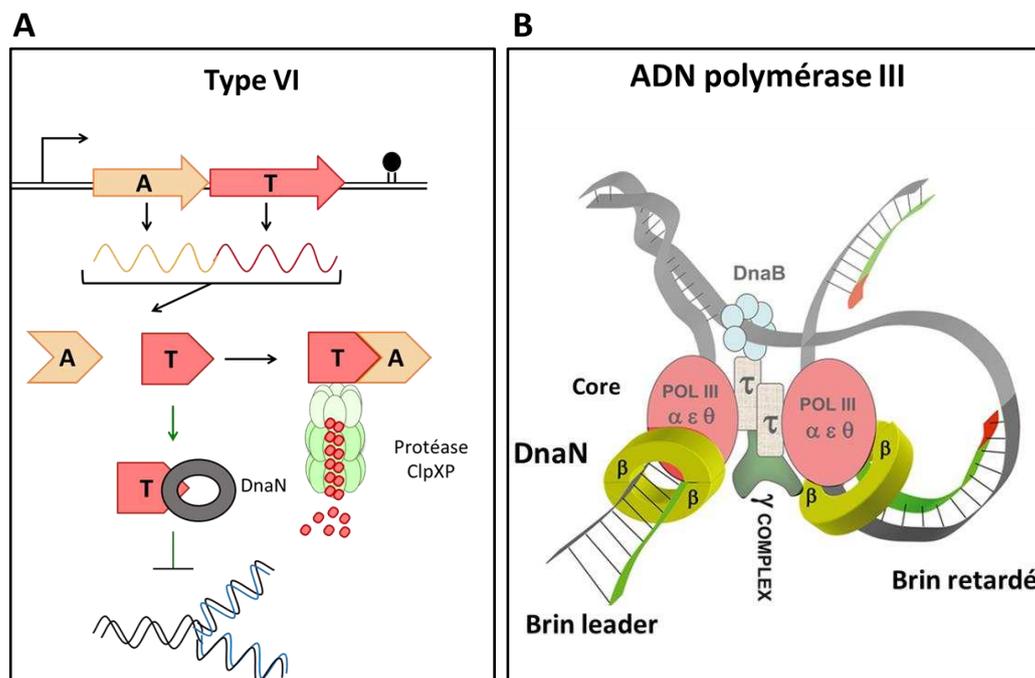


Figure 8 : Mécanisme d'action des systèmes TA de type VI - Cas de SocAB chez *C. crescentus*

A : L'antitoxine (SocA) est un adaptateur protéolytique de la protéase ClpXP. Elle transporte la toxine (SocB) jusqu'à ClpXP qui la dégrade de manière constitutive. Lorsque l'antitoxine est absente, la toxine se lie à DnaN, une sous-unité de l'ADN polymérase III nécessaire lors de la réplication. La division cellulaire ne peut donc plus avoir lieu.

B : Structure de l'ADN polymérase III adaptée de Fijalkowska et al., 2012. L'ADN polymérase III est constituée d'un « core » $\alpha\epsilon\theta$ contenant les sous-unités α (polymérase), ϵ (exonucléase d'activité « proofreading ») et θ (sous-unité stabilisatrice). DnaB est une hélicase associée à la primase DnaG (non montrée) permettant la synthèse du brin retardé lors de la réplication. DnaN (pince β) permet de verrouiller l'ADN polymérase sur l'ADN et augmente sa processivité. Les sous-unités τ permettent de dimériser l'holoenzyme. Cette polymérase permet de répliquer l'ADN et de le réparer.

Chez *C. crescentus*, ClpXP est essentielle contrairement à la majorité des espèces bactériennes étudiées. Une des raisons qui permettrait de justifier sa nécessité dans cet organisme serait son rôle dans la dégradation de la toxine SocB permise grâce à SocA. La présence du système TA SocAB limitée à cette seule espèce, s'expliquerait donc par son rôle dans l'adaptation de *C. crescentus* au milieu aquatique, milieu aux ressources nutritives limitées et soumis en permanence à des variations environnementales (Aakre et al., 2013; Markovski and Wickner, 2013; Yang and Walsh, 2017).

2) Distribution des systèmes TA chez les procaryotes

Les systèmes TA sont retrouvés à la fois chez les bactéries et chez les archées. Les systèmes TA ont été initialement identifiés sur des plasmides (système CcdAB) (Ogura and Hiraga, 1983), mais ils sont également abondants sur les chromosomes bactériens, quel que soit le type considéré.

Récemment, la distribution de systèmes TA de type I, II et III chez les procaryotes a été particulièrement analysée (Figure 9A) (Coray et al., 2017).

La distribution des familles de systèmes TA de type I est très étroite. A l'exception de la famille SymER retrouvée dans 5 phyla et chez les virus, toutes les autres familles sont exclusivement retrouvées dans un seul phylum : soit chez les protéobactéries (famille Entérobactérie) soit chez les firmicutes (famille *Bacillaceae*). La plupart des systèmes sont chromosomiques.

La majorité des familles de systèmes TA de type II est quant à elle retrouvée dans plusieurs phyla. Quelques familles de toxines sont présentes dans l'ensemble des 16 phyla analysés (Doc, MazF, RelE, VapC) alors que les familles CcdB et YafO ne sont retrouvées que dans le phylum des protéobactéries. Ces systèmes de type II sont présents aussi bien sur le chromosome que sur un plasmide (Coray et al., 2017). Ces résultats sont en accord avec ceux de l'étude, menée en 2005, sur la distribution de 7 familles de systèmes TA de type II (VapBC, RelBE, MazEF, ParDE, HigBA, Phd/Doc et CcdAB), codées sur des plasmides, dans les génomes de 110 bactéries et de 16 archées (Pandey and Gerdes, 2005). En effet, les résultats montrent que 1) seuls 31 organismes sur 110 n'ont aucun de ces systèmes (25%), 2) toutes les espèces d'archées étudiées ont au moins un système TA. De plus, la distribution bactérienne des TA ne semble pas être dépendante du Gram, ni leur présence et abondance être liées à la taille du génome mais plutôt à leur mode de vie. En effet, les systèmes TA sont présents de manière ubiquitaire et souvent en grand nombre chez les bactéries ayant un mode de vie planctonique et occupant des niches écologiques variées et/ou soumises à des stress abiotiques, tandis que les espèces n'ayant

aucun système TA, sont majoritairement des bactéries ayant une interaction obligatoire, symbiotique ou pathogène, avec leur hôte (Pandey and Gerdes, 2005).

En comparaison avec les systèmes de type I, les systèmes de type II sont présents dans une plus grande diversité de familles taxonomiques (Coray et al., 2017).

Les 3 familles de systèmes de type III identifiées à ce jour, sont distribuées à la fois chez les Gram-positive (Firmicutes) et chez les Gram-négative (Protéobactéries, Bacteroidetes, Spirochaetes) (Figure 9AB) (Coray et al., 2017). La famille AbiE du système TA de type IV est retrouvée dans 430 génomes séquencés de la majorité des lignées d'archées et bactéries (Figure 9C). De plus, la toxine AbiEii est quant à elle également présente dans des génomes de champignons (ascomycètes) (Dy et al., 2014; Makarova et al., 2013). Concernant les systèmes de type V et VI, ils ne sont décrits que chez *E. coli* et *C. crescentus* respectivement.

II. Les systèmes TA de type II

Nous avons vu précédemment que les systèmes TA de type II sont prévalents dans le règne procaryote par rapport aux autres types. Leur prédominance semble liée au fait que ces systèmes TA confèrent, aux bactéries présentant plusieurs modes de vie (libre ou en interaction) ou évoluant dans des environnements changeants, une meilleure adaptabilité. Ainsi, *Mycobacterium tuberculosis*, bactérie adaptée à la survie dans différents microenvironnements (libre, macrophages, cellules pulmonaires), possède 79 systèmes TA de type II, alors que *Mycobacterium smegmatis*, saprophyte non-pathogène, n'en possède que 4 (Gupta et al., 2017; Sala et al., 2014).

1) Classification des toxines de type II

À ce jour, huit super-familles de toxines de type II ont été définies suivant leurs homologues de séquence en acides aminés et leur structure tertiaire: ParE/RelE, CcdB/MazF, PIN/VapC, Fic/Doc, HipA, YafO, Zeta et AtaT/TacT (Jurénas et al., 2017) (Tableau 1). A cette classification, s'ajoute trois systèmes récemment identifiés et apparentés à aucune des 8 super-familles : PhoH2 où la toxine possède deux domaines, un domaine PIN (RNase) couplé à une activité hélicase inédite chez les toxines de type II (Andrews and Arcus, 2020), ParT où la toxine possède une activité mono-ADP-ribosyltransférase (mART) sur l'enzyme phosphoribosyl pyrophosphate synthetase (Prs), qui est essentielle à la

Super-famille	Famille	Signification	Membres	Activité de la toxine	Cibles
CcdB/MazF	CcdB	Controller of Cell Division or Death		Inhibiteur de topoisomérase	DNA gyrase
	MazF/Kid		ChpA, YdcE, NdoA, YjhX/TopA?	RNase ribosome-indépendante	ARNt/r/m
ParE/RelE	ParE			Inhibiteur de topoisomérase	DNA gyrase
	RelE		HigB, YafQ, YoeB/Txe, MqsR, YgjN	RNase ribosome-dépendante (sauf MqsR)	ARNm
Fic	Fic	Filamentation induced by cAMP	VbhT	Adénylylation de topoisomérase	DNA gyrase, topoisomérase IV
	Doc	Death on curing protein		Kinase du facteur d'élongation EF-Tu	EF-Tu
PIN	VapC/PIN	Virulence Associated Protein		PIN= RNase site-spécifique, ribosome-indépendante	ARNt/r/m
HipA	HipA	high persistence		Kinase de amino-acyl tRNA synthétase	GltX, TrpS
YafO	YafO			RNase ribosome-dépendante	ARNm
Zeta	Zeta		PezT	Kinase de précurseurs de peptidoglycanes	UNAG
GNAT	AtaT	Aminoacyl tRNA Acetyltransferase		Acetyltransférase de l'ARNt ^{fMet} , Ac-CoA dépendant	ARNt ^{fMet}
	TacT	tRNA-acetylating toxin		Acetyltransférase d'ARNt, Ac-CoA dépendant	ARNt
	PhoH2			RNase et hélicase d'ARN	ARN
	MbcT	Mycobacterial cidal toxin		Phosphorylase du NAD+	NAD+
	ParT	Prs ADP-ribosylating toxin		Inhibe synthèse précurseur nucléotide/histidine/ tryptophane et NAD	Prs phosphoribosyl pyrophosphate synthetase

Tableau 1 : Classification des toxines de type II adaptée de Jurénas et al., 2017

La classification des systèmes TA de type II repose sur 8 super-familles correspondant à une ou plusieurs familles. Une liste non exhaustive des membres retrouvés dans la littérature est associée à chaque famille. Les activités des toxines impactant la réplication sont représentées en vert, celles impactant la traduction en jaune, celles impactant la synthèse de la paroi en rose et celles impactant des processus plus généraux en gris. PhoH2, MbcT et ParT sont des toxines nouvellement identifiées n'appartenant à aucune des 8 super-familles présentées.

biosynthèse nucléotidique (Piscotta et al., 2019), et enfin MbcT où la toxine possède une activité phosphorylase sur le NAD⁺ (Freire et al., 2019).

L'identification bioinformatique des systèmes TA de type II dans les génomes bactériens repose sur des caractéristiques génétiques et protéiques (homologie de séquences et de structures). La base de données qui fait référence est la TADB2 (Xie et al., 2018) (<https://bioinfo-mml.sjtu.edu.cn/TADB2/index.php>).

Au niveau des caractéristiques génétiques, l'organisation en opéron et la taille des gènes sont les deux principaux critères. La taille des opérons TA est inférieure à 1 kb, et l'antitoxine est plus petite que la toxine (sauf pour MqsA et HicB (Chan et al., 2016)). Les opérons des systèmes TA de type II peuvent avoir trois types d'organisation. En majorité, le gène de l'antitoxine est situé en amont de celui de la toxine. Toutefois dans quelques familles, le gène de l'antitoxine est en aval de celui de la toxine. Enfin, il existe également des opérons composés d'une entité supplémentaire codant un chaperon intervenant dans la régulation de l'opéron ou dans la neutralisation de la toxine. Ces systèmes TA tripartites sont appelés TAC (toxine-antitoxine-chaperon) (Bordes et al., 2016).

Au niveau des caractéristiques protéiques, des domaines conservés sont décrits chez les antitoxines et les toxines. Un domaine de liaison à l'ADN est retrouvé chez la majorité des antitoxines tandis que les toxines sont associées à une activité enzymatique (RNase, Kinase...). Les toxines de type II sont majoritairement des inhibiteurs de la traduction du fait de leur activité RNase, pouvant cibler n'importe quel type d'ARN (ARNr, ARNm et ARNt), ou de leur activité acétyltransférase d'ARNt, ou encore leur activité de kinase (**Tableau 1, jaune**). Certaines toxines de type II sont toutefois des inhibiteurs de la réplication, en interférant avec l'ADN gyrase ou des topoisomérases (**Tableau 1, vert**). Enfin, une famille de toxine de type II inhibe la synthèse de la paroi via une activité kinase sur les précurseurs de peptidoglycanes (**Tableau 1, rose**) (Jurénas et al., 2017; Leplae et al., 2011). Les toxines de type II diffèrent donc dans leur structure et leur activité enzymatique.

Dans une même super-famille, les fonctions moléculaires ciblées peuvent être très variées. En effet, les super-familles ParE/RelE et CcdB/MazF possèdent des toxines inhibitrices de la réplication (ParE et CcdB) et d'autres de la traduction (RelE, MazF). De plus, au sein d'une même famille, des exceptions mécanistiques peuvent être retrouvées. Par exemple dans la famille RelE, dont les membres sont des RNases ribosome-dépendantes, MqsR est une RNase ribosome-indépendante.

Ainsi, pour la suite de cette étude, nous regrouperons l'analyse des systèmes TA de type II suivant leur activité et non leur famille.

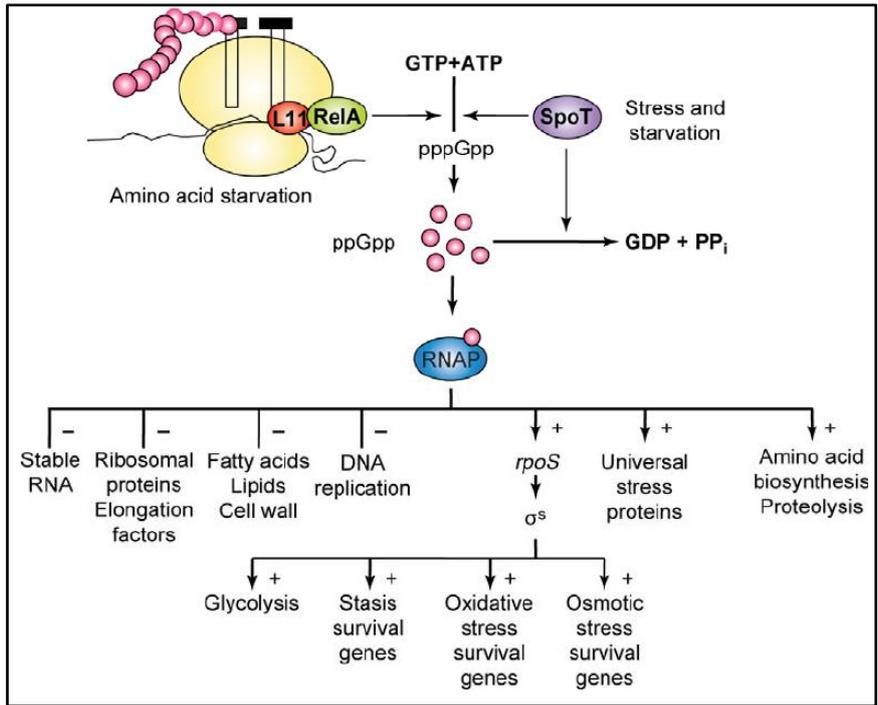
2) Voies de signalisation associées aux systèmes TA de type II

Lors de stress perçu(s) par la cellule (carence nutritionnelle, stress antibiotiques ou abiotiques, ...), la bactérie doit s'adapter afin de limiter son métabolisme jusqu'au retour de conditions favorables à la croissance lors d'un changement d'environnement. L'activation de systèmes TA, au sein d'un réseau complexe de multi-interactions, va permettre à la bactérie d'arrêter des processus vitaux de la cellule (réplication, traduction et synthèse de la paroi) et donc permettre une reprogrammation globale de la cellule nécessaire à un switch métabolique, accompagné ou non d'un arrêt de la croissance. D'autre part, l'activation des systèmes TA, par des régulateurs (à définir), peut également permettre l'activation de voies de signalisation de réponse aux stress. Parmi ces voies de signalisation, la réponse stringente, réponse au stress générale médiée par la production de l'alarmone (p)ppGpp, et la réponse SOS (LexA, RecA) activée lors de lésion de l'ADN, sont les plus documentées.

a) La réponse stringente et l'alarmone (p)ppGpp

La réponse stringente, principalement induite lors d'une carence nutritionnelle ou d'un stress environnemental, permet une adaptation métabolique de la bactérie grâce à la production d'une alarmone, la (p)ppGpp (guanosine penta- ou tétra-phosphate). Chez *E. coli*, la (p)ppGpp est produite, par les protéines SpoT et RelA, deux régulateurs majeurs de la réponse stringente. En se fixant à l'ARN polymérase, l'alarmone change l'affinité de cette dernière pour des promoteurs. Ainsi, l'alarmone permet une large reprogrammation transcriptionnelle, qui comprend l'activation de gènes de la synthèse d'acides aminés et de réponse au stress, et l'inhibition de gènes de la réplication de l'ADN, de la synthèse de protéines ribosomales ou de synthèse de la paroi (**Figure 10A**) (Dalebroux and Swanson, 2012; Magnusson et al., 2005). En parallèle, en inhibant les exopolyphosphatases, l'alarmone (p)ppGpp entraîne l'accumulation de polyphosphates, ce qui favorise la dégradation des protéines ribosomales par les protéases ClpXP ou Lon. Cette protéolyse permet ainsi de recycler des acides aminés de protéines non essentielles et de préserver de l'énergie nécessaire à la survie bactérienne (**Figure 10B**) (Dalebroux and Swanson, 2012). D'une manière générale, la réponse stringente favorise donc un arrêt de la croissance bactérienne et la formation de cellules persistantes (Germain et al., 2013; Kaspy et al., 2013).

A



B

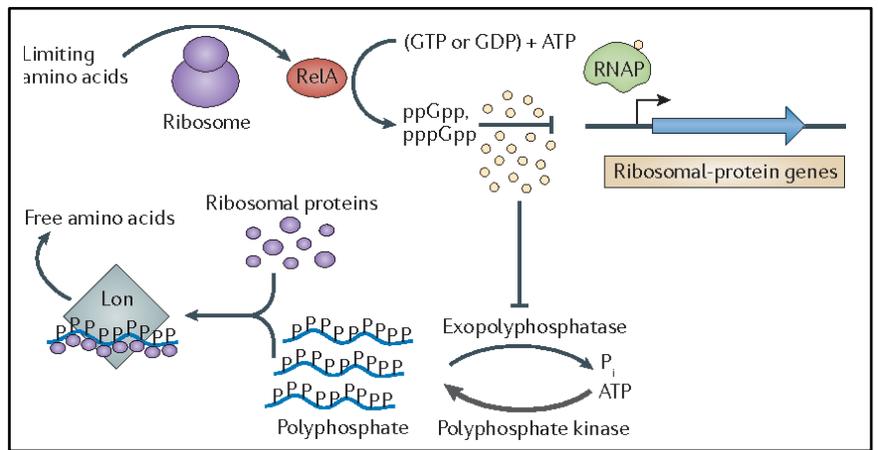


Figure 10 : La réponse stringente bactérienne chez *E. coli*

A : La réponse stringente : reprogrammation transcriptionnelle, issu de Magnusson et al., 2005. Lors d'une carence nutritionnelle ou un stress, l'alarmone (p)ppGpp est synthétisée, à partir d'ATP et de GTP, par SpoT et/ou RelA. La liaison de l'alarmone à l'ARN polymérase (RNAP) initie une reprogrammation transcriptionnelle : inhibition de gènes liés à la croissance (ex : gènes codant des protéines ribosomales) et activation de gènes de résistance aux stress et de survie. L'hydrolyse de l'alarmone est catalysée par SpoT. NB : L11 est une protéine ribosomale.

B : La réponse stringente : recyclage des protéines ribosomales, issu de Dalebroux and Swanson, 2012. Lors d'une carence en acides aminés, l'alarmone, en inhibant la synthèse des exopolyphosphatases, favorise la production de polyphosphates qui activent la dégradation des protéines ribosomales par la protéase Lon, permettent ainsi la libération des acides aminés.

Les systèmes TA, tout comme la réponse stringente, permettent une adaptation de la bactérie aux stress environnementaux et à la carence nutritionnelle. D'autre part, leur activation implique les protéases Lon et ClpXP. Un lien entre TA et réponse stringente a donc tout naturellement été proposé (**Figure 10B**).

Toutefois, l'implication des TA dans cette réponse stringente est aujourd'hui encore discuté. En effet, la communauté scientifique ne parvient pas à s'accorder ni sur le rôle des **polyphosphates** dans l'activation des protéases responsables de la **dégradation de l'antitoxine**, ni sur le rôle de la réponse stringente avec la persistance **médiée par les systèmes TA** (Van Melderen and Wood, 2017; Ramisetty et al., 2016). Les mécanismes liant les TA et la réponse stringente ne semblent en effet pas universels. Par exemple, alors que l'activation par l'alarmone des systèmes MazEF (Aizenman et al., 1996; Christensen et al., 2003) et RelBE (Christensen et al., 2001) est démontrée, celle-ci n'existe pas pour les systèmes TA YefM/YoeB (Ramisetty et al., 2016) et MqsRA (Fraikin et al., 2019).

b) La réponse SOS -lésion/réparation de l'ADN

La réponse SOS est une voie de signalisation induite lorsque l'ADN est endommagé ou la réplication bloquée. Elle est également activée lors d'un stress environnemental, tel qu'un stress antibiotique, une carence en acides aminés ou un changement de pH intracellulaire (Simmons et al., 2008). Elle implique deux régulateurs majeurs : LexA et RecA. LexA est un répresseur transcriptionnel qui, en se liant aux opérateurs de gènes possédant une box SOS, empêche l'accès à l'ARN polymérase (RNAP). RecA est une protéine impliquée dans la recombinaison homologue et dans la réparation de l'ADN. Elle se lie à l'ADN simple brin généré à partir de l'ADN endommagé et forme ainsi un filament nucléoprotéique permettant la réparation de l'ADN. Lorsque le complexe RecA : ADNsb interagit avec LexA, l'autoclivage de LexA permet l'inactivation du répresseur et donc la transcription des gènes réprimés par LexA (**Figure 11**). Ainsi, par exemple, lorsque la réponse SOS est induite, l'inactivation de LexA par RecA permet la dé-répression du gène SulA qui code pour un inhibiteur de la division cellulaire. La croissance bactérienne est alors inhibée. Une fois la bactérie adaptée, LexA réprimera de nouveau SulA pour permettre un retour de la division cellulaire (**Figure 11**).

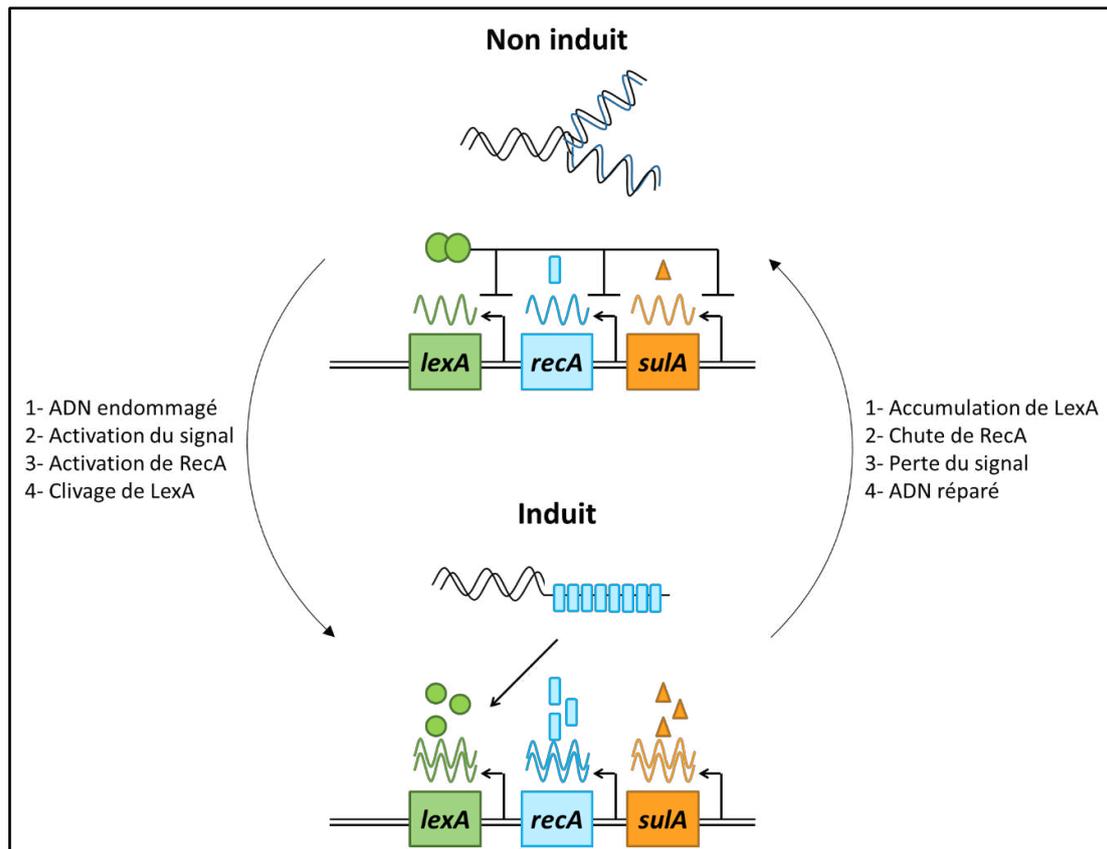


Figure 11 : La réponse SOS

Induction de la réponse SOS, adaptée de Simmons et al., 2008. En condition non induite (transcription réprimée par LexA), lors de la réplication, la quantité d'ADN sb présent au niveau des fourches n'est pas suffisante pour permettre la liaison de RecA. La transcription des gènes SOS *lexA*, *recA* et *sulA* et d'autres gènes est réprimée. Lorsque l'ADN est endommagé, RecA se lie à l'ADNsb créant un filament nucléoprotéique. Ce filament agit comme co-protéase pour le clivage de LexA et permet ainsi la levée de la répression des gènes SOS, tel que *sulA*, médiée par LexA. Une fois l'ADN réparé, la cellule retourne à une condition non induite et la réplication peut avoir lieu.

Certains systèmes TA de type II possèdent une box SOS permettant d'envisager une régulation de leur transcription par LexA. A ce jour, le seul exemple connu de systèmes TA de type II régulés par LexA correspond à YafNO présent chez *E. coli*, où la toxine YafO, par son activité RNase, participe à l'arrêt de croissance (Singletary et al., 2009). D'autre part, les toxines CcdB, ParE et FicT, bien que non régulées par LexA, participent à la réponse SOS en bloquant les fourches de réplication, reconnues par RecA, en interagissant avec des topoisomérases de type II bactériennes (Harms et al., 2016; Smith and Maxwell, 2006; Yuan et al., 2011). Le lien entre la réponse SOS et les systèmes TA est représenté sur la **Figure 12**.

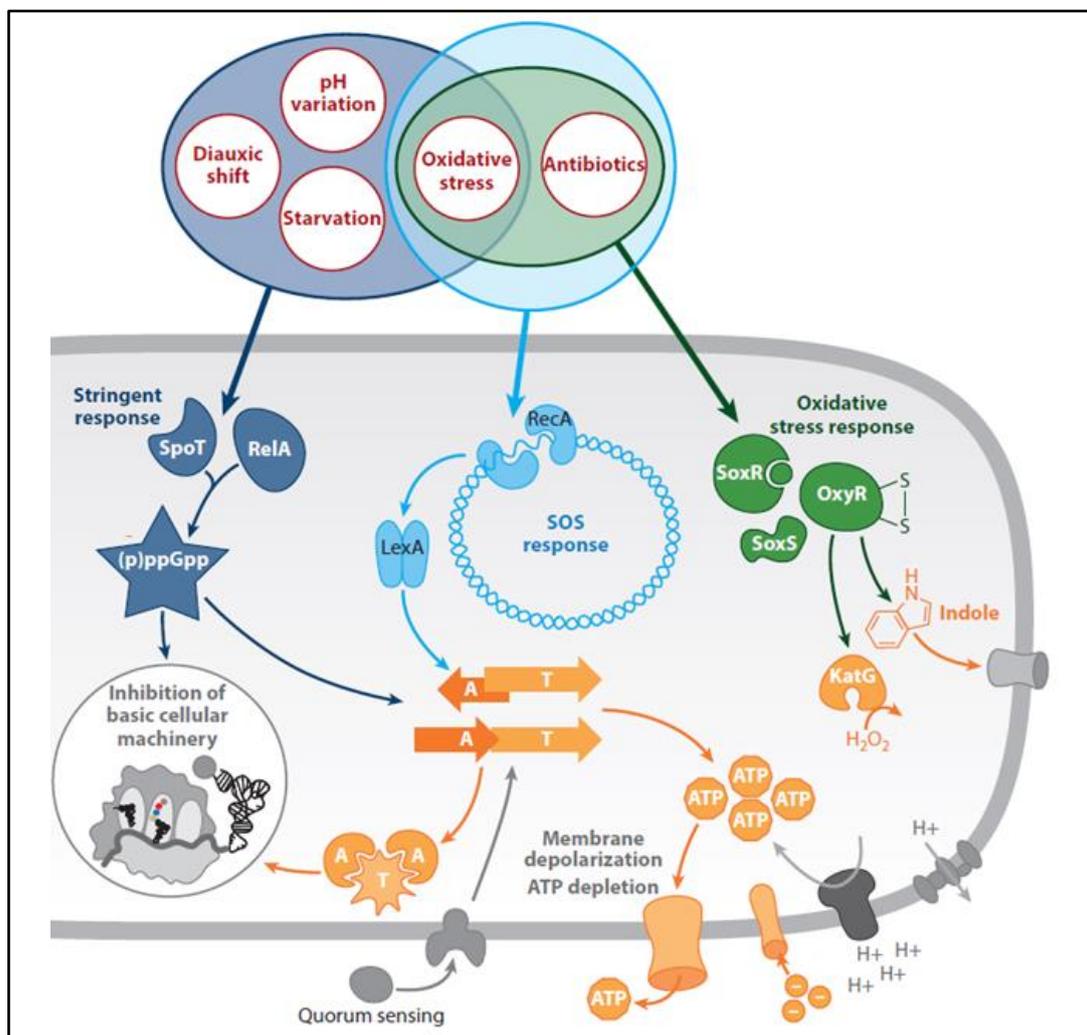


Figure 12 : Lien entre signaux activateurs des systèmes TA, réponse stringente et réponse SOS issu de Gollan et al., 2019

Les signaux externes activateurs de la persistance sont entourés par les cercles rouges. Les voies de signalisation de la réponse au stress sont représentées en bleu ou en vert. Les effecteurs identifiés sont en orange et les composants cellulaires affectés par les effecteurs en gris. Abréviations : A, antitoxine, T, toxine.

L'adaptation bactérienne aux stress fait intervenir différentes voies de signalisation (réponses stringente, SOS ...). L'adaptation est caractérisée par un arrêt de la croissance transitoire dans l'attente d'un retour à des conditions favorables. Les systèmes TA peuvent participer à ces voies de signalisation, en inhibant la traduction et/ou la réplication de l'ADN de sorte à préserver et recycler de l'énergie pour lutter face au stress. Par conséquent, leur régulation est très importante pour favoriser la dormance ou au contraire la croissance, c'est-à-dire réguler la quantité de toxines par rapport à celle d'antitoxines pour que ce ratio $[T]/[A]$ soit en faveur d'une activation du module (ON) ou en faveur de sa répression/neutralisation (OFF).

C'est pourquoi, nous nous intéresserons dans un premier temps au contexte « sans stress », c'est-à-dire quand la balance est dite OFF. Ceci comprend l'autorégulation négative de l'opéron par le complexe TA et la neutralisation de la toxine par son antitoxine. Ensuite, nous regarderons les paramètres d'activation de la balance ON, c'est-à-dire les signaux activateurs des TA et la libération de la toxine par protéolyse de l'antitoxine. Une fois ces balances présentées, nous approfondirons les activités biochimiques des toxines de type II, en insistant plus particulièrement sur les activités RNases, puisque la famille VapBC, objet de cette thèse, appartient à cette catégorie.

3) Inactivation des systèmes TA : modèle « OFF »

Nous avons vu précédemment que les Toxines/Antitoxines des systèmes de type II interagissent entre elles via une interaction protéine-protéine. D'une part, cette interaction permet la neutralisation de la toxine par l'antitoxine. D'autre part, l'interaction de l'antitoxine, complexée ou non à la toxine, avec l'opéron, conduit à un rétrocontrôle négatif de la transcription. Ce rétrocontrôle conduit à l'inactivation de la toxine. Les différents mécanismes de régulation transcriptionnelle ainsi que l'inactivation protéique de la toxine sont décrits ci-dessous. Chaque partie est résumée au sein d'un tableau bilan référencé.

a) Autorégulation négative des opérons TA

a.1 Classification des antitoxines appartenant aux systèmes TA de type II

La classe des antitoxines de type II est variable et non liée à la famille de système TA à laquelle elle appartient. En effet, au sein d'une même famille, différentes classes d'antitoxines peuvent être

retrouvées. Les antitoxines sont classées en fonction de leur domaine de liaison à l'ADN qui, en général, correspond à l'extrémité N-terminale de la protéine. Sont identifiées ainsi 3 grandes classes d'antitoxine : les antitoxines à motif RHH (ribbon-helix-helix), les antitoxines à motif HTH (helix-turn-helix) et les antitoxines à motif AbrB (Figure 13A) (Chan et al., 2016).

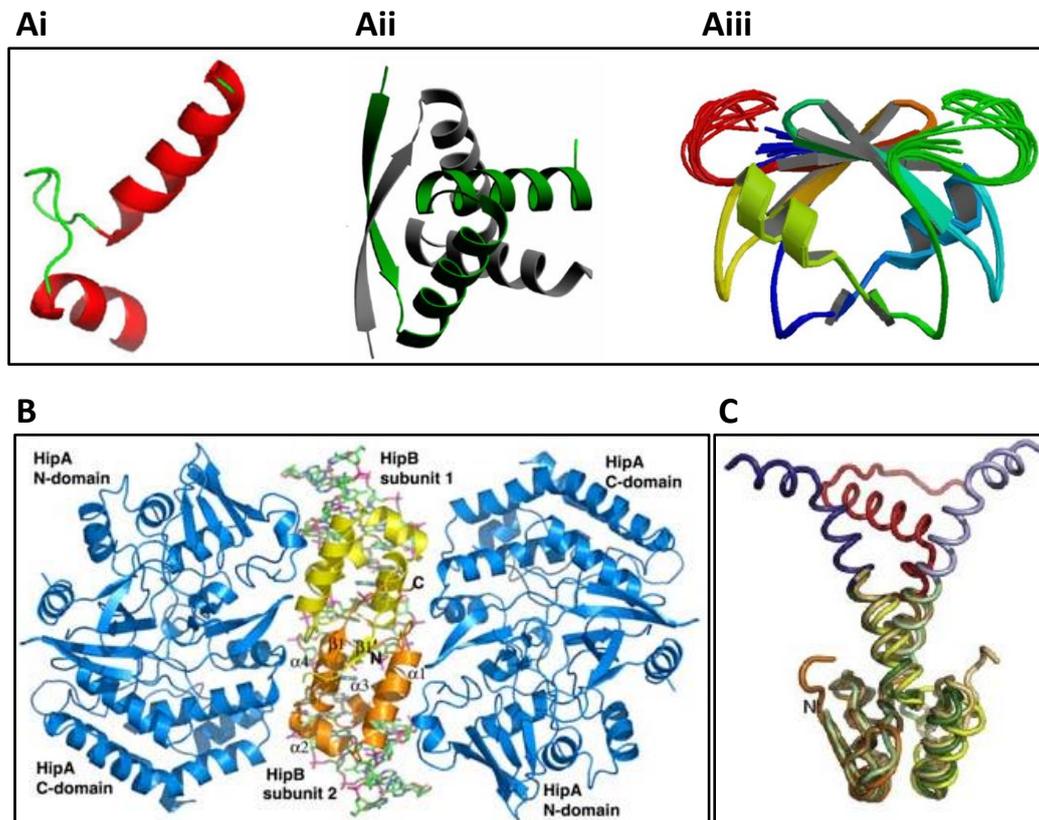


Figure 13 : Structure des domaines de liaison à l'ADN des antitoxines de type II

A : Domaines consensus de liaison à l'ADN des antitoxines de systèmes TA de type II, issu de Chan et al., 2016.
 Ai : domaine HTH (helix-turn-helix) composés de deux hélices α (rouge) connectée par une boucle (vert), Aii : domaines RHH (ribbon-helix-helix) associés en dimère générés par deux brins β (flèches) et Aiii : domaines AbrB associés en dimère qui est formé par 3 et 4 feuilletts β . Les boucles maintenant la partie externe de la molécule sont représentées en vert clair et en rouge.

B : Structure en sandwich du complexe HipBA issue de Schumacher et al., 2009. L'antitoxine HipB (jaune et orange), complexée à la toxine HipA (bleu), interagit avec l'ADN (squelette vert et rose) tout le long de sa structure.

C : Antitoxines Phd et YefM issues de Arbing et al., 2010. Superposition des antitoxines Phd et YefM où le domaine de liaison à l'ADN est représenté en vert (Phd) et en jaune (YefM), et le domaine de neutralisation de la toxine en bleu (Doc) et en rouge (YefM).

Les antitoxines à motif HTH :

Le motif HTH (helix-turn-helix) est composé d'environ 20 acides aminés organisés en deux hélices α séparées par un coude, généralement médié par un résidu glycine (Figure 13Ai). Une des hélices participe à la reconnaissance et à la liaison de l'antitoxine à l'opérateur de l'opéron par des interactions hydrogènes et électrostatiques au niveau du sillon majeur de l'ADN. La seconde hélice, ainsi parfois qu'une troisième, permet de stabiliser la structure. Ce motif, fréquemment retrouvé chez des répresseurs transcriptionnels procaryotes et eucaryotes, a été identifié en région **N-terminale** des antitoxines cristallisées PezA et HigA de *Proteus vulgaris*, et en région **C-terminale** des antitoxines HicB, HigA de *Shigella flexneri*, *Vibrio cholerae* et d'*E. coli* et de l'antitoxine MqsA chez *E. coli*. De plus, ce motif HTH a été prédit chez de nombreuses autres antitoxines telles que les antitoxines VapB (Bendtsen and Brodersen, 2017). A noter enfin que, l'antitoxine HipB du système HipBA, chez *E. coli*, présente une structure HTH originale. En effet, dans ce système, un dimère de l'antitoxine, placé en « sandwich » entre deux monomères de toxines, interagit avec l'ADN tout le long de la structure de l'antitoxine (Figure 13B).

Les antitoxines à motif RHH :

Le motif RHH (ribbon-helix-helix) est composé d'un feuillet β associé à deux hélices α . Les antitoxines de type RHH s'associent en dimère formant ainsi un ruban généré par les deux feuillets β en orientation antiparallèle (Figure 13Aii). Les feuillets β permettent, en plus de la dimérisation des antitoxines, la reconnaissance de l'ADN cible. Les monomères, instables, ne semblent pas exister. Ce motif, majoritairement procaryote, est prépondérant dans les systèmes TA de type II. Hormis pour l'antitoxine HicB du système HicAB, ce motif est exclusivement situé en **N-terminale** des antitoxines.

Les antitoxines à motif AbrB:

Les antitoxines à motif **AbrB** ont une structure très similaire au régulateur transcriptionnel ambiactif AbrB de *B. subtilis* (Strauch et al., 1989). Chaque monomère d'antitoxine présente une structure en épingle à cheveux constituée de deux feuillets β , qui après dimérisation, forme un « sandwich β » présenté précédemment (Figure 13Aiii). Les motifs d'ADN reconnus sont des palindromes parfaits ou imparfaits situés au niveau des opérateurs du promoteur de l'opéron. Ce type de structure, uniquement rencontrée à l'extrémité **N-terminale** des antitoxines, est uniquement présente dans les antitoxines de type MazE et VapB.

Autres antitoxines :

Certaines antitoxines ne possèdent aucun des trois motifs consensus présentés précédemment. Les antitoxines de type Phd/YefM sont homologues entre elles au niveau de l'extrémité N-terminale

qui correspond à un faisceau hélicoïdal composé de 6 hélices α , partageant des similarités de structure avec AbrB (**Figure 13C**). Ce motif (Phd/YefM-like) est retrouvé chez les antitoxines Phd (système Phd/Doc), YefM (système YefM/YoeB), certaines FicA (système FicAT) et VapB (système VapBC). Leur domaine de liaison à l'ADN situé en **N-terminale** reconnaît des régions palindromiques. Les antitoxines FicA quant à elles ne partagent pas de motif de liaison à l'ADN. Il est proposé que la toxine FicT pourrait changer la topologie de l'ADN et réguler ainsi directement ou non la transcription de l'opéron (**Harms et al., 2016**). Enfin, chez certains systèmes TA de type II appelés TAC, ayant une organisation tripartite Toxine-Antitoxine-Chaperon, l'antitoxine a des motifs classiques de liaison à l'ADN et participe à la régulation transcriptionnelle de l'opéron (**Fivian-Hughes and Davis, 2010**). Le chaperon ne possède aucun motif de liaison à l'ADN mais le complexe chaperon/antitoxine lie l'ADN de manière spécifique via l'antitoxine (**Guillet et al., 2019**).

a.2 Mécanismes de régulation transcriptionnelle des systèmes TA

Dans la majorité des cas, l'antitoxine seule n'a qu'une faible affinité pour l'ADN. En effet, la toxine va jouer le rôle de corépresseur en rendant l'interaction Antitoxine : ADN plus stable permettant ainsi une répression optimale de la transcription de l'opéron. De manière générale, les complexes A:T formés avec l'ADN sont des hétérotétramères ou des hétérohexamères composés de deux monomères de toxines complexés à un dimère ou un tétramère d'antitoxines. Toutefois, pour les systèmes VapBC et CcdAB, le complexe A:T est un hétérooctamère composé d'un tétramère de toxines et d'un tétramères d'antitoxines (**Tableau 2**).

La stœchiométrie Antitoxine:Toxine (A:T) est cruciale pour la régulation de l'expression de l'opéron. Quand $[T] < [A]$, la toxine est un co-répresseur, en augmentant la stabilité du complexe T:A:ADN, ce qui permet une répression totale de la transcription. Quand $[T] \geq [A]$, la toxine est alors un dé-répresseur qui va déstabiliser le complexe A:ADN. Ce phénomène est appelé **coopérativité conditionnelle**. A noter que ce mécanisme n'est toutefois jamais rencontré pour les antitoxines de classe HTH (**Tableau 2**). De plus, la dé-répression observée *in vitro*, à des concentrations non physiologiques, n'a pu pour le moment être confirmée *in vivo* (**Bendtsen and Brodersen, 2017**). Par ailleurs, ce mécanisme n'est pas universel comme par exemple HicAB chez *E. coli*, où la toxine HicA n'agit pas en tant que corépresseur (**Turnbull and Gerdes, 2017**). De manière générale, le gène de l'antitoxine est situé en amont de celui de la toxine afin de favoriser un ratio $[A]/[T] > 1$. Toutefois, une étude récente révèle d'autres niveaux possibles de régulation de la production des deux protéines telles que la présence de sites d'initiation de la transcription et/ou de sites d'accrochage des ribosomes

multiples, favorisant la transcription d'ARNs possédant un RBS faible pour la toxine et fort pour l'antitoxine, d'un ARN tronqué dans la transcription de la toxine ou encore d'un ARN dépourvu de toxine (Deter et al., 2017) (**Figure 14**).

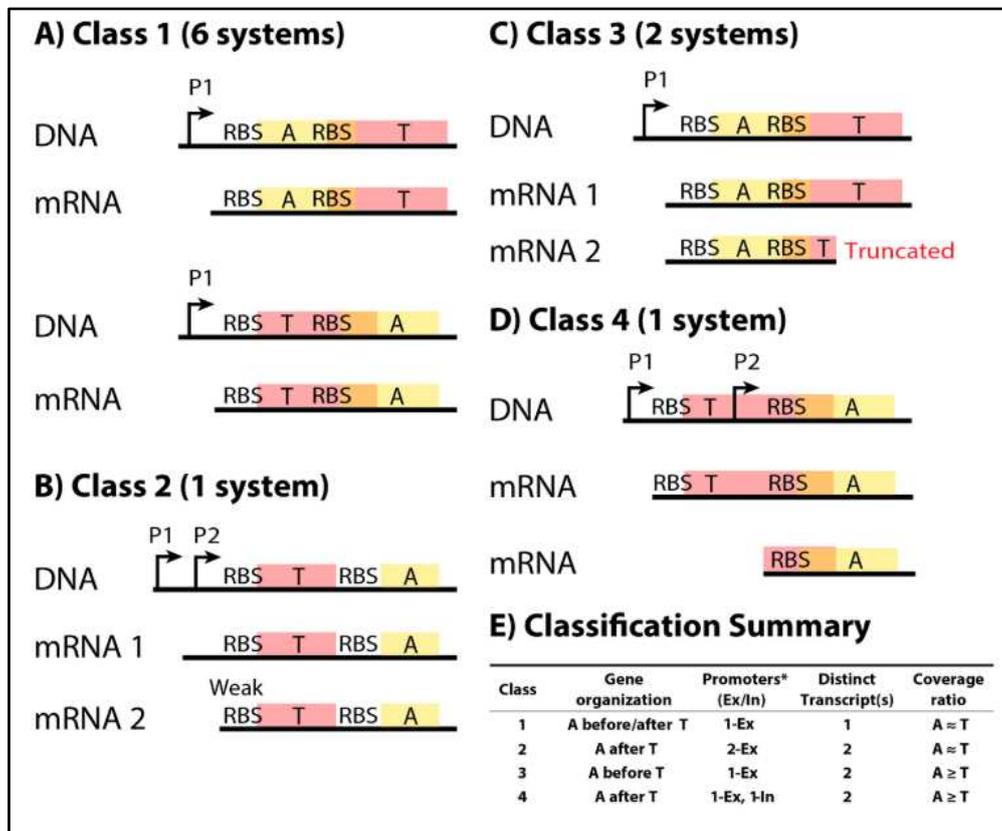


Figure 14 : Modes de régulation transcriptionnelle et traductionnelle des systèmes TA de type II, issus de Deter et al., 2017

Les systèmes TA (toxine–antitoxine) ont été classés en quatre classes différentes en fonction de la séquence d'ADN et des produits d'ARNm mesurés. (A-D) Diagrammes représentatifs de l'organisation de l'opéron et des produits d'ARNm de chaque classe (non à l'échelle).

A : Systèmes TA de classe 1 (FicAT, MazEF, MqsAR, PrIF-YhaV, RelBE, YefM-YoeB). Les systèmes de cette classe, la plus abondante dans cette étude, ont une transcription unique pour l'opéron et repose sur la régulation traductionnelle pour assurer une production plus élevée d'antitoxines par rapport à la production de toxines;

B : La classe 2 est caractérisée par un deuxième promoteur qui produit un transcrit légèrement plus court, dont il est prédit pour avoir un taux de traduction de toxine inférieur à celui issu de la transcription du premier promoteur. Le seul exemple disponible (HicAB) a des régions codantes qui ne se chevauchent pas avec la toxine en amont de l'antitoxine;

C : Les systèmes TA de classe 3 (DinJ-YafQ, YafNO) ont une transcription tronquée en plus de la transcription entière de l'opéron, en raison d'un mécanisme inconnu (peut-être un terminateur ou une dégradation post-transcriptionnelle);

D : Les systèmes TA de classe 4 (RnlAB) produisent deux transcriptions : une transcription de l'opéron entier (à la fois l'ARNm de la toxine et de l'antitoxine), et une transcription de l'ARNm de l'antitoxine uniquement;

E : Un résumé de la classification des systèmes TA de cette étude. Pour la colonne promoteur, le nombre indique le nombre de promoteurs situés en amont des régions de traduction (externe, Ex) ou dans les régions de traduction (interne, In). Chaque classe a un ratio A/T d'ARN différent Certains gènes peuvent avoir des promoteurs supplémentaires, mais ils n'ont pas affecté le rapport d'expression de l'ARNm. P: Promoteur. RBS: Ribosome Binding Site. A: Antitoxine. T: toxine.

L'existence de **promoteurs additionnels**, faibles et constitutifs, a été démontrée au niveau de l'opéron *yefM/yoeb* chez *Streptococcus pneumoniae* (Chan et al., 2011) et en amont du gène de la toxine du système homologue Axe-Txe chez *Enterococcus faecium* (Boss et al., 2013). Ces promoteurs **non régulés par les protéines du système TA** apportent un nouveau niveau de complexité dans la régulation transcriptionnelle des opérons TA et du contrôle du ratio Antitoxine : Toxine. De plus, chez *Lactobacillus rhamnosus*, **deux sites d'initiation** de l'antitoxine *yefM* sont retrouvés, permettant de favoriser sa transcription (Chan et al., 2016). Enfin, la présence d'un site opérateur pour le répresseur **LexA** au niveau du promoteur de l'opéron *dinJ/yafQ* d'*E. coli* suggère une régulation transcriptionnelle de l'opéron via les réponses stringente et SOS et non via le complexe A:T (Ruangprasert et al., 2014).

La régulation transcriptionnelle des opérons TA présente donc, selon les cas, des mécanismes et des niveaux de complexité différents. Ceci a par ailleurs été confirmé par la découverte de systèmes TA de type II tripartites, différents de systèmes TAC. En effet, dans cette famille dont des représentants sont les systèmes $\omega/\epsilon/\zeta$ et *paaR/paaA/parE*, les toxines et antitoxines sont associées à une troisième **entité** permettant une régulation de la transcription du système.

Dans le système $\omega/\epsilon/\zeta$, la composante ω , codée par une unité transcriptionnelle indépendante, permet seule la répression de l'opéron ϵ/ζ (De La Hoz et al., 2000). Dans le système *paaR/paaA/parE*, la composante PaaR vient compléter l'action du complexe A : T PaaA/ParE pour réprimer la transcription de l'opéron codant les trois protéines, mais probablement de manière indépendante à PaaR car aucun complexe tri-protéique n'a été détecté (Chan et al., 2016; Hallez et al., 2010) (Figure 15). Enfin, le chaperon SecB, identifié dans des opérons des systèmes TAC de type HicAB, HigBA, et MqsRA chez *M. tuberculosis*, pourrait participer à la régulation (in)directe de l'opéron (Bordes et al., 2016).

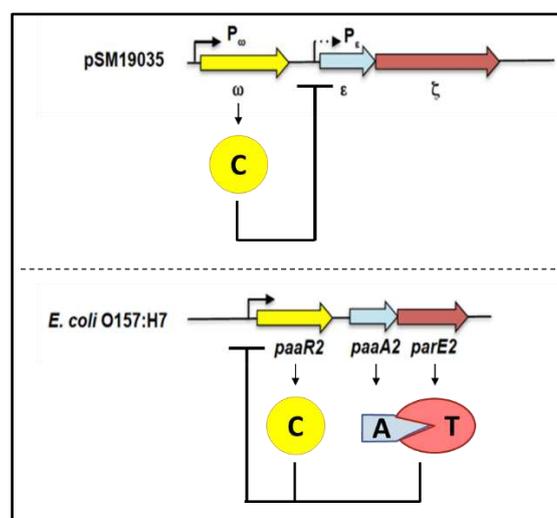


Figure 15 : Particularités de régulation des systèmes TA tripartite

Organisation génétique et régulation transcriptionnelle des systèmes TA $\omega/\epsilon/\zeta$ et *paaR/paaA/parE* adaptées de Chan et al., 2016. C : Composante, A : Antitoxine, T : Toxine.

Sachant que les antitoxines possèdent des motifs communs (**Tableau 2**), il se pose la question des interactions/activations croisées entre antitoxine et toxine de même famille ou de famille différente. La spécificité de séquence de l'antitoxine entre systèmes TA homologues peut être très importante et peut ne reposer que sur un seul acide aminé (cas VapBC ([Walling and Butler, 2016](#))). Parfois, cette spécificité peut être beaucoup moins forte puisque des interactions croisées ont été observées entre homologues de RelBE ([Yang et al., 2010](#)) et entre des systèmes non-homologues tels que MazE/VapC ([Zhu et al., 2010](#)).

Famille	Opéron	Complexe (T:A)	Type A	Liaison A-ADN	Répression	Ref
HicAB	TA	nd	HTH, 2 promoteurs dont un activé par Sxy/CRP-AMPC et l'autre réprimé par HicB	C-ter	Pas de coopérativité conditionnelle, en excès dérepresseur mais retour HicB seulement	(Turnbull and Gerdes, 2017)
GraTA	TA	2 :2	HTH	C-ter+N-ter	Pas de coopérativité conditionnelle, T dérepresseur	(Talavera et al., 2019)
HigBA	TA	2:2 (1T:2A:1T)	HTH	N-ter ou C-ter-Sandwich	Pas de coopérativité, T peut améliorer stabilité A-ADN	(Hadži et al., 2017; Schureck et al., 2014; Xu et al., 2019)
HipBA	AT	2:2,	HTH	nd	Toxine corépresseur	(Schumacher et al., 2009, 2012)
HipBST	AT	nd	HTH HipB	nd	nd	(Nielsen et al., 2019)
MqsRA	TA	2:2 (1T:2A:1T), 0:1, 0:2?	HTH; MqsR déstabilise et peut dégrader son propre ARNm; MqsA régule aussi expression d'autres gènes	C-ter+N-ter	Pas de coopérativité conditionnelle, promoteurs différents (TA/A) chez <i>Ec</i> mais 1 seul chez <i>P. putida</i>	(Brown et al., 2013; Sun et al., 2017)
PezAT	AT	2:2, (1T:2A:1T)	HTH peza	N-ter	Toxine corepresseur	(Khoo et al., 2007)
VapBC	AT	nd	HTH	N-ter	A seule active transcription, +T répression	(Ning et al., 2013)
AtaRT	AT	2:4, T:2A:ADN:2 A:T	RHH	N-ter,	Coopérativité conditionnelle	(Yashiro et al., 2019; Yeo, 2018)
CcdAB	AT	(2:2)n	RHH	N-ter	Coopérativité conditionnelle	(De Jonge et al., 2009)
DinJ-RelE	AT	nd	RHH	nd	nd	(Burbank and Stenger, 2017)
DinJ/YafQ	AT	2:2 (1T:2A:1T), 0:1	RHH, et LexA peut réprimer aussi; Yaf ne semble pas être un co-répresseur	N-ter	Pas de coopérativité conditionnelle, SOS/Stringent response médiée par LexA possible	(Ruangsrasert et al., 2014, 2017)
(Ω) $\epsilon\zeta$	AT	2:2,	triple hélice pour ϵ , ne participe pas et RHH pour Ω	Ω	Chaperon et complexe AT	(Murayama et al., 2001; Mutschler and Meinhart, 2013)
HicAB	TA	2:2 (1T:2A:1T), 2:4 (1T:4A:1T), 4:4	RHH	C-ter	Pas de rôle de T de corépresseur, en excès dérepresseur	(Bibi-Triki et al., 2014; Kim et al., 2018)
ItaRT	AT	nd	RHH	nd,	nd	
KacAT	AT	2:4, (1T:4A:1T)	RHH	N-ter	Coopérativité conditionnelle	(Qian et al., 2018, 2019)
MazEF	AT	2:1 (2T:1A), 4:2 (2T:2A:2T)	RHH	N-ter	nd	(Ahn et al., 2017)
ParDE	AT	2:2,	RHH	N-ter	Coopérativité conditionnelle	(Dalton and Crosson, 2010; Oberer et al., 2007; Yuan et al., 2011)
paaR-paaA-parE	AT	2:2,	Pas de motif de liaison à l'ADN pour l'antitoxine, paaR =?	NA	Chaperon et complexe AT	(Hallez et al., 2010)
RelBE	AT	1:2/2:4; 2:2 (1T:2A:1T)	RHH	N-ter	Coopérativité conditionnelle	(Li et al., 2008)
TacAT	AT	2:2,	RHH	N-ter	Toxine corépresseur/ dérepresseur par acétylation de TacA	(VanDrissse et al., 2017)
VapBC	AT	2:2, 4:4	RHH	N-ter	nd	(Mattison et al., 2006)
Phd/Doc	AT	1:2(1A:1T:1 A)/2:2/ 2:1:2 (2A:1T:2A),	Phd-YefM-like	N-ter	Coopérativité conditionnelle	(Garcia-Pino et al., 2010, 2016)
VapBC	AT	nd	Phd-YefM-like	N-ter	nd	(Roy et al., 2019)
YefM/YoeB	AT	1:2/2:4,	Phd-YefM-like	N-ter	Coopérativité ou expression faible constitutive ou RNAi	(Kamada and Hanaoka, 2005)
MazEF	AT	4:2 (2T:2A:2T)	AbrB-like	N-ter	Coopérativité conditionnelle	(Zorzini et al., 2015)
VapBC	AT	4:4,	AbrB-like	N-ter	?	(Maté et al., 2012)
VapBC	AT	2:2, (1A:2T:1A)	AbrB-like, A corépresseur,	NA	T réprime transcription, activation par FIS Factor for Inversion Stimulation	(Cline et al., 2012; Molinaro et al., 2019)
VapBC	AT	nd	AbrB-like	N-ter	Coopérativité conditionnelle	(Winther and Gerdes, 2012)
VapBC	AT	2:2, 4:4	AbrB-like	N-ter	Toxine corépresseur	(Dienemann et al., 2011)
Fic	AT	nd	alpha-helice, (S/T)xxxE(G/N)	nd	Conformation ADN	(Harms et al., 2016)
YafNO	DinB AT	nd	nd	nd	SOS	(Singletary et al., 2009)

Tableau 2 : Bilan des interactions TA et régulation transcriptionnelle.

Les données sont représentées en fonction du type de motif de liaison à l'ADN d'antitoxine. Puis les systèmes sont présentés dans l'ordre alphabétique. Les données concernant les VapBC, objet de cette thèse, sont représentés en gras.

b) Neutralisation de la toxine par l'antitoxine

Les antitoxines de type II neutralisent leurs toxines apparentées par des interactions protéine-protéine. Dans la majorité des cas, cette interaction se fait au niveau de l'extrémité C-terminale flexible de l'antitoxine qui devient alors structurée. Les antitoxines HigA, MqsA, et HicB présentent toutefois une structure originale, inversée, avec une extrémité C-terminale se liant à l'ADN tandis que l'extrémité N-terminale interagit avec la toxine (exception faite de HigA chez *P. vulgaris* (Xu et al., 2019)). Enfin, la conformation en sandwich du complexe HipAT montre des interactions tout le long de l'antitoxine (Tableau 3). La structuration des complexes A:T repose sur des liaisons hydrogènes et interactions hydrophobes et/ou électrostatiques. En effet, l'antitoxine est le plus souvent acide et la toxine basique, hormis le cas particulier de MqsRA où les deux partenaires sont basiques (Chan et al., 2016) et des VapBC où la toxine est acide et l'antitoxine basique (Bendtsen and Brodersen, 2017).

Il existe différents modes de neutralisation de la toxine : soit la liaison A:T bloque le site catalytique et/ou empêche la liaison d'un cofacteur, par modification conformationnelle ou non, soit la liaison A:T empêche la liaison Toxine/Cible.

Un tableau bilan est présenté à la fin de cette partie (Tableau 3).

b.1 Neutralisation par modification conformationnelle de la toxine

La neutralisation par modification conformationnelle de la toxine est fréquemment observée pour les toxines de type RNases telles que RelE, YoeB, YafQ, HigA, MazF et une VapC.

Dans la famille RelE-like, les complexes TA formés peuvent être des hétérotrimères (1T:2A)/hétérohexamères (2T:4A), comme par exemple RelBE, ou des hétérotétramères (1T:2A:1T), cas de HigBA notamment. La liaison de l'antitoxine induit un changement de conformation de la toxine qui masque le site catalytique et/ou empêche la liaison au ribosome des toxines (RelBE, YefM/YoeB (Li et al., 2009) (Figure 16A), (Ruangprasert et al., 2017)). Dans la famille HigBA, plusieurs mécanismes impliquant une modification conformationnelle de la toxine sont retrouvés. Chez *Phaseolus vulgaris*, par exemple, l'antitoxine HigA, en se liant à la toxine HigB, empêche par encombrement stérique la liaison de la toxine au ribosome et ce bien que le site actif reste accessible (Schureck et al., 2014). Chez *V. cholerae*, HigA bloque directement le site actif de HigB (Hadži et al., 2017).

Pour les toxines de type RNases ribosome-indépendantes, dont la liaison de l'antitoxine induit un changement de conformation de la toxine, deux cas sont rencontrés. L'insertion de l'antitoxine MazE

entre deux monomères de la toxine MazF induit une réorganisation du site actif, formant ainsi un hétérotrimère (2T:1A) ou un hétérohexamère (4T:2A) (Ahn et al., 2017; Hoffer et al., 2017) (Figure 16B), et empêche la liaison de la toxine à sa cible ARN (Hoffer et al., 2017). En général, les antitoxines VapB n'induisent pas de changement de conformation de leurs toxines VapC. Toutefois, dans le cas du système VapBC30 de *M. tuberculosis*, la liaison de l'antitoxine modifie la conformation du site actif de VapC30, ce qui semble empêcher la liaison de l'ion divalent (Lee et al., 2015). Enfin, certaines VapB, en s'insérant dans les dimères de VapC, rompent le site actif (Winther and Gerdes, 2012).

Enfin, la neutralisation de la toxine par changement conformationnel est également retrouvée pour une toxine à activité kinase : HipT. La liaison d'HipA induit une conformation ouverte inactive de la toxine. La toxine peut lier son cofacteur mais ne peut plus phosphoryler sa cible (Schumacher et al., 2009).

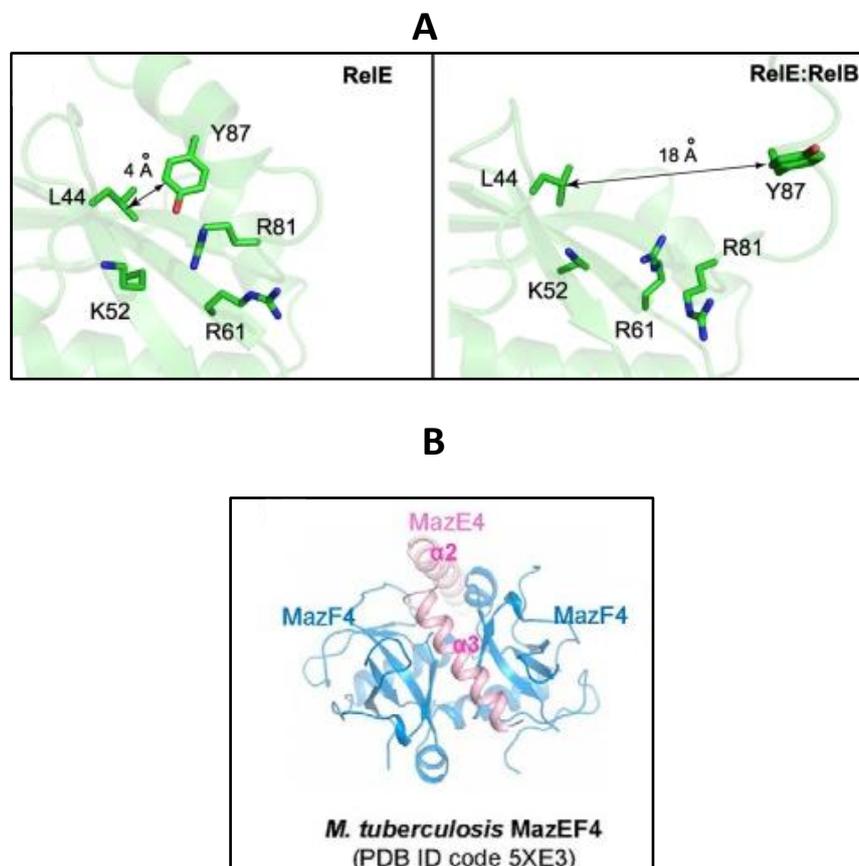


Figure 16 : Changement conformationnel de la toxine par liaison de l'antitoxine

A : Modification du site actif de la toxine par la liaison de l'antitoxine. La liaison de l'antitoxine RelB induit un espacement trop important des acides aminés du site actif de la toxine RelE (passant de 4 à 18 Å), ce qui rend la toxine inactive (Li et al., 2009). RelB n'est pas représentée.

B : Rupture du dimère de toxine par insertion de l'antitoxine : cas de MazEF, issue de Ahn et al., 2017. Hétérotrimère de MazEF4 de *M. tuberculosis*. Le dimère MazF4 est représenté en bleu et l'antitoxine MazE4 en rose.

b.2 Neutralisation de la toxine par blocage du site actif

Le blocage du site catalytique de la toxine, par encombrement stérique ou liaison directe de l'antitoxine, sans changement de conformation, est un mode de neutralisation fréquent de la majorité des systèmes TA de type II (FicAT, $\epsilon\zeta$ /PezAT, Phd/Doc, KacAT, HicAB et VapBC (**Figure 17A**)). Les complexes formés présentent des stœchiométries variables. En effet, il est possible d'observer une interaction simple, un monomère d'antitoxine avec un monomère de toxine (FicAT, $\epsilon\zeta$ (de *Neisseria gonorrhoeae*)), ou des interactions plus complexes : deux monomères de toxines complexés avec un dimère d'antitoxines ($\epsilon\zeta$ /PezAT, HicAB) ou un tétramère d'antitoxines (KacAT, HicAB) ; un dimère de toxines complexé à un monomère ou un dimère d'antitoxines (Phd/Doc, **VapBC**); un hétérooctamère, formé d'un tétramère de toxines et d'un tétramère d'antitoxines (HicAB et **VapBC**).

Dans le cas des VapC, deux modes de neutralisation des sites actifs ont été distingués : l'inhibition **proximale**, où l'antitoxine bloque le site actif de la toxine à laquelle elle est liée (**Figure 17B**) (*Neisseria gonorrhoeae* FitAB, *Shigella flexneri* VapBC, et *M. tuberculosis* VapBC-5) ou les deux sites actifs de l'homodimère de toxine (*Rickettsia felis* VapBC2), et, l'inhibition **distale** où l'antitoxine bloque le site actif de la toxine opposée à celle à laquelle elle est liée dans l'hétéromultimère AT (*M. tuberculosis* VapBC3/30) (Bendtsen and Brodersen, 2017).

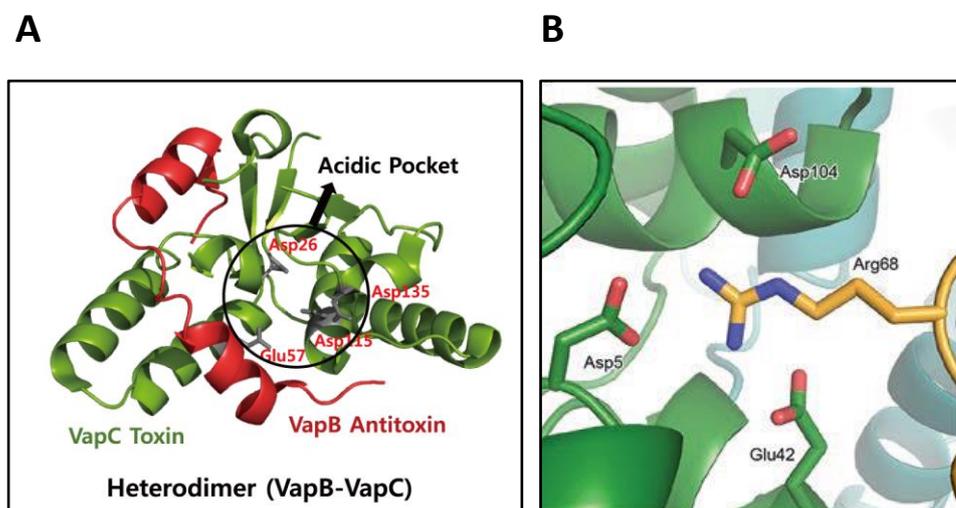


Figure 17 : Site actif de la toxine bloqué par liaison de l'antitoxine : Cas des VapBC

A : Site actif acide de VapC bloqué par l'antitoxine VapB, issu de Lee and Lee, 2016. Cas d'un hétérodimère VapBC (1A : 1T) chez *M. tuberculosis* : le monomère de toxine VapC (vert) possède un site actif acide (acides aminés en rouge) qui forme une poche acide (cercle noir). La liaison de l'antitoxine VapB (rouge) bloque cette poche acide.

B : Neutralisation par l'antitoxine VapB de la charge du site actif de la toxine VapC issu de Bendtsen and Brodersen, 2017. Cas du complexe VapBC (FitAB) de *N. gonorrhoeae*. Le site actif de la toxine VapC (vert) présentant une charge acide (acides aminés aspartate et glutamate) est neutralisée par l'acide aminé basique (arginine) de l'antitoxine VapB dans le complexe TA.

b.3 Neutralisation de la toxine par blocage du site de liaison à la cible

Certaines antitoxines neutralisent leurs toxines en bloquant non pas le site actif mais le site de la liaison de la toxine à la cible. C'est le cas notamment des antitoxines des systèmes CcdAB, ParDE, AtaRT et MqsRA. Le mécanisme mis en jeu est variable. La liaison de l'antitoxine CcdA à la toxine CcdB entraîne la **rupture** de la liaison CcdB :Gyrase, libérant ainsi la cible gyrase, et permet dans le même temps de **séquestrer** la toxine (De Jonge et al., 2009, 2012). L'antitoxine ParD quant à elle **empêche** par encombrement stérique la liaison de ParE à la Gyrase (Dalton and Crosson, 2010; Yuan et al., 2010). Enfin, l'antitoxine AtaR empêche d'une part la dimérisation de la toxine AtaT et d'autre part, génère un encombrement stérique limitant la liaison de la toxine à l'ARNt^{fMet} (Jurénas et al., 2019).

Une seule exception concerne le mécanisme unique à ce jour de réversibilité de la toxicité de TacT (acétyltransférase d'ARNt) qui ne semble pas être neutralisée. TacT, en plus des ARNt, est capable d'acétyler son antitoxine TacA, ce qui favorise son activité. Il existe deux mécanismes de réversibilité de l'acétylation permise par TacT : la protéine Pth déacétyle les ARNt, et la protéine CodB (déacétylase NAD⁺ dépendante), déacétyle l'antitoxine TacA, permettant une complexité supplémentaire dans les modes de neutralisation de la toxine. Le complexe est un hétérotétramère comprenant un dimère de toxines et un dimère d'antitoxines (Cheverton et al., 2016; VanDrisse et al., 2017).

b.4 Neutralisation de la toxine favorisée par un chaperon : cas des systèmes TAC

Certaines antitoxines de systèmes TA tripartites, dont les TAC, ne participent qu'à la régulation transcriptionnelle de l'opéron, alors que d'autres interviennent dans la neutralisation de la toxine.

La composante PasC (du système PasA/B/C) favorise la neutralisation de la toxine PasB par l'antitoxine PasA. Le mode d'action reste encore à élucider (Chan et al., 2016).

Dans certains systèmes TA où le gène de la toxine précède celui de l'antitoxine (HigBA, MqsRA et HicAB), un chaperon de type SecB, codé en aval de l'opéron, peut être retrouvé. L'antitoxine possède alors une courte séquence d'addiction au chaperon (ChAD), permettant le recrutement de SecB du système TAC (SecB^{TA}) qui, par interaction directe, aide au repliement de l'antitoxine et la protège de la dégradation protéolytique (Bordes et al., 2016). En évitant la dégradation de l'antitoxine, le chaperon favorise donc indirectement la neutralisation de la toxine par l'antitoxine.

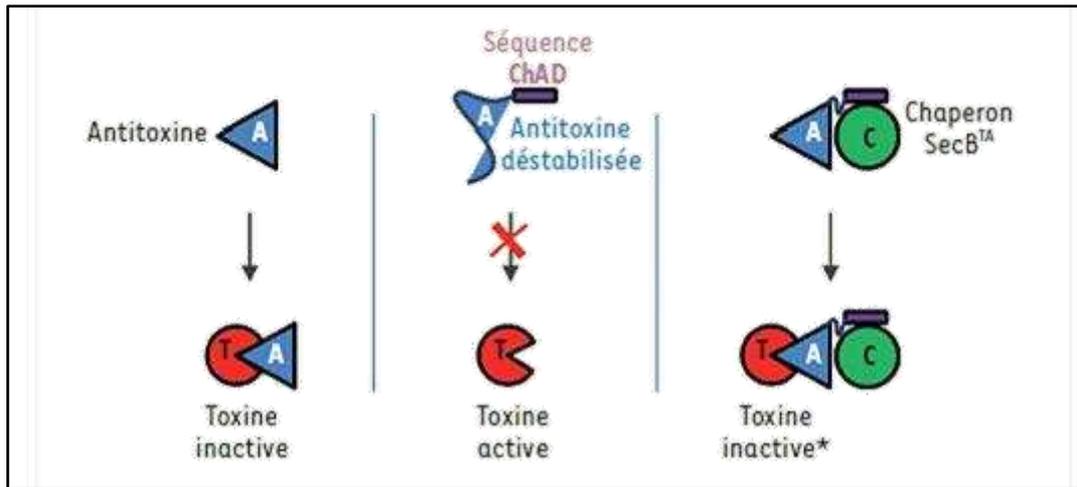


Figure 18 : Mécanisme d'addiction au chaperon chez les systèmes Toxine-Antitoxine issu de Bordes and Genevax, 2017

Dans le cas d'un système toxine-antitoxine « classique » à deux composants (TA), l'antitoxine se fixe à la toxine et inhibe son activité (partie gauche). Dans le cas du système toxine-antitoxine-chaperon (TAC), l'extension ChAD (*chaperone addiction sequence*) déstabilise l'antitoxine, l'empêchant ainsi d'inhiber la toxine (comme représenté au centre). Le chaperon SecB dédié se fixe à la séquence ChAD et stabilise l'antitoxine, facilitant son interaction avec la toxine (comme représenté à droite). L'étoile (*) indique que la présence du chaperon dans le complexe final n'est pas démontrée.

En conclusion à cette partie, l'inactivation des systèmes TA (modèle OFF) repose donc sur une régulation fine et complexe aussi bien au niveau transcriptionnel que post-traductionnel. Les mécanismes mis en jeu sont variés et dépendent de la stœchiométrie des deux entités toxine et antitoxine. De plus, il n'y a pas de lien direct entre la nature de l'antitoxine et de la toxine pour un mécanisme de régulation donné. En revanche, nous pouvons observer quelques des tendances générales : **l'antitoxine est généralement en excès par rapport à la toxine (sauf pour MazEF et VapBC), elle neutralise la toxine via son extrémité C-terminale et elle réprime l'opéron via son extrémité N-terminale (sauf pour ϵ , HipB, HigA, MqsA et HicB).**

La régulation de la balance ON/OFF (module actif vs module inactif), permettant une modulation fine des systèmes TA, dépend également des signaux activateurs de la protéolyse de l'antitoxine. Nous avons précédemment vu qu'un contexte cellulaire de stress, perçu par la bactérie, aboutit à des réponses communes (stringente ou SOS). Nous allons maintenant nous intéresser à la nature des stress pouvant de manière globale être perçus par les systèmes TA de type II, et enfin, à la spécificité de réponse de certains systèmes TA à un stress donné.

Famille	Complexe (T:A)	Liaison AT	Mécanisme neutralisation	Références
εζ	2:2, (1T:2A:1T), ng 1:1,	N-ter	Liaison à la toxine masque site liaison à l'ATP	(Moreno-Del Álamo et al., 2019; Rocker et al., 2018)
FicAT (VbhAT)	1:1,	C-ter	Liaison à la toxine masque site liaison à l'ATP	(Harms et al., 2016; Stanger et al., 2016)
HicAB	2:2 (1T:2A:1T), 2:4 (1T:4A:1T), 4:4	N-ter	Liaison à la toxine masque son site catalytique	(Bibi-Triki et al., 2014; Jørgensen et al., 2009; Kim et al., 2018)
KacAT	2:4, (1T:4A:1T)	C-ter	Liaison à la toxine affecte liaison Ac-CoA et empêche dimérisation	(Qian et al., 2018, 2019)
PezAT	2:2, (1T:2A:1T)	C-ter	Liaison à la toxine masque site liaison à l'ATP	(Khoo et al., 2007; Moreno-Del Álamo et al., 2019; Mutschler et al., 2011)
Phd/Doc	2:2, 2:1	C-ter	Liaison à la toxine masque son site catalytique	(Arbing et al., 2010)
VapC	2:2 ou 4:4 ou 4:2 un cas 2:1	C-ter	Liaison proximale ou distale au site catalytique, possible rupture des dimères T, 1 cas changement de conformation	(Bendtsen and Brodersen, 2017; Lee et al., 2015; Winther and Gerdes, 2012)
DinJ-YafQ	2:2 (1T:2A:1T), (voire 1:1 = suffisant)	C-ter	Liaison à la toxine empêche sa liaison au ribosome, masque site catalytique et change sa conformation	(Liang et al., 2014; Ruangprasert et al., 2017)
HigBA	2:2 (1T:2A:1T), (voire 1:1 = suffisant)	N-ter chez Vc, Sf, Ec et C-ter chez Pv	Liaison à la toxine ne masque pas toujours site catalytique mais induit changement de conformation	(Hadži et al., 2017; Schureck et al., 2014, 2019; Wu et al., 2019; Xu et al., 2019)
HipBA	2:2,	Sandwich	Pas de liaison au site actif de la toxine, empêche la toxine de se refermer (conformation ouverte inactive)	(Schumacher et al., 2009)
MazEF	2:1, ou 4:2	C-ter	Liaison rompant les monomères MazF, réorganisant site actif	(Ahn et al., 2017; Hoffer et al., 2017; Zorzini et al., 2015)
RelBE	1:2/2:4; 2:2 (1T:2A:1T)	C-ter	Liaison neutralise charge site actif et induit changement de conformation , toxine inactive	(Li et al., 2009)
YefM/YoeB Axe/Txe	1:2/2:4,	C-ter	Liaison à la toxine masque site son catalytique et change sa conformation	(Kamada and Hanaoka, 2005)
AtaRT	2:4, (1T:4A:1T)	C-ter	Liaison à la toxine masque son site de liaison à sa cible et empêche dimérisation	(Jurénas et al., 2019)
CcdAB	(2:2)n, 2:1/4:2	C-ter	Rupture liaison toxine-cible et séquestration de la toxine	(De Jonge et al., 2009, 2012)
MqsRA	2:2 (1T:2A:1T)	N-ter	Liaison à la toxine empêche liaison cible-toxine	(Brown et al., 2009)
ParDE	2:2,	C-ter	Empêche liaison toxine-cible, toxicité irréversible	(Dalton and Crosson, 2010; Yuan et al., 2010)
HicAB-SecB	nd	nd	Chaperon favorise inhibition de la toxine	(Bordes et al., 2016)
HigBA-SecB	nd	nd	Chaperon favorise inhibition de la toxine	(Bordes et al., 2016)
MqsrRA-SecB	nd	nd	Chaperon favorise inhibition de la toxine	(Bordes et al., 2016)
TacAT	2:2,	C-ter	Mécanisme de réversibilité par CodB et PtsH	(VanDrissse et al., 2017)

Tableau 3 : Bilan des interactions TA et neutralisation de la toxine par l'antitoxine

Les données sont représentées en fonction du type neutralisation entraînée par la liaison de l'antitoxine à la toxine. Puis les systèmes sont présentés dans l'ordre alphabétique. Les données concernant les VapBC, objet de cette thèse, sont représentés en gras.

4) Activation des systèmes TA de type II par protéolyse de l'antitoxine (modèle « ON »)

L'activation des systèmes TA correspond à la libération de la toxine des complexes A:T. Cette libération est permise grâce à la protéolyse de l'antitoxine induite en condition de stress (Hayes, 2003; Hayes and Kędzierska, 2014; Lobato-Márquez et al., 2016). Dans un premier temps, nous nous intéresserons aux signaux activateurs des systèmes TA et/ou des protéases bactériennes. Enfin, dans un second temps, nous préciserons les protéases responsables de la dégradation de l'antitoxine.

a) Signaux d'activation des systèmes TA

Au vu de la grande diversité des signaux pouvant activer des systèmes TA, seuls les principaux répertoriés seront présentés ci-après (en gras) (Brzozowska and Zielenkiewicz, 2013; Helaine and Kugelberg, 2014; Lobato-Márquez et al., 2016).

Nous avons précédemment vu que **la carence nutritionnelle** (en phase stationnaire ou non) pouvait entraîner une activation de la réponse stringente ou SOS, probablement via l'activation de systèmes TA. Il s'agit du signal d'activation des systèmes TA le plus étudié. Il est retrouvé dans l'ensemble des familles de systèmes TA de type II. Des analyses transcriptionnelles (RNA-seq ou RTqPCR) ont notamment montré une surexpression des systèmes MqsRA, HicAB, YafNO et DinJ/YafQ (Muthuramalingam et al., 2016). Cette approche transcriptionnelle (Christensen et al., 2001; Gupta et al., 2017) a de plus été confirmée par analyse protéomique pour les systèmes ParDE, RelBE, MazEF (Albrethsen et al., 2013).

Toutefois, la carence nutritionnelle n'est pas le seul stress pouvant être perçu par la bactérie et nécessitant une adaptation de cette dernière. Le second signal de stress le plus étudié est **la présence d'antibiotiques/composés anti-microbiens**, dans le milieu de culture ou la cellule eucaryote infectée. Il entraîne l'activation transcriptionnelle de nombreux systèmes TA dont les familles ParDE, GNAT, RelBE/RelBE-like, MazEF et VapBC (Gupta et al., 2017; Helaine et al., 2014; Muthuramalingam et al., 2016). La persistance aux antibiotiques, caractérisée par une sous-population bactérienne résistante aux antibiotiques dans un état de dormance, utilise plusieurs voies de signalisation dont celles des Toxine-Antitoxine, via la réponse SOS notamment (Figure 19).

Enfin, l'activation des systèmes TA a également été décrite chez des bactéries pathogènes de l'homme (Lobato-Marquez et al., 2016), lors de l'**infection** intracellulaire des macrophages, en condition de **microoxie** (Helaine et al., 2014; Ramage et al., 2009), de **pH acide** (Gupta et al., 2017) ou encore de **stress thermique** (Muthuramalingam et al., 2016; Schuster and Bertram, 2016) (**Figure 19**). Il a également été montré le rôle d'un stress uranium comme activateur de systèmes TA chez une bactérie extrémophile (Mukherjee et al., 2017).

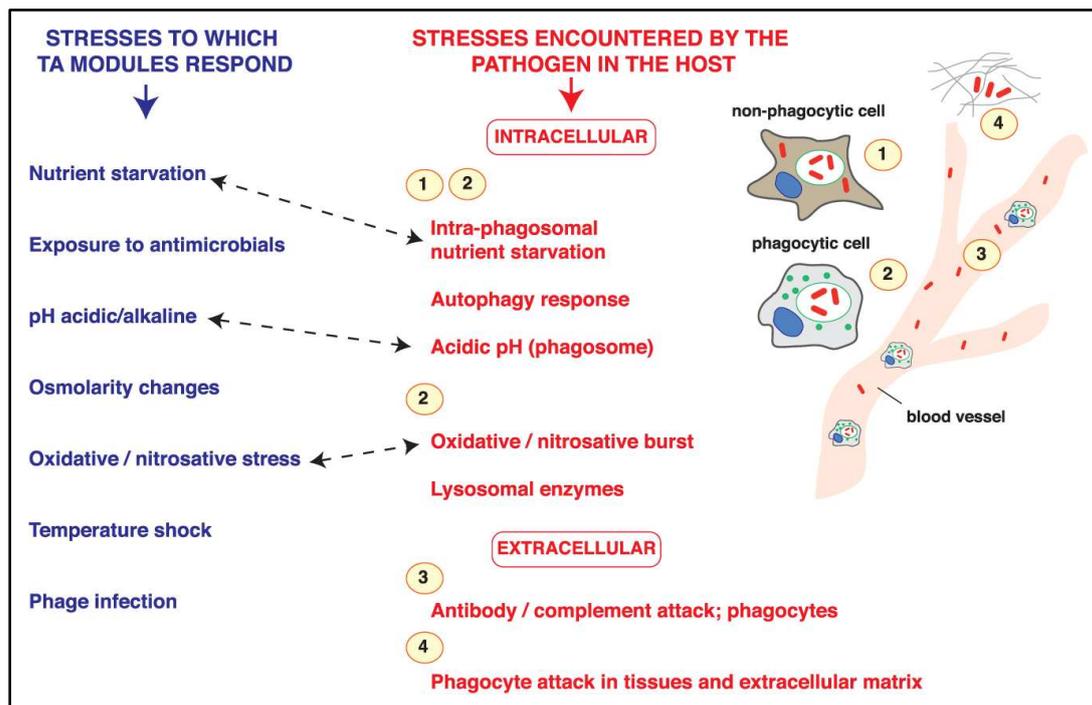


Figure 19 : Parallèles entre les réponses aux stress de l'hôte et les signaux auxquels les TA répondent, issu de Lobato-Márquez et al., 2016

Les stress connus auxquels les TA répondent sont à gauche et ceux que le pathogène rencontre à la suite de son interaction avec l'hôte à droite. Les numéros correspondent aux stress rencontrés dans les différents environnements de l'hôte : (1) Niche intracellulaire d'une cellule non-phagocytaire (fibroblaste, cellule épithéliale), (2) compartiment phagosomal des cellules immunitaires phagocytaires (macrophages, cellules dendritiques), (3) Protéines complémentaires et anticorps circulant dans les fluides comme le sang, et (4) exposition aux molécules antimicrobiennes et attaque des phagocytes dans les sites intercellulaires (matrice).

En conclusion, de nombreux stress associés au mode de vie de la bactérie considérée peuvent être des signaux activateurs de TA. L'ensemble de ces signaux (microoxie, pH acide, stress oxydatif/nitrosatif, carence nutritionnelle, exposition à des composés antimicrobiens...) permettent donc une régulation post-traductionnelle par dégradation de l'antitoxine, suivie d'une stimulation transcriptionnelle de l'opéron TA. Cela sous-entend que les protéases, responsables de la dégradation de l'antitoxine, sont également activées par ces stress. Par une approche transcriptionnelle, il est possible d'observer une concomitance entre la surexpression de protéases et celle de systèmes TA,

notamment des systèmes HicAB et VapBC (Gupta et al., 2017). De même, une activation, dépendante de la protéase Lon, a pu être démontrée pour le système HigBA, lors d'un stress nutritionnel chez *Vibrio cholerae* (Budde et al., 2007; Christensen-Dalsgaard and Gerdes, 2006), et pour les CcdAB, MqsRA et RelBE, lors de stress oxydatifs chez *E. coli* (Christensen et al., 2001; Van Melderen et al., 1994; Wang et al., 2011).

b) Nature des protéases

La régulation de la protéolyse, en général, permet de contribuer à de nombreux processus biologiques telles que la réponse aux stress, la différenciation cellulaire et la virulence (Bhandari et al., 2018; Tsilibaris et al., 2006). Les protéases de la famille AAA+ (ATPases Associated with different cellular Activities) sont responsables de la dégradation de protéines mal repliées ou endommagées, et constituent des protéasomes-like bactériens. La dégradation d'une protéine est initiée par la liaison de celle-ci au domaine ATPase de la protéase AAA+. L'hydrolyse d'ATP permet ensuite de déplier la protéine et de la transférer au domaine protéolytique où elle est dégradée. Cette famille de protéase est subdivisée en 4 classes : deux classes ont les domaines protéolytique (ClpP, ClpQ (HslV)), et ATPase (ClpA ou X, ClpY (HslU)), séparés tandis que les protéases Lon et FtsH disposent des deux domaines sur un même polypeptide (Yang et al., 2020a) (Figure 20, Annexe 6). Dans la littérature, la protéolyse des antitoxines est réalisée par les protéases Lon et ClpXP/ClpAP (Brzozowska and Zielenkiewicz, 2013; Muthuramalingam et al., 2016).

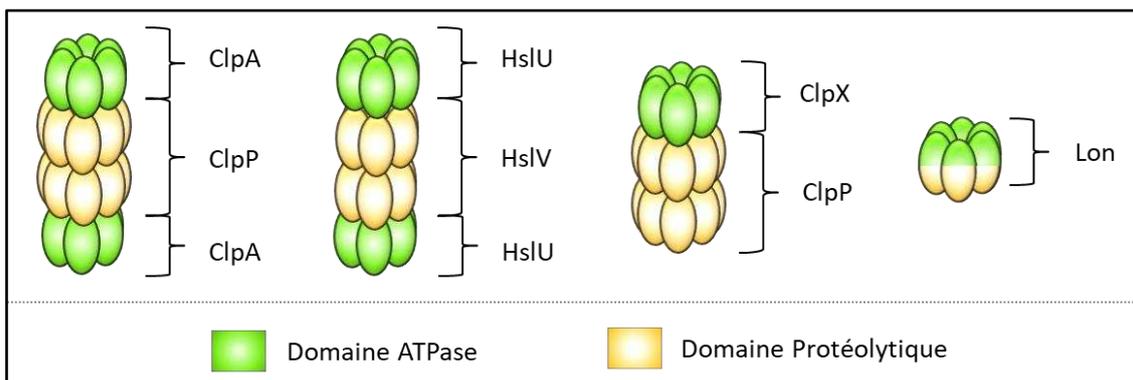


Figure 20 : Structure des protéases AAA+ issue de Yang et al., 2020a

Les protéases AAA+ possèdent un domaine ATPase (vert) et un domaine protéolytique (jaune) au sein d'une même ou de plusieurs sous-unités. Chez *E. coli*, la protéase ClpP est heptamérique et HslV (ClpQ) et Lon hexamériques. ClpP peut s'associer avec deux adaptateurs ClpA ou un seul adaptateur ClpX et HslV avec deux adaptateurs HslU (ClpY).

L'antitoxine, du fait de sa labilité, est plus sensible à la dégradation que la toxine. En effet, la majorité des antitoxines de type II ont une extrémité, le plus souvent C-terminale, flexible et

désordonnée, qui les rend sensibles à la dégradation par les protéases. Les familles d'antitoxine, définies par leur domaine de liaison à l'ADN, ne présentent pas de spécificité vis-à-vis de la protéase qui les dégrade. En effet, les protéases Lon ou ClpP (associée à ClpA ou ClpX), sont capables de dégrader n'importe quel type d'antitoxines, à l'exception de PezA, dont la dégradation est indépendante de la famille AAA+ (Mutschler et al., 2010). Ces protéases réduisent fortement la demi-vie de l'antitoxine *in vivo* (pouvant être de quelques minutes à moins d'une heure en général), jusqu'à un facteur 10 (Christensen et al., 2001; Hansen et al., 2012) (Tableau 4).

Les différences observées entre des expériences menées *in vivo* et *in vitro* suggèrent que Lon utiliserait un adaptateur pour permettre son fonctionnement optimal (Ruangprasert et al., 2017). En effet, la régulation de l'activité de Lon par des adaptateurs protéiques accessoires a déjà été démontrée lors du cycle cellulaire de *C. crescentus* et de la motilité de *Bacillus subtilis*. Dans un contexte de protéolyse de l'antitoxine, ces régulateurs apporteraient une régulation plus fine et spécifique de la réponse aux stress (Ruangprasert et al., 2017).

Toutefois, l'hypothèse d'activation de la toxine par protéolyse de l'antitoxine par des protéases non spécifiques mérite quelques précisions. En effet, l'antitoxine a une demi-vie plus longue lorsqu'elle est liée à la toxine que lorsqu'elle est seule. La protéolyse de l'antitoxine aurait donc plus probablement lieu avant la liaison de cette dernière à sa toxine apparentée. Par ailleurs, il est proposé que la toxine soit active juste après sa synthèse *de novo* pendant le laps de temps où elle n'est pas liée à son antitoxine, et/ou, suite à la dégradation préférentielle de l'ARNm de l'antitoxine par rapport à celui de la toxine (Song and Wood, 2020). Bien que des précisions soient nécessaires, il reste vrai que l'antitoxine puisse être dégradée par des protéases de la famille AAA+, que sa dégradation diminue dans des souches dépourvues de ces protéases (comme par exemple HipB chez *E. coli* (Hansen et al., 2012)) et qu'elle est moins stable que la toxine quand elles ne sont pas en complexe (Tableau 4).

Récemment, une recherche, par co-immunoprécipitation, des protéines interagissant avec les protéases AAA+ ClpXP1 et HslUV (également nommée ClpYQ) de *S. meliloti*, en culture pure et au sein des nodosités de *M. sativa* (28 jours post-infection) a mis en évidence, en culture pure, une interaction entre les antitoxines VapB2, VapB4, VapB7 et les sous-unités ClpX (ATPase) et ClpP1 (protéase) ainsi qu'entre VapB8 /VapB9 et la sous-unité ClpX. De même, les antitoxines VapB2 et VapB7 sont, en culture pure, capables de lier les sous-unités HslU (ATPase) et HslV (protéase) tandis que VapB6 et VapB8 ne lient que HslV. De manière plus surprenante, peut-être artéfactuelle, les toxines VapC2 et VapC7 semblent également interagir avec HslV mais avec un score de fiabilité relativement moyen. Au sein de la nodosité, en revanche, aucune interaction entre des protéines VapB ou VapC et les sous-unités ClpP1, ClpX, HslV ou HslU n'a été retrouvée (Ogden et al., 2019).

Famille de la toxine	Antitoxine	Extrémité flexible	Stabilisation par T	Protéase	Demi-vie antitoxine <i>in vivo</i>	Demi-vie toxine <i>in vivo</i>	Réf
Axe	Txe	C-ter?		ClpCP	18 min		(Donegan et al., 2010)
CcdB	CcdA	C-ter	oui	Lon	30 min	2h	(Jaffe et al., 1985; Van Melderen et al., 1994)
Doc	Phd	C-ter	nd	ClpXP	120 min	nd	(Garcia-Pino et al., 2008; De Gieter et al., 2014; Lehnherr and Yarmolinsky, 1995)
εζ	ε	C-ter?	nd	Lon (ClpXP)	18min	1h	(Lioy et al., 2006)
HicA	HicB	nd	nd	Lon	nd	nd	(Jørgensen et al., 2009)
HigB	HigA	C-ter chez Pv, N-ter disordered chez Vc	oui chez Vc	nd	nd	nd	(Hadži et al., 2017; Schureck et al., 2014, 2019)
HipA	HipB	Core hydrophobe ?/C-ter	oui	Lon	17 min	nd	(Hansen et al., 2012)
MazF	MazE	C-ter?	nd	ClpAP	30min	>180min	(Aizenman et al., 1996)
MazF	MazE	C-ter?	nd	ClpCP	18 min	nd	(Donegan et al., 2010)
MazF	MazE	C-ter?	nd	ClpP	nd	nd	(Tian et al., 2019)
MazF	MazE	C-ter ?	nd	Lon	nd	nd	(Christensen et al., 2003)
MazF	MazE	C-ter?	nd	Lon/ClpP	nd	nd	(Tripathi et al., 2014)
MqsR	MqsA	nd	?	Lon	>60min	nd	(Wang et al., 2011)
PaaRPaaAParE	PaaA	nd	nd	ClpAP/XP/Lon	6 min	nd	(Hallez et al., 2010)
ParDE	ParD	C-ter	oui	Lon/ClpAP	<i>in vitro</i> 15 min	nf	(Dubiel et al., 2018)
RelE	RelB	C-ter	oui?	Lon/ClpXP	15 min	nd	(Christensen et al., 2001; Li et al., 2016)
VapC	VapB	C-ter?	nd	ClpXP	40 min	> 120 min	(Ning et al., 2013)
VapC	VapB	C-ter ?	nd	Lon	nd	nd	(Winther and Gerdes, 2012)
YafQ	DinJ	C-ter	non	Lon, ClpXP	nd	nd	(Ruangprasert et al., 2017)
YoeB	YefM	C-ter	oui	Lon	50 min	nd	(Cherny et al., 2005; Christensen et al., 2004)

Tableau 4 : Protéolyse des antitoxines de type II par les protéases AAA+

Le tableau est rangé par ordre alphabétique en fonction de la famille de toxine. Les données concernant les VapBC, objet de cette thèse, sont représentés en gras. Lorsque la définition des extrémités flexibles n'est pas aboutie, un point d'interrogation est présent. nd : non déterminé, nf : not found (non trouvé).

En conclusion, la régulation de la balance ON/OFF présente une grande complexité : il n'y a pas de mécanisme universel de régulation transcriptionnelle des systèmes TA (**Tableau 2**), et il n'y a pas de spécificité identifiée pour la protéolyse de l'antitoxine (**Tableau 4**). Aussi, beaucoup de connaissances devront être apportées dans les prochaines années pour mieux comprendre l'abondance des systèmes TA et leur redondance, les régulations transcriptionnelles et post-traductionnelles, et être à même de prévenir une infection bactérienne pathogène ou au contraire de promouvoir une infection symbiotique en réponse d'un signal donné.

III. Mécanismes d'action des toxines de type II ciblant la traduction

Nous avons précédemment vu que les toxines ciblaient trois processus cellulaires vitaux : la réplication, la traduction et la formation de la paroi. (**Figure 2**) Ces toxines de type II, outre leur petite taille commune, présentent des similitudes dans leur mécanisme d'action : elles sont toxiques sous forme de monomère ou de dimères et la charge de leur site actif est positive, sauf dans le cas des VapC qui ont un site actif de charge négative. Comme la majorité des toxines de type II ciblent la traduction et que les VapC, objet de cette thèse, sont des RNases, seuls les mécanismes d'action des toxines visant la traduction (**Figure 2**) seront décrits dans cette sous-partie de l'Introduction de thèse.

1) Les acteurs de la traduction

La traduction d'un ARNm en protéines est réalisée en trois étapes : l'initiation (**Figure 21**), l'élongation (**Figure 22**) et la terminaison. Le mécanisme et les différents acteurs de la traduction bactérienne sont rappelés dans les Figures 21 et 22, afin de faciliter la compréhension du mode d'action des toxines de type II inhibant ce processus cellulaire.

L'activité kinase, RNase ou acétyltransférase de toxines conduit à une inhibition partielle ou totale de la traduction. En effet, en ciblant les facteurs d'élongation, les aminoacyl tRNA synthétases, les ARNr, les ARNm ou les ARNt, l'initiation et/ou l'élongation de la traduction sont inhibées, empêchant ainsi toute synthèse protéique globale ou spécifique.

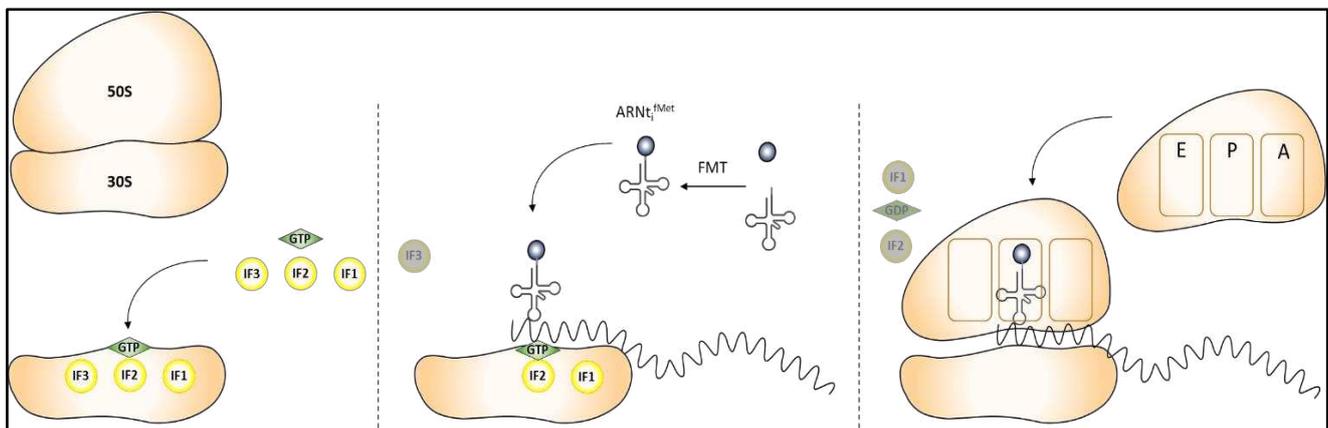


Figure 21 : Initiation de la traduction procaryote

Initiation de la traduction. La traduction est initiée par la séparation de la petite sous-unité 30S de la grande sous-unité 50S du ribosome par les facteurs d'initiation (IF) IF3 et IF1. Ce complexe, 30S-IF, se fixe sur la séquence Shine-Delgarno, région riche en purine et complémentaire à l'extrémité 3' de l'ARNr 16S. Ceci permet d'assurer le cadre de lecture et d'initier la traduction au niveau de l'AUG. Le facteur IF2 se lie à l'ARNt initiateur de la traduction, chargé avec une N-formylméthionine en 3' (ARNt^{fMet}), et avec du GTP. Il permet la liaison de l'anticodon UAC de l'ARNt^{fMet} à l'ARNm au niveau de l'AUG, ce qui entraîne la séparation du facteur IF3 du complexe 30S d'initiation de la traduction. La grande sous-unité 50S vient ensuite se fixer sur ce complexe, la molécule de GTP est hydrolysée et les facteurs IF sont détachés du complexe d'initiation 70S. Le ribosome possède 3 sites : le site A (aminoacyl) correspond à l'entrée des ARNt élongateurs de la traduction, le site P (polypeptide bound) permet la formation de la chaîne polypeptidique et le site E (exit) permet le relargage de l'ARNt déchargé de son acide aminé. L'ARNt^{fMet} initiateur est positionné au niveau du site P. L'élongation de la traduction peut alors commencer (Laursen et al., 2005)

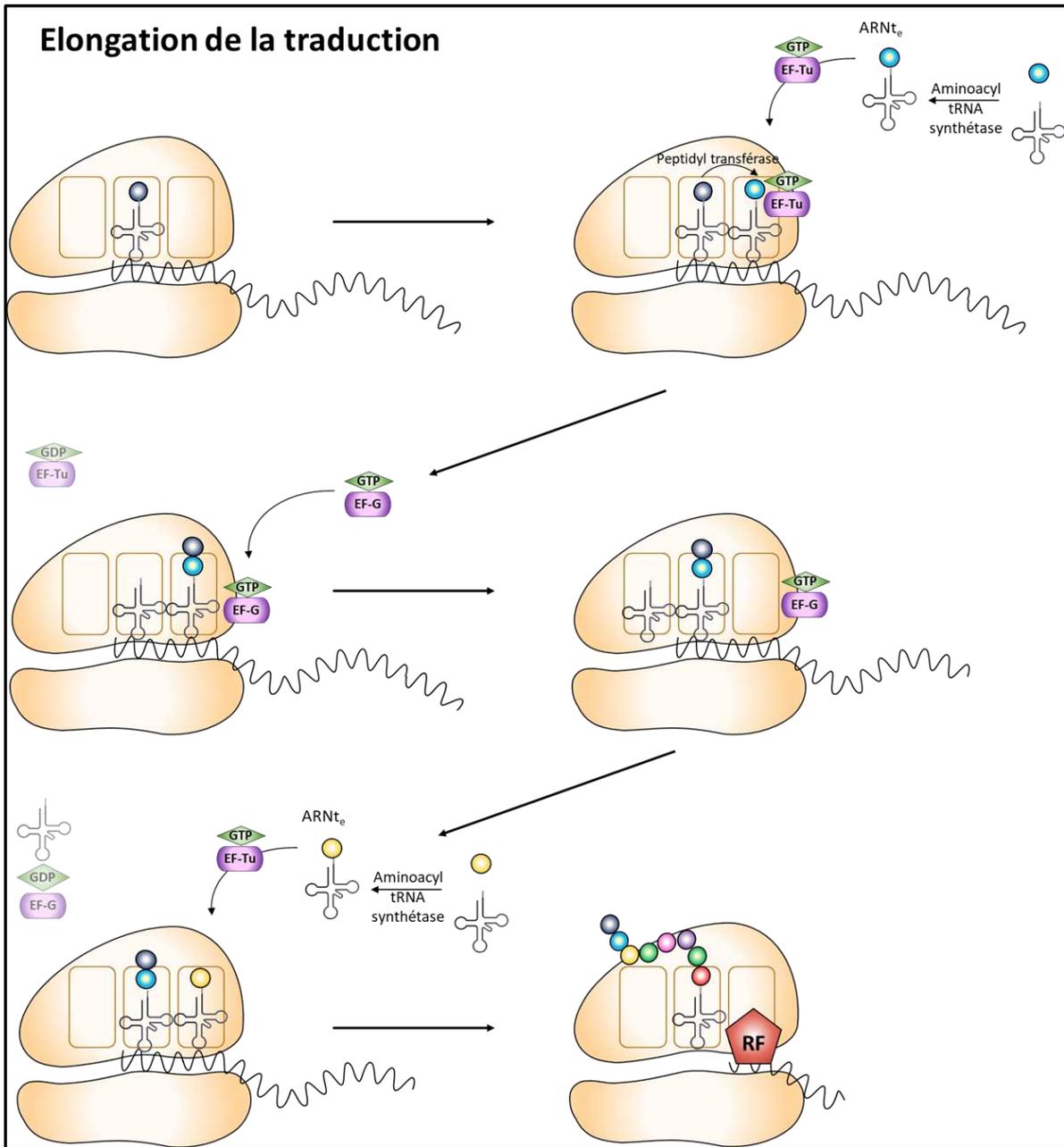


Figure 22 : Elongation de la traduction procaryote

Elongation de la traduction. L'élongation de la traduction est composée de 3 étapes : liaison de l'ARNt élongateur au ribosome, formation de la liaison peptidique entre acides aminés adjacents et déplacement du ribosome au prochain codon. Ainsi, un ARNt élongateur, chargé en acide aminé par une aminoacyl tRNA synthétase, forme un complexe avec le facteur d'élongation EF-Tu et une molécule de GTP. Le complexe ARNt-EF-Tu-GTP se fixe alors au niveau du site A du ribosome sur le deuxième codon de l'ARNm. La molécule de GTP est ensuite hydrolysée et le facteur d'élongation EF-Tu-GDP libéré le rendant disponible pour la suite de l'élongation. La liaison peptidique entre la méthionine et le nouvel acide aminé est catalysée par une transférase peptidique (qui est un ARN, appelé ribozyme) de la sous-unité 50S du ribosome. La formylméthionine est d'abord séparée de l'ARNt initiateur, au niveau du site P, puis elle se lie au niveau du site A à l'acide aminé suivant. Le ribosome, grâce au facteur d'élongation EF-G lié à une molécule de GTP, se déplace au codon suivant de l'ARNm par hydrolyse du GTP. Par conséquent, l'ARNt initiateur déchargé se retrouve au niveau du site E et l'ARNt élongateur au niveau du site P, libérant l'accès au site A pour un autre ARNt élongateur. L'ARNt situé sur le site E est alors éjecté du ribosome et le cycle de l'élongation peut continuer jusqu'à la liaison du site A du ribosome au codon stop de l'ARNm, permettant l'accrochage du facteur de terminaison (RF) (Steitz TA, 2008).

2) Les toxines Doc, HipA, HipT : activités kinases inhibitrices de la traduction

Les toxines Doc sont des kinases inhibitrices de l'élongation de la traduction, qui ont pour cible le facteur d'élongation EF-Tu. Les toxines HipA/HipT sont des kinases inhibitrices de la synthèse d'ARNt^{Glu} / ARNt^{Trp}, en ciblant la glutamyl tRNA synthétase et la tryptophanyl-tRNA synthétase respectivement.

a) Toxine Doc : kinase inhibitrice de l'élongation de la traduction

La toxine Doc, du système TA Phd/Doc (Prevents host death/Death on curing), a initialement été caractérisée lors du PSK, renforçant le maintien du plasmide P1 chez *E. coli* (Harms et al., 2016; Lehnherr et al., 1993). Les protéines Doc ont un domaine consensus proche du domaine FIC. Toutefois, ces protéines présentent une activité enzymatique différente des protéines Fic (Cruz et al., 2014). En effet, ce sont des kinases, capables d'autophosphorylation (forme inactive), très spécifiques, d'une cible unique : le facteur d'élongation EF-Tu. La phosphorylation sur un résidu conservé (Thr³⁸²) à l'extrémité C-terminale de ce facteur, inhibe la formation du complexe tertiaire ARNt:EF-Tu:GTP (Castro-Roa et al., 2013; Cruz et al., 2014), empêchant donc l'élongation de la traduction (**Figure 23A**). En revanche, ce mécanisme est réversible. En cas d'arrêt de la croissance (dormance), conduisant à des concentrations élevées en ADP ou GDP, Doc est capable de retirer la phosphorylation d'EF-Tu (activité phosphatase). Ce résultat suggère que ce mécanisme permettrait, par réactivation de la traduction, un retour de la croissance des bactéries en dormance (Castro-Roa et al., 2013) ou des cellules persistantes. Par exemple, chez *S. Typhimurium*, ce système TA est important dans la persistance des bactéries internalisées dans les macrophages (Helaine et al., 2014). De plus, le fait que les cellules surexprimant Doc soient plus petites (Lehnherr et al., 1993) et que le facteur EF-Tu joue également un rôle dans l'organisation du cytosquelette (Soufo et al., 2010), il est proposé que Doc puisse également affecter le cytosquelette bactérien (Castro-Roa et al., 2013; Harms et al., 2016).

b) Toxines HipA/HipT : kinases inhibitrices de la synthèse d'ARNt

La toxine HipA (high persistence) a été identifiée chez *E. coli* grâce à l'étude du mutant *hipA7* présentant une forte persistance après inhibition de la croissance lors d'une carence nutritionnelle ou d'ajout d'antibiotiques bactériostatiques (Moyed and Bertrand, 1983). HipA est une sérine/thréonine kinase qui, comme Doc est capable d'autophosphorylation (inactivation), et qui phosphoryle, grâce à l'ATP, le résidu Ser²³⁹ de la Glutamyl-tRNA synthétase (GltX), l'enzyme responsable du chargement de

l'acide aminé glutamate sur l'ARNt (Germain et al., 2013; Wen et al., 2014b). La phosphorylation de GltX empêche la charge des ARNt^{Glu} ce qui entraîne une augmentation de la concentration d'ARNt non chargés puis conduit à l'activation de RelA et à la production de l'alarmone (p)ppGpp, acteurs clé de la réponse stringente bactérienne (Figure 23B). La réponse stringente conduit à l'inhibition globale des métabolismes cellulaires et entraîne un arrêt de la croissance voire la formation de cellules persistantes (Germain et al., 2013; Kaspary et al., 2013). Ce phénotype est aboli lorsque GltX est surexprimée, notamment grâce à une inactivation par autophosphorylation de la toxine (Kaspary et al., 2013).

Récemment, ce mécanisme a été retrouvé pour le système TA à trois composantes d'*E. coli*, *hipBST* (HipB chaperon, HipS antitoxine, HipT toxine), ce qui permet d'agrandir la famille des toxines sérine/thréonine kinase. La toxine HipT, homologue de HipA, phosphoryle le résidu conservé Ser¹⁹⁷ de TrpS, la tryptophanyl-tRNA synthétase, et conduit à l'accumulation d'ARNt^{Trp} non chargés, activant la réponse stringente et favorisant la formation de cellules persistantes. La surexpression de TrpS abolit le phénotype. Ces deux enzymes, HipT et HipA, sont spécifiques puisqu'elles ne peuvent ni se phosphoryler entre elles ni phosphoryler leurs cibles respectives (Nielsen et al., 2019). La capacité des toxines HipA/HipT à phosphoryler GltX et TrpS a également été montrée chez *Caulobacter crescentus* (Huang et al., 2020).

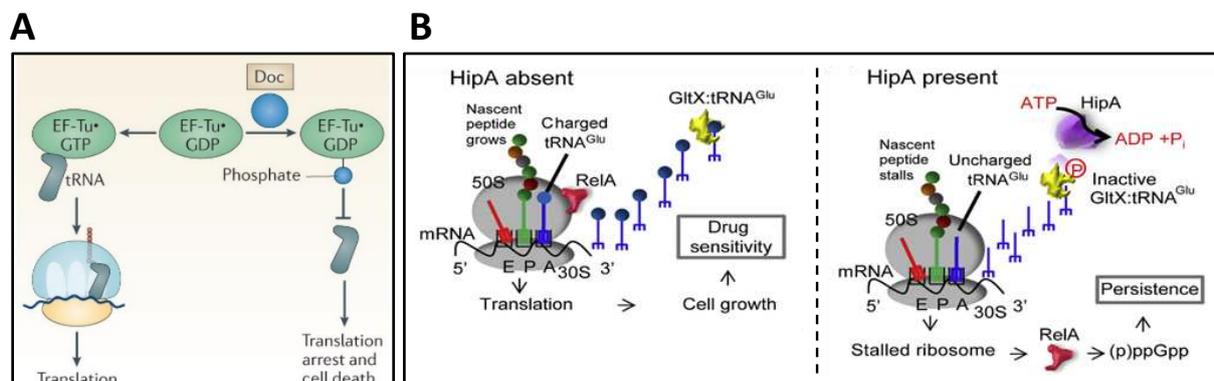


Figure 23 : Mécanisme d'inhibition de la traduction par les kinases Doc et Hip

A : Mécanisme d'inhibition de la traduction par Doc issu de Roy and Cherfils, 2015. Doc phosphoryle le facteur EF-Tu-GDP qui ne peut plus charger d'ARNt au niveau du site A du ribosome. La traduction est donc inhibée.

B : Mécanisme d'inhibition de la traduction par HipA issu de Germain et al., 2013. Lorsque la toxine HipA est active, une accumulation d'ARNt non chargés entraîne le blocage du ribosome sur l'ARNm puisque la liaison peptidique ne peut plus avoir lieu. La réponse stringente est alors activée, ce qui permet l'activation de la production de l'alarmone ppGpp par RelA. Les processus cellulaires vitaux étant arrêtés par mise en dormance des bactéries favoriseraient la formation de cellules persistantes.

3) Les toxines à activité acétyltransférase ciblant les ARNt

Les toxines ayant une activité acétyltransférase vont transférer un groupement acétyle depuis l'acétyl-coenzyme A (Ac-CoA) vers le groupement amine de l'acide aminé chargé sur l'ARNt au niveau du site d'attachement (en 3') du ribosome en cours d'élongation. Cette acétylation empêche donc la liaison peptidique entre deux acides aminés, ou la reconnaissance de l'ARNt^{fMet} par IF2, et inhibe ainsi la traduction de manière partielle ou globale en fonction de l'ARNt acétylé (Jurénas et al., 2017).

Il existe à ce jour trois familles de toxines de type II ayant une activité acétyltransférase : AtaT, TacT et ItaT ciblant respectivement l'ARNt^{fMet}, les ARNt^{Gly/Ser/Ile/Trp} (majoritairement) et l'ARNt^{Ile}. Elles agissent sous forme de dimères et sont très proches structurellement.

a) TacT

TacT (tRNA-acetylating toxin) a été la première toxine à activité acétyltransférase d'ARNt, identifiée chez *Salmonella Typhimurium*. L'acétylation du groupement amine de l'acide aminé chargé sur l'ARNt empêche la liaison peptidique, entre cet ARNt chargé sur le site A et le groupement carboxyle de l'ARNt chargé au niveau du site P du ribosome (Figure 22). L'élongation de la traduction est alors inhibée. En revanche, il existe un mécanisme de réversibilité de l'acétylation par TacT des ARNt chargés. En effet, la Peptidyl-tRNA hydrolase (Pth), une estérase essentielle et ubiquitaire recyclant les ARNt en cas de terminaison prématurée de la traduction, déacétyle les ARNt après expression de TacT (Figure 24A) (Cheverton et al., 2016). De plus, TacT peut acétyle son antitoxine TacA ce qui favorise l'activité de la toxine. Enfin, la protéine CobB, déacétylase protéique non-spécifique, peut réverser l'acétylation de l'antitoxine TacA, et donc contribuer à la neutralisation de la toxicité (Cheverton et al., 2016). D'autres TacT ont été caractérisées chez *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium*. Elles ciblent principalement les ARNt glycine, sérine, isoleucine et tryptophane (Figure 24B) (Rycroft et al., 2018).

b) ItaT

ItaT est une toxine acétyltransférase spécifique des ARNt^{Ile} chez *E. coli*. Comme TacT, elle inhibe l'élongation de la traduction mais de manière plus spécifique car elle n'acétyle que les deux ARNt d'isoleucine présents chez *E. coli*, en présence d'Ac-CoA. Ces résultats suggèrent que le groupe aminoacyle de l'ARNt est le principal déterminant de la spécificité de ItaT plutôt que l'ARNt lui-même (Wilcox et al., 2018).

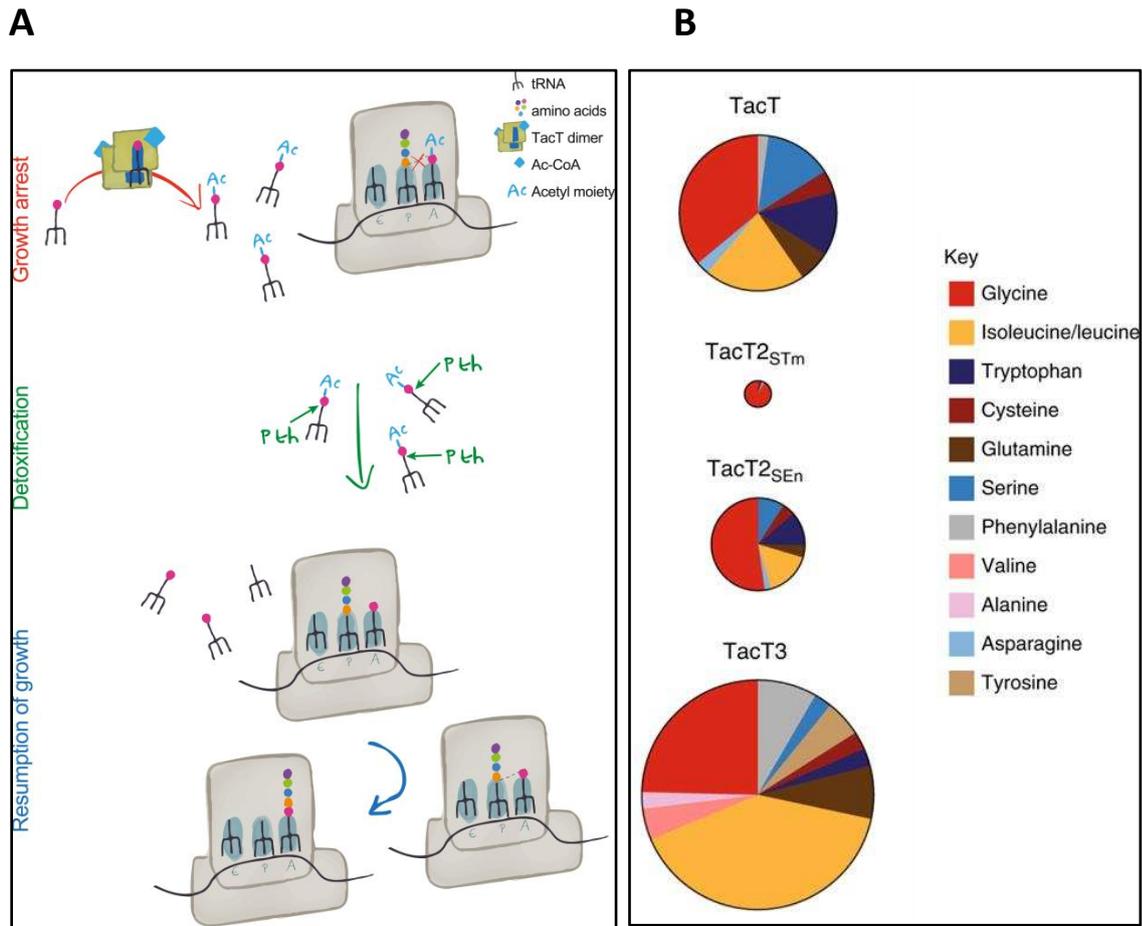


Figure 24 : Structure et mécanisme de TacT

A : Mécanisme de réversibilité de l'acétylation des ARNt-AA issu de Cheverton et al., 2016. Les ARNt chargés en acides aminés (AA) sont acétylés par les dimères de toxines TacT à domaine GNAT (GCN5-related N-acétyltransférase), possédant une activité acétyltransférase, par le transfert d'un groupement acétyle depuis l'acétyl-CoA. Ces ARNt-AA acétylés sont incapables d'effectuer la liaison peptidique lors de l'élongation de la traduction, ce qui entraîne l'arrêt de la croissance. L'estérase Peptidyl-tRNA hydrolase (Pth) est capable d'hydrolyser la liaison acétyl-AA et permet donc la détoxification des ARNt-AA acétylés. Les ARNt-AA déacétylés peuvent donc de nouveau effectuer la liaison peptidique entre acides aminés lors de l'élongation de la traduction, permettant un retour de la croissance.

B : Les ARNt cibles des TacT issus de Rycroft et al., 2018. STm : Salmonella Typhimurium et SEn : Salmonella Enteritidis. La taille des diagrammes représente les quantités relatives d'acétylation des acides aminés.

c) AtaT

AtaT est la seconde toxine de cette famille identifiée, chez *E. coli*. Elle cible spécifiquement l'ARNt^{fMet}. L'acétylation de cet ARNt, avant l'ajout du groupement formyle, sur le groupement aminé de la méthionine chargée, empêche sa reconnaissance par le facteur d'initiation de la traduction IF2 (**Figure 25**). Ce dernier ne peut donc pas se fixer au site P du ribosome ce qui rompt la formation du complexe d'initiation de la traduction (30S). Cette toxine a été proposée comme compétiteur de la FMT (L-methionyl-tRNA^{fMet}-N-formyltransferase), enzyme responsable de la formylation des Met-ARNt^{fMet}, réduisant le pool d'ARNt initiateurs disponibles. En revanche, contrairement à TacT, aucun mécanisme de réversibilité de l'acétylation des ARNts n'a pu être identifié (Jurenas et al., 2017; Jurénas et al., 2019; Van Melderen et al., 2018).

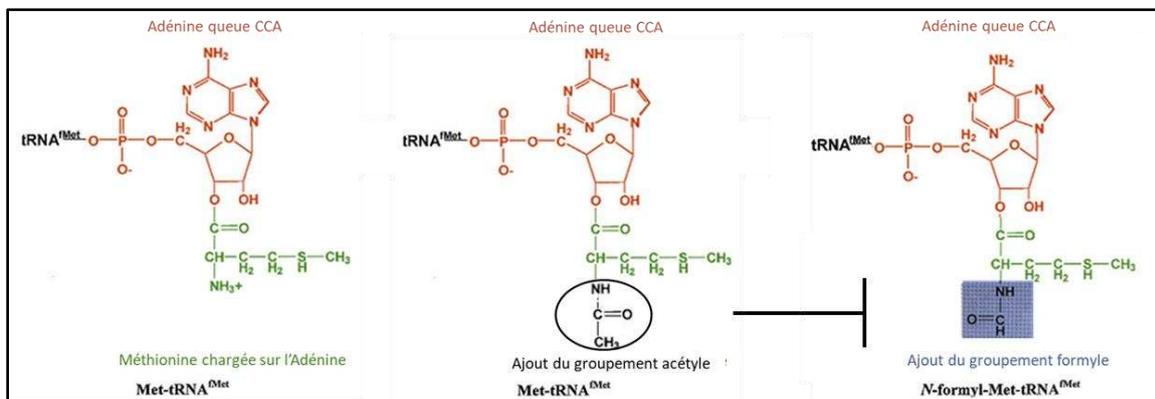


Figure 25 : Mécanisme d'action de la toxine AtaT

Différences entre le Met-ARNt^{fMet}, l'N-formyl-Met-ARNt^{fMet} et l'Ac-Met-ARNt^{fMet}. Structures adaptées de The Crankshaft Publishing. L'ARNt^{fMet} lie l'acide aminé méthionine (vert), devenant alors Met-tRNA^{fMet} au niveau de l'adénine (orange) appartenant au site d'attachement ou queue CCA de l'ARNt. La toxine AtaT va acétyler le groupement amine de la méthionine (noir) ce qui inhibe la formylation de l'ARNt-méthionine (bleu) au même endroit.

Par analyse bioinformatique des groupes TacT/AtaT/ItaT (1% des GNAT-related), 5 clades de GNAT (GCN5-related N-acétyltransférase) ont pu être identifiés, retrouvés près de régulateurs transcriptionnels antitoxine-like, dont trois correspondant à TacT ou AtaT ou ItaT. Les deux clades restants, n'ayant pas de membres validés, pourraient constituer des acétyltransférases avec de nouvelles spécificités (Wilcox et al., 2018).

En conclusion, nous avons vu que les acétyltransférases, identifiées à ce jour, ont une structure conservée mais présentent des différences de spécificité dans les cibles et les mécanismes de détoxification. AtaT est très spécifique de l'ARNt initiateur et inhibe la formation du complexe d'initiation de la traduction, ItaT est spécifique pour les ARNt d'isoleucine tandis que TacT peut cibler

différents ARNt. Dans ce cas, c'est l'élongation de la traduction qui est inhibée (Van Melder et al., 2018).

Les différences rencontrées entre ces toxines suggèrent des fonctions différentes. TacT, activée lors de l'entrée des bactéries au sein des macrophages, augmente la résistance aux antibiotiques et favorise la formation de cellules persistantes. Les mécanismes de détoxification pourraient permettre un retour de croissance (Cheverton et al., 2016; Rycroft et al., 2018). Le système AtaRT serait impliqué dans d'autres processus que la persistance car aucun mécanisme de réversibilité n'a été identifié (Jurénas et al., 2019; Van Melder et al., 2018). La toxine KacT, GNAT identifiée chez *Klebsiella pneumoniae* dont la cible n'a pas encore été identifiée, est activée en réponse à des stress antibiotiques et favorise la tolérance bactérienne à ces molécules (Qian et al., 2018, 2019).

4) Les toxines à activité RNase

- a) RNases ribosome-dépendantes ciblant l'ARNm : RelE, RelE-like (HigB, YoeB, YafQ, YafO et l'exception MqsR)

La première toxine à activité RNase identifiée, RelE, chez *E. coli* (2001), a permis, par homologie de structure/fonction/organisation génique, l'identification d'homologues.

Les toxines RelE-like sont de petites protéines (~8–13 kDa), avec un repliement conservé chez les RNases microbiennes, à savoir un feuillet β attaché à deux/quatre hélices α , et un site actif concave pouvant présenter des variations entre les membres de cette famille (Goeders et al., 2013; Maehigashi et al., 2015; Schureck et al., 2016). Ces toxines ribosomes-dépendantes reconnaissent le phosphate scissile de leur substrat ARNm au niveau du site A du ribosome et coupe entre le 2^{ème} et le 3^{ème} nucléotide du codon, en 3' (Griffin et al., 2013; Schureck et al., 2015). Ces toxines sont dites « ribosome-dépendante » car leur activité RNase n'est possible qu'en présence de ribosome, donc lors de la traduction. Il s'agit de monomères, à l'exception de la toxine YoeB d'*E. coli*, la seule toxine dimérique RNase ribosome-dépendante. Bien qu'un monomère soit suffisant pour conférer l'activité RNase, la formation de dimère permet une meilleure stabilisation thermique (Pavelich et al., 2019).

Ces toxines ciblent l'ARNm avec une spécificité de codon variable. Pour certains membres de cette famille, il semble que la position du codon soit plus importante dans la reconnaissance enzyme-substrat que le codon lui-même. Par exemple, la toxine **RelE** n'a pas de spécificité de codon (Hurley et al., 2011) mais une préférence pour cliver entre un C et un G (Hwang and Buskirk, 2017). En revanche,

la structure conservée du site actif ([Lys⁵²](#), [Lys⁵⁴](#), [Arg⁶¹](#), [Arg⁸¹](#), et [Tyr⁸⁷](#)) lui confère une spécificité non pas pour un codon, mais pour la position de la liaison entre le phosphate scissile de l'ARNm et la sous-unité 16S du ribosome chez *E. coli* K12 (Burbank and Stenger, 2017; Griffin et al., 2013). La toxine **YoeB** ([Glu⁴⁶](#), [Arg⁵⁹](#), [Glu⁶³](#), [Arg⁶⁵](#), [His⁸³](#) et [Tyr⁸⁴](#)) n'a pas de forte spécificité de codon non plus, elle coupe principalement l'ARN, entre le codon initiateur et le deuxième codon ou au niveau du codon stop, au niveau du site A du ribosome (Christensen et al., 2004; Pavelich et al., 2019). Des homologues RelE présentant une même activité RNase ribosome-dépendante et un site actif avec des résidus conservés (sans forte spécificité de clivage), ont été décrites chez des espèces éloignées (α -/ γ -Protéobactéries, Spirochaetes, Cyanobactéries et Actinobactéries) (Goeders et al., 2013). Le mécanisme d'action des RelE est donc conservé au sein du règne procaryote (Ferrari et al., 2019).

D'autres membres de cette famille arborent une meilleure spécificité de codon. La toxine **YafQ** d'*E. coli* (site actif : [His⁵⁰](#), [His⁶³](#), [His⁸⁷](#), [Asp⁶¹](#), [Asp⁶⁷](#) et [Phe⁹¹](#)) a une préférence pour les codons AAA (Ferrari et al., 2019; Maehigashi et al., 2015; Prysak et al., 2009). La toxine **HigB** ([His⁵⁴](#), [Arg⁷³](#), [Asp⁹⁰](#), [Tyr⁹¹](#) et [His⁹²](#)) de *P. vulgaris* a une préférence pour les codons riches en adénosine (Hurley and Woychik, 2009). En effet, HigB coupe entre le deuxième (C ou A) et le troisième nucléotide du codon ARN (AAA, ACA) (Schureck et al., 2015, 2016).

Bien qu'apparentée à la toxine RelE, **MqsR** (Motility quorum-sensing regulator), également appelée YgiU (site actif: [Lys⁵⁶](#), [Gln⁶⁸](#), [Tyr⁸¹](#), et [Lys⁹](#)) (Brown et al., 2009), dégrade l'ARN de manière **ribosome-indépendante** (Brown et al., 2009; Christensen-Dalsgaard et al., 2010; Goeders et al., 2013; Sun et al., 2017). Elle est donc position-indépendante mais séquence-spécifique et, de plus, elle arbore une préférence pour les séquences GC(N) chez *E. coli*, et peut dégrader les codons d'ARNm et les précurseurs d'ARNr (Mets et al., 2017, 2019). D'autres toxines apparentées à RelE mais ribosome-indépendante ont été identifiées. Il s'agit des toxines BrnT ([Asp⁶](#), [Glu⁷](#), [Lys⁹](#), [Arg⁴¹](#), and [Glu⁷⁸](#)) de *Brucella abortus* (Heaton et al., 2012; Lee and Lee, 2016) et HP0894 ([Lys⁵²](#), [Glu⁵⁸](#), [Asp⁶⁴](#) et [Arg⁸⁰](#)) d'*Helicobacter pylori* (Cárdenas-Mondragón et al., 2016; Han et al., 2011; Pathak et al., 2013).

Enfin, la toxine **YafO**, qui a aussi une conformation de type RNase microbienne appartenant à la famille RelE (Christensen-Dalsgaard et al., 2010) constitue une super-famille à part. En effet, il s'agit de la seule toxine ribosome-dépendante à ne pas couper l'ARN au niveau du site A du ribosome mais au niveau de l'entrée de l'ARN dans le tunnel (Zhang et al., 2009). Cette toxine n'a pas de spécificité de codon, liée à la sous-unité 50S du ribosome, elle dégrade l'ARNm 11 à 13 nucléotides après le codon initiateur.

La flexibilité de la spécificité de séquence du codon des toxines à activité RNase-ribosome dépendante permet une inhibition globale de la traduction et semble ainsi favoriser l'adaptation rapide des bactéries aux stress environnementaux (Goeders et al., 2013). Par exemple, en condition de carence en acide aminé, **RelE** est fortement induite, ce qui permet d'inhiber totalement la traduction (Christensen et al., 2001). La production de YafQ est plus importante à basse température (18°C) chez *E. coli* et donc plus efficace à réduire l'activité métabolique cellulaire (Zhao et al., 2016). Des homologues de HigB (GraT) chez *Pseudomonas putida*, retrouvée dans des environnements hautement pollués, semblent également activés à basse température et peuvent augmenter la résistance à des antibiotiques (Sun et al., 2017). Ces systèmes pourraient donc être impliqués dans la régulation de la formation de biofilm et dans la persistance, notamment par le biais d'adaptations spécifiques à des stress environnementaux, grâce à une reprogrammation métabolique rapide.

b) RNases ribosome-indépendantes : HicA, MazF, VapC

b.1 HicA

La toxine **HicA** a été identifiée chez *Haemophilus influenza*, proche de l'îlot de pathogénicité *hif*, d'où le nom *hic* (*hif* contigous). Les toxines HicA sont des petites protéines qui ont un domaine de liaison à l'ARN **double brin**, α - β - β - α , (Kim et al., 2018). Ce sont des RNases ribosome-indépendantes, qui ciblent l'ARNm db sans motif particulier, l'ARNtm (ARN hybride transfert-messager), possédant des structures double brin, au niveau de deux sites A' AAC (validées *in vivo* (Daimon et al., 2015; Jørgensen et al., 2009)), et l'ARNr (validations *in vitro* (Thomet et al., 2019)). Leur site actif, déterminé notamment chez *Yersinia pestis*, *Burkholderia pseudomallei*, *E. coli* et *S. pneumoniae*, contient un résidu **histidine** conservé nécessaire à l'activité RNase (Bibi-Triki et al., 2014; Butt et al., 2014; Daimon et al., 2015; Kim et al., 2018). L'activité RNase, conduisant à un arrêt de la traduction, procure un effet bactériostatique, en accord avec la persistance, et permet une réversibilité de l'arrêt de croissance (Turnbull and Gerdes, 2017). Ces systèmes, largement présents dans le règne procaryote, sont impliqués dans la réponse aux stress, la virulence et la persistance (Thomet et al., 2019).

b.1 MazF

Les toxines **MazF/PemK** sont des petites protéines globulaires contenant un domaine PemK-like (**deux feuillets β** , dont un à 5 brins, et **trois/quatre hélices α**), très conservé. Elles présentent un site actif, de **charge positive**, possédant des résidus (Arg/Lys)/(Thr/Ser), très conservés entre espèces éloignées, nécessaires à l'activité RNase (Hoffer et al., 2017). La dégradation d'ARN par MazF implique

un mécanisme de relais de charge de proton où l'arginine, ou la lysine, fonctionne à la fois comme un acide et comme une base. La sérine ou la thréonine stabilise les états de transitions (Ahn et al., 2017). La toxine MazF exerce son activité RNase sous forme de dimère, permettant la formation d'une poche où l'ARN est lié (Zorzini et al., 2016).

Les cibles ARN reconnues par les toxines **MazF** ainsi que la longueur minimale du motif sont parfois très différentes, même au sein d'une seule espèce bactérienne et avec la même technique d'identification (Tableau 5) (Schifano and Woychik, 2017). Ainsi certaines MazF de *M. tuberculosis* sont spécifiques car elles ne dégradent que des ARNt (MazF-mt4/mt11), ou que des régions simple brin de l'ARNr 16S (MazF-mt10), alors que d'autres sont capables de dégrader tout type d'ARN (MazF-mt7) (Greendyk, 2017). La longueur des séquences reconnues varie de 3 à 7 bases, sachant que la structure de l'ARN peut également intervenir dans la reconnaissance (Schifano and Woychik, 2017) (Figure 26).

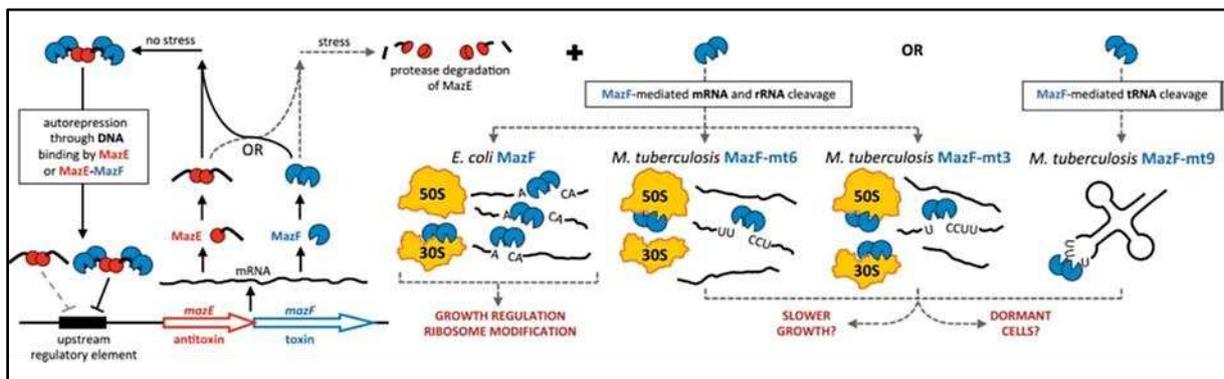


Figure 26 : Cibles de MazF et réponses biologiques, issues de Schifano and Woychik, 2017

Une fois active, la toxine MazF peut dégrader des ARNm, en reconnaissant un site spécifique de l'espèce considérée, des ARNr différents, ou encore des ARNt. Chez *E. coli*, MazF clive le site A'CA des ARNm et l'ARNr 16S dans la sous-unité 30S du ribosome. Chez *M. tuberculosis*, MazF-mt6 clive le site UU'CCU des ARNm et l'ARNr 23S dans la sous-unité 50S du ribosome tandis que MazF-mt3 peut dégrader l'ARNm au niveau de la séquence U'CCUU, et les deux ARNr (16S et 23S), et MazF-mt9 dégrade les ARNt^{Lys} au niveau de la boucle de l'anticodon UUU.

Toxines	Sources	Séquences consensus	ARNm	ARNr	ARNt	ARNtm	Techniques	Références
MoxT	<i>B. anthracis</i>	U [^] ACAU	+				primer extension	(Verma and Bhatnagar, 2014)
MazF-bs	<i>B. subtilis</i>	U [^] ACAU	+				primer extension	(Park et al., 2011)
MazF	<i>D. radiodurans</i>	UACA	?	?	?	?	Massive Parallel Sequencing	(Miyamoto et al., 2017)
MazF-ec	<i>E. coli</i>	A [^] CA ou N [^] ACA	+	16S			primer extension	(Zhang et al., 2003)
ChpBK	<i>E. coli</i>	[^] ACY and A [^] CY	+				primer extension	(Zhang et al., 2005)
Kid (PemK)	<i>E. coli R100 and R1 plasmid</i>	U [^] AH and UA [^] H UU [^] ACU	+				primer extension	(Pimentel et al., 2005).
MazF-hw	<i>H. walsbyi</i>	UU [^] ACUCA	+				primer extension	(Yamaguchi et al., 2012)
MazF	<i>L. pneumophila</i>	AACU	+				primer extension	(Akiyama et al., 2020)
MazF-Me	<i>M. evestigatum</i>	(U/C) [^] UGGU	+				primer extension	(Ishida et al., 2019)
MazF-mt1	<i>M. tuberculosis</i>	U [^] AC	+				primer extension	(Zhu et al., 2006)
MazF-mt3	<i>M. tuberculosis</i>	U [^] CCUU	+	16S, 23S	-	-	MORE RNA-seq	(Schifano et al., 2014)
MazF-mt4	<i>M. tuberculosis</i>	ARNt ^{Thr}	-	-	+	-	MORE RNA-seq	(Greendyk, 2017),
MazF-mt6	<i>M. tuberculosis</i>	UU [^] CCU	+	23S			primer extension	(Schifano et al., 2013)
MazF-mt7	<i>M. tuberculosis</i>	U [^] CGCU	+	16S, 23S			primer extension	(Zhu et al., 2008)
	<i>M. tuberculosis</i>	nd	+	16S, 23S	+	-	MORE RNA-seq	(Greendyk, 2017)
MazF-mt9	<i>M. tuberculosis</i>	UU [^] U	+	-	+	-	MORE RNA-seq	(Schifano et al., 2016)
MazF-mt10	<i>M. tuberculosis</i>	CACCU	-	16S	-	-	MORE RNA-seq	(Greendyk, 2017)
MazF-mt11	<i>M. tuberculosis</i>	nd	-	-	+	-	MORE RNA-seq	(Greendyk, 2017)
MazF-mx	<i>M. xanthus</i>	GU [^] UGC	+				primer extension	(Nariya et al., 2008)
MazF-pp	<i>P. putida</i>	U [^] AC					Massive Parallel Sequencing	(Miyamoto et al., 2016)
MazF	<i>S. aureus</i>	UACAU	+				primer extension	(Zhu et al., 2009)
MazF	<i>S. equorum</i>	U [^] ACAU	+				primer extension	(Schuster et al., 2013)

Tableau 5 : Liste non exhaustive des cibles ARN des toxines MazF (ChpBK et PemK)

Différentes techniques ont permis l'identification des cibles MazF. La technique la plus couramment utilisée est celle de l'extension d'amorces réalisée *in vitro*, en blanc. La technique du MORE (Mapping by Overexpression of an RNase in *E. coli*) RNA-seq, en vert, permet d'identifier des cibles *in vivo*, chez un hôte le plus souvent hétérologue (*E. coli*) dans lequel la surexpression de la toxine est réalisée, suivi d'un séquençage des ARN (5' RNA-seq) qui permet d'identifier les sites de coupure ARN générés par la toxine. Enfin, une technique récente appelée Massive Parallel Sequencing, en rose, consiste à définir le site consensus de clivage de la toxine en séquençant des ARNs synthétiques, possédant un barcode, clivés par la toxine. Y : C ou U ; H : A, C ou U. (+) ARN clivé, (-) ARN non clivé.

Le rôle biologique des toxines **MazF** est encore discuté. En effet, la capacité de MazF à induire la mort cellulaire programmée à forte concentration, n'a pas encore été démontrée à doses « physiologiques » (Song and Wood, 2018). Certaines études montrent l'implication de MazF dans la production d'un facteur extracellulaire de mort (EDF), un pentapeptide généré lors du blocage du ribosome à traduire un ARN dégradé (Ahn et al., 2017; Nigam et al., 2018). Cet aspect est critiqué car le pentapeptide pourrait être simplement lié à la présence d'un antibiotique, absent dans des conditions physiologiques. Il est en effet important de souligner, que beaucoup d'études concernant le rôle des systèmes TA ont été menées via la surexpression de la toxine. Le phénotype observé n'est peut-être pas toujours directement lié à la toxine ou pas physiologiquement réaliste dans un contexte sauvage.

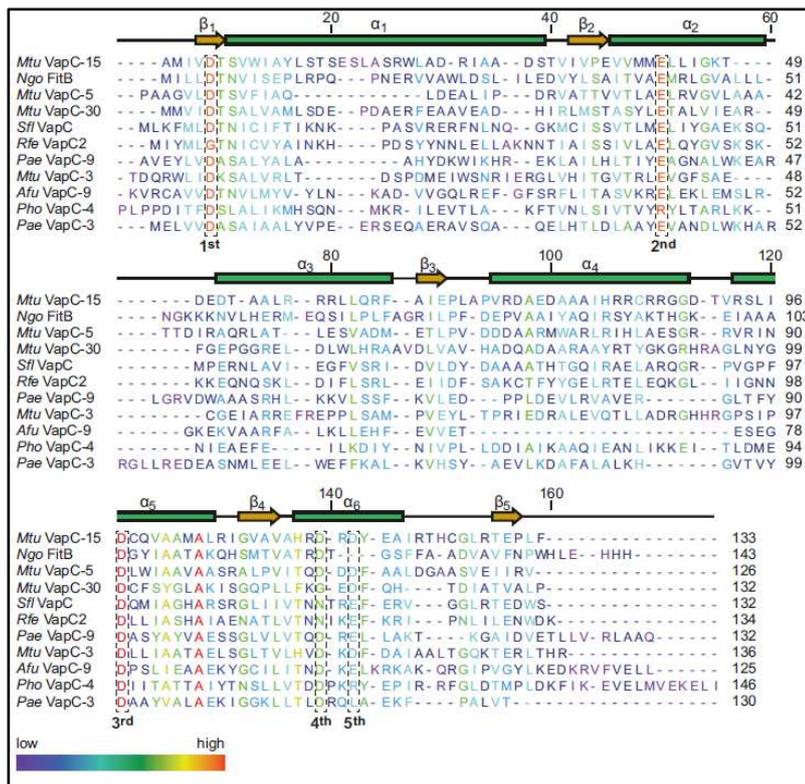
En revanche, les analyses transcriptomiques obtenues à partir de bactéries en situation de stress révèlent une expression différentielle significative des systèmes TA, dont les systèmes MazEF par exemple chez *M. tuberculosis* (Gupta et al., 2017), montrant un lien clair de leur activation en réponse aux stress. Enfin, d'autres études utilisent la perte de fonction de la toxine pour l'analyse phénotypique. Ainsi, chez *S. aureus*, un mutant *mazF* entraîne une augmentation de la masse du biofilm et une perte de la tolérance aux antibiotiques (Ma et al., 2019). Par conséquent, MazF jouerait un rôle dans la formation de biofilm et la tolérance aux antibiotiques

b.3 VapC

A l'origine, les toxines **VapC** (Virulence Associated Protein) ont été identifiées chez le pathogène ovin *Dichelobacter nodosus*, comme favorisant sa virulence, d'où leur nom. Elles correspondent à un domaine PIN (PiIT N-terminal domain) ayant une structure fortement conservée, d'environ 130 acides aminés, et leur repliement ressemble à celui de la RNase H (Arcus et al., 2011). Le « core » correspond à un sandwich α - β - α à 3 couches, contenant un feuillet β central à 5 brins, associés à des hélices α et des brins β alternatifs, renfermant une poche catalytique **acide**, de **charge négative** stabilisée par un ou deux ions divalents, permettant l'activité ribonucléasique (Figure 27) (Arcus et al., 2011; Cook et al., 2013). La majorité des VapC caractérisées contiennent entre 3 et 5 acides aminés acides fortement conservés permettant la liaison à l'ion divalent, majoritairement Mg^{2+} et Mn^{2+} mais pouvant être également du Ca^{2+} , nécessaire à l'activité RNase (Bendtsen and Brodersen, 2017; Park et al., 2020). Des résidus polaires sont retrouvés à une position +1/+2 du premier acide aminé acide et permettent la structuration du site actif avec l'acide aminé acide voisin, essentielle à la catalyse. Comme pour MazF, les toxines VapC/PIN sont organisées en homodimère, ce qui forme une poche concave où l'ARN est clivé (Deep et al., 2017). Parfois, les toxines forment des tétramères où les sites actifs sont positionnés

au sein d'un tunnel dans lequel l'ARN est lié, comme chez *Pyrobaculum aerophilum* (Arcus et al., 2011). Toutefois, aucune publication ne montre la toxine complexée à sa cible, soulevant la question de la conformation active en homodimère ou non, et si oui, l'utilisation de chaque site actif pour le clivage/la liaison/la reconnaissance de l'ARN cible (Bendtsen and Brodersen, 2017).

A



B

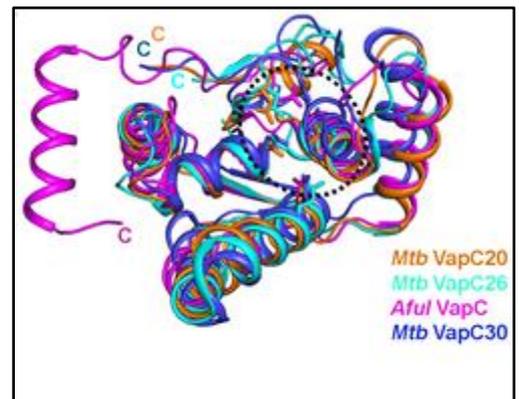


Figure 27: Conservation des acides aminés du site actif et de la structure 3D des VapC

A : Conservation des acides aminés du site actif des toxines VapC, issue de Bendtsen and Brodersen, 2017. Un alignement des séquences primaires protéiques permet de constater que les toxines VapC, issues d'espèces bactériennes différentes, possèdent toutes, et certaines jusqu'à cinq (vert), trois acides aminés très conservés (encadrés en pointillé). De plus, elles possèdent toutes une structure secondaire composée de 5 feuillets β et 6 hélices α .

B : Conservation de la structure tridimensionnelle des toxines VapC, issue de Deep et al., 2017. La superposition des toxines VapC de *Archaeoglobus fulgidus* et de VapC20, VapC26 et VapC30 de *M. tuberculosis* montre une forte conservation de la structure tridimensionnelle.

La famille VapBC est la famille de système TA la plus distribuée dans le règne procaryote et VapC est la seule toxine de système TA à posséder un domaine PIN (Arcus et al., 2011).

L'identification des cibles des VapC est très dépendante de la technique utilisée. A l'origine, par des expériences *in vitro* et/ou d'extension d'amorces, les VapC ont été décrites comme dégradant l'ARNm, au niveau d'un motif de reconnaissance de 3 à 7 nucléotides. Grâce aux nouvelles techniques

de séquençage de l'ARN *in vivo*, les VapC sont, dans la majorité des cas, identifiées comme des tRNAses reconnaissant la structure tige-boucle de l'ARNt, et dans un cas comme une rRNase, ciblant la boucle sarcine de l'ARNr 23S (**Tableau 6**). A titre d'exemple, la toxine VapC-mt11 de *M. tuberculosis* dégrade 15 des 45 ARNt de *M. tuberculosis in vitro* et seulement deux (ARNt^{Leu}/ARNt^{Gln}) *in vivo* (Cintrón et al., 2019). Ce résultat souligne l'importance de la technique d'identification des cibles qui doit être le plus proche possible de la réalité physiologique. Enfin, différentes toxines VapC, pour un même organisme, présentent des différences dans leur spécificité de clivage. Par exemple, l'utilisation du CRAC système (UV-induced RNA-protein crosslinking and analysis of cDNA), qui séquence l'ADNc d'un ARN « piégé » par une toxine VapC de *M. tuberculosis* chez *M. smegmatis*, montre que des VapC issues d'un même organisme peuvent cibler des ARNt différents ; et de manière intéressante avoir des cibles communes entre VapC d'un même groupe phylogénétique, groupe identifié par comparaison des séquences primaires des toxines (Winther et al., 2016). La mise en évidence des différences de structure du complexe VapC : ARN permettra d'apporter une meilleure compréhension de la spécificité de reconnaissance. Concernant la redondance fonctionnelle entre VapC ciblant le même ARN, cela peut s'expliquer par le fait qu'elles n'interviennent pas au même moment puisqu'en effet des études montrent une induction spécifique de VapCs en fonction du stress appliqué. Par exemple, VapC-mt15 et VapC-mt11 ont les mêmes cibles (Winther et al., 2016) mais sont induites spécifiquement lors d'un stress hypoxie ou lors de l'infection des macrophages, respectivement (Ramage et al., 2009).

Toxines	Sources	Séquences consensus	ARNm	ARNr	ARNt	ARNtm	Techniques	REF
VapC	<i>M. smegmatis</i>	AU^AW-hairpin-G-	+				pentaprobés	(McKenzie et al., 2012)
VapC-mt1	<i>M. tuberculosis</i>	(G/C)G(G/C)(G/C/A)	?	?	?	?		(McKenzie et al., 2012)
VapC-mt29		(G/C)G(G/C)(G/C/A)	?	?	?	?		
VapC-PAE0151	<i>P. aerophilum</i>	GG^(U/G)G	?	?	?	?		
VapC-PAE2754			?	?	?	?		
VapC-mt1	<i>M. tuberculosis</i>	GC-rich 4mer	?	?	?	?		(Sharrock et al., 2018)
VapC-mt19		?	?	?	?	?		
VapC-mt27		UA^GG	?	?	?	?		
VapC-mt29		GC-rich 4mer	?	?	?	?		
VapC-mt39		UA^GG	?	?	?	?		
VapC-mt11	<i>M. tuberculosis</i>	ASL GG^(A/U) ARNt ^{Leu(CAG)} /ARNt ^{Gln(CUG)}	-	-	+	-	RNA-seq	(Cintrón et al., 2019)
VapC-hi1	<i>H. influenzae</i>	ASL of ARNt ^{fMet} A↓AU	-	-	+	-	MORE RNA-seq	(Walling and Butler, 2018)
VapC-hi2		ASL of ARNt ^{fMet} A↓AU	-	-	+	-		
VapC	<i>S. flexneri 2a and S. enterica</i>	ASL of ARNt ^{fMet} AA↓U	-	-	+	-	primer extension	(Winther and Gerdes, 2011)
VapC	<i>L. interrogans</i>	ASL ARNt ^{fMet}			+		<i>In vitro</i>	(Lopes et al., 2014)
VapC-mp4	<i>M. prunae</i>	GAAG	+	+			primer extension	(Mukherjee et al., 2017)
VapC-mp7		(A/U)AG(G)A	+	+				
VapC-mp8		(U/G)AAU	+	+				
VapC-mt4	<i>M. tuberculosis</i>	ASL ARNt ^{Cys(GCA)} , C ³⁴ ↓A ³⁵ , A ³⁵ ↓A ³⁶ , A ³⁶ ↓A ³⁷ et A ³⁷ ↓G ³⁸	-	-	+	-	CRAC-Ms	(Winther et al., 2016)
VapC-mt11		ASL ARNt ^{Leu(CAG)/(GAG)} (et ARNt ^{Gln(CUG)} chez M.s), G ³⁷ ↓U ³⁸ , et U ³⁸ ↓G ³⁹	-	-	+	-		
VapC-mt28/30		ASL ARNt ^{Ser(TGA)/(CGA)} , G ³⁶ ↓A ³⁷	-	-	+	-		
VapC-mt29/37		ASL ARNt ^{Trp(CCA)} A ³⁶ ↓A ³⁷ , A ³⁷ ↓A ³⁸ et A ³⁸ ↓A ³⁹	-	-	+	-		
VapC-mt26		GAG^A	-	23S sarcin loop	-	-	Northern Blot	(Winther et al., 2013))
VapC-mt20								

Tableau 6 : Liste non exhaustive des cibles ARN de la toxine VapC

Différentes techniques ont permis l'identification des cibles MazF. La technique la plus ancienne est l'extension d'amorces (*in vitro*), en blanc. La technique des pentaprobés, orange, consiste à séquencer par MALDI-TOF MS des ARNs synthétiques composés de 5 nucléotides après un test RNase avec la toxine VapC. La technique du MORE (Mapping by Overexpression of an RNase in *E. coli*) RNA-seq, vert, permet d'identifier des cibles *in vivo*, en effectuant un RNA-seq des bactéries surexprimant la toxine chez un hôte hétérologue. La technique du CRAC système (UV-induced RNA-protein crosslinking and analysis of cDNA), en rouge, qui séquence l'ADNc d'un ARN « piégé » par une toxine VapC de *M. tuberculosis* chez *M. smegmatis*, est une méthode *in vivo*. Enfin, les approches *a priori* sont représentées en bleu. ASL : Anticodon Stem-Loop.

En conclusion, la traduction bactérienne peut être inhibée par une grande variété de mécanismes. L'initiation de la traduction peut être bloquée par des toxines ciblant les ARNr, empêchant la formation des ribosomes, ou l'ARNt^{fMet}. L'ARNt^{fMet} devient soit acétylé par AtaT, avant la formylation nécessaire à sa reconnaissance par le ribosome, soit dégradé au niveau de la boucle de l'anticodon par des RNases ribosome-indépendantes de type MazF ou VapC, via des mécanismes différents puisque les sites actifs sont de charge positive ou négative respectivement (**Tableau 7**). L'élongation de la traduction peut également être affectée par un grand nombre de toxines : le facteur d'élongation EF-Tu est rendu inactif par la phosphorylation menée par Doc, les acides aminés ne sont plus chargés sur les ARNt à cause des toxines telles que HipA ou HipT phosphorylant les tRNA synthétases, les ARNt élongateurs peuvent également être acétylés par TacT et ItaT ou dégradés par MazF et VapC, de la même façon que pour celui initiateur, et l'ARNm peut également être dégradé par des RNases ribosome-dépendantes ou non. Un résumé des structures secondaires et des sites actifs est présenté (**Tableau 7**).

Toxines	Domaine	Structure (core)	Charge site actif	Acides aminés site actif	Cofacteur	Références
Doc Hip	FIC PI 3/4-kinase	6A 15A/15B	négative?	HxFx[D/N][A/G]NKR SKDN(S?)D	GTP ATP, Mg ²⁺	(Cruz et al., 2014) (Schumacher et al., 2009)
AtaT TacT	GNAT GNAT		? positive	Q/R-x-x-G-x-G/A R+K (tRNA), Y (Ac-CoA)	Ac-CoA Ac-CoA	(Jurénas et al., 2019) (Cheverton et al., 2016)
ItaT KacT	GNAT GNAT	nd nd	nd nd	nd nd	Ac-CoA Ac-CoA	
RelE YoeB YafQ HigB MqsR YafO	RNase-fold ss RNase-fold ss RNase-fold ss RNase-fold ss RNase-fold ss RNase-fold ss	βααβββα, A-B 5B 2A 4B 2A, A-B-A 3B 2A ou ααβββα 6B 3A nd	positive positive positive positive positive nd	KKRRY DRDRHY HHHEEF HREYH KNYK nd	Ribosome Ribosome Ribosome, ion sulfaté Ribosome ? Ribosome	(Burbank and Stenger, 2017; Li et al., 2009) (Kamada and Hanaoka, 2005) (Maehigashi et al., 2015) (Hurley and Woychik, 2009; Schureck et al., 2014; Yoon et al., 2019) (Brown et al., 2009) (Zhang et al., 2009)
Hic MazF VapC	RNase-fold ds RNase-fold ss PIN	αβββα 2B 3A A-B-A, βαβαβαβαβ	positive positive négative	H (G) [R/K] et [T/S] E et D	? Mg ²⁺ , Mn ²⁺ , Ca ²⁺	(Kim et al., 2018) (Hoffer et al., 2017) (Bendtsen and Brodersen, 2017; Park et al., 2020)

Tableau 7 : Généralités sur les toxines de systèmes TA de type II inhibitrices de la traduction

Les toxines sont présentées dans le même ordre que dans leur apparition dans le texte. Les données concernant les VapBC, objet de cette thèse, sont représentés en gras.

IV. Conclusion : les systèmes TA , outils d'adaptation bactérienne

Les systèmes TA constituent des outils moléculaires d'adaptation bactérienne, pour répondre rapidement à un changement d'environnement donc à différents stress abiotiques. Ces outils sont particulièrement essentiels lors d'interaction procaryote-eucaryote, symbiotique ou pathogène, avec un hôte eucaryote d'origine végétale ou animale. En effet, l'organisme hôte doit contrôler l'infection bactérienne pour ne pas épuiser ses propres ressources, nécessaires à sa survie. Dans le cadre d'une interaction pathogène, l'hôte doit contrôler l'évènement infectieux pour éviter le développement et la prolifération intracellulaire du pathogène et limiter, voire empêcher, son succès parasitaire. De même, pour une interaction symbiotique, l'hôte doit contrôler la population bactérienne qu'il accueille pour ne pas permettre aux bactéries de consommer plus de ressources que nécessaires, ou d'utiliser la réserve énergétique de l'hôte lui permettant de lutter à un stress potentiel.

Un évènement infectieux, symbiotique ou non, comprend trois étapes majeures : une étape de reconnaissance/infection, une étape d'adaptation bactérienne pour permettre sa survie et une dernière étape, qui, en cas de succès, permet un nouveau cycle infectieux, ou, en cas d'échec, met fin à l'interaction. Ces trois grandes étapes sont très conservées entre hôtes (animal/végétal) ou entre agents infectieux (pathogène ou symbiotique). Lors d'interactions pathogènes, animales ou végétales, les systèmes TA ont été montrés comme impliqués dans ces différentes phases d'adaptation bactérienne (Helaine et al., 2014; Lobato-Márquez et al., 2016; Shidore and Triplett, 2017). Les interactions symbiotiques, encore peu caractérisées dans l'étude des systèmes TA du microsymbiote, présentent de nombreux environnements/conditions de stress, à l'origine de l'activation des systèmes TA, communs avec ceux rencontrés dans les interactions pathogènes (Figure 28). L'étude du rôle des systèmes TA de bactéries symbiotiques lors des interactions avec leur hôte pourraient donc apporter une autre vision des TA que celle d'acteurs de la virulence et de la persistance antibiotique.

La première étape d'un évènement infectieux correspond à la **reconnaissance** entre les deux partenaires au cœur d'un dialogue moléculaire, à l'origine de l'**infection**. Dans le cadre d'une interaction pathogène, ce dialogue n'est autre que le modèle en zig-zag où le pathogène possède au moins un motif moléculaire associé aux pathogènes (PAMP ou MAMP pour les bactéries non pathogènes), perçu par l'hôte par un récepteur de reconnaissance de PAMP (PRR), puis cette reconnaissance conduit à la réponse immunitaire de l'hôte (Jones and Dangl, 2006), appelée MTI dans le cas de la symbiose pour MAMP-Triggered Immunity (Cao et al., 2017).

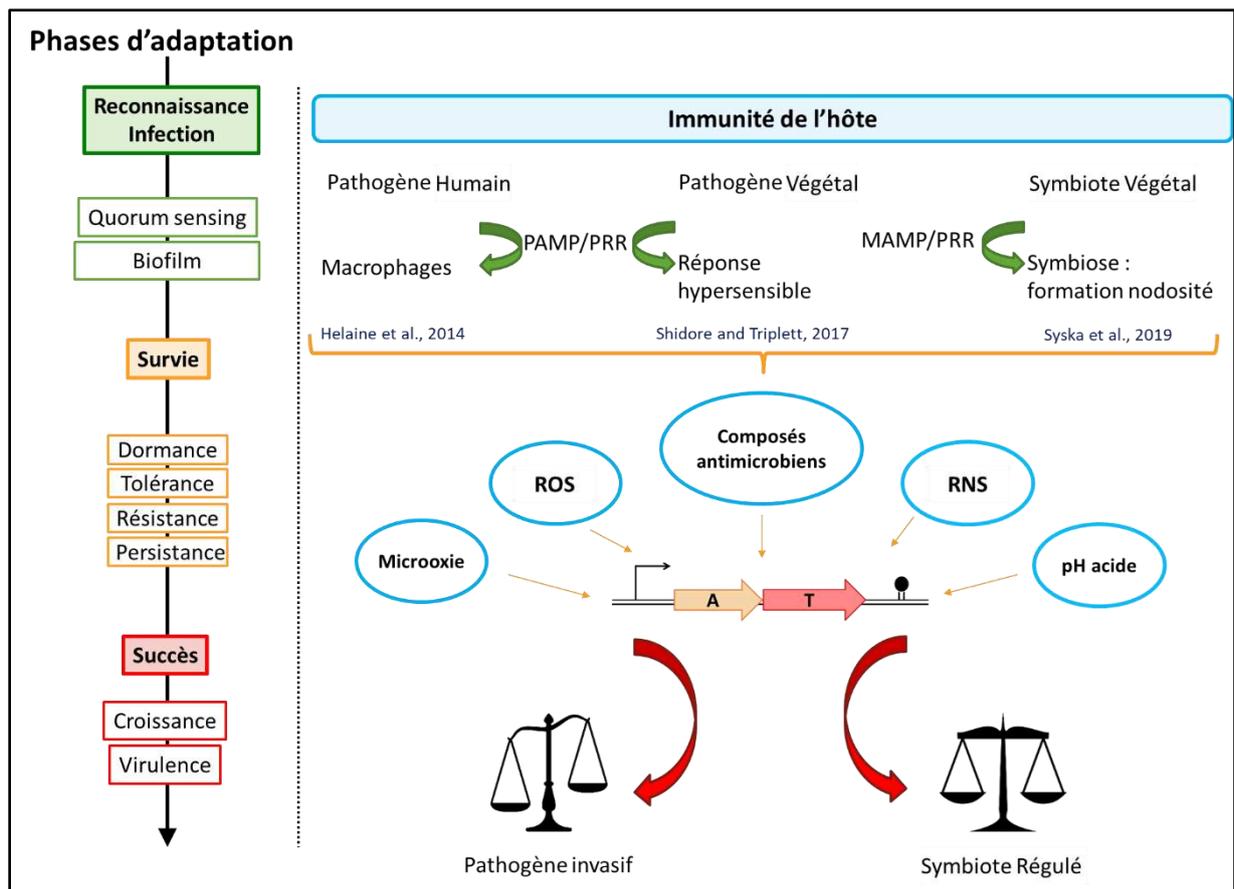


Figure 28 : Les systèmes TA au cœur d'un événement infectieux

Les bactéries vont devoir s'adapter au cours d'un événement infectieux. Cet événement est organisé en trois grandes étapes : la reconnaissance/infection (mise en place d'un dialogue moléculaire de la population bactérienne par quorum-sensing, formation d'un biofilm avant infection), la survie (changement métabolique de la bactérie pour lutter face à l'immunité de l'hôte, aboutissant à la dormance/tolérance/résistance voire persistance) et le succès de l'infection (retour de la croissance, augmentation de la virulence chez des pathogènes). En parallèle de ces trois grandes étapes, l'hôte lutte et/ou contrôle l'infection par mise en place d'une réponse immunitaire. En fonction des organismes, l'immunité peut varier mais aboutit toujours à une même réponse : production de composés antimicrobiens, d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS) et changement d'environnement intracellulaire (pH acide, microoxie). Tous ces signaux peuvent activer des systèmes TA, essentiels à l'adaptation bactérienne, au cœur de l'interaction avec l'hôte.

Lors de cette première étape, certains agents microbiens peuvent communiquer au sein de l'ensemble d'une population par quorum-sensing et permettre la régulation concertée d'un ensemble de processus moléculaires conduisant à la formation d'un biofilm. Cette stratégie populationnelle favorise le succès de l'interaction, en augmentant la virulence pour des agents pathogènes (Ham, 2013) ou en permettant l'infection de la plante par certaines rhizobia (Pérez-Montañó et al., 2014).

Une fois l'infection établie, les bactéries vont devoir s'adapter à une multitude de stress générés par l'hôte, tels que des changements de pH ou de concentration en oxygène, la présence de

composés antimicrobiens, ou encore d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) ou de l'azote (RNS) (Helaine et al., 2014; Lobato-Márquez et al., 2016; Shidore and Triplett, 2017; Syska et al., 2019) (Annexe 5). Nous avons vu précédemment que pour lutter face à ce type de stress, les bactéries employaient des systèmes TA pour permettre une adaptation métabolique aboutissant à la dormance, la tolérance, la résistance ou encore la persistance. En cas de succès de ce dialogue en faveur de la survie bactérienne, les bactéries vont pouvoir reprendre leur croissance et recréer un évènement infectieux.

Le rôle des systèmes TA dans le cas d'une interaction symbiotique a été peu étudié. Pourtant, les systèmes TA sont largement distribués chez les bactéries phytosymbiotiques. De plus, les contextes cellulaires de l'interaction symbiotique hôte-microbe sont semblables à ceux décrits pour des interactions pathogènes. Aussi, malgré un manque d'informations disponibles sur les systèmes TA dans la symbiose, leur étude constitue un enjeu prometteur dans la compréhension de l'adaptation bactérienne.

Nous allons maintenant nous intéresser au rôle des systèmes TA dans la symbiose fixatrice d'azote Rhizobia-Légumineuses. Dans un premier temps, nous définirons les légumineuses et la symbiose fixatrice d'azote. Puis nous ferons un résumé de ce qui est connu des TA dans la symbiose et plus particulièrement chez *S. meliloti*.

Section Introduction générale



➤ **Partie 1** : Les systèmes Toxine-Antitoxine

➤ **Partie 2** : La symbiose fixatrice d'azote

➤ **Partie 3** : Les objectifs de thèse

Section : Introduction générale

Partie 2 : La symbiose fixatrice d'azote : Rhizobia-Légumineuses

Les légumineuses (*Fabaceae*) sont une famille de plantes de haut intérêt agronomique, tant d'un point de vue alimentaire qu'écologique. Il s'agit de la deuxième famille de plantes la plus cultivée dans le monde après les céréales, pour l'alimentation humaine et animale. Grâce à leur capacité à former une symbiose fixatrice d'azote avec des bactéries telluriques du genre *Rhizobium*, la culture de nombreuses légumineuses ne nécessite pas l'ajout d'intrants azotés, polluants, mais au contraire, permet un enrichissement des sols en azote (Andrews et al., 2007). En effet, alors que les plantes ne sont capables d'assimiler l'azote indispensable à leur croissance que sous forme minérale (nitrate : NO_3^- , ammonium NH_4^+), présent en faible quantité dans les sols, les légumineuses, grâce à leur capacité à établir une symbiose avec des *Rhizobia* diazotrophes, peuvent exploiter la propriété des bactéries à réduire l'azote atmosphérique (N_2) en ammonium pour subvenir à leurs besoins.

Cette symbiose fixatrice d'azote Légumineuse-*Rhizobium* est une interaction plante/microorganisme mutualiste, bénéfique aux deux partenaires. Les bactéries, grâce à leur activité nitrogénase, réduisent l'azote atmosphérique en ammonium directement assimilable par la plante. En contrepartie, la plante grâce à son activité photosynthétique fournit les substrats carbonés nécessaires au développement de la bactérie (Figure 29). L'interaction aboutit à une différenciation morphologique et à la formation d'un nouvel organe racinaire : la nodosité. Les nodosités sont classées en deux catégories, (1) déterminées lorsqu'elles ne possèdent qu'un méristème transitoire et (2) indéterminées lorsque le tissu méristématique est maintenu et permet une croissance en continu de l'organe (Sprent et al., 2013). Le type de nodosité est dépendant de la plante hôte et les espèces de légumineuses susceptibles de produire à la fois des nodosités déterminées et indéterminées sont rares (Liu et al., 2014).

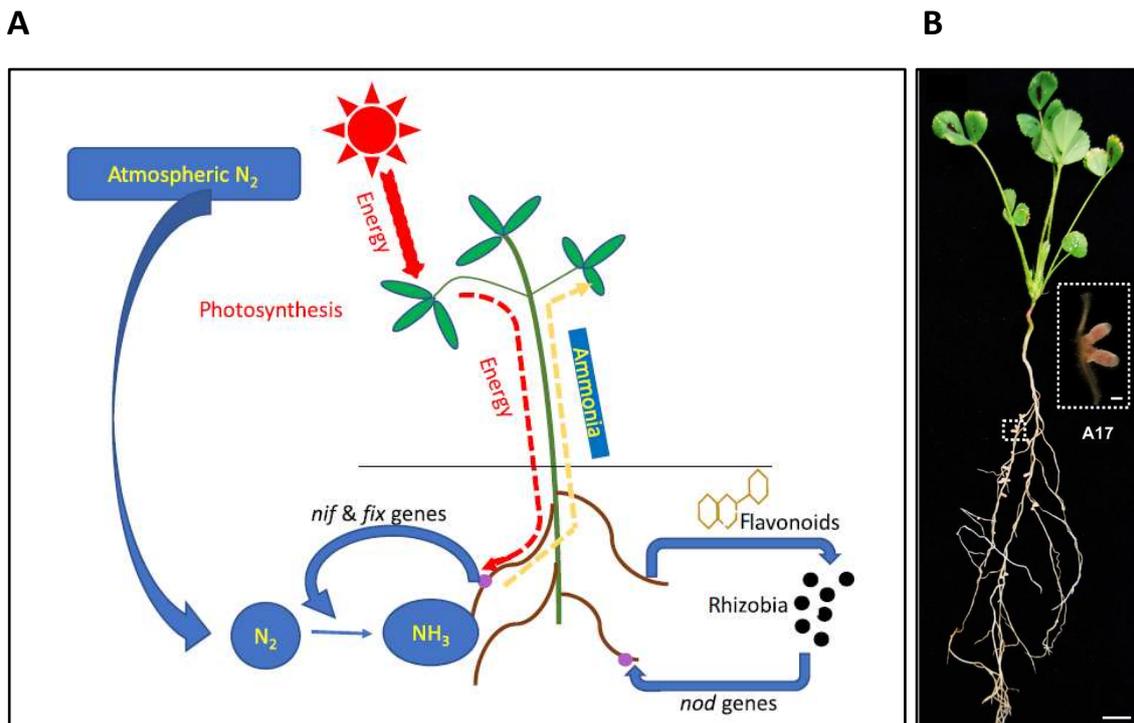


Figure 29 : Représentation schématique de la symbiose fixatrice d'azote Rhizobium-Légumineuse, issue de Lindström and Mousavi, 2020

A : Représentation schématique de la symbiose fixatrice d'azote Rhizobium- Légumineuse, issue de Lindström and Mousavi, 2020. Dans le cas de la symbiose fixatrice d'azote, lors de carence en azote, certaines légumineuses entrent en symbiose avec des bactéries diazotrophes, telluriques et saprophytes, le plus souvent du genre *Rhizobium*. Cette symbiose conduit à la formation d'un nouvel organe : la nodosité. Les bactéries reconnaissent des exsudats racinaires de type flavonoïdes et sécrètent des facteurs Nod, à l'origine de la nodosité. Elles fixent l'azote atmosphérique qu'elles réduisent en ammoniac, grâce à la nitrogénase dont la production est dépendante des gènes *nif* et *fix*, assimilable par la plante et participant également au cycle de l'azote global environnemental. Les bactéries vont recevoir des sources carbonées par la plante, produites par photosynthèse, et, en échange, la plante va recevoir des sources azotées.

B : Illustration de l'interaction symbiotique entre *M. truncatula* écotype A17 et *S. medicae*, issue de Yang et al., 2017. Barre d'échelle : 1 cm. Le zoom, en pointillé, montre des nodosités fixatrices issues de la même plante. Barre d'échelle : 500 µm

I. Les partenaires de l'interaction

1) Les légumineuses (*Fabaceae*)

Les légumineuses sont des plantes dicotylédones comprenant environ 19'300 espèces regroupées en 750 genres et retrouvées dans la plupart des types de végétation du monde. Elles comprennent des plantes herbacées, des arbustes, des lianes et des arbres. La famille des légumineuses est divisée en 6 sous-familles : les Caesalpinioideae (également appelées Mimosoideae-Caesalpinieae-Cassieae ou MCC (ex : mimosa, arbre de Judée)), les Cercidoideae, les Detarioideae, les Dialioideae, les

Duparquetioideae et les Papilionoideae (ex : luzerne, soja, pois, trèfle...), (Azani et al., 2017) (Figure 30). Toutefois, les espèces appartenant aux familles des Cercidoideae, Detarioideae, Dialioideae, et Duparquetioideae ne sont pas capables d'établir de symbiose fixatrice d'azote. Tous les genres, capables de noduler, de la sous-famille des Caesalpinioideae développent quant à eux des nodosités indéterminées, tout comme d'ailleurs la majorité des Papilionoideae (Andrews and Andrews, 2017).

La luzerne tronquée, *Medicago truncatula*, a été reconnue comme plante modèle pour l'étude génétique et moléculaire du déterminisme des légumineuses (Cook, 1999). En effet, *Medicago truncatula* offre de nombreux avantages pour le développement d'analyses génétiques et moléculaires. Elle dispose notamment d'un génome diploïde de petite taille (500 Mpb ; 2n=16) et d'un cycle de vie court. Elle est facilement transformable et présente une forte synténie avec plusieurs espèces d'intérêt agronomique tels que la luzerne ou le pois. Enfin, son génome a entièrement été séquencé (Young et al., 2011) et une banque de mutants par insertion de transposon est mise à la disposition de la communauté scientifique (<https://medicagomutant.noble.org/mutant/> (Tadege et al., 2008)).

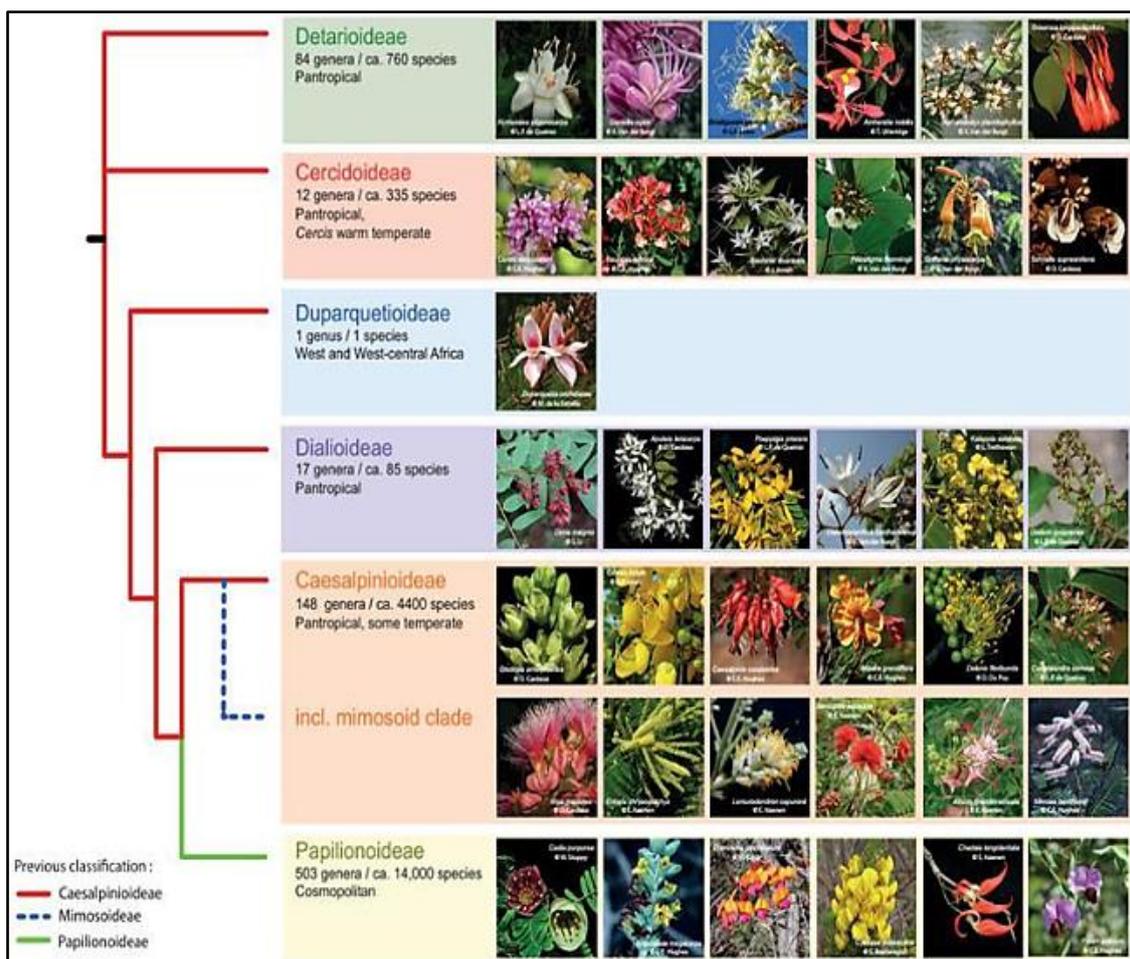


Figure 30 : Classification des sous-familles de légumineuses, issue de Domergue, 2019

Arbre phylogénétique des sous-familles de légumineuses issu de Domergue, 2019.

2) Les Rhizobia

Le nom Rhizobia est le terme générique donné à certaines α - ou β - Protéobactéries aérobies du sol, à Gram-négatif, de la famille des *Rhizobiaceae*, capables d'établir une symbiose avec des plantes de la famille des légumineuses aboutissant à la formation de nodosités racinaires (ou parfois caulinaires) au sein desquelles elles fixent l'azote atmosphérique (Sprent and James, 2008). Le genre *Rhizobium* ayant été le premier décrit, il est communément utilisé pour désigner les bactéries fixatrices d'azote symbiotes des légumineuses.

Sur la base du séquençage de l'ADNr 16S, la famille des *Rhizobiaceae* est divisée en plus de 20 genres et 200 espèces, dans les classes α et β des Protéobactéries (Figure 31). Toutes les α -Rhizobia appartiennent à l'ordre des Rhizobiales et les β -Rhizobia à celui des Burkholderiales. Un même genre ou espèce contient souvent à la fois des souches symbiotiques et non symbiotiques (saprophytiques) (<http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia.html>; (Masson-Boivin et al., 2009)).

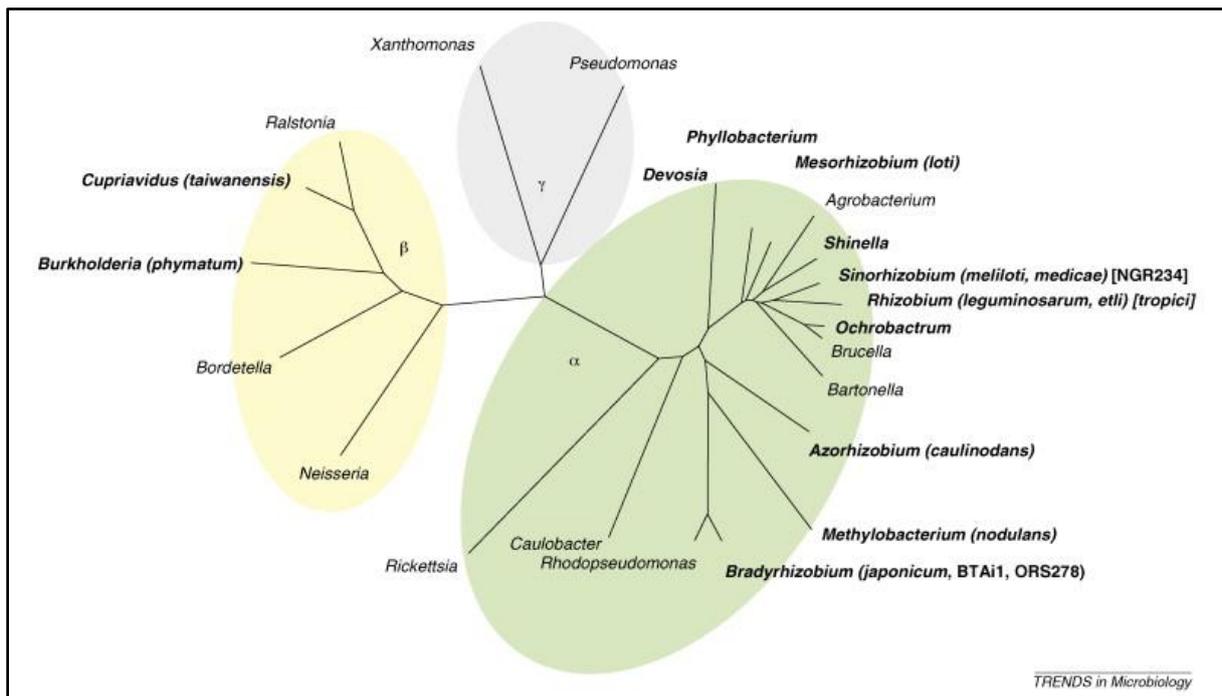


Figure 31 : Arbre phylogénétique simplifié des *Rhizobiaceae* de l'ADNr

Arbre basé sur la comparaison de séquences de l'ADNr16S (Masson-Boivin et al., 2009). Les bactéries induisant la nodulation des légumineuses (en gras) sont classées parmi les α et β -Protéobactéries. Les génomes séquencés des différentes espèces sont entre parenthèses.

Sinorhizobium meliloti a été choisi comme micro-organisme modèle pour l'étude de la symbiose Rhizobia-Légumineuses. *S. meliloti* dispose d'un spectre d'hôte étroit et ne s'associe qu'aux légumineuses du genre *Medicago*, *Melilotus* et *Trigonella*. La séquence nucléotidique complète de son génome a été rapportée par un consortium international en 2001 (Barnett et al., 2001; Capela et al.,

2001; Finan et al., 2001; Galibert et al., 2001). Le génome est réparti sur 3 réplicons : le chromosome bactérien de 3.65Mb et deux mégaplasmides, pSymA et pSymB, de 1.35 Mb et 1.68Mb respectivement (**Figure 32**). Le mégaplasmide pSymA porte la majorité des gènes nécessaires à la nodulation et à la fixation d'azote tandis que le mégaplasmide pSymB code des gènes nécessaires aux fonctions de base de la cellule ainsi que les gènes de biosynthèse des exopolysaccharides, indispensables à la mise en place de la symbiose. Le mégaplasmide pSymB, contrairement au pSymA, est essentiel à la croissance de la bactérie. En effet, ce dernier code notamment pour l'unique ARNt de reconnaissance du triplet CCG de la cellule, vital à la synthèse protéique. Aussi, pSymB est parfois assimilé à un second chromosome (chromide) (Downie and Young, 2001; Finan et al., 2001).

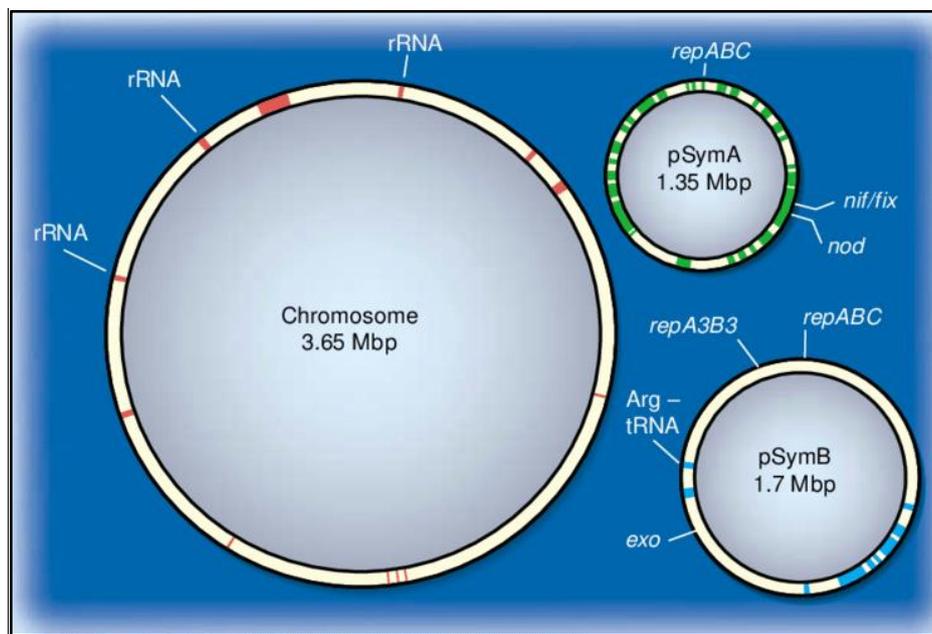


Figure 32 : Le génome à trois composants de *S. meliloti* : un chromosome et deux mégaplasmides, issu de Downie and Young, 2001

Les régions rouges, vertes et bleues possèdent un contenu G+C de moins de 60%. Les positions de certains sont montrées, incluant ceux nécessaires à la synthèse de l'ARNr et à la répllication plasmidique (*rep*), ainsi que le gène spécifiant l'ARNt^{ARG} essentiel reconnaissant le codon CCG. Les régions requises à la formation des nodosités (*nod*), à la formation des exopolysaccharides (*exo*) et à la fixation de l'azote (*nif/fix*) sont également représentées.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons choisi comme modèle d'étude de l'interaction Rhizobium-Légumineuse le couple modèle *Sinorhizobium meliloti*-*Medicago truncatula*.

II. Mise en place et fonctionnement de la nodosité

La mise en place de l'interaction symbiotique Rhizobia-Légumineuses peut être divisée en 3 étapes fondamentales qui sont (1) la reconnaissance et le dialogue moléculaire entre les deux partenaires, (2) l'infection bactérienne et (3) l'organogénèse de la nodosité (pour revue Lindström and Mousavi, 2020).

1) Reconnaissance et dialogue moléculaire

L'établissement de la symbiose Rhizobium-Légumineuse débute par la reconnaissance entre les deux partenaires, initiée par un dialogue moléculaire complexe. En condition de carence azotée, la plante sécrète, par ses exsudats racinaires, une panoplie de molécules comprenant notamment des flavonoïdes qui pourront être reconnus par des Rhizobia (Redmond et al., 1986). La reconnaissance est spécifique, la composition de l'exsudat définissant un spectre d'hôte pour chaque Rhizobium. Ainsi, certaines souches bactériennes pourront interagir avec plusieurs centaines d'espèces de légumineuse (ex : Rhizobium sp NGR 234 (Pueppke and Broughton, 1999)) tandis que d'autres, telle que *Sinorhizobium meliloti*, présenteront un spectre plus étroit. Les flavonoïdes excrétés par la plante vont être liés à un récepteur de la bactérie, NodD, et permettre tout d'abord l'attraction par chimiotactisme des bactéries vers la racine (Perret et al., 2000). D'autre part, l'activation du récepteur NodD va induire l'expression des opérons de nodulation *nod*, *nol* et *noe* (Perret et al., 2000). L'expression de ces gènes va alors permettre la synthèse et la sécrétion de lipochitooligosaccharides (LCO) communément appelés facteurs Nod ou FN. Les FNs sont constitués d'un squelette d'oligosaccharide formé d'une chaîne de 3 à 5 molécules de N-acetyl-D-glucosamine et de groupements d'acides gras ajoutés aux différents sucres non-réducteurs du squelette (Lerouge et al., 1990). Suivant les espèces, le squelette est ensuite décoré par différentes modifications post-traductionnelles (acétylation, méthylation, glycosylation ou sulfation) (Bonaldi et al., 2010). Cette variabilité dans la structure des FNs participe également au spectre d'hôte de l'interaction (Dénarié et al., 1996; Downie et al., 2014; Spaink, 2000; Zipfel and Oldroyd, 2017). La reconnaissance des FNs par la plante sera ensuite essentielle pour induire les modifications cellulaires indispensables aux étapes d'infection et d'organogénèse de la nodosité (Suzaki et al., 2015)(Figure 33).

2) Infection et formation du primordium nodositaire

La perception des FNs par la plante conduit à l'activation d'une voie de signalisation nommée Common Symbiosis Signaling Pathway (CSSP) car les premières étapes sont communes avec l'endosymbiose racinaire de mycorhization à arbuscules.

La reconnaissance des FNs est réalisée par l'intermédiaire de récepteurs kinases ser/thr de type LysM-RLK, localisés à la membrane plasmique des cellules de l'épiderme racinaire. La liaison des FNs au domaine LysM extracellulaire du récepteur induit une signalisation calcium-dépendante permettant la transduction du signal de la membrane jusqu'au noyau (Madsen et al., 2003). La perception d'oscillations calciques nucléaires par la protéine kinase calcium et calmoduline dépendante (CCaMK) permet l'activation de l'expression de facteurs de transcription qui, à leur tour, vont réguler l'expression de nombreux gènes appelés nodulines (Hirsch et al., 2009; Zipfel and Oldroyd, 2017). Cette cascade de transduction permet donc une reprogrammation rapide et complexe du transcriptome des poils absorbants. Les nodulines vont, quant à elles, être responsables des nombreuses modifications cellulaires essentielles à l'infection bactérienne et l'organogenèse de la nodosité.

a) L'infection bactérienne

Suite à la perception des FNs, l'infection bactérienne débute par une déformation du poil absorbant en une structure courbée dite de « crosse de berger » (Gage, 2004; Suzuki et al., 2015) (**Figure 33A**). Cette courbure, liée à une réorientation isotopique de la croissance du poil absorbant, emprisonne dans une poche les bactéries qui se multiplient et dégradent localement la paroi végétale. Les bactéries progressent ensuite dans le poil absorbant, en se divisant, via un cordon d'infection formé par invagination de la membrane plasmique. (**Figure 33B**). La progression des bactéries au sein des cordons est assurée par la synthèse bactérienne d'exopolysaccharides (EPS) et le remodelage de la paroi végétale (Jones et al., 2007; Liu et al., 2019). Au stade final de l'infection, les bactéries sont délivrées dans les cellules du cortex par endocytose. Les bactéries sont ainsi séparées du cytoplasme de la cellule végétale par une membrane dite peribactéroïdienne, d'origine végétale. La structure ainsi formée est appelée le symbiosome au sein duquel la bactérie se différencie en bactéroïde.

b) Formation du primordium nodositaire

Simultanément à l'infection bactérienne, en réponse aux FNs, les cellules du péricycle et corticales situées sous le cordon d'infection vont se différencier puis se multiplier pour former un primordium nodositaire (Vernié et al., 2015). Les premières divisions actives débutent environ 24h

après l'infection. Le primordium nodositaire est formé 18 à 24h après infection. Les bactéries seront libérées, depuis le cordon d'infection, dans les cellules du primordium nodositaire environ 3 jours après infection. Enfin, 80h après infection, le méristème nodositaire est formé à partir des cellules primordiales des cortex médian et externe non infectées par les cordons d'infection (Xiao et al., 2014).

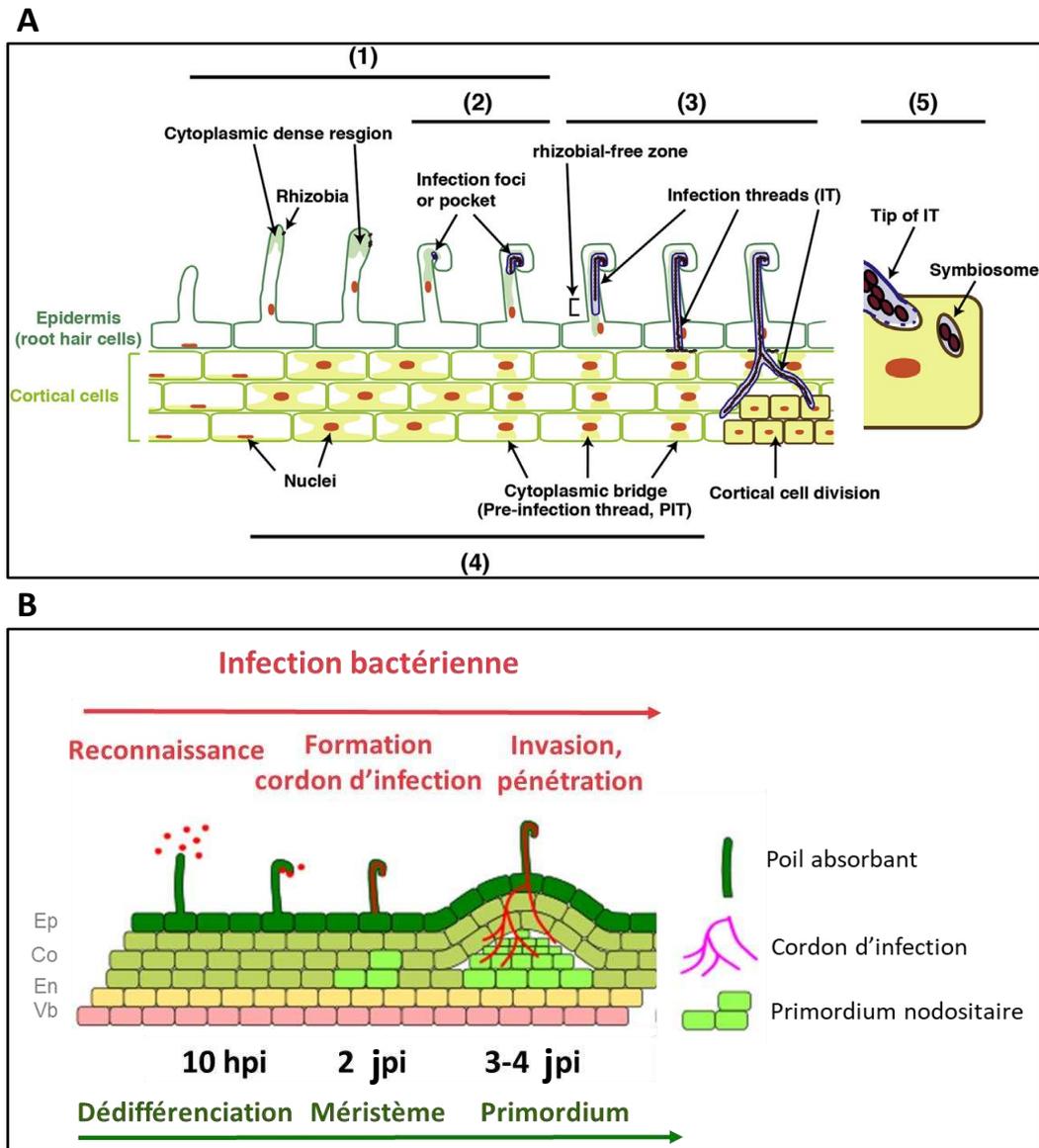


Figure 33 : Infection bactérienne et formation du primordium nodositaire, issues de Suzaki et al., 2015

A : (1) L'attachement des bactéries au niveau du poil absorbant et l'accumulation de FNs induit la déformation du poil absorbant suivant une structure dite « en crosse de berger » (2) les bactéries emprisonnées dans la crosse dégradent localement la paroi végétale et pénètrent dans le poil absorbant par invagination de la membrane plasmique. (3) Elongation du cordon d'infection (IT). (4) Parallèlement à l'invasion bactérienne, dans les cellules corticales, un pont cytoplasmique ou cordon de pré-infection (PIT) est formé pour guider l'élongation. (5) Les bactéries sont libérées dans les cellules du primordium nodositaire par endocytose.

B : La formation de la crosse de berger s'effectue dans les 10 heures suivant la reconnaissance bactérienne. Puis, la formation du cordon d'infection, 2 jours post-infection (jpi), va permettre aux bactéries de progresser jusqu'aux cellules corticales nouvellement divisées (Co). A 4 jpi, les bactéries sont délivrées dans les cellules végétales.

3) Organogénèse de la nodosité indéterminée

Comme indiqué précédemment, lors de l'interaction *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium meliloti*, la nodosité formée est de type indéterminée, caractérisée par la présence d'un méristème persistant. Il s'agit donc d'un organe à croissance continue. Les cellules à l'extrémité distale de la nodosité se divisent en continu conférant à la nodosité une forme allongée caractéristique. De plus, les cellules végétales ne seront par conséquent pas au même stade de développement au même instant. De ce fait, la nodosité mature peut être divisée en 4 zones correspondant chacune à un stade de développement différents: zone I : zone méristématique, zone II : zone d'infection, zone III : zone de fixation et zone IV : zone de sénescence (Jones et al., 2007) (Figure 34).

a) Zone I méristématique

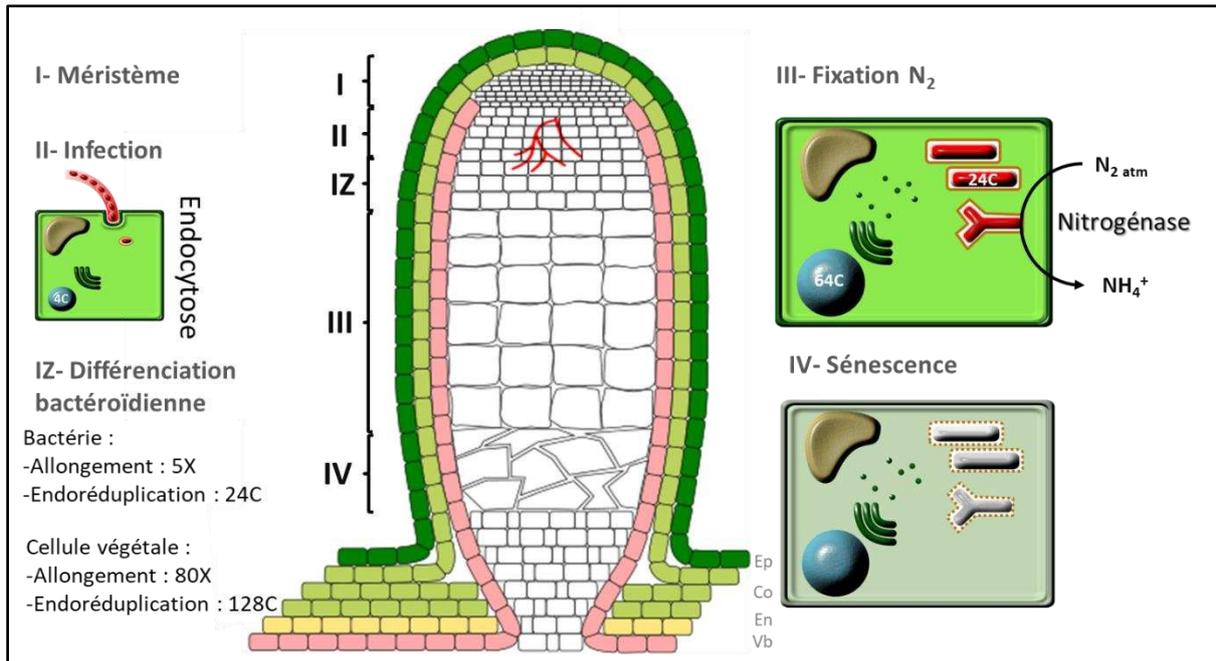
Le méristème nodositaire formé à partir des cellules primordiales des cortex médian et externe non infectées par les cordons d'infections (Xiao et al., 2014), va assurer la croissance continue de l'organe pendant plusieurs semaines (Figure 34A). Cette zone composée de cellules végétales indifférenciées en division ne renferme jamais de bactéries.

b) Zone II d'Infection bactérienne

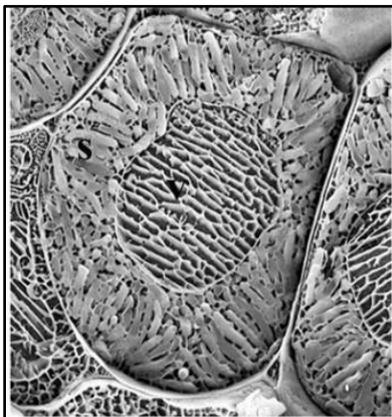
La zone II de la nodosité correspond à la région où les bactéries infectent les cellules végétales. Les bactéries, délivrées dans le cytoplasme des cellules végétales par endocytose, sont séparées du cytoplasme de la cellule par une membrane dite peribactéroïdienne, d'origine végétale. Cette nouvelle structure est appelée symbiosome. Les symbiosomes vont tout d'abord se diviser plusieurs fois puis les bactéries vont initier leur différenciation en bactéroïdes.

La zone d'infection peut être subdivisée en deux sous-zones : (1) la zone II distale (adjacente au méristème) où les cellules végétales sont soit différenciées et non infectées (zone de pré-infection) soit des cellules dans lesquelles les bactéries viennent d'être déversées et (2) la zone II proximale où les cellules végétales infectées et les bactéries s'élargissent et se différencient progressivement (Roux et al., 2014; Vasse et al., 1990). La subdivision de la zone II peut être précisée en fonction de la progression de la différenciation bactéroïdienne qui comprend 5 étapes donnant lieu à 5 états bactéroïdiens différents observables par microscopie (Roux et al., 2014; Vasse et al., 1990). Le type 1 est rencontré dans la zone II distale. Il correspond aux bactéries récemment déversées par les cordons d'infection. Les cellules, en forme de bâtonnet, sont capables de se diviser. Les bactéroïdes de type 2

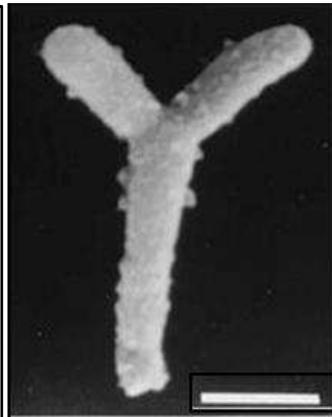
A



B



C



D

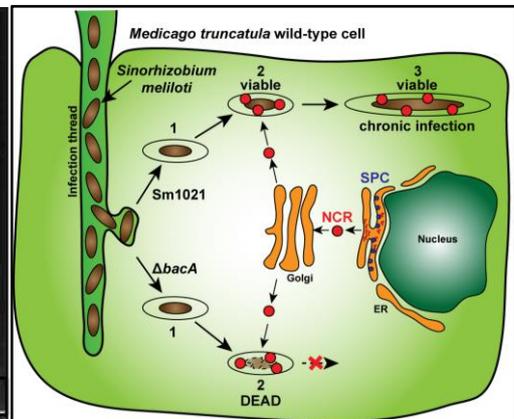


Figure 34 : Organogénèse de la nodosité de *Medicago*

A : Schéma d'une nodosité indéterminée mature. Quatre zones caractéristiques sont retrouvées. . Zone I : méristème, Zone II : infection, Zone III : fixation d'azote, Zone IV : sénescence. Ep : épiderme, Co : cortex, En : endoderme, Vb : vaisseaux conducteurs

B : Cellule infectée mature observée par microscopie électronique à balayage issu de De La Peña et al., 2018. La cellule infectée renferme des milliers de symbiosomes (S) matures répartis autour de la vacuole (V).

C : Bactéroïde de morphotype E observé par microscopie électronique à balayage issu de Latch and Margolin, 1997. Zoom sur un bactéroïde isolé. Echelle = 2 μm .

D : Régulation de l'infection bactérienne par les NCRs et le transporteur BacA issue de Haag et al., 2011. Lors de l'infection bactérienne, la protéine bactérienne BacA est essentielle pour protéger la bactérie des facteurs antimicrobiens NCRs produits par la plante. Seules les bactéries possédant le transporteur BacA sont capables de survivre. Un mutant *bacA* ne sera pas viable dans la cellule végétale.

sont retrouvés dans la zone II proximale. Ils présentent un allongement cellulaire mais pas de divisions (Vasse et al., 1990). La progression de la différenciation du type 1 vers le type 2 est retrouvée dans les cellules au centre de la zone II.

c) Interzone II-III : différenciation du bactéroïde

Les zones d'infection (II) et de fixation (III) sont séparées par quelques couches de cellules végétales caractérisées par leur importante teneur en amidon, facilement visualisable par coloration au Lugol, appelée interzone II-III (IZ). Les bactéroïdes de type 3 sont retrouvés dans cette interzone. A ce stade de la différenciation, les bactéroïdes arrêtent de s'allonger et présentent une hétérogénéité cytoplasmique. (Figure 34AB). Contrairement au type 2, les bactéroïdes de type 3 remplissent la quasi-totalité de la cellule végétale. Cette différence indique que même si la différenciation débute en zone II proximale, la plus grande partie se déroule dans l'interzone II-III (Vasse et al., 1990). La différenciation s'accompagne d'un important élargissement des cellules végétales infectées, responsable de la croissance de la nodosité. Cette augmentation de la taille des cellules est due à la répétition de plusieurs cycles d'endoréduplication (réplication du génome sans mitose ni cytokinèse) menant les cellules végétales à un stade de polyploïdie de 64 ou 128 C. La cellule végétale infectée est 80 fois plus grande que la cellule méristématique (2C). Chez *Medicago*, la différenciation des bactéroïdes implique aussi une amplification du génome par endoréduplication (24C) responsable de l'élongation de la bactérie (morphologie E= elongated) (Jones et al., 2007; Maróti and Kondorosi, 2014; Mergaert et al., 2006) (Figure 34C). Les bactéries différenciées en bactéroïdes ont une taille 5 fois plus importante que la bactérie libre et une perméabilité membranaire augmentée, probablement pour favoriser les échanges avec la cellule hôte (Jones et al., 2007; Maróti and Kondorosi, 2014; Mergaert et al., 2006).

D'autre part, la différenciation terminale du bactéroïde (TBD) est dite irréversible. En effet, les bactéroïdes ne peuvent plus revenir à un mode de vie libre, ils sont incapables de retrouver une croissance en milieu de culture. Chez les légumineuses du clade des galégoïdes auquel appartient *Medicago*, la différenciation terminale du bactéroïde est induite par une large famille de facteurs antimicrobiens de la plante, les NCRs (nodule-cystein rich peptides). Ces composés, spécifiquement exprimés dans la nodosité, présentent des similarités avec les facteurs de l'immunité innée de type défensine (Mergaert et al., 2003; Wang et al., 2010). Ils présentent *in vitro* une forte activité antimicrobienne envers les bactéries libres. *In planta*, les NCRs apparaissent comme des régulateurs majeurs de la différenciation terminale bactéroïdienne. Les peptides NCRs sont adressés au symbiosome via la voie de sécrétion classique de la plante (Mergaert et al., 2003; Wang et al., 2010). Certains peptides NCRs restent localisés dans l'espace pér bactéroïdien tandis que d'autres sont

transportés à travers la membrane bactérienne via une protéine de la famille des transporteurs ABC, BacA (Haag et al., 2011). Les souches de *S. meliloti* déficientes pour *bacA* sont plus sensibles à l'activité anti-bactérienne des NCRs et les bactéries sont tuées aussitôt après leur relargage dans la cellule végétale (Haag et al., 2011). Pour survivre à l'exposition aux NCRs, la bactérie doit donc disposer du transporteur ABC BacA (Haag et al., 2013) (Figure 34D). Aujourd'hui encore, il n'est pas totalement compris pourquoi la plante induit une différenciation terminale irréversible du symbiote. Certaines études semblent indiquer que les bactéroïdes à TBD ont une meilleure capacité fixatrice d'azote (Oono and Denison, 2010). Il est donc possible que la plante impose la TBD à son symbiote pour obtenir un meilleur rendement ce qui, dans une certaine mesure, remet en cause la nature mutualiste de l'interaction (Alunni and Gourion, 2016).

d) Zone III de fixation de l'azote

La zone III est la plus large des zones de la nodosité mature. Chaque cellule végétale contient environ 50 000 bactéroïdes. Les cellules de la zone III distale sont remplies de bactéroïdes de type 4. Ces derniers se distinguent du type 3 par un enrichissement en ribosomes et/ou polysomes (Maróti and Kondorosi, 2014; Vasse et al., 1990). Cette différenciation bactéroïdienne terminale comprend l'induction de l'expression des gènes nécessaires à la réduction de l'azote moléculaire en ammoniac par le complexe de la nitrogénase. Ce complexe est constitué de deux métalloprotéines : une protéine à fer et molybdène (FeMo), codée par *nifK* et *nifD*, qui contient le site actif et une protéine à fer (Fe), codée par *nifH*, *nifF* et *nifJ*. La fixation d'ATP provoque un changement de conformation de la protéine Fe, qui s'associe à la protéine FeMo pour former la nitrogénase active (Figure 35). Ce complexe enzymatique permet la réduction de l'azote suivant la réaction suivante :

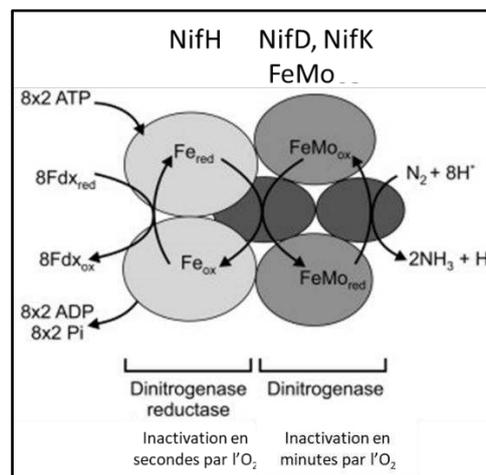
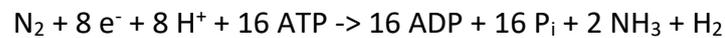


Figure 35 : Complexe enzymatique de la nitrogénase issu de Rascio and La Rocca, 2013

La réduction d'azote atmosphérique en ammoniac est réalisée par la Nitrogénase qui est un complexe composé de dinitrogénase et de dinitrogénase réductase. La dinitrogénase, responsable de la fixation d'azote, est composée de NifD, de NifK et de FeMoco, c'est-à-dire de Fer et de Molybdène pour permettre le transfert d'électron. La dinitrogénase réductase, composée de NifH, permet d'apporter les électrons nécessaires à la réduction d'azote, par catalyse de 16 molécules d'ATP et l'oxydation de ferrédoxine. Ces protéines sont sensibles à l'oxygène.

La fixation d'azote est coûteuse en énergie : 16 molécules d'ATP consommées pour 1 molécule de N₂ réduit. Le saccharose issu de la photosynthèse, métabolisé dans les cellules nodositaires en acides dicarboxyliques C-4 (malate, fumarate, succinate) fournit l'ATP et la capacité réductrice nécessaire au fonctionnement de la nitrogénase (Arsene et al., 1996). L'assimilation de NH₄⁺ par les Rhizobia est réprimée lors de la différenciation en bactéroïdes. Chez la plante, l'activité Glutamine Synthétase (GS) est au contraire fortement stimulée au niveau des nodosités (Udvardi and Poole, 2013).

La nitrogénase est d'autre part très sensible à l'oxygène. Une reprogrammation transcriptionnelle est donc nécessaire pour permettre une optimisation entre (1) la consommation et la production des ressources énergétiques et (2) un changement de microenvironnement cellulaire favorable à la nitrogénase (microoxie). L'expression de la nitrogénase démarre en zone II, mais cette enzyme n'est fonctionnelle qu'en condition de microoxie, c'est-à-dire en zone III. La mise en place de l'environnement microoxique en zone III est réalisée grâce d'une part à la présence dans le cortex d'une barrière à l'O₂, qui limite la diffusion des gaz extérieurs à l'intérieur de la nodosité (Batut and Boistard, 1994), et, d'autre part, à la présence, en grande quantité, d'une protéine végétale affine pour l'O₂ de la famille des hémoglobines, la leghémoglobine, qui facilite la diffusion de l'O₂ vers les mitochondries pour alimenter la chaîne de transfert d'électrons (Ott et al., 2005). Afin de réduire la concentration en oxygène en zone III, une respiration mitochondriale de type « phytoglobine-oxyde nitreux (NO) » est mise en place. Dans ce métabolisme, le nitrite sert d'accepteur final d'électron et est converti en NO. Les phytoglobines, telle que la léghémoglobine, capturent l'oxygène et créent l'environnement pauvre en O₂ (<1%) (Berger et al., 2018, 2020; Syska et al., 2019). La leghémoglobine peut représenter jusqu'à 40% de la fraction protéique soluble totale de la nodosité mature (Nash and Schulman, 1976). L'ensemble de ces changements conduit à une acidification progressive de l'espace pér bactéroidien nécessaire à l'efficacité de la fixation d'azote (Pierre et al., 2013).

Chez *S. meliloti*, la synthèse de la nitrogénase s'effectue à partir de deux clusters génétiques, présents sur le mégaplasmide symbiotique pSymA, renfermant les gènes *nif* impliqués dans la synthèse et la régulation de la nitrogénase, et les gènes *fix* impliqués dans la synthèse de cofacteurs de la nitrogénase et dans la régulation de la teneur en oxygène et de l'état rédox de la cellule (Rajwar et al., 2013) (Tableau 8).

Gène	Produit et/ou fonction (proposée)
Gènes <i>nif</i>	
<i>nifH</i>	Protéine Fe de la nitrogénase
<i>nifD</i>	Sous-unité α de la protéine MoFe de la nitrogénase
<i>nifK</i>	Sous-unité β de la protéine MoFe de la nitrogénase
<i>nifE</i>	Impliqué dans la biosynthèse du cofacteur FeMo
<i>nifN</i>	Impliqué dans la biosynthèse du cofacteur FeMo
<i>nifB</i>	Impliqué dans la biosynthèse du cofacteur FeMo
<i>nifS</i>	Cystéine désulfurase, activation du soufre pour la synthèse du métallocluster?
<i>nifW</i>	Fonction inconnue, requis pour l'activité de la protéine FeMo
<i>nifX</i>	Fonction inconnue
<i>nifA</i>	Régulateur positif des gènes <i>nif</i> , <i>fix</i> et additionnels
Gènes <i>fix</i>	
<i>fixABCX</i>	Requis pour l'activité de la nitrogénase, sans doute lors de la chaîne de transport d'électron, FixX présente des similarités avec les ferrédoxines
<i>fixNOQP</i>	Induit par microanaérobiose, Cytochrome oxidase membranaire, impliqué dans la respiration
<i>fixGHIS</i>	Pompe cationique rédox-dépendante membranaire
<i>fixLJ</i>	Système régulateur à deux composantes répondant à l'oxygène impliqué dans le contrôle positif de <i>fixJ</i> et <i>nifA</i>
<i>fixM</i>	Flavoprotéine oxydoréductase
<i>fixK/fixK₂</i>	Régulateur positif des gènes <i>fixNOQP</i> , <i>rpoN</i> et la respiration nitrate, et négatif de <i>nifA</i> et <i>fixK</i>
<i>fixT</i>	Protéine antikinase

Tableau 8 : Les gènes *nif* and *fix* identifiés chez *S. meliloti*, et leur fonction connue ou proposée, adapté de Fischer, 1994

a) Zone IV de sénescence nodositaire

La sénescence nodositaire correspond à la rupture de l'interaction symbiotique. Elle se met en place progressivement, après quelques semaines de fixation optimale. Cette rupture peut également être induite par un stress environnemental (biotique ou abiotique) ou un retour à des conditions azotées optimales (Kazmierczak et al., 2020; Puppo et al., 2005).

L'entrée en sénescence se caractérise d'un point de vue macroscopique par une modification de la couleur de la nodosité qui passe du rose au vert (**Figure 36**). Ce changement est dû à la dégradation de la leghémoglobine qui donne sa couleur rose à la nodosité. Les premiers signes de la sénescence apparaissent dans des cellules au centre de la zone de fixation. La zone de sénescence s'étend ensuite progressivement dans les couches cellulaires périphériques (Pérez Guerra et al., 2010). Le processus de sénescence peut être divisé en deux temps : (1) les bactéroïdes sont dégradés et les symbiosomes fusionnent pour former des compartiments de lyse qui permettent la remobilisation des nutriments (Limpens et al., 2009; Vasse et al., 1990); (2) les cellules végétales sont à leur tour dégradées. Ces

dégradations impliquent une forte activité lytique assurée par l'activation de gènes codant pour des cystéine protéases (CP), des nucléases, des lipases et des hydrolases (Van De Velde et al., 2006).

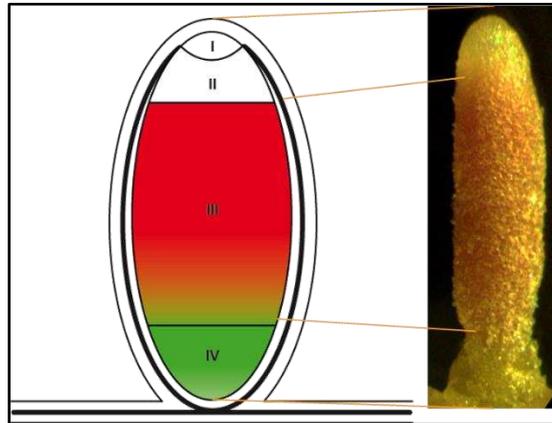


Figure 36 : Schéma et photo d'une nodosité indéterminée, adaptés de Dupont et al., 2012

La réduction d'azote atmosphérique en ammoniac est réalisée par la Nitrogénase qui est un complexe composé D'un point de vue macroscopique, cette sénescence est visualisée par un changement de couleur de la nodosité. En effet, la leghémoglobine, responsable du transport de l'oxygène nécessaire à la respiration des bactéroïdes, donne une couleur rose au nodule durant la phase de fixation d'azote. Lorsque les nodules entrent en sénescence, la dégradation de la leghémoglobine conduit à la formation de la biliverdine donnant une couleur verte au nodule.

L'observation de coupes longitudinales ultrafines de nodosité, colorées au bleu de toluidine, met en évidence trois types de cellules sénescents, dans la zone proximale (la plus âgée) de la nodosité. (Figure 37). Dans la zone de sénescence distale, près de la zone de fixation, les cellules sénescents de type I, présentent une lyse bactérienne progressive. Elles se caractérisent par une perte du contenu cytosolique avec un maintien de la rigidité membranaire végétale (Figure 37AB, F-H). Ces cellules contiennent des bactéroïdes de type 5 (Vasse et al., 1990). Ensuite, les cellules vont perdre leur rigidité (cellules sénescents de type II) et auront un aspect « aplati » dû aux ruptures de la paroi (Figure 37AB, J). Ces deux types de cellules sont observés dès le début de la sénescence, à environ 5 semaines post-inoculation (spi). Les cellules sénescents de type III sont observées à partir d'environ 8 spi. Il s'agit de cellules vacuolées, totalement résorbées, présentant un relâchement de la membrane plasmidique végétale (Figure 37CD, I) (Van De Velde et al., 2006).

Une sénescence avancée, observable à partir de 6 spi, permet de définir une zone V de la nodosité. Il s'agit d'une zone saprophytique où les bactéries, non différenciées issues des cordons d'infection, vont pouvoir se développer en présence d'oxygène (Timmers et al., 2000) (Figure 37K).

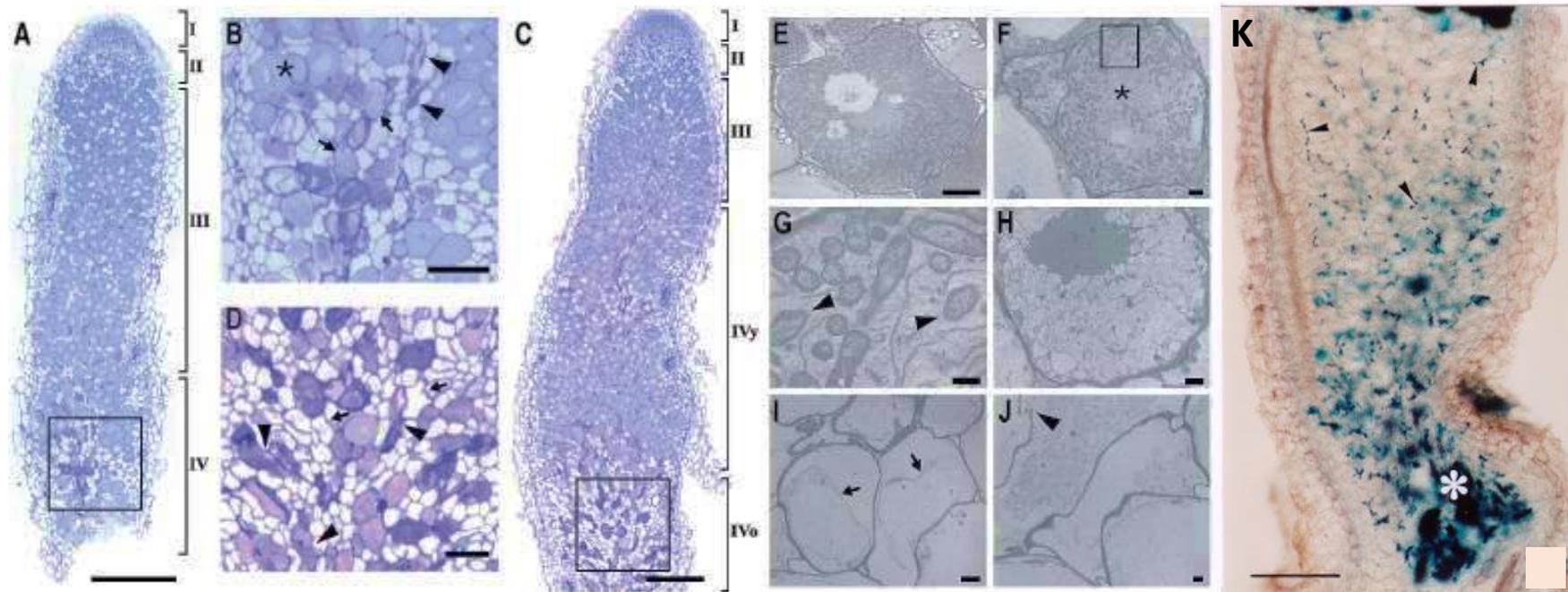


Figure 37 : Analyse microscopique de la sénescence nodositaire chez *M. truncatula* issue de Timmers et al., 2000; Van De Velde et al., 2006

A-C: Coupe longitudinale colorée au bleu de Toluidine de nodosité âgée de 5 spi (A), montrant une zone de sénescence jeune et petite, et de 9 spi (C), montrant des zones de sénescence jeune et âgée.

B-D : Zooms du rectangle présent en A (B), où les astérisques, les flèches et les pointes de flèches indiquent des cellules fixatrices, sénescentes de type I et II, respectivement, et du rectangle présent en B (D), où les pointes de flèches et les flèches indiquent des cellules sénescentes de type II et III, respectivement.

E-F: Clichés de microscopie électronique à transmission d'une cellule saine, fixatrice remplie de bactéroïdes (E) et d'une cellule sénescente de type I présentant un nombre clairement réduit de bactéroïdes et la présence proéminente de réticulum endoplasmique.

G : Zoom du rectangle présentant en F montrant la dégradation de la membrane péribactéroïdienne (pointes de flèche)

H-J : Clichés de microscopie électronique à transmission de cellules sénescentes de type I (H) subissant une résorption complète, de type III (I) présentant des signes de mort cellulaire végétal, telle que la perte de la membrane plasmique (flèches), et de type II présentant une perte de l'intégrité cellulaire et une rupture la paroi végétale.

K : Différenciation de la zone V chez nodosités de luzerne. La microscopie à champ clair des coupes longitudinales des nodosités induites par une souche bactérienne porteuse du gène *hemA::lacZ*. Il s'agit d'une coloration des rhizobia intracellulaire à l'aide de β -galactosidase au sein d'un nodule âgé de 9 spi. Pointes de flèche : cordons d'infection.

I, Méristème; II, Zone d'infection; III, Zone de fixation; IV, Zone de sénescence; zones de sénescence y et o, young (jeune) et old (o) respectivement.

Barres d'échelle : 500 μ m (A et C), 100 μ m (B and D), 50 μ m (K) 10 μ m (E), 2 μ m (F, H-J), et 500 nm (G).

Les signaux activateurs de la sénescence nodositaire naturelle développementale restent encore à définir, notamment chez le partenaire bactérien qui est le premier à être affecté. Toutefois, un certain nombre d'indicateurs de l'entrée en sénescence a pu être caractérisé telles que l'augmentation de la teneur en oxyde nitreux d'origine végétale et/ou bactérienne, la forte activation de protéases (**Annexe 6**, Yang et al., 2020a) dont les protéases végétales spécifiques de la nodosité CP6 (cystéine protéase) et VPE (vacuolar processing enzyme), et la diminution de la capacité fixatrice d'azote concordante à une répression transcriptionnelle de la leghémoglobine (Cam et al., 2012; Kazmierczak et al., 2020; Pierre et al., 2014; Yang et al., 2020a). Ces différents marqueurs sont également retrouvés lors de la sénescence induite, comme par exemple à la suite d'un stress de sécheresse, conduisant à un apport en oxygène insuffisant pour le métabolisme bactéroïdien, un stress d'obscurité, inhibant la photosynthèse et donc l'apport en sucres, ou un stress de traitement nitrates, qui une fois dégradés en NO, inhibe notamment la nitrogénase (**Figure 38**) (Kazmierczak et al., 2020). Toutefois, des différences physiologiques et moléculaires peuvent être observées entre des nodosités en sénescence naturelle ou sénescence induite. Notamment, il a été noté que seuls 50% des gènes induits dans la nodosité lors de la sénescence naturelle le sont également lors d'une sénescence induite par l'obscurité (Pérez Guerra et al., 2010). Il semble donc que les deux catégories de sénescence soient régulées par des mécanismes différents. Enfin, il a été proposé qu'une potentielle réactivation des défenses immunitaires de la plante puisse être à l'origine de cette sénescence, bien que le processus en jeu reste encore inconnu (Berrabah et al., 2019).

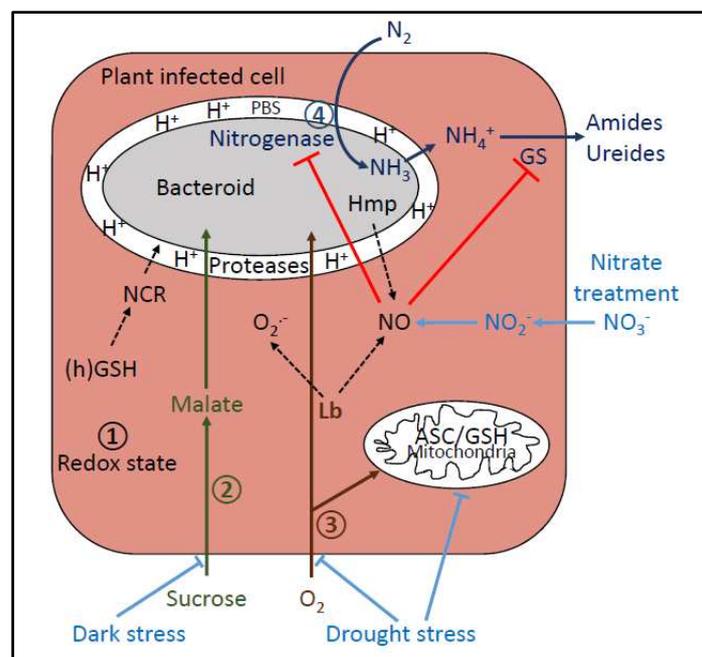


Figure 38 : Processus majeurs impliqués dans la sénescence nodositaire en réponse à des contraintes environnementales.

(1), Modification de la balance rédox ; (2), Altération de la nutrition carbonée du bactéroïde ; (3), Altération de l'homéostasie de l'oxygène ; (4), Altération de la fixation d'azote par la nitrogénase. Les lignes rouges indiquent les processus réprimés. Les lignes noirs en pointillé indiquent les captures de l'oxyde nitreux (NO) et de l'oxygène O₂ par les protéines Lb (leghémoglobine) et Hmp (flavohémoglobine). La couleur rose dans le cytoplasme de la cellule végétale illustre la teneur en Lb. ASC The pink color of the plant cell cytoplasm illustrates the Lb content. ASC: Ascorbate; Hmp: Flavohémoglobine; GS: Glutamine; (h)GSH: (homo) Glutathione synthétase; Lb: Leghémoglobine; PBS: Espace pér bactéroïdien; Protéases: Cystéine protéases; NCR: Nodule cysteine-rich peptides.

a) Adaptation intracellulaire des Rhizobia au cours de la symbiose : rôle des systèmes TA ?

Au cours de l'interaction symbiotique, les Rhizobia vont subir de nombreux changements environnementaux auxquels elles devront s'adapter. En effet, les bactéries vont quitter une vie planctonique dans le sol pour progresser dans les cordons d'infection et finalement aboutir à une vie intracellulaire. De plus, au sein des cellules végétales, les conditions sont également évolutives. La bactérie devra s'adapter à la modification de la teneur en ROS, en NO, à des changements de pH (acide en zone III), à la pression partielle en oxygène inférieure à 1% ainsi qu'à la présence de composés antimicrobiens type NCR (Berger et al., 2018; Syska et al., 2019). Tous ces différents acteurs sont également fréquemment rencontrés lors d'interactions de cellules eucaryotes avec des bactéries pathogènes où ils peuvent constituer des signaux activateurs de systèmes TA (Figure 39, Annexe 5)(Martins et al., 2018; Shidore and Triplett, 2017; Syska et al., 2019). Les systèmes TA participent à la survie de la bactérie en permettant une reprogrammation rapide du métabolisme. Chez les Rhizobia, de nombreux systèmes TA de type II putatifs ont été identifiés (Shidore and Triplett, 2017), mais peu d'analyses fonctionnelles ont été réalisées.

A ce jour, seules quelques études sur les systèmes TA de Rhizobia en interaction ont été publiées. Chez *Sinorhizobium meliloti*, les systèmes HicAB, VapBC-4 (NtrPR) et VapBC-5 ont été étudiés (Bodogai et al., 2006; Dusha et al., 1989; Lipuma et al., 2014; Oláh et al., 2001; Thomet et al., 2019). Le système HicAB a seulement été validé en tant que système TA. Aucun mutant de ce système n'a été étudié en culture pure ou en interaction. Le mutant de la toxine NtrR (nitrogen regulator) a été identifié grâce à sa capacité à former des nodosités malgré la présence d'ammonium exogène (Dusha et al., 1989). De plus, ce mutant conduit à une amélioration de la capacité fixatrice d'azote et du rendement végétal à 6spi (Oláh et al., 2001). Un phénotype similaire est également observé chez le mutant *vapC-5*, où la caractérisation de l'amélioration de la fixation d'azote et du rendement végétal montre un retard de sénescence nodositaire à 6spi (Lipuma et al., 2014). Ces mutants n'ont pas de phénotypes en culture pure. Par conséquent, dans un contexte sauvage, les systèmes VapBC-4 et VapBC-5 limiteraient l'interaction symbiotique et contribueraient à la mise en place de la sénescence.

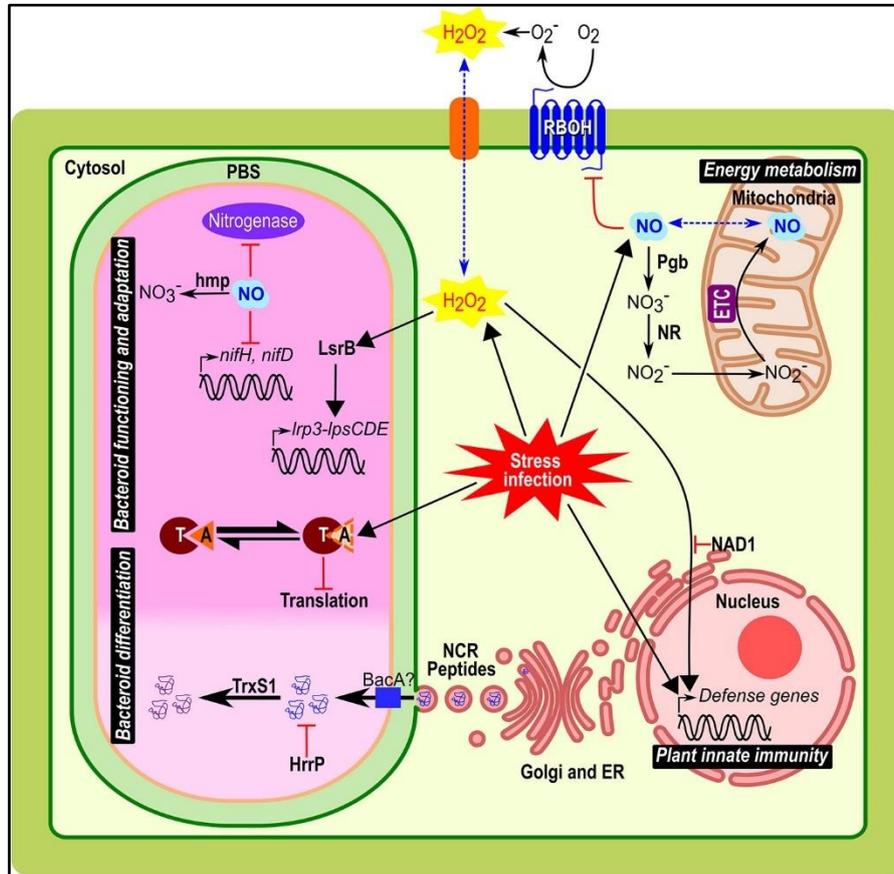


Figure 39 : Implication et connexion des ROS, du NO, des peptides NCR et des modules TA dans les symbiosomes des nodosités racinaires de *Medicago*, issu de Syska et al., 2019

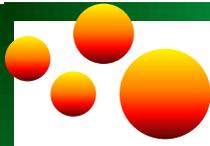
Le rôle biologique de ces composés durant la différenciation bactéroïdienne, le fonctionnement et l'adaptation de la nodosité, l'immunité de la plante et le métabolisme énergétique sont représentés. Les cellules végétales hôtes infectées par les bactéries/bactéroïdes impliquent de nombreuses réponses au stress tels que le stress oxydatif/nitrosatif, le pH acide, la microoxie et l'exposition aux NCR. Dans le symbiosome, la partie rose claire correspond à la zone d'infection et la partie rose foncé à la zone de fixation où les bactéries sont différenciées en bactéroïdes. Les flèches noires indiquent les réactions métaboliques ou les voies de transduction du signal en aval ; les flèches rouges indiquent les mécanismes de régulation (activation avec un point de flèche et répression avec une ligne en tête). Les flèches en pointillés bleues indiquent la diffusion membranaire.

Abréviations: PBS, espace pér bactéroidien; NR, nitrate réductase; Pgb, Phytoglobine; RBOH, respiratory burst oxidase homologs; O₂⁻, radical superoxyde; H₂O₂, Hydrogène peroxyde; ETC, Chaîne de transport d'électron; NO, oxide nitreux; ER; réticulum endoplasmique; NCR peptides, nodule-specific cysteine-rich peptides; Hmp, flavohémoglobine; NAD1, Nodules with Activated Defence 1; TrxS1, Thioredoxine S1; HrrP, Host-range restriction peptidase; LsrB, LysR transcription factor; T, toxine; A, antitoxine.

Toutefois, les systèmes TA de *S. meliloti* n'interviennent pas tous lors de l'interaction symbiotique puisque la délétion complète de quatre systèmes TA, présents sur les mégaplasmides symbiotiques pSymA et pSymB, ne conduisent pas à un phénotype symbiotique mais induit une toxicité cellulaire en culture pure (Milunovic et al., 2014). Enfin, chez *Bradyrhizobium japonicum* USDA110, le seul système VapBC étudié (*bat/bto*) induit une toxicité cellulaire et limite la nodulation du soja associée à une réduction du rendement végétal (Miclea et al., 2010). Dans ce cas, le phénotype suggère un rôle positif de ce système dans la survie bactérienne planctonique et peut-être aussi dans la survie intracellulaire.

L'élargissement des recherches bibliographiques aux bactéries fixatrices d'azote du genre *Burkholderia* apporte quelques données supplémentaires. Une étude récente de l'analyse transcriptomique de la réponse aux exsudats racinaires de *Mimosa pudica* de *Burkholderia phymatum*, *Rhizobium mesoamericanum* et *Cupriavidus taiwanensis* a été publiée. Deux systèmes TA, chez *C. taiwanensis* uniquement, sont surexprimés : *kluBA* (RelE-like/RHH) où seule l'antitoxine est surexprimée et un *vapBC* (PIN/Phd) pour lequel les deux entités sont surexprimées (Klonowska et al., 2018).

En conclusion, l'adaptation bactérienne est un élément clé dans la compréhension des différentes étapes de l'interaction symbiotique Rhizobia-Légumineuses (reconnaissance, infection, fixation et sénescence). Bien que les Rhizobia possèdent de nombreux systèmes TA connus, lors d'interactions pathogènes, pour jouer un rôle primordial dans l'adaptation bactérienne (Lobato-Márquez et al., 2016) (Shidore and Triplett, 2017), un manque drastique d'informations persiste quant à leur rôle dans la symbiose. Par conséquent, dans le cadre de cette thèse, je me suis intéressée aux rôles des systèmes TA VapBC de *S. meliloti* (majoritairement représentés) en interaction avec *M. truncatula*.



Section Introduction générale



- **Partie 1** : Les systèmes Toxine-Antitoxine
- **Partie 2** : La symbiose fixatrice d'azote
- **Partie 3** : Les objectifs de thèse

Section : Introduction générale

Partie 3 : Les objectifs de thèse

L'équipe Symbiose de l'UMR INRAE 1355, CNRS 7254, Université Côte d'Azur, s'intéresse à l'interaction symbiotique entre *Sinorhizobium meliloti* 2011 et *Medicago truncatula* A17. *M. truncatula* (diploïde), légumineuse modèle pour laquelle de nombreux outils génétiques et moléculaires sont disponibles, est proche de l'espèce d'intérêt agronomique *M. sativa* (tétraploïde), la luzerne fourragère. Son génome a été séquencé et l'assemblage a été amélioré récemment (Pecrix et al., 2018). *S. meliloti* est un de ses partenaires symbiotiques, dont le génome de la souche 2011 a été séquencé et annoté (Sallet et al., 2013) (<https://iant.toulouse.inra.fr/bacteria/annotation/cgi/rhime2011/rhime2011.cgi>).

S. meliloti 2011 possède un chromosome, de 3.66 Mb (NC_020528), et deux mégaplasmides pSymA et pSymB, de 1.35 (NC_020527) et 1.66 Mb (NC_020560) respectivement. L'analyse de son génome a permis l'identification de systèmes TA putatifs grâce à la base de données TADB2 (Xie et al., 2018) (<https://bioinfo-mml.sjtu.edu.cn/TADB2/>). Au total, *S. meliloti* possède 53 systèmes TA, dont 29 sur le chromosome, 17 sur le pSymA et 7 sur le pSymB (Figure 40A). Parmi les systèmes TA chromosomiques, les systèmes de la famille VapBC sont prépondérants (Figure 40B). Sachant que le phénotype de mutants (*vapC-4* et *vapC-5*) invalidés dans la toxine des systèmes VapBC-4 (ntrPR) et VapBC-5 induisent une amélioration la fixation d'azote en interaction avec *M. sativa* (Bodogai et al., 2006; Lipuma et al., 2014; Oláh et al., 2001), nous nous sommes demandé si les 11 systèmes VapBC de *S. meliloti* avaient tous un rôle dans la symbiose.

Dans la section Introduction des systèmes Toxine-Antitoxine, plusieurs aspects ont été abordés concernant la famille VapBC et sont résumés ci-après Figure 40C. Les systèmes VapBC sont des systèmes TA de type II, c'est-à-dire que l'antitoxine bloque la toxine par une interaction de type protéine-protéine. Ces systèmes sont retrouvés dans au moins 16 phyla et sont largement distribués dans le règne procaryote (Coray et al., 2017). L'extrémité N-terminale de l'antitoxine interagit avec l'ADN via un motif HTH, RHH, AbrB ou encore Phd-like, permettant le plus souvent la répression de l'opéron. Il est possible que la toxine agisse en tant que corépresseur par coopérativité conditionnelle (Tableau 2). L'extrémité C-terminale de l'antitoxine neutralise la toxine (Tableau 3), soit en entraînant une modification conformationnelle du site actif, pouvant aller jusqu'à la rupture des multimères de toxine, soit par neutralisation de la charge du site actif acide de la toxine par liaison proximale ou

distale (**Figure 17**). Le complexe VapB : VapC a un niveau d'oligomérisation très variable, allant de 1:1 à 4:4 et, par ailleurs, l'antitoxine n'est jamais en excès en complexe avec la toxine, contrairement à la majorité des toxines de type II (**Tableaux 2 et 3**). La protéolyse de l'antitoxine, conduisant à la libération de la toxine, est menée par des protéases de la famille AAA+ de type ClpXP et Lon. Une étude récente de co-immunoprécipitation chez *S. meliloti* a également montré des interactions possibles avec ClpYQ (également appelée HslUV) (Ogden et al., 2019). Cette protéolyse peut être activée lors de stress perçu par la bactérie, comme par exemple la présence d'antibiotique ou la microoxie. Une fois la toxine libérée, VapC peut exercer son activité de RNase site-spécifique. Les toxines VapC sont capables de dégrader les ARNm, les ARNr et les ARNt initiateur ou élongateur de la traduction (**Tableau 6**). Ainsi, les toxines VapC inhibent la traduction, de manière globale ou partielle, et permettent une adaptation bactérienne allant de la dormance à la persistance ou la mort cellulaire.

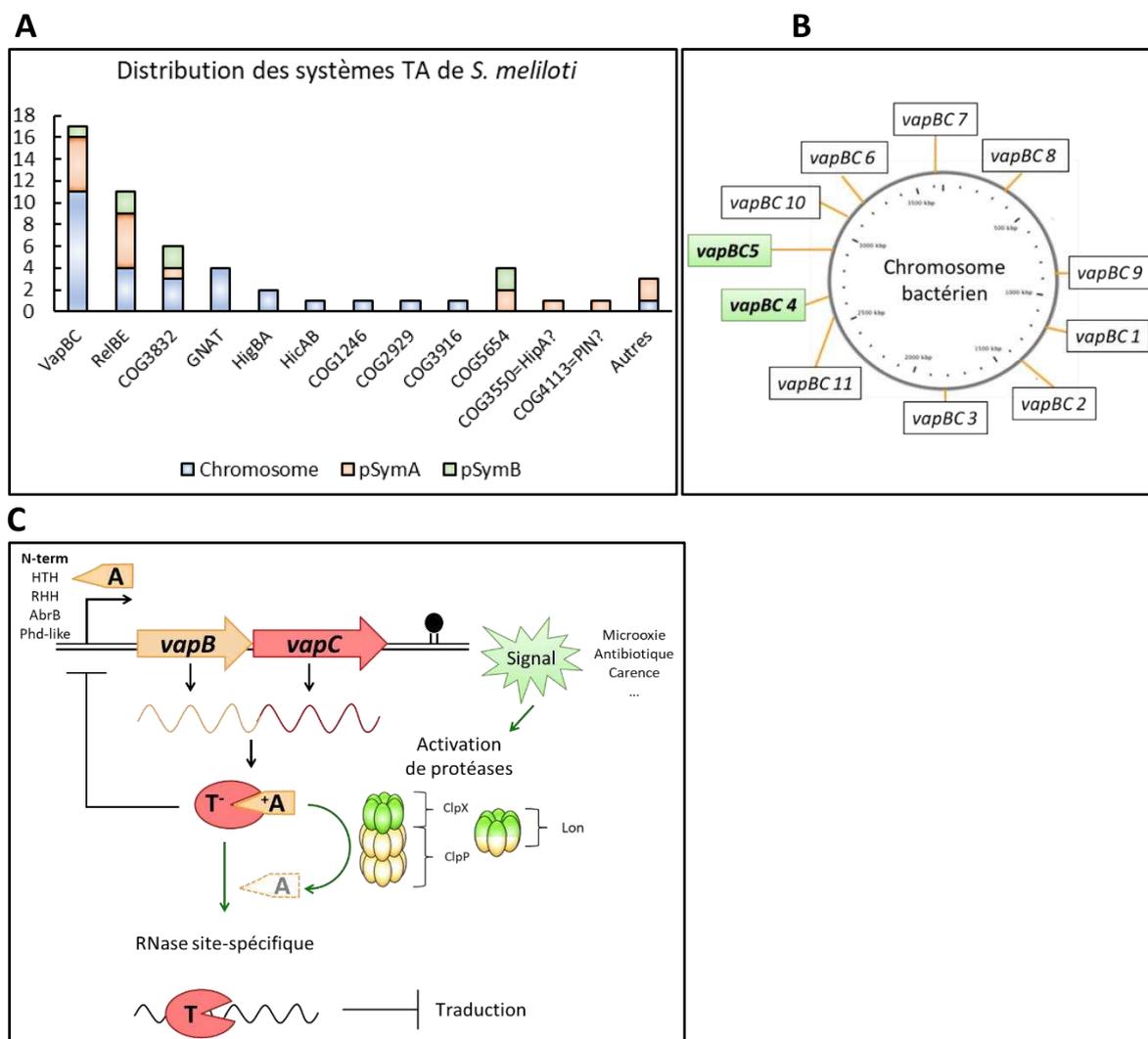


Figure 40 : Distribution des systèmes TA de *S. meliloti* et état de l'art des systèmes VapBC

A : Distribution des systèmes TA sur l'ensemble du génome de *S. meliloti*.

B : Répartition des systèmes VapBC sur le chromosome de *S. meliloti* dont VapBC4 et VapBC5 déjà caractérisés (vert).

C : Résumé des connaissances sur les systèmes VapBC.

Au cours de cette thèse, la caractérisation globale des 11 systèmes VapBC chromosomiques a été effectuée selon 3 objectifs principaux résumés sur la **Figure 41C** :

1. **Validation fonctionnelle des systèmes VapBC putatifs en tant que modules Toxine-Antitoxine.** Ce premier objectif consiste à démontrer que les gènes *vapC* de *S. meliloti* codent des toxines et que les gènes *vapB* codent des antitoxines. Ce premier objectif repose sur la surexpression chez un hôte hétérologue, *E. coli*, des protéines d'intérêt et à observer une diminution de la viabilité en cas de surexpression des VapC, contrecarrée lors de la coexpression avec VapB (effet antidote).

2. **Caractérisation phénotypique de mutants *vapC* en interaction avec *M. truncatula*.** Ce deuxième objectif consiste à créer des mutants d'inactivation des gènes des toxines VapC chromosomiques puis à tester leur capacité fixatrice d'azote à 6 semaines post-inoculation (spi), correspondant au début de la rupture symbiotique (sénescence nodositaire). Pour les mutants ayant un phénotype symbiotique différent de celui de la souche WT, une caractérisation phénotypique plus poussée a été réalisée pour préciser l'étape symbiotique affectée. La capacité fixatrice d'azote a également été étudiée à 3 spi (optimum de la fixation d'azote), de sorte à déterminer si un phénotype plus précoce pouvait également être observé. N'ayant pas observé de différence à ce point de cinétique, l'analyse moléculaire et cellulaire, présentée dans la partie Résultats de cette thèse, est montrée à 6 spi. L'expression de gènes marqueurs de la fixation d'azote et de la sénescence nodositaire a été mesurée par RTqPCR. Les longueurs totales et de la zone de sénescence des nodosités a été mesurée à la loupe binoculaire. L'abondance bactéroïdienne a été observée par transparence de la nodosité (BABB) et la viabilité bactéroïdienne par une coloration Live/Dead sur des coupes semi-fines.

3. **Détermination des cibles des toxines VapC7 et VapC10 par MORE RNA-seq.** Au vu des résultats obtenus par ces deux premiers objectifs, VapC7 et VapC10 ont été choisies pour réaliser une expérience de MORE RNA-seq (Mapping by Overexpression of an RNase in *E. coli*). Cette technique consiste à surexprimer la toxine d'intérêt chez *E. coli*, dans une souche dépourvue de systèmes TA de type II, puis de séquencer l'extrémité 5' des ARNs clivés (sélectionnés grâce à leur extrémité 5'-OH ou 5'-monophosphate). Après traitement bioinformatique et analyse statistique, les résultats montrent que ces deux VapC clivent des ARNs.

La réalisation de ces trois objectifs permettra à terme la soumission de deux articles :

- **Article 1** : Cet article concerne l'étude du rôle symbiotique du système VapBC10, comprenant sa validation fonctionnelle, sa caractérisation phénotypique du mutant *vapC10* et la détermination de la cible de la toxine VapC10. Cet article en cours de préparation est présenté dans la Partie 2 des Résultats.

- **Article 2** : Etude de l'ensemble des systèmes VapBC non publiés : VapBC1, VapBC2, VapBC3, VapBC6, VapBC7, VapBC8, VapBC9 et VapBC11, comprenant leur validation fonctionnelle, leur caractérisation phénotypique en symbiose via des mutants *vapC* et la détermination de la cible de VapC7 (seule toxine ayant un effet bactéricide, contrairement aux autres qui sont bactériostatiques).

Pour faciliter la lecture du manuscrit, les résultats sont présentés comme suit :

- Etat de l'art sur les systèmes VapBC de *S. meliloti* (données transcriptomiques disponibles)
- Présentation de l'ensemble des résultats concernant les systèmes VapBC de *S. meliloti* en termes de leur validation fonctionnelle et de la capacité fixatrice d'azote des mutants *vapC* en interaction avec *M. truncatula*
- Présentation de l'article scientifique 1 (en préparation)
- Présentation des résultats du MORE RNA-seq de la toxine VapC7

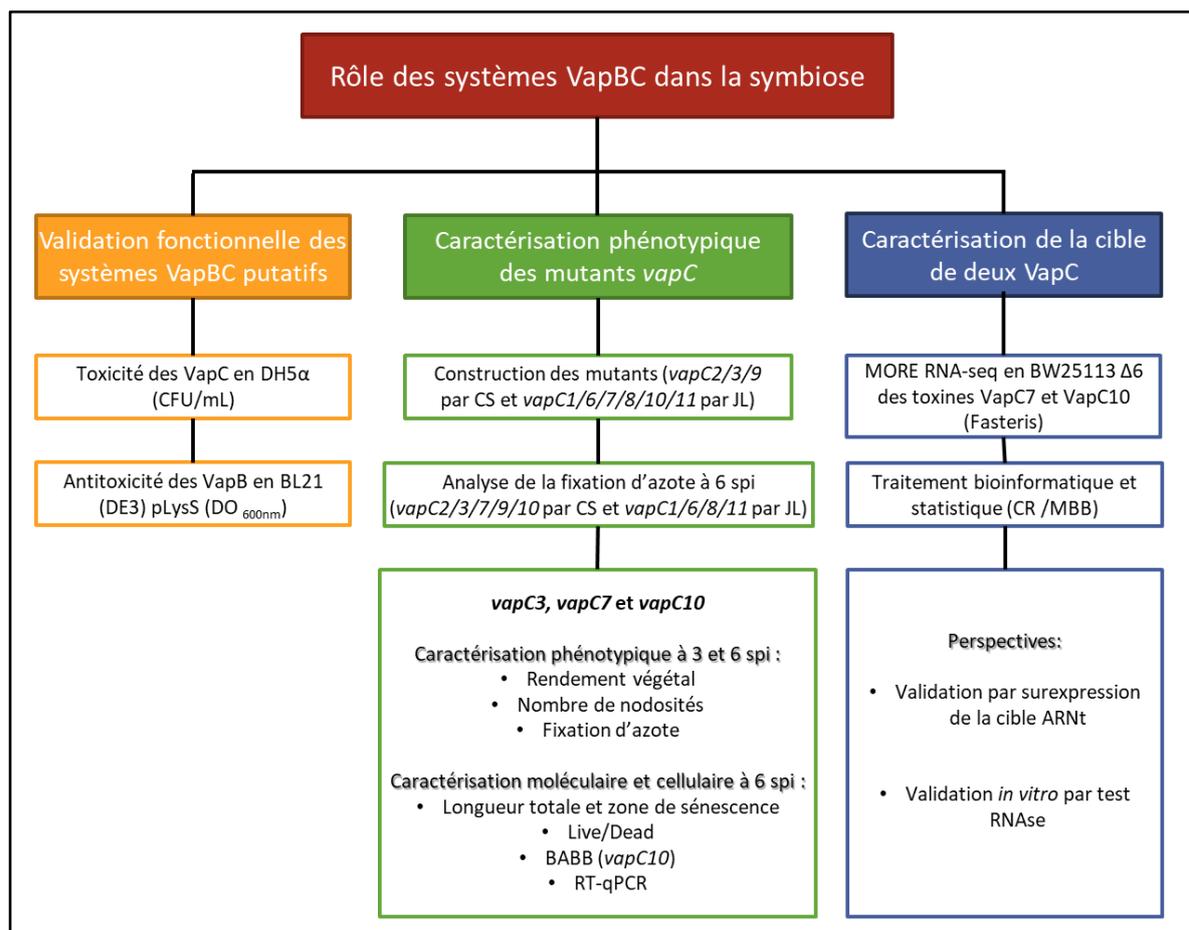


Figure 41 : Mindmap des objectifs de thèse

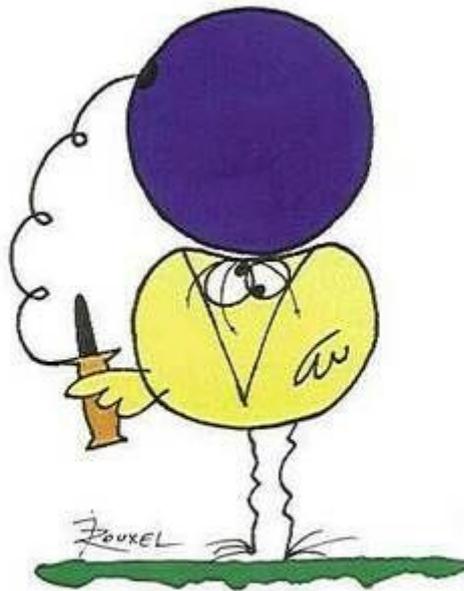
Mindmap des trois principaux objectifs de thèse. CS : Camille SYSKA, JL : Justine LIPUMA-précédente doctorante, CR : Corinne RANCUREL -bioinformatique, MBB : Marc Bailly-Bechet – statistique

Section Résultats



- **Partie 1** : Etude globale des systèmes VapBC de *S. meliloti*
- **Partie 2** : Article scientifique en préparation
- **Partie 3** : Identification de la cible de VapC7

Les devises Shadok



EN ESSAYANT CONTINUUELLEMENT
ON FINIT PAR RÉUSSIR. DONC:
PLUS ÇA RATE, PLUS ON A
DE CHANCES QUE ÇA MARCHE.

Section Résultats

Partie I : Etude globale des systèmes VapBC de *S. meliloti*

La première partie du chapitre Résultats est consacrée à l'étude globale des 11 systèmes VapBC chromosomiques de la souche 2011 de *S. meliloti*. Fort des résultats précédemment publiés montrant un rôle des systèmes VapBC4 et VapBC5 dans la symbiose fixatrice d'azote, l'implication, dans ce processus, des autres systèmes VapBC de *S. meliloti* a été étudiée.

Après une description des gènes et protéines VapB et VapC de *S. meliloti*, je présenterai une compilation des données *in silico*, disponibles dans la littérature de l'expression des 11 opérons *vapBC*. La validation fonctionnelle des opérons putatifs VapBC1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10 et 11 en tant que modules Toxine-Antitoxine sera ensuite décrite. Enfin, la capacité fixatrice d'azote, en interaction symbiotique avec la plante modèle *Medicago truncatula*, des mutants *vapC* pour les 9 systèmes non caractérisés sera décrite.

III. Les systèmes VapBC de *S. meliloti*

1) Analyse des séquences nucléotidiques et protéiques

Seul l'environnement génique de certains opérons *vapBC* présente des particularités qui méritent d'être mentionnées. Ainsi, l'opéron *vapBC1* est proche du gène *relA*, codant l'enzyme responsable de la production de l'alarmone (p)ppGpp. L'opéron *vapBC11* est relativement proche du gène codant la protéase AAA+ ClpP2, et l'opéron *vapBC3* est relativement proche du gène *lexA*, codant pour un régulateur de la réponse SOS, et de gènes précurseurs des ARNt^{Asn} et ARNt^{Cys}. De plus, la présence d'un ARN non codant est retrouvée dans les gènes des toxines VapC3 et VapC11, et en amont de l'opéron VapBC10, suggérant des régulations négatives post-transcriptionnelles (Figure 42). Concernant les autres modules, l'environnement génique n'apporte pas d'informations significatives.

La majorité des gènes *vapB* et *vapC* possèdent un ATG comme codon initiateur de la traduction. Cependant un codon initiateur GTG est retrouvé pour les gènes codant les toxines VapC1, VapC6, VapC7 et VapC11, et ceux codant les antitoxines VapB3, VapB6 et VapB8. Enfin, un codon TTG

initiateur est retrouvé pour les gènes codant la toxine VapC4 et l'antitoxine VapB5. Par conséquent, l'efficacité de traduction des protéines VapB et VapC sera différente en fonction du codon initiateur (ATG codon le plus efficace et TTG le moins efficace).

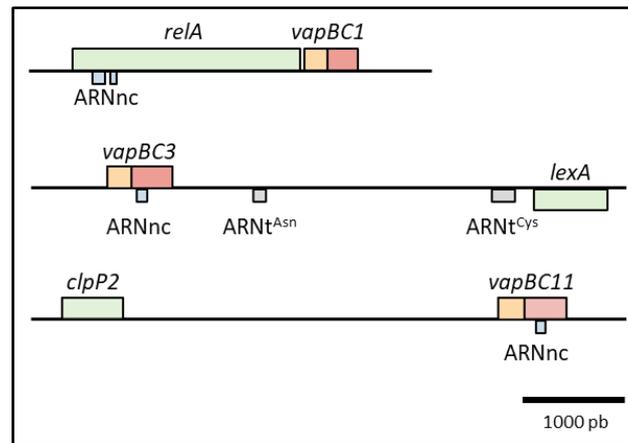


Figure 42 : Environnement génétique des opérons *vapBC1*, *vapBC3* et *vapBC11*

Les gènes connus pouvant être impliqués dans la régulation des systèmes TA sont représentés en vert. *relA* code pour l'enzyme responsable de la production de l'alarmone (p)ppGpp, impliquée dans la réponse stringente. *lexA* code pour un régulateur majeur impliqué dans la réponse SOS. *clpP2* code pour une protéase impliquée dans la dégradation d'antitoxine de type II. Les gènes des antitoxines *vapB* sont en orange, ceux des toxines *vapC* en rouge. Les ARN non codant (nc) sont en bleu et enfin, les ARNt sont en gris. Les gènes situés au-dessus du brin d'ADN (noir) sont sur le brin positif et ceux en dessous du brin d'ADN sont sur le brin négatif.

L'alignement des séquences nucléotidiques ou protéiques de l'ensemble des *vapB* ou *vapC* ne révèle qu'une très faible identité entre les gènes ou les protéines. Un simple blastn ou blastp (alignement de séquences nucléotidiques et protéiques respectivement) ne permet pas d'aligner l'ensemble des *vapB* ni des *vapC*, et donc de calculer un pourcentage d'identité. Pour permettre la comparaison des protéines, l'outil InterPro (un outil de prédiction d'appartenance à une famille protéique, grâce aux domaines protéiques et motifs importants) a été choisi. Il permet de confronter la séquence protéique d'intérêt avec des homologues déjà caractérisés dans la base de données SwissProt (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>). D'après cet outil, les antitoxines VapB de *S. meliloti* sont subdivisées en 4 types : le type AbrB-like (VapB1, VapB3, VapB4, VapB5 et VapB7), le type HTH (VapB9, VapB10 et VapB11), le type Phd/YefM-like (VapB6 et VapB8) et le type RHH (VapB2) (Figure 43A). Les toxines, quant à elles, sont toutes prédites comme des VapC et/ou possédant un domaine PIN, hormis VapC1, tronquée d'environ un tiers dans sa partie C-terminale, suggérant une protéine non fonctionnelle (Figure 43B). D'autre part, VapC4, VapC5 et VapC7 sont prédites comme des tRNAses de l'ARNt^{fMet} et partagent les mêmes homologues ; VapC9, VapC10 et VapC11 sont prédites comme des ribonucléases et partagent au moins deux homologues (VapC42 de *Mycobacterium tuberculosis* et

A

N° de gène	Nom	Prédiction InterPro
SMc02658	<i>vapB1</i>	AbrB-like
SMc01933	<i>vapB2</i>	RHH
SMc01176	<i>vapB3</i>	AbrB-like
SMc03949	<i>vapB4</i>	AbrB-like
SMc00686	<i>vapB5</i>	AbrB-like
SMc03136	<i>vapB6</i>	Phd/YefM
SMc04408	<i>vapB7</i>	AbrB-like
SMc00392	<i>vapB8</i>	Phd/YefM
SMc00899	<i>vapB9</i>	HTH
SMc02988	<i>vapB10</i>	HTH
SMc02716	<i>vapB11</i>	HTH

B

N° de gène	Nom	Prédiction InterPro	Homologue(s) prédits par Swiss Prot	Cible dans la littérature	Référence
SMc02657	<i>vapC1</i>	NA	NA	NA	NA
SMc01932	<i>vapC2</i>	VapC family, PIN Domain	NA	NA	NA
SMc01177	<i>vapC3</i>	PIN Domain	NA	NA	NA
SMc01521	<i>vapC4</i>	tRNA(fMet)-specific endonuclease VapC	<i>Haemophilus influenzae</i> : VapC1 et 2; <i>Shigella flexneri</i> : VapC; <i>Salmonella Typhimurium</i> : VapC _{LT2} ;	tRNA ^{fMet}	(Walling and Butler, 2018) (Winther and Gerdes, 2011)
SMc00687	<i>vapC5</i>	tRNA(fMet)-specific endonuclease VapC	<i>Haemophilus influenzae</i> : VapC1 et 2; <i>Shigella flexneri</i> : VapC; <i>Salmonella Typhimurium</i> : VapC _{LT2} ;	tRNA ^{fMet}	(Walling and Butler, 2018) (Winther and Gerdes, 2011)
SMc03137	<i>vapC6</i>	PIN Domain	NA	NA	NA
SMc04881	<i>vapC7</i>	tRNA(fMet)-specific endonuclease VapC	<i>Haemophilus influenzae</i> : VapC1 et 2; <i>Shigella flexneri</i> : VapC; <i>Salmonella Typhimurium</i> : VapC _{LT2} ;	tRNA ^{fMet}	(Walling and Butler, 2018) (Winther and Gerdes, 2011)
SMc00393	<i>vapC8</i>	VapC family, PIN Domain	NA	NA	NA
SMc00900	<i>vapC9</i>	VapC family, PIN Domain	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> : VapC30, 36 et 42; <i>Mycobacterium bovis</i> : VapC2 et 8	tRNA(Ser), VapC30	(Winther et al., 2016)
SMc02987	<i>vapC10</i>	VapC family, PIN Domain	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> : VapC42; <i>Mycobacterium bovis</i> : VapC8	NA	NA
SMc02715	<i>vapC11</i>	VapC family, PIN Domain	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> : VapC28 et 42; <i>Mycobacterium bovis</i> : VapC1 et 8	NA	NA

Figure 43 : Prédictions des domaines protéiques (InterPro) et des homologues (SwissProt) des antitoxines VapB et des toxines VapC

A: Analyse des antitoxines VapB.

Les séquences protéiques des antitoxines VapB ont été comparées avec la base de données InterPro de sorte à prédire les domaines protéiques.

B : Analyse des toxines VapC.

Les séquences protéiques des toxines VapC ont été comparées avec la base de données InterPro de sorte à prédire les domaines protéiques et à identifier de potentiels homologues déjà caractérisés dans la base de données SwissProt.

Les couleurs orange et bleu correspondent respectivement aux références Winther and Gerdes, 2011 et Walling and Butler, 2018

VapC8 de *Mycobacterium bovis*). VapC9 étant proche de VapC30 de *M. tuberculosis*, dont la cible est l'ARNt^{Ser}, nous pouvons émettre l'hypothèse que VapC10 et VapC11 partagent également cette même cible. Enfin, VapC2, VapC3, VapC6 et VapC8 n'ont pas d'homologues connus. D'après les outils de prédiction ClustalW et ETE3 de FastTree, les toxines VapC9/10/11, VapC4/5/7 et VapC3/6 semblent être phylogénétiquement liées. La prédiction pour les toxines VapC2 et VapC8 quant à elle varie suivant l'outil utilisé et la séquence fournie (nucléotidique ou protéique).

Cette première analyse nous a permis d'affiner les critères d'alignement entre antitoxines ou toxines proches. L'outil d'alignement protéique PROMALS3D a alors été utilisé pour effectuer des alignements multiples entre antitoxines (Figure 44) ou toxines proches entre elles (Figure 45). Cet outil prédit également la structure secondaire consensus à partir des séquences protéiques.

D'après nos résultats, les structures secondaires retrouvées au sein des antitoxines appartenant à un même groupe phylogénique sont concordantes avec les domaines de liaison à l'ADN identifiés à l'extrémité N-terminale des antitoxines. Les antitoxines de type AbrB-like possèdent au moins une épingle à cheveux β reliée à des hélices α (Figure 44A), les antitoxines de type Phd/YefM forment probablement un faisceau hélicoïdal au vu du nombre d'hélices α retrouvées (Figure 44B) et les antitoxines de type HTH présentent bien en N-terminal des hélices séparées par un tour (Figure 44C). Enfin, l'antitoxine VapB2 étant chez *S. meliloti* l'unique représentant de type RHH, a été alignée contre elle-même. Elle présente une structure feuillet β - hélice α - hélice α caractéristique (Figure 44D).

Concernant l'alignement multiple des toxines, il permet surtout de mettre en évidence la présence d'au moins trois acides aminés fortement conservés (un aspartate entre la 4ème et la 7ème position, un glutamate entre la 40ème et 46ème position et un aspartate entre la 86ème et la 116ème position), caractéristiques du domaine PIN, à l'exception de VapC1, tronquée à l'extrémité C-terminale, qui ne possède que les deux premiers acides aminés conservés (Figure 45). Pour souligner les ressemblances entre différentes toxines, cet alignement a également été effectué entre toxines appartenant à un même groupe phylogénique. Ainsi :

- VapC4 (D7, E43, D98, **E119 et E129**), VapC5 (D7, E42, D98, **E119 et E129**) et VapC7 (D7, E43, D99, **E120 et E130**) possèdent 5 acides aminés conservés,
- VapC9 (D4, **E15**, E40, D99, **D119 et D124**), VapC10 (D5, **E16**, E42, D116, **D136 et D141**) et VapC11 (D5, **E16**, E42, D116, **D135 et D140**) en partagent 6,
- VapC3 (D5, **E34**, E46, D99 et **D118**) et VapC6 (D6, **E35**, E46, D99 et **D118**) en contiennent 5
- VapC2 et VapC8 en possèdent au minimum 3 (le nombre varie de 3 à 4 en fonction du groupe auquel elles sont comparées).

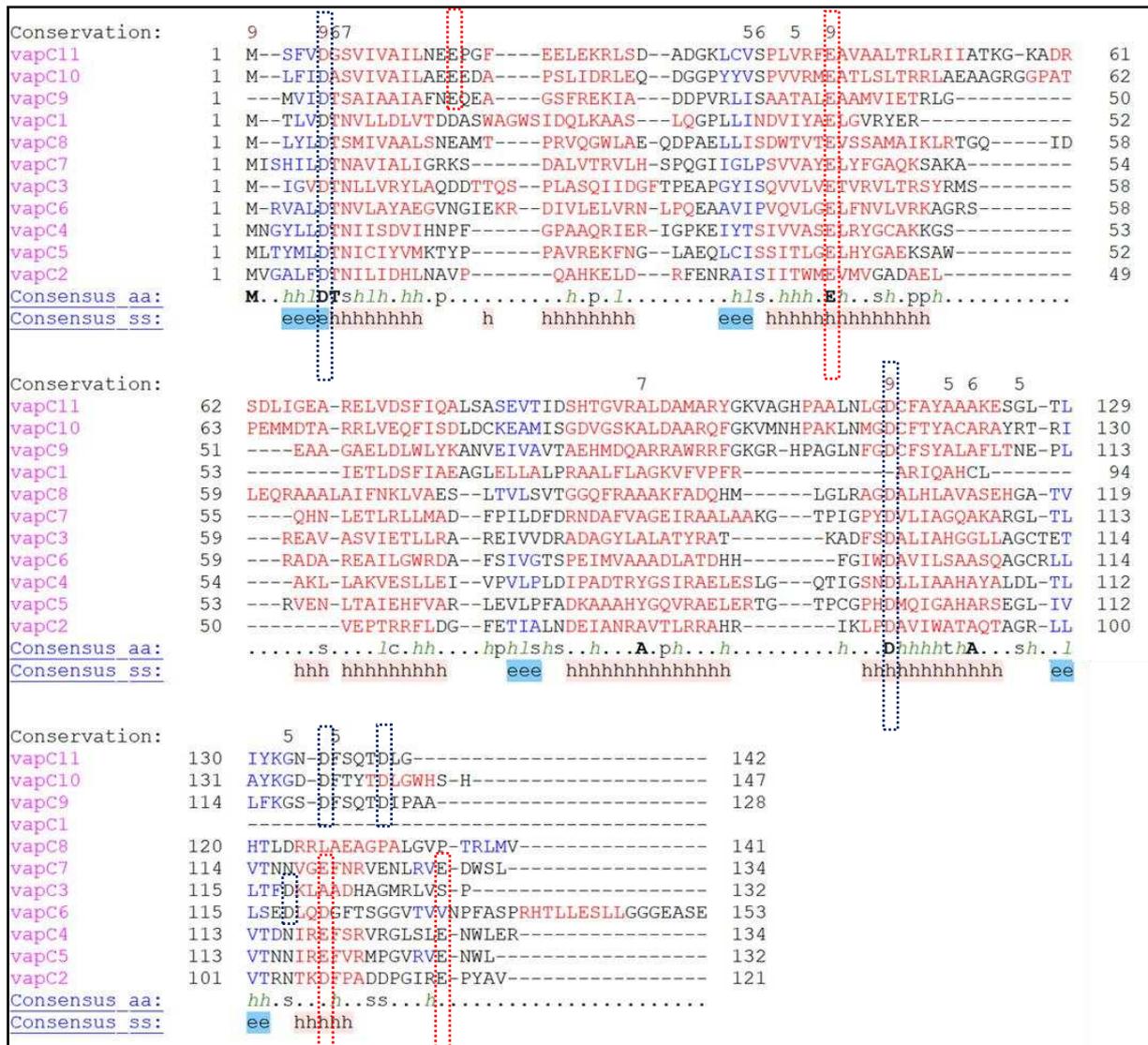


Figure 45 : Alignement des toxines VapC (PROMALS 3D)

Les acides aminés formant une hélice α sont représentés en rouge (lettre h), et ceux formant un feuillet β en bleu (lettre e). La conservation des acides aminés entre les différentes séquences alignées affiche un score de 9 quand tous les acides aminés sont conservés. Ce score diminue en fonction de la variabilité des acides aminés entre les différentes séquences. Les consensus en acides aminés (aa) et en structure secondaire (ss) sont présentés en dessous des séquences alignées. Les encadrés en pointillés correspondent aux acides aminés acides du potentiel site actif conservés entre plusieurs VapC, en bleu quand il s'agit d'un aspartate et en rouge quand il s'agit d'un glutamate.

2) Analyse des données transcriptomiques des gènes *vapBC*

A ce jour, seuls trois transcriptomes, pour lesquels les données complètes sont disponibles, permettent d'estimer l'expression des gènes *vapB* et *vapC* : un transcriptome comparant l'expression des gènes lors de la phase exponentielle de croissance et la phase stationnaire, en milieu riche (Sallet et al., 2013), un transcriptome présentant l'expression génique dans les différentes zones de la nodosité fonctionnelle (15 jours post-inoculation) lors de l'interaction de *S. meliloti* 2011 avec *M. truncatula* (Roux et al., 2014) et un transcriptome, encore non publié, comparant l'expression dans des nodosités jeunes ou âgées, soumises ou non à un stress nitrate ou salin (Projet ANR StayPink).

a) Expression des gènes *vapBC* en culture pure : phase stationnaire versus phase exponentielle de croissance

L'analyse de l'expression différentielle des gènes de *S. meliloti* cultivée en milieu riche montre que, dans l'ensemble, les gènes *vapBC* sont exprimés 1.5 à 7 fois plus, selon le module considéré, en phase stationnaire, phase associée à des carences nutritives et à un arrêt de la croissance, qu'en phase exponentielle (Figure 46A). A noter, qu'au sein des opérons VapBC3 et VapBC11, l'expression des gènes de l'antitoxine VapB3 et de la toxine VapC11 est stimulée en phase stationnaire alors que les gènes de leur toxine et antitoxine apparentée, VapC3 et VapB11 respectivement, ne le sont significativement pas, malgré une tendance à être stimulée par rapport à la phase exponentielle. De manière originale, le système VapBC1 est quant à lui réprimé en phase stationnaire (Figure 46A). Rappelons toutefois que ce module code une toxine tronquée d'environ 30% dans sa partie C-terminale. Cette différence originale d'expression pourrait donc s'expliquer par un défaut d'auto-régulation du système lié à un défaut de formation du complexe A : T. De plus, bien que l'expression de *vapBC1* soit significativement différente entre ces deux stades de croissance, il est à préciser que le niveau d'expression de cet opéron est particulièrement bas (Figure 46B) suggérant plus vraisemblablement une absence d'expression de l'opéron dans les deux états physiologiques analysés. Enfin, l'expression du système VapBC8 reste inchangée entre les deux phases de croissance.

En conclusion, l'expression des systèmes VapBC de *S. meliloti* est stimulée par la phase stationnaire, suggérant que la carence nutritionnelle puisse être un signal d'activation. Ceci est en accord avec la littérature qui décrit la carence nutritionnelle comme l'un des principaux signaux activateurs des systèmes TA bactériens (Albrethsen et al., 2013; Gupta et al., 2017). Toutefois, une stimulation de l'expression de l'opéron n'est pas systématiquement synonyme d'activation (Song and Wood, 2020). En effet, celle-ci dépend du ratio [A]/[T] et donc de l'activation de protéases énergie dépendante de la famille AAA+ (ATPases Associated with different cellular Activities), responsables de la dégradation de l'antitoxine.

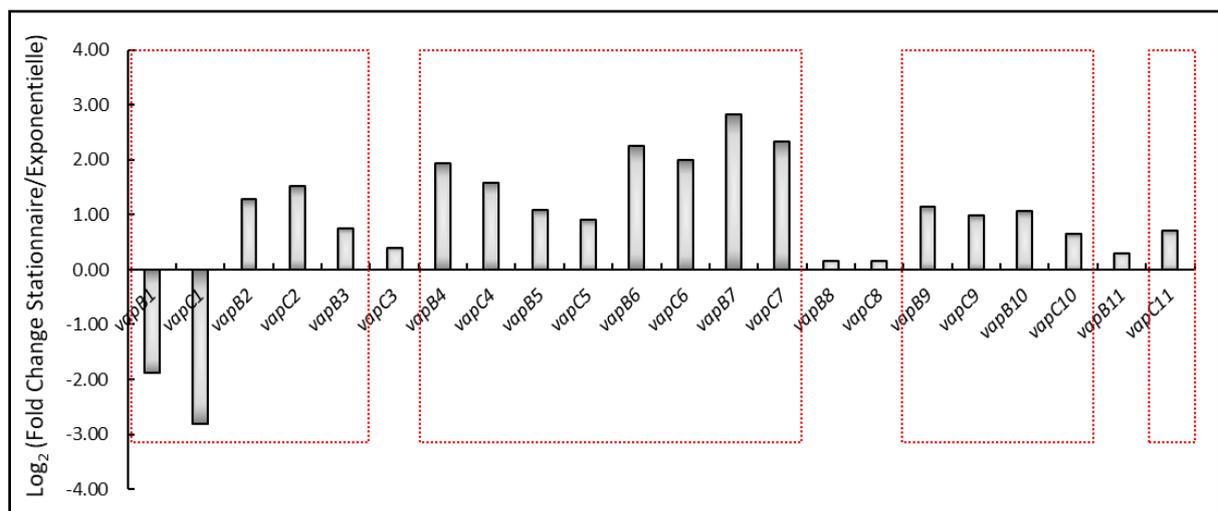
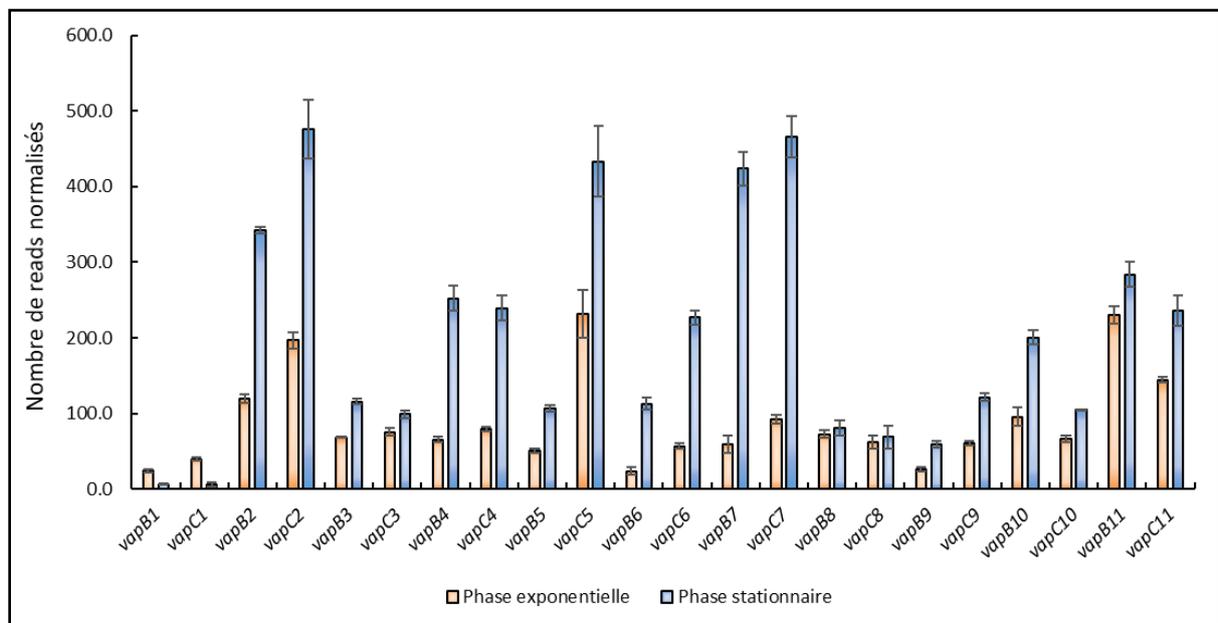
A**B**

Figure 46 : Analyse de l'expression différentielle des gènes *vapBC* de *S. meliloti* entre la phase stationnaire et la phase exponentielle de croissance.

A : Différentiel d'expression (Fold Change) des gènes *vapBC* entre la phase stationnaire et la phase exponentielle de croissance, exprimé en \log_2 . Les Fold change correspondent à l'expression différentielle de gène entre deux conditions où, par exemple, un gène 2 fois plus exprimé aura un $\log_2(2)=1$.

B : Histogramme du nombre de reads moyen des gènes *vapBC* obtenus en phase exponentielle et en phase stationnaire de croissance. Les moyennes sont calculées sur 3 réplicats biologiques, et les écarts-types sont des écarts moyens.

Les données correspondent à la fraction des longs ARNs séquencés, après croissance en milieu riche de *S. meliloti*. Les encadrés en pointillés rouges correspondent aux gènes ayant une variation significative, c'est-à-dire une p -value < 0.05.

b) Expression des gènes *vapBC* dans les différentes zones de la nodosité fixatrice

La microdissection au laser des différentes zones de la nodosité fixatrice d'azote (15 jpi), couplée à une analyse en RNA-seq, a permis d'étudier l'expression différentielle des gènes de nodosités de *M. truncatula* induites par *S. meliloti* 2011 (Roux et al., 2014) (Figure 47). Pour rappel (Figure 47B), la nodosité peut être subdivisée en différentes zones suivant les stades de différenciation des cellules végétales et bactériennes. La zone II dite d'infection est divisée en sous-zone distale (II_d) et proximale (II_p). A l'interzone II-III les bactéroïdes achèvent leur différenciation (IZ II-III). Dans la zone III, fixatrice, les bactéroïdes fixent l'azote atmosphérique (N₂) et le convertissent en ammoniac. Enfin, la zone IV, de sénescence, n'est pas analysée dans cette étude de Roux et al., 2014, réalisée sur des nodosités fixatrices jeunes, non sénescentes.

L'expression dans les zones II_d, II_p, IZ et III de la nodosité des 22 gènes des 11 opérons *vapBC* est reportée et représentée sur les Figures 47CD et 48. L'analyse statistique des données est résumée en Figure 48. Il en résulte que la majorité des gènes *vapB* et *vapC* ne présentent pas, dans les différentes zones, de forte accumulation de transcrits. Les opérons *vapBC2*, *vapBC5*, *vapBC7* et *vapBC11* et dans une moindre mesure *vapBC6*, *vapBC8* et *vapBC10* sont les modules les plus exprimés dans la nodosité. En comparant l'abondance de transcrits entre les différentes zones, il apparaît que seule la toxine VapC7 est préférentiellement exprimée en zone III de fixation (Figures 47CD et 48). En effet, la majorité des autres opérons *vapBC* sont globalement moins transcrits en zone III et plutôt exprimés dans la zone II (proximale ou distale) par rapport à l'interzone, siège de la différenciation bactéroïdienne, ou par rapport à la zone de fixation (zone III), ou dans l'interzone par rapport à la zone III, comme par exemple les opérons *vapBC2*, *vapBC5* et *vapBC11* (Figure 48). De plus, il est à noter que la présence de VapC11 dans les bactéroïdes, a été confirmée dans une étude protéomique récente (Antonets et al., 2018). Toutefois, seule une liste des protéines les plus présentes a été communiquée, ne permettant pas d'analyser le profil de production des autres toxines/antitoxines.

Indépendamment du niveau d'expression atteint en cumulatif dans la nodosité, au sein de l'opéron, les transcrits *vapC* sont plus abondants que ceux de *vapB*, sauf pour les opérons *vapBC2*, *vapBC8* et *vapBC10*. L'abondance prédominante des transcrits *vapC* n'est pas en accord avec la règle du « First gene rule » qui veut que le gène de tête d'un opéron soit plus transcrit que celui en aval. Ces résultats suggèrent donc que les transcrits *vapB* et *vapC* aient des demi-vies différentes.

En conclusion, les gènes *vapBC* présentent des expressions différentielles selon les systèmes et la zone considérée. Ceci suggère des régulations transcriptionnelles et post-transcriptionnelles différentes, possiblement associées à la perception de différents signaux rencontrés dans les différents micro-environnements traversés par le symbiote.

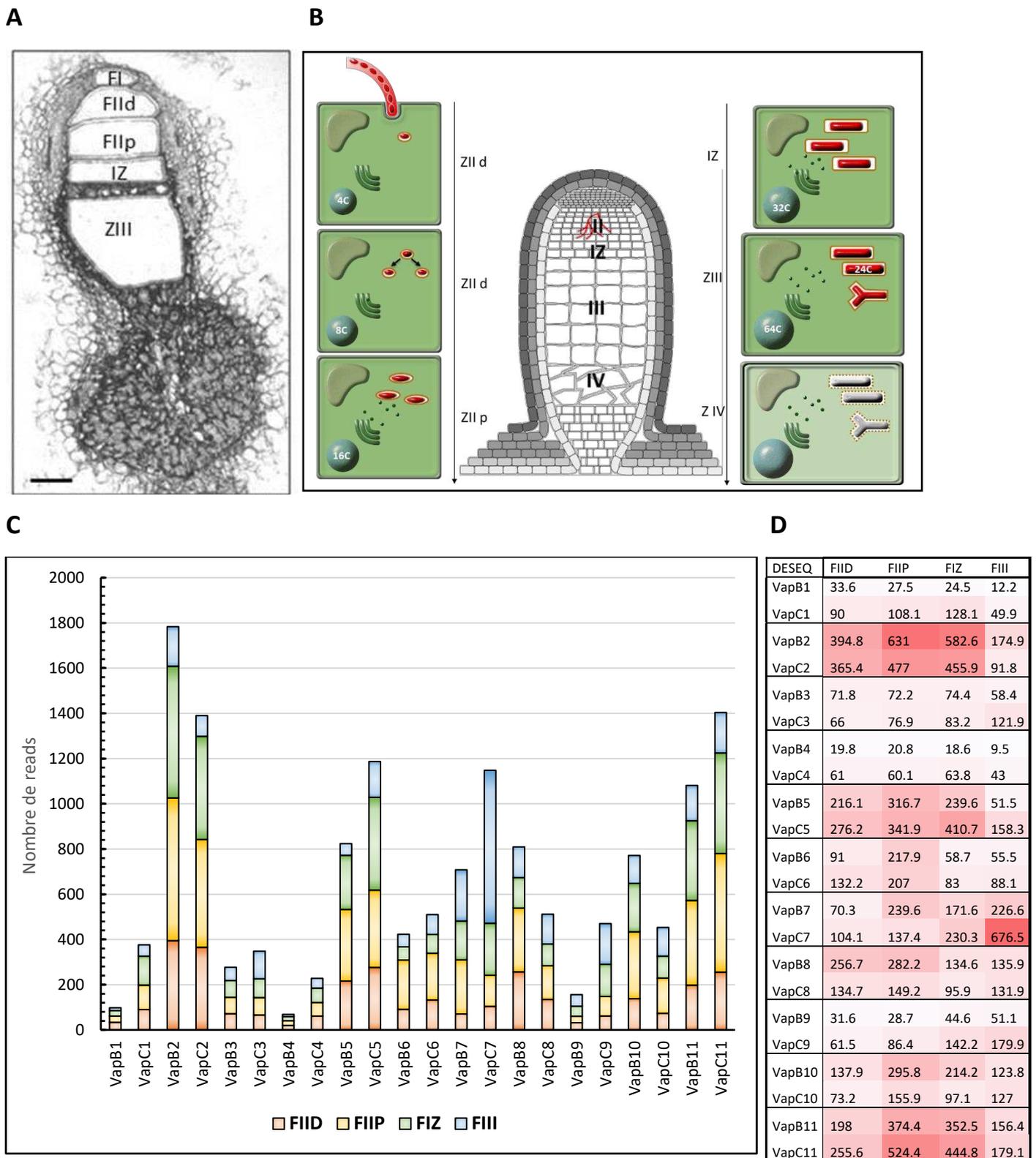


Figure 47 : Analyse de l'expression différentielle des gènes *VapBC* dans les différentes zones de la nodosité fonctionnelle âgée de 15 jpi

A : Coupe de nodosité fixée au méthanol (16 µm), illustrant la microdissection au laser de 5 zones de la nodosité âgée de 15 jours post-inoculation (jpi). Barre d'échelle = 100 µm

B : Schéma explicatif des différentes zones de la nodosité mature. Les bactéries, relarguées depuis le cordon d'infection dans les cellules végétales en zone II distale (ZII d), se divisent dans les symbiosomes et commencent à s'allonger jusqu'en zone II proximale (ZII p). Ensuite, la différenciation bactériodienne, caractérisée par des endoréductions du génome, s'initie en interzone (IZ) jusqu'à ce que les bactéroïdes deviennent fonctionnels et adoptent une forme branchée en Y en zone III (ZIII). Ensuite les bactéroïdes puis les cellules végétales vont dégénérer en zone IV (ZIV).

C : Histogramme empilé du nombre de reads (**D**) des gènes *vapB* et *vapC* au sein des différentes zones de la nodosité. L'expression des gènes bactériens a été déterminée par une analyse en RNA-seq couplée à une micro-dissection au laser de nodosités âgées de 15 jpi, depuis le méristème apical jusqu'à la zone de fixation (Roux et al., 2014). FIID : zone d'infection distale ; FIIP : zone d'infection proximale ; IZ : interzone zone II et zone III ; FIIL : zone de fixation. Les valeurs numériques sont présentées en **D**.

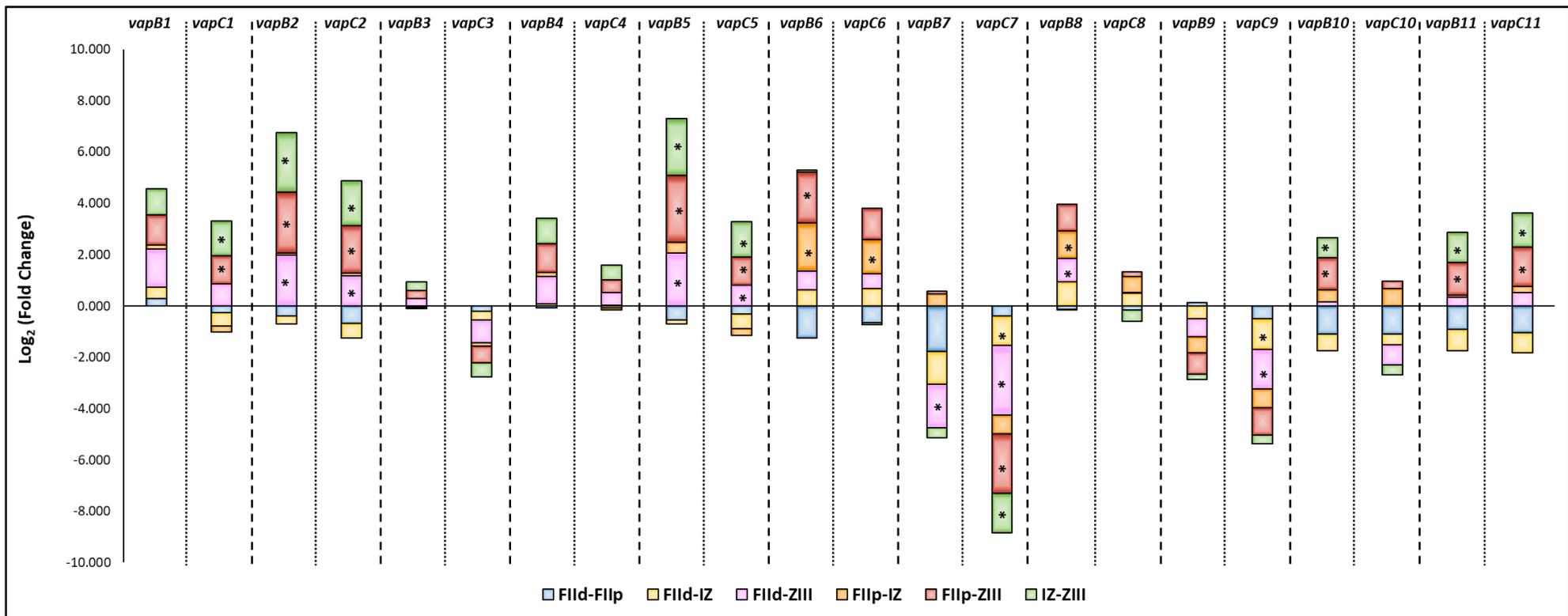


Figure 48 : Analyse des Fold Change d'expression différentielle des gènes *vapBC* chez *S. meliloti* dans les différentes zones de la nodosité fonctionnelle âgée de 15 jpi.

Histogramme empilé des fold change d'expression des gènes *vapB* et *vapC* au sein des différentes zones. La comparaison de l'expression des gènes entre la zone II distale (FIId) et la zone II proximale (FIIP) est en bleu, celle entre la zone II distale et l'interzone (IZ) en jaune, celle entre la zone II distale et la zone III (FIII) en rose, celle entre la zone II proximale et l'interzone en orange, celle entre la zone II proximale et la zone III en rouge, et, enfin, celle entre l'interzone et la zone III en vert. Les données significatives (p-value < 0.01) présentent un astérisque.

c) Expression des gènes *vapBC* dans des nodosités sénescentes

Cette thèse s'inscrit dans le projet ANR « STAYPINK » qui vise à élucider les mécanismes mis en jeu lors de la sénescence nodositaire naturelle (développementale) ou induite (par ajout de nitrates ou de NaCl). Un transcriptome non publié, en cours de validation et produit par Rémy, A., Sauviac, L et Bruand, C., a été élaboré afin d'identifier des marqueurs de la sénescence nodositaire chez *M. truncatula* et *S. meliloti*, à partir de nodosités prélevées à différents âges post-infection, soumises ou non à un stress salin ou nitrate et obtenues par culture des plantes en aéroponie. Les trois conditions étudiées sont les suivantes :

- De jeunes nodosités entières (14 jpi) soumises ou non à un stress nitrate (KNO_3), permettant un apport azoté suffisant pour mettre fin à la symbiose.
- De jeunes nodosités entières (14 jpi) soumises ou non à un stress salin (NaCl), stress abiotique fréquemment rencontré dans l'environnement conduisant à une rupture de la symbiose.
- Des nodosités âgées entières (28 jpi) présentant une zone de sénescence naturelle très développée (culture aéroponique) vs des nodosités jeunes entières (14 jpi).

Un récapitulatif de l'expression des gènes *vapB* et *vapC*, exprimé en $\log_2(\text{FoldChange})$, correspondant au \log_2 des différentiels d'expression, est présenté en **Figure 49**, sous forme d'un histogramme empilé. Globalement, l'analyse de l'expression différentielle des systèmes VapBC montre peu de différences significatives, dans l'ensemble des conditions testées. A noter, toutefois, qu'un stress nitrate (couleur bleue **Figure 49**) conduit à une répression de l'expression des gènes *vapC2* et *vapB3* alors qu'un stress salin (couleur orange **Figure 49**) permet une activation de l'expression du gène *vapB6* et une répression de celle de *vapB11*. Par conséquent, les variations d'expression génique observées lors d'une sénescence induite sont dépendantes de la nature du stress appliqué. De plus, même si le résultat n'est pas statistiquement significatif, les gènes *vapBC* semblent, exception faite des opérons *vapBC6* et *vapBC8*, globalement réprimés en sénescence induite.

Concernant la sénescence naturelle (couleur rose **Figure 49**), aucune différence de l'expression génique n'est retrouvée à 21 jpi (non montré), que ce soit pour la partie proximale ou distale de la nodosité âgée. Il faut attendre 28 jpi pour observer une répression significative des antitoxines *vapB3* et *vapB4* et non significative des toxines *vapC3* et *vapC4*, bien qu'elles appartiennent aux mêmes opérons. Là encore, bien que le résultat soit statistiquement non significatif, les gènes *vapBC* ont globalement tendance à être réprimés lors de la sénescence naturelle, sauf exception pour les gènes *vapB6* et *vapB8*.

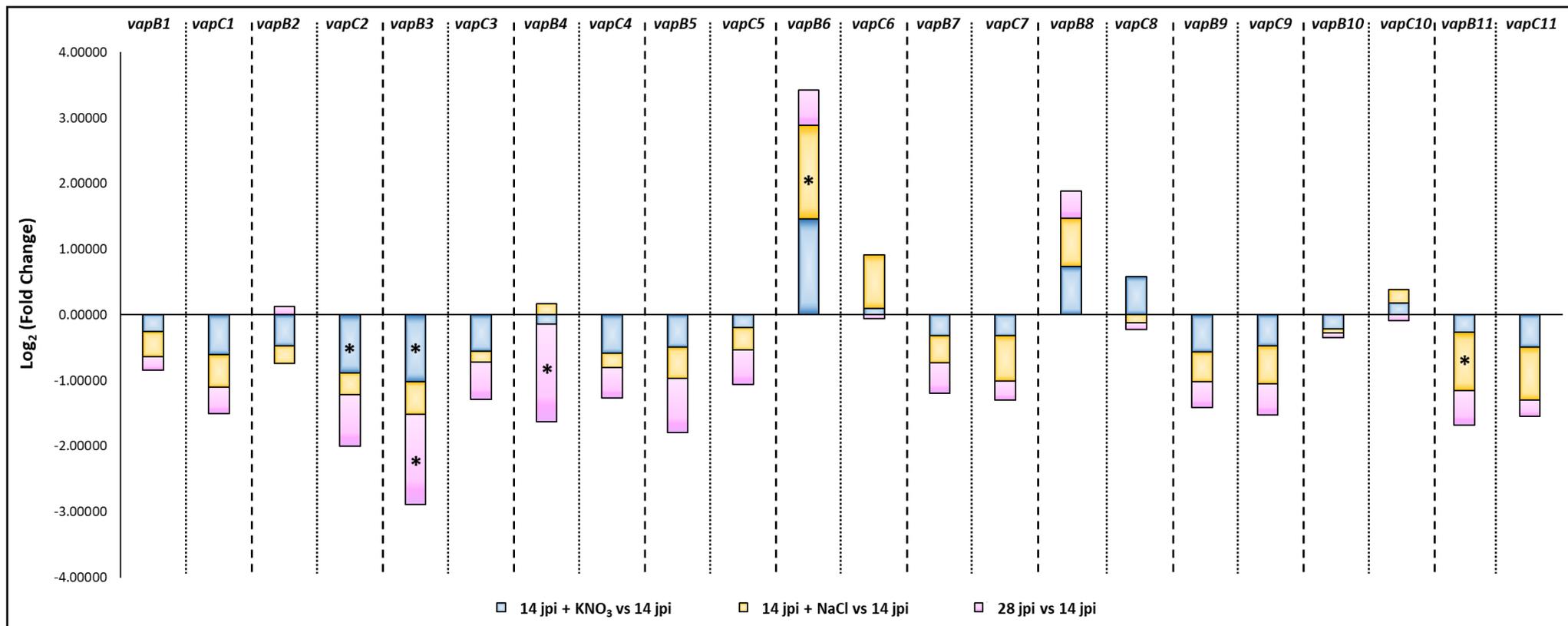


Figure 49 : Analyse de l'expression différentielle des gènes *vapBC* de *S. meliloti* dans des nodosités à différents âges, soumises ou non à des stress salins et nitrates

Histogramme empilé des fold change d'expression des gènes *vapB* et *vapC* dans la nodosité suivant différentes conditions. Transcriptome non publié, en cours de validation et produit par Rémy, A., Sauviac, L et Bruand, C. dans le cadre du projet ANR Stay Pink. La sénescence induite par un stress nitrate est représentée en bleu et celle par un stress salin en orange. La sénescence naturelle est indiquée en rose. Les données significatives (p-value < 0.01) présentent un astérisque.

En conclusion, les données transcriptomiques restent insuffisantes pour élaborer une vision globale du rôle des systèmes VapBC au cours de la symbiose. En effet, comme souligné précédemment, les systèmes VapBC sont soumis à un mécanisme de rétrocontrôle négatif de leur expression ainsi qu'à des régulations post-traductionnelles/activation par des protéases. Il faudrait donc analyser ces systèmes au niveau de leur abondance protéique afin de déterminer la stœchiométrie [A]/[T] et définir si le module est ou non activé.

IV. Validation fonctionnelle des systèmes VapBC

Les 11 systèmes VapBC chromosomiques de *S. meliloti* ont été identifiés par analogie de séquences, d'organisation génique (opéron) et de prédiction de domaines protéiques, dans la base de données « Toxin-Antitoxin DataBase » (<http://202.120.12.135/TADB2/index.php>). Afin de procéder à une validation fonctionnelle de cette analyse *in silico*, la toxicité des protéines VapC putatives a été vérifiée en exprimant chaque toxine chez un hôte hétérologue dépourvu de modules TA de type VapBC, *E. coli*. L'effet antidote des antitoxines VapB putatives a ensuite été démontré. La validation des modules VapBC4 et VapBC5 ayant précédemment été réalisée (Bodogai et al., 2006; Lipuma et al., 2014), celle-ci n'a donc pas été étudiée lors de ce travail.

1) Démonstration de la toxicité des protéines VapC

Les gènes codant pour les toxines VapC1, VapC2, VapC3, VapC6, VapC7, VapC8, VapC9, VapC10 et VapC11 ont été amplifiés par PCR à partir de l'ADNg de *S. meliloti* et clonés dans le plasmide d'expression bactérien pBAD24, sous le contrôle d'un promoteur inductible à l'arabinose, (Annexe 1) (Guzman et al., 1995), soit le même plasmide que celui utilisé pour démontrer la toxicité de VapC4 et VapC5. La viabilité des souches d'*E. coli* DH5 α porteuses des plasmides pBAD24-*vapC* est étudiée en absence ou présence d'arabinose et comparée à celle obtenue avec la souche d'*E. coli* contenant le plasmide sans gène d'intérêt (pBAD24 vide ou « Ctrl »). Cette approche est classiquement utilisée pour démontrer la fonctionnalité des toxines d'un module TA. En effet, dans un système dérégulé (absence du promoteur de l'opéron et de l'antitoxine associée), la surexpression de *vapC* conduit à une dégradation massive des ARN qui conduit à un arrêt de la croissance et à la mort cellulaire. Le nombre de cellules viables, capables de former une colonie (CFU : Colony Forming Unit) est déterminé, à différents temps, après ajout de l'inducteur (arabinose), par dénombrement des colonies après dilutions sérielles des cultures. Chaque expérience est réalisée en duplica biologique et chaque dépôt

sur boîte en duplica technique. Les résultats représentatifs des tests de viabilité effectués sont présentés en **Figure 50** et **51** et résumés dans le **Tableau 9**.

VapC	Perte de viabilité	Cinétique
1 (ΔC -ter)	1	Non toxique
2	10^4	2 h
3	10^4	4 jours
4 (publié)	10^3	< 1 jour
5 (publié)	10^3	< 18 h
6	10^4	2 h
7	10^3	0.3 h
8	10^4	2 h
9	10^4	4 jours
10	10^5	2 h
11	10^2	4 jours

Tableau 9 : Bilan de toxicité des protéines VapC de *S. meliloti* exprimées chez *E. coli*.

Les toxines arrêtant rapidement la croissance des bactéries sont représentées en orange, et celles l'arrêtant tardivement en vert. La perte de viabilité est mesurée entre les conditions contrôle non induites (pBAD24-*vide* et pBAD24-*vapC* + glucose, - arabinose) et la condition contrôle induite (pBAD24-*vide* + arabinose, -glucose) par rapport à la condition toxine induite (pBAD24-*vapC* + arabinose, -glucose). Ainsi en exemple, pour la toxine VapC7, une baisse de la viabilité bactérienne d'un facteur mille est observée en moins de 20 minutes par rapport aux conditions où la toxine n'est pas produite.

En absence d'arabinose, aucune différence de viabilité n'est observée entre la souche pBAD24-vide et celle contenant un plasmide pBAD24-*vapC*. A l'inverse, après addition d'arabinose, 8 souches pBAD24-*vapC* présentent, par rapport à la souche pBAD24 vide, une baisse de viabilité. Ce résultat confirme donc l'efficacité du contrôle de l'expression assuré par le promoteur *araBAD* et **surtout la toxicité des 8 protéines testées**. Aucune toxicité n'est observée avec la souche exprimant VapC1 dont la séquence codante tronquée conduit probablement à une protéine non fonctionnelle (Figure 50AB).

Suivant la toxine étudiée, nous observons d'autre part une grande variabilité quant à la cinétique et l'intensité de l'effet toxique. Le Tableau 9 résume ces résultats, ainsi que ceux obtenus pour les toxines VapC4 et VapC5 précédemment publiés.

L'expression de *vapC2*, *vapC6*, *vapC7*, *vapC8*, et *vapC10* induit une toxicité rapide. La baisse de viabilité est observée dès la première heure d'induction (exemple de VapC6 Figure 50CD, VapC8 Figure 50GH, VapC10 Figure 50IJ), et de manière encore plus drastique en seulement 15 min pour VapC7 (Figure 50EF) et 30 min pour VapC2 (Figure 50AB). Après 2 h, la viabilité cellulaire est réduite d'un facteur 10^4 à 10^6 selon la surexpression de la toxine considérée.

A l'inverse, la toxicité des protéines VapC3, VapC9 et VapC11 semble beaucoup plus faible. L'effet toxique de ces VapC n'est observé qu'après un temps d'induction de 4 jours (Figure 51). La viabilité cellulaire est alors réduite d'un facteur d'environ 10^3 pour les souches porteuses des toxines VapC3, VapC9 et VapC11.

Les protéines VapC étant des RNase site-spécifique, le plus souvent ciblant des ARNt, la différence de vitesse et d'intensité de toxicité observée (Tableau 9) peut s'expliquer par un taux de production variable de la protéine, une différence d'activité enzymatique (mRNase, rRNase ou tRNase) ou de la nature et de l'abondance de l'ARN ciblé. Par exemple, nous avons précédemment vu que VapC7, la protéine la plus toxique chez *E. coli* d'après notre étude, est apparentée à des VapC ciblant l'ARNt^{Met} initiateur de la traduction. La nature essentielle à la traduction de l'ARN ciblé pourrait expliquer la vitesse et l'intensité de la toxicité de VapC7. Ainsi, suivant la nature des ARNs cibles, la dégradation pourra être plus ou moins globale et donc avoir un effet plus ou moins drastique sur la survie de la cellule. D'autre part, afin d'exclure l'hypothèse d'un effet toxique retardé et atténué de VapC3, VapC9 et VapC11 en raison d'une faible expression de ces protéines liée à un biais d'usage de codon chez *E. coli*, la fréquence des codons rares dans la séquence des 3 gènes a été déterminée. Aucune différence significative n'a été constatée.

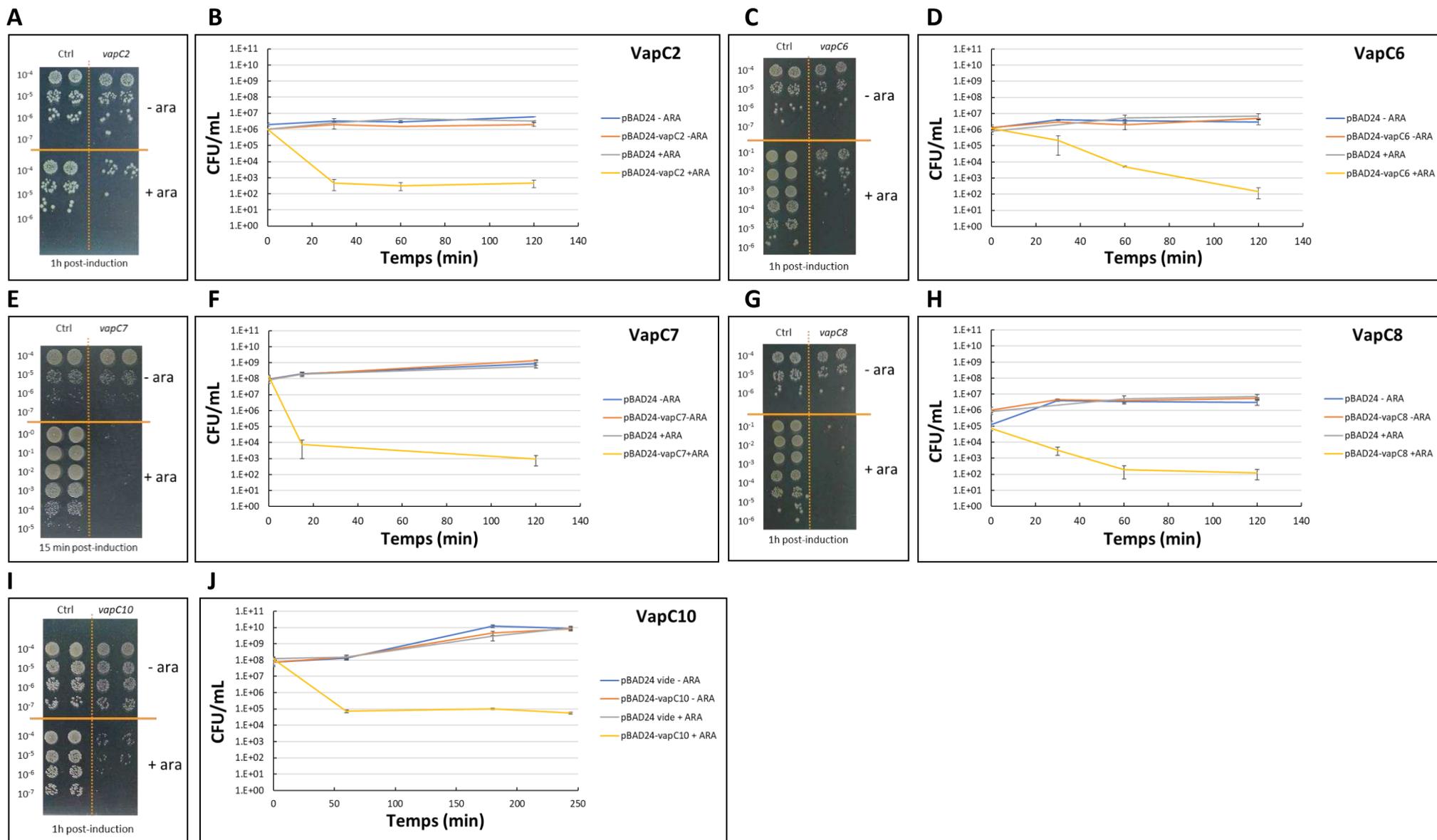


Figure 50 : Expression hétérologue chez *E. coli* DH5α des toxines VapC2, VapC6, VapC7, VapC8 et VapC10 de *S. meliloti*.

A, C, E, G et I : Dénombrement des colonies formées (CFU) sur milieu LB après dépôt (10 µL) des dilutions sérielles des cultures d'*E. coli* exprimant *vapC2* (A), *vapC6* (C), *vapC8* (E) et *vapC10* (G) induites (+ara) ou non (-ara) à l'arabinose.

B, D, F et H et J : Cinétique de viabilité par dénombrement des colonies formées (CFU) après induction (+ara) ou non (-ara) des cultures d'*E. coli* exprimant *vapC2* (B), *vapC6* (D), *vapC8* (F) et *vapC10* (H).

La souche d'*E. coli* transformée avec le vecteur pBAD24 vide est utilisée comme contrôle (Ctrl).

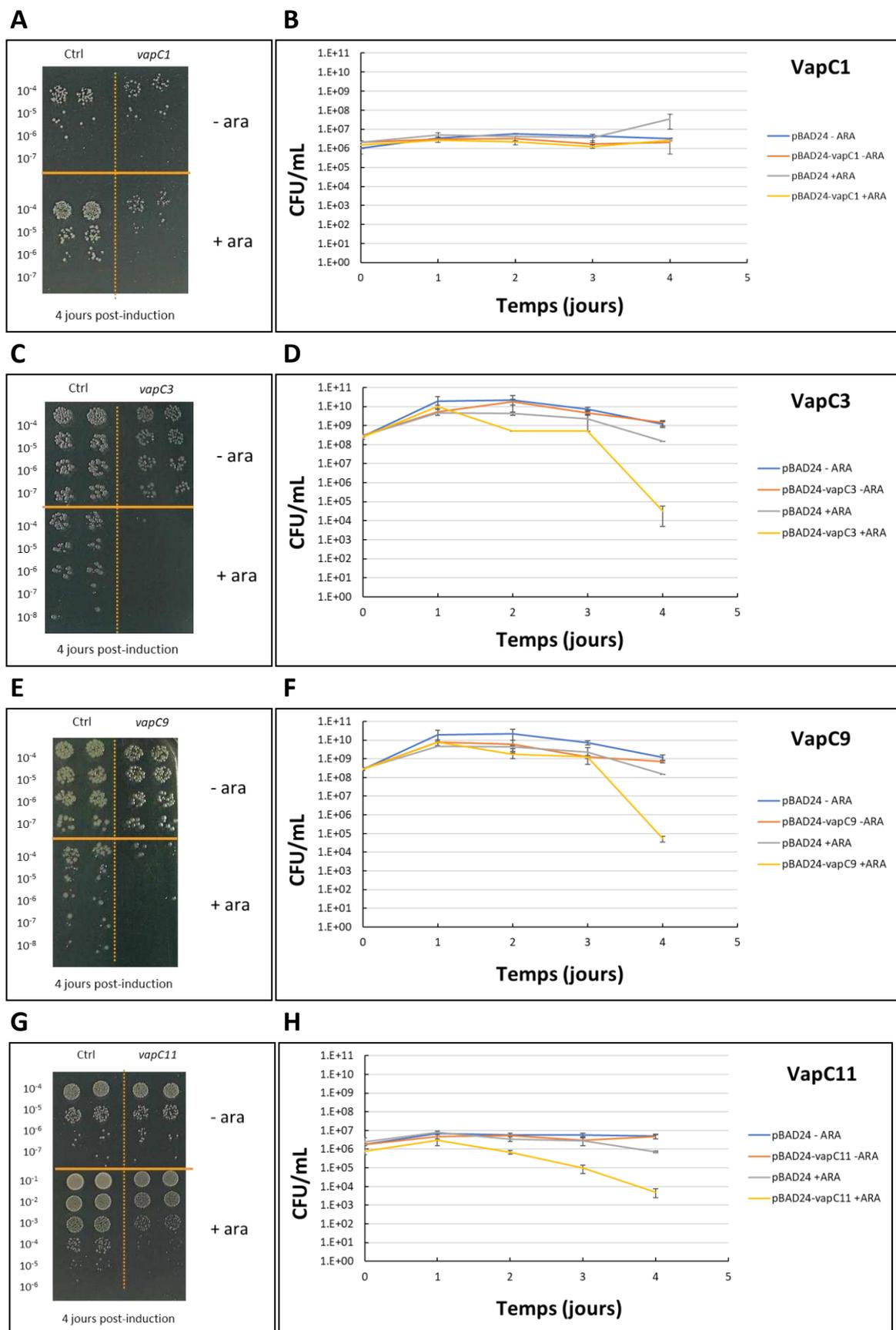


Figure 51 : Expression hétérologue chez *E. coli* DH5α des toxines VapC1, VapC3, VapC9 et VapC11 de *S. meliloti*.

A, C, E et G : Dénombrement des colonies formées (CFU) sur milieu LB après dépôt (10 µL) de dilutions sérielles des cultures d'*E. coli* exprimant *vapC1* (A), *vapC3* (C), *vapC9* (E) et *vapC11* (G) induites (+ara) ou non (-ara) à l'arabinose.

B, D, F et H : Cinétique de viabilité par dénombrement des colonies formées (CFU) après induction (+ara) ou non (-ara) des cultures d'*E. coli* exprimant *vapC1* (B), *vapC3* (D), *vapC9* (F) et *vapC11* (H).

La souche d'*E. coli* transformée avec le vecteur pBAD24 vide est utilisée comme contrôle.

En conclusion, les résultats obtenus nous ont permis de confirmer la nature toxique de toutes les VapC putatives : VapC2, VapC3, VapC6, VapC7, VapC8, VapC9, VapC10 et VapC11 hormis la toxine VapC1, tronquée, probablement non fonctionnelle. Afin de valider définitivement la fonctionnalité des systèmes TA, il est toutefois nécessaire de vérifier la perte de toxicité de ces protéines lorsqu'elles sont exprimées avec leurs antitoxines VapB comme cela a précédemment pu être réalisé pour VapC4 (Bodogai et al., 2006) et VapC5 (Lipuma et al., 2014).

2) Démonstration de l'effet antidote des protéines VapB

Afin de démontrer la fonction antidote de l'antitoxine VapB, une stratégie adaptée de Sberro *et al* (2013) a été développée. Dans cette approche, l'inhibition de la baisse de viabilité induite par l'expression de la toxine VapC lors de la co-expression de l'antitoxine VapB est recherchée. Cette approche a été réalisée pour tous les systèmes VapBC restant à caractériser hormis VapBC1 dont la toxine tronquée est non toxique.

Pour cela, les gènes codant VapB2, VapB3, VapB6, VapB7, VapB8, VapB9, VapB10 et VapB11 ont été amplifiés par PCR à partir de l'ADNg de *S. meliloti* et clonés dans le plasmide d'expression bactérien pRSF1b, sous le contrôle d'un promoteur inductible à l'IPTG (Annexe 2). Les souches d'*E. coli* exprimant soit la toxine (VapC) soit l'antitoxine (VapB) soit les 2, ont été produites dans le fond génétique de la souche BL21 (DE3) pLysS pour permettre l'expression du gène *vapB* à partir du promoteur T7 (du plasmide pRSF1b). La viabilité des souches d'*E. coli* porteuses des plasmides pBAD24-*vapC*, pBAD24-*vapC*/pRSF1b-*vapB* et pRSF1b-*vapB* est étudiée en présence d'arabinose et d'IPTG, par suivi de densité optique (DO_{600nm}). Chaque expérience est réalisée en dupliquat biologique et répétée trois fois. Les résultats représentatifs des suivis de densité optique sont présentés en Figure 52.

L'expression de la toxine seule provoque bien un arrêt de croissance bactérienne (Figure 52). A l'inverse, aucun arrêt de croissance n'est observé lorsque l'antitoxine est induite seule ou co-exprimée avec la toxine. L'effet antidote de l'antitoxine est donc bien mis en évidence pour les systèmes VapBC2, VapBC6, VapBC7, VapBC8, VapBC10 et de manière originale VapBC9. En effet, dans la souche DH5 α , la surexpression de la protéine VapC9 n'est toxique que 4 jours post-induction alors que dans la souche BL21 (DE3) pLysS, la toxicité est observée dès 1h post-induction. Il s'agit de la seule toxine dite « temps-long » à présenter ce profil puisqu'aucune différence, pour l'ensemble des souches comparées des systèmes VapBC3 et VapBC11, n'a pu être observée en cinétique de croissance.

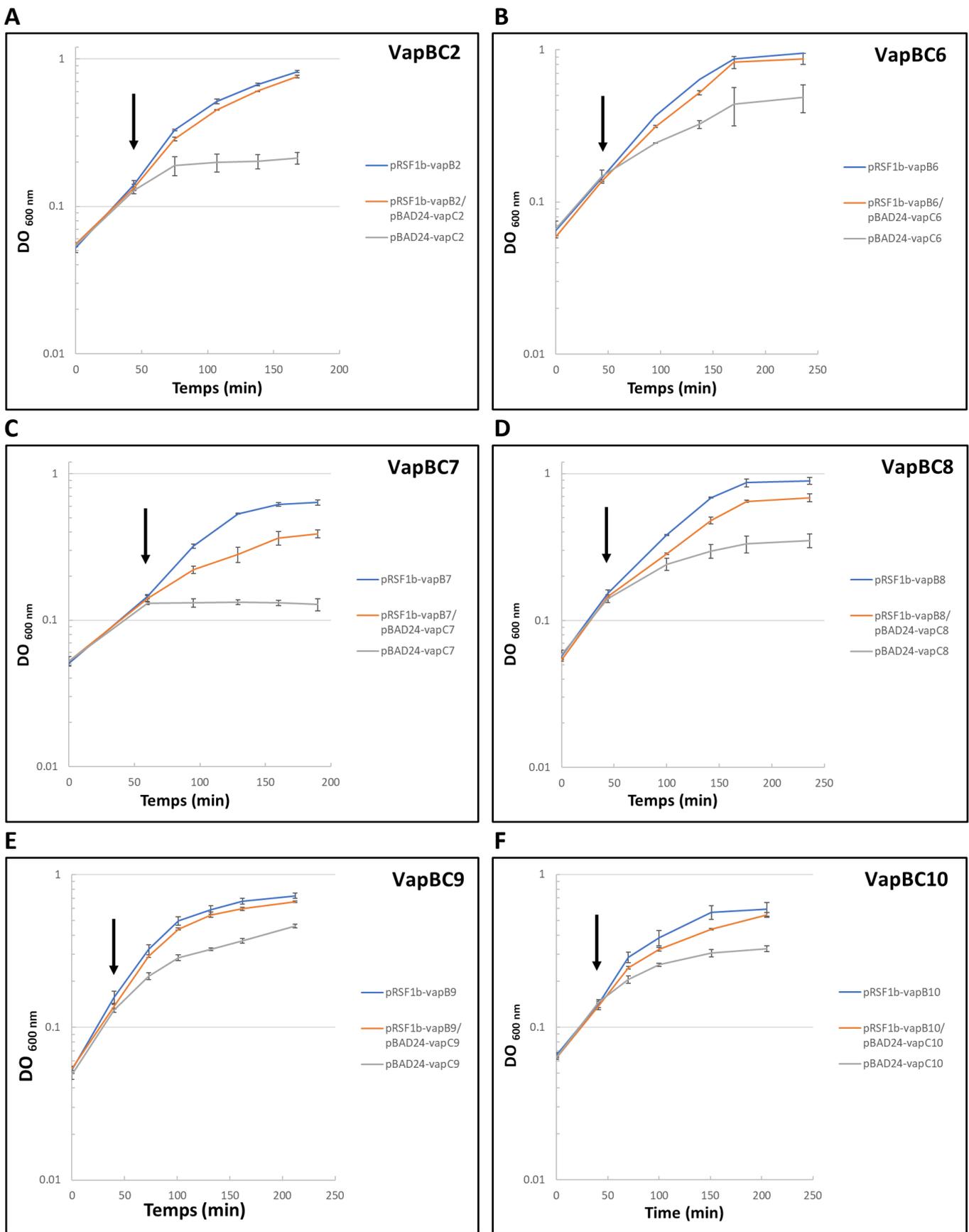


Figure 52: Cinétique de croissance des souches d'*E. coli* BL21 (DE3) pLysS co-exprimant les toxines VapC2, VapC6, VapC7, VapC8, VapC9 et VapC10 de *S. meliloti*, et leurs antitoxines respectives.

Une cinétique de croissance est réalisée par mesure de la $DO_{600\text{nm}}$ des différentes souches d'*E. coli* BL21 (DE3) pLysS pRSF1b-vapB (bleu), pRSF1b-vapB/pBAD24-vapC (orange) et pBAD24-vapC (gris). Lorsque les cultures atteignent une $DO_{600\text{nm}}=0.15$, les inducteurs IPTG et arabinose, des promoteurs des plasmides pRSF1b et pBAD24 respectivement, sont ajoutés (flèche noire). Les différents couples d'antitoxine/toxine étudiés sont VapB2/VapC2 (A), VapB6/VapC6 (B), VapB7/VapC7 (C), VapB8/VapC8 (D), VapB9/VapC9 (E) et VapB10/VapC10 (F).

Des tests de viabilité, par mesure de CFU, ont donc été initiés pour tester l'effet des antitoxines VapB des systèmes VapBC3 et VapBC11, dits « temps-long ». Le nombre de cellules viables est déterminé, à différents temps, après ajout des inducteurs (arabinose et IPTG), par dénombrement des colonies après dilutions sérielles des cultures. Chaque expérience, répétée trois fois, est réalisée en dupliqua biologique et chaque dépôt sur boîte en dupliqua technique. A ce jour, seule une expérience du système VapBC11 a été validée (Figure 53).

L'expression de la toxine seule provoque un léger arrêt de croissance bactérienne (Figure 53). A l'inverse, un arrêt de croissance quasi inexistant est observé lorsque l'antitoxine est induite seule ou co-exprimée avec la toxine. Bien que l'effet soit léger, la tendance semble montrer un effet antidote de la toxine VapC11 procuré par VapB11. Ce résultat préliminaire devra être conforté par la réalisation de réplicats supplémentaires. Une approche similaire devra être développée pour valider l'effet antidote de l'antitoxine VapB3.

En conclusion, les résultats obtenus nous ont permis de confirmer l'effet antidote de plusieurs VapB putatives : VapB2, VapB6, VapB7, VapB8, VapB9, VapB10. L'étude des antitoxines VapB3 et VapB11 nécessitent une calibration de l'expérimentation supplémentaire puisque l'effet toxique n'est pas directement mesurable par densité optique. Un premier essai, réalisé sur le système VapBC11, semble confirmer l'effet antidote de l'antitoxine VapB11. Puisque des interactions croisées ont déjà été observées entre toxines-antitoxines non apparentées (Goeders and Van Melderen, 2014), il pourrait également être intéressant de tester l'effet antidote de VapB3 (AbrB-like) sur d'autres VapC fonctionnelle ayant une antitoxine de même type (VapC4, VapC5 ou VapC7), et de VapB11 (HTH) sur VapC9 ou VapC10. Cette expérience conforterait l'interprétation des résultats, à savoir que VapB3 et VapB11 sont bien des antitoxines capables de neutraliser la toxicité d'une VapC.

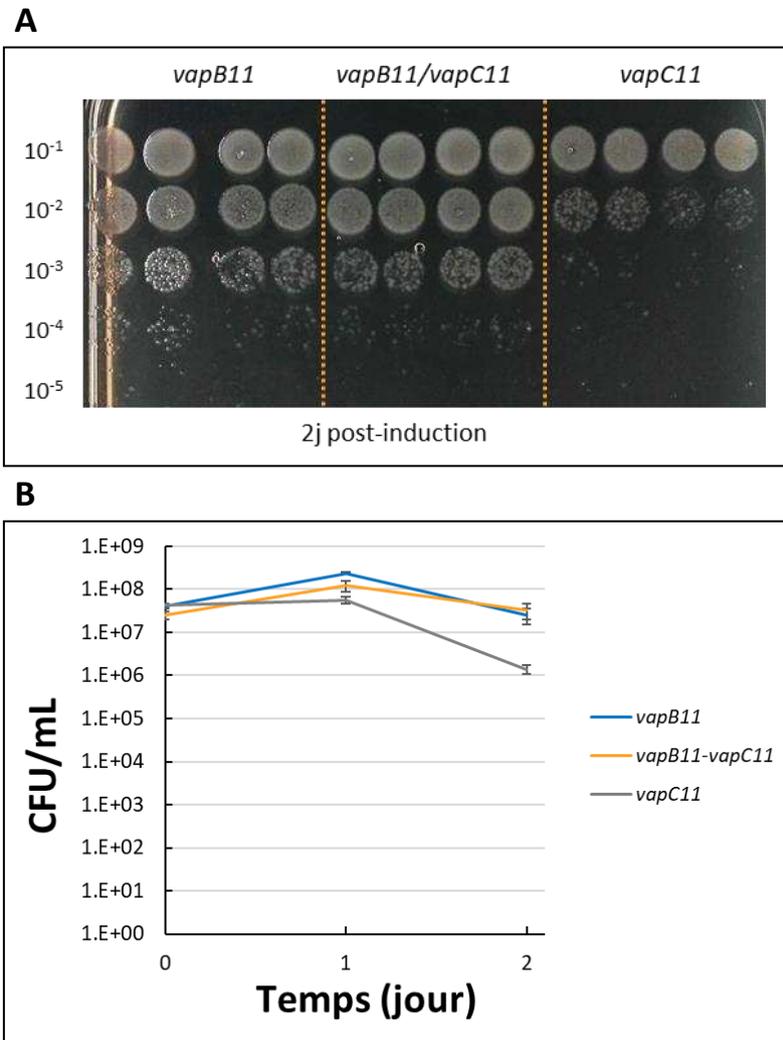


Figure 53 : Test de viabilité des souches d' *E. coli* BL21 (DE3) pLysS exprimant la toxine VapC11 seule ou en présence de l'antitoxine VapB11.

A: Dénombrement des colonies formées (CFU) sur milieu LB après dépôt (10 μ L) de dilutions sérielles des cultures d'*E. coli* exprimant *vapC11*, *vapB11* ou les deux (+ arabinose, + IPTG).

B : Cinétique de viabilité par dénombrement des colonies formées (CFU) après induction (+ arabinose, + IPTG) des cultures d'*E. coli* exprimant *vapC11*, *vapB11* ou les deux.

V. Caractérisation phénotypique des mutants d'invalidation des toxines VapC en interaction avec *M. truncatula*

Afin d'étudier le rôle possible des systèmes VapBC lors de la symbiose, le laboratoire a initié une analyse phénotypique des plants de *Medicago* inoculés par des mutants bactériens d'invalidation des toxines. L'analyse primaire, menée à 6 semaines après inoculation, repose sur une évaluation de la capacité fixatrice d'azote (mesure de l'activité nitrogénase) et de la production de nodosités (poids total de nodosités par plante), comparées aux données obtenues avec la souche sauvage (WT). L'analyse secondaire repose sur la détermination de l'efficacité de l'établissement de la symbiose (dénombrement des nodosités) et du rendement végétal (taille et poids des parties aériennes). Enfin, une analyse plus poussée comprenant une caractérisation cellulaire (Live/Dead et transparence) et une caractérisation moléculaire (RTqPCR) est réalisée pour les mutants présentant un phénotype symbiotique.

1) Construction des mutants d'invalidation des gènes *vapC*.

Ce travail s'inscrit dans la continuité des travaux menés par le laboratoire sur le module VapBC5 (Lipuma et al., 2014) et ceux précédemment réalisés sur le module VapBC4 (ou NtrPR) (Bodogai et al., 2006; Oláh et al., 2001; Puskás et al., 2004). Dans ces études, qui ont permis de démontrer le rôle de ces systèmes lors de la symbiose avec *M. sativa* (luzerne fourragère), la stratégie utilisée consistait à invalider le gène *vapC* et/ou le gène *vapB* pour étudier le phénotype de ces mutants en interaction. Sur cette base, afin de disposer d'une étude globale du rôle de tous les systèmes VapBC, la même stratégie a été retenue, à savoir, étudier le rôle des systèmes VapBC via l'analyse du phénotype symbiotique de tous les mutants invalidés dans le gène *vapC*. Pour cela, je disposais de différentes sources : (1) des mutants issus d'une banque de *S. meliloti* 2011, obtenus à l'aide d'un mini-transposon Tn5 (Pobigaylo et al., 2006) où *vapC2* et *vapC7* étaient disponibles; (2) d'une banque d'*E. coli* portant des fragments de gènes de *S. meliloti* clonés dans le vecteur pK19mob2ΩHMB non répliquatif mais mobilisable chez *S. meliloti* (Pobigaylo et al., 2006), permettant, par recombinaison homologue, d'invalider le gène correspondant de *S. meliloti* (voir Annexe 3). Un clone disposant d'un fragment interne du gène *vapC3* était ainsi disponible. Les autres mutants *vapC* ont été construits *de novo* suivant la stratégie décrite dans le matériel et méthode et brièvement reportée ci-dessous.

Cas particulier des mutants Tn5 de *S. meliloti* : les mutants *vapC2* et *vapC7* :

Les mutants Tn5 *vapC2* et *vapC7* disponibles nous ont tous deux permis d'obtenir en interaction avec *M. truncatula*, un **phénotype fort de sénescence nodositaire accélérée** qui a finement été caractérisé, par la doctorante précédente concernant *vapC7*, et par moi-même concernant *vapC2* (voir les résultats présentés en **Annexe 4**). Toutefois, très récemment, lors de ma dernière année de thèse, notre équipe et des partenaires de la communauté symbiose sont arrivés à la conclusion que ce phénotype était lié à la souche/présence du Tn5 et non à l'invalidation d'un gène particulier. Aussi, ces deux mutants, *vapC2* et *vapC7*, ont dû être reconstruits *de novo* pour finaliser l'étude exhaustive de l'ensemble des mutants d'invalidation des toxines VapC chez *S. meliloti*.

Aussi, au cours de cette étude, 9 mutants d'invalidation du gène *vapC* ont finalement été réalisés, par recombinaison homologue simple d'un fragment interne du gène *vapC* cloné dans le plasmide pK19mob2ΩHMB. L'amplification et le clonage des fragments internes des gènes *vapC* dans le vecteur pK19mob2ΩHMB ainsi que la conjugaison chez *S. meliloti* est décrite dans la section Matériels et Méthodes. La recombinaison conduit à l'invalidation du gène de la toxine par rupture de la phase codante de lecture. Seule une toxine tronquée d'environ un tiers dans sa partie C-terminale et donc dépourvue de résidus d'acides aminés essentiels du site actif est susceptible d'être produite (**Annexe 3**). Afin de démontrer que les protéines VapC tronquées à l'extrémité C-terminale ne sont effectivement plus fonctionnelles, la séquence correspondant à la toxine VapC7 résiduelle a été clonée dans le plasmide pBAD24 et exprimée chez *E. coli*. Bien que la toxine VapC7 soit la plus létale, aucun impact dans la croissance ni dans la viabilité bactérienne n'est observée avec la toxine VapC7 résiduelle (non montré). Ceci atteste de l'invalidation de la toxine par la stratégie retenue.

2) Phénotype des mutants d'invalidation des toxines VapC en culture pure

La croissance des 9 souches *vapC* mutantes de *S. meliloti* a été mesurée, par suivi de la densité optique à 600 nm, en milieu riche, en comparaison avec la souche sauvage (WT 2011) (**Figure 54**). Aucune différence n'a été observée pour l'ensemble des souches testées par rapport à la souche WT. Ainsi, l'invalidation d'une toxine VapC ne conduit pas à un défaut de croissance de *S. meliloti* en milieu riche LB_{MC}. Ceci suggère que, dans les conditions expérimentales utilisées, les toxines VapC et donc les systèmes VapBC, ne jouent pas de rôle majeur dans l'adaptation au mode de vie en culture pure.

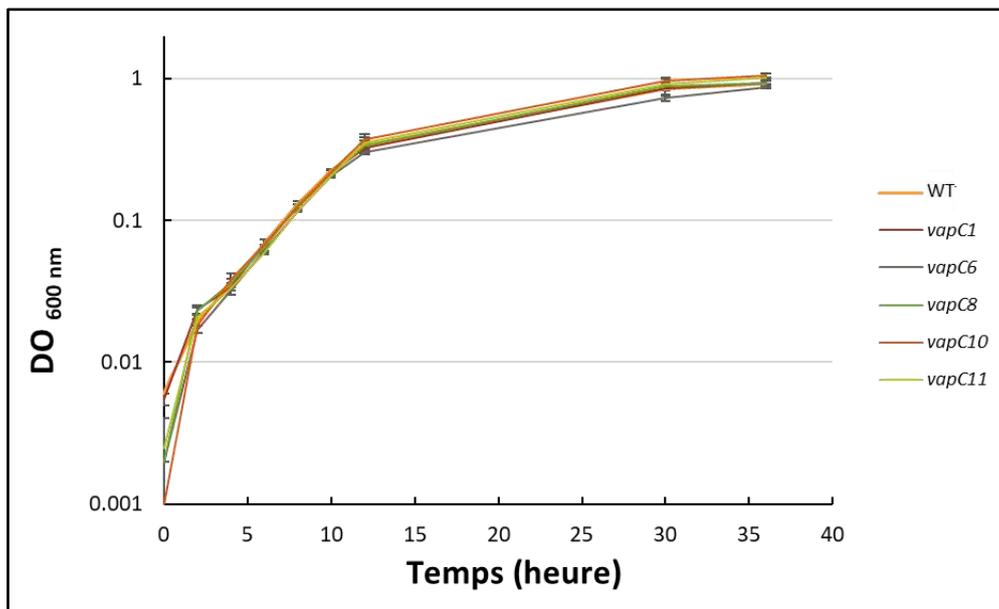
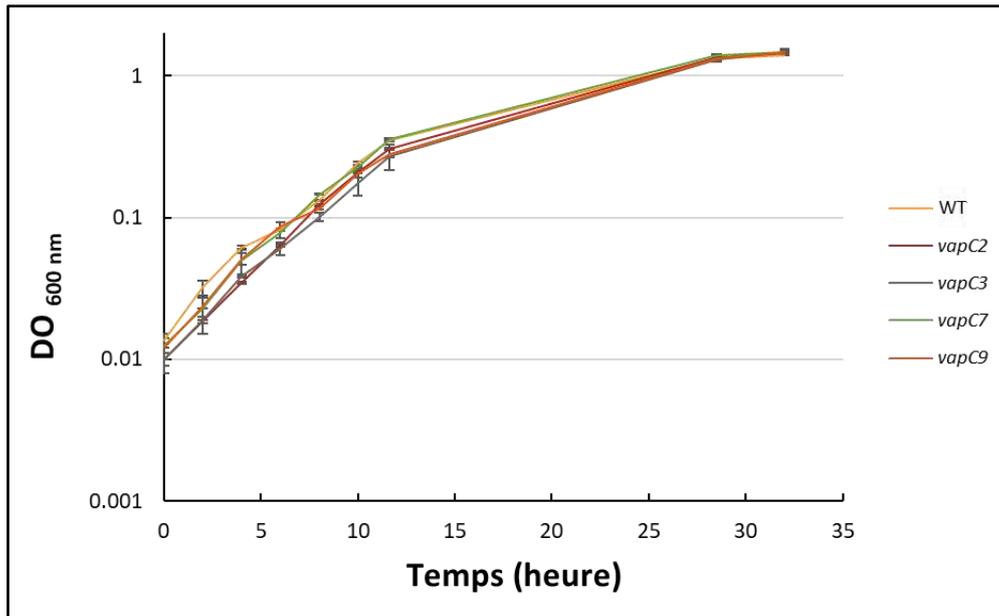


Figure 54 : Cinétique de croissance des mutants *vapC* de *S. meliloti* en milieu riche.

Les croissances sont réalisées en milieu liquide riche (LB_{MC}) à 30°C en duplica biologique. La croissance est suivie par la mesure de la densité optique à 600nm. Ces croissances ont été réalisées en triplica. Le graphique représente un répliquat significatif.

3) Capacité fixatrice d'azote des mutants d'inactivation des toxines VapC en symbiose.

La caractérisation phénotypique des mutants *vapC* en interaction avec *M. truncatula* a été réalisée à 6 semaines post-inoculation (spi), en comparaison avec la souche WT. Cette caractérisation repose sur la capacité des souches bactériennes à fixer l'azote et à produire des nodosités. La capacité fixatrice d'azote est analysée suivant deux référentiels : (1) la capacité fixatrice d'azote par poids (mg) de nodosités (**Figure 55A**) qui traduit l'efficacité fixatrice bactéroïdienne ; et (2) la capacité fixatrice d'azote par plante (**Figure 55B**) qui rend compte de l'apport azoté de l'ensemble des bactéroïdes des nodosités racinaires (environ 50 nodosités/plante) suivant les besoins de la plante. Ce dernier indicateur permet de déterminer si la demande en azote à l'échelle de la plante entière est comblée ou non, voire si l'apport total est amélioré, avec de possibles conséquences visibles sur le rendement végétal des parties aériennes (**Figure 57** pour *vapC3* et *vapC7*, et *vapC10* **Figure 2** de l'article). La production globale de nodosités est mesurée par la masse (en mg) des nodosités racinaires récoltées à 6 spi (**Figure 56**).

Les plantes inoculées avec les souches mutantes *vapC2*, *vapC6*, *vapC8* et *vapC9* ne présentent, sur l'ensemble des réplicats, aucune différence avec celles inoculées avec la souche sauvage que ce soit au niveau de leur capacité fixatrice d'azote (**Figure 55**) et ce, quel que soit le référentiel utilisé, ou de leur poids de nodosités par plante (**Figure 56**).

Les plantes inoculées avec les souches mutantes *vapC3*, *vapC7* et *vapC10* présentent quant à elles une augmentation significative de leur capacité fixatrice d'azote par mg de nodosités (28%, 19% et 32% respectivement) (**Figure 55A**). Lorsque la capacité fixatrice d'azote est exprimée par plante, une augmentation significative est également retrouvée pour les plantes inoculées avec les mutants *vapC3* et *vapC7* (+108% et + 60% respectivement) (**Figure 55B**). Ces deux mutants générant d'autre part un poids de nodosités par plante significativement supérieur (*vapC3* :+52% et *vapC7* :+ 39%) (**Figure 56**), les mutants *vapC3* et *vapC7* permettent donc d'améliorer la capacité fixatrice d'azote bactéroïdienne et d'augmenter la production de nodosités. Ce résultat est en accord avec un apport azoté global par plante plus important qui se traduit par un rendement végétal amélioré (**Figure 58**).

Contrairement à *vapC3* et *vapC7*, le mutant *vapC10* n'induit pas un poids de nodosités par plante significativement plus important (**Figure 56**). Toutefois, ce poids a une tendance non significative à être plus faible ce qui pourrait expliquer que l'apport azoté global par plante soit similaire à celui de la souche sauvage (**Figure 2** de l'article) alors que la capacité fixatrice d'azote par poids de nodosité est augmentée.

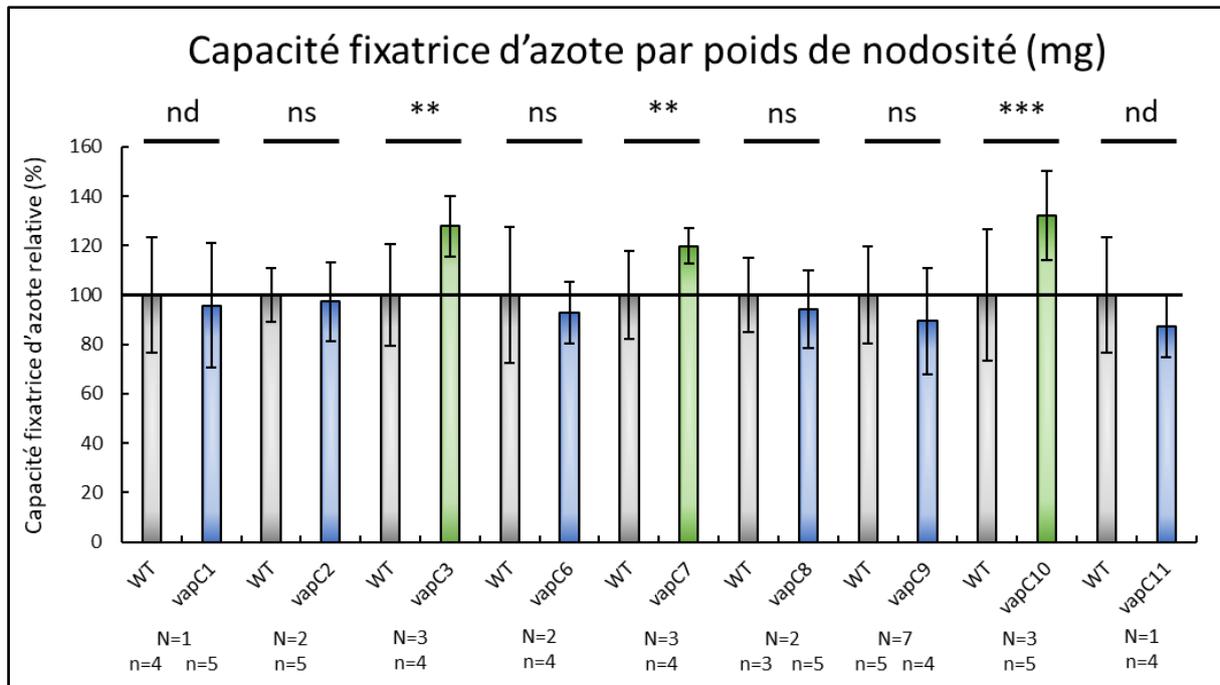
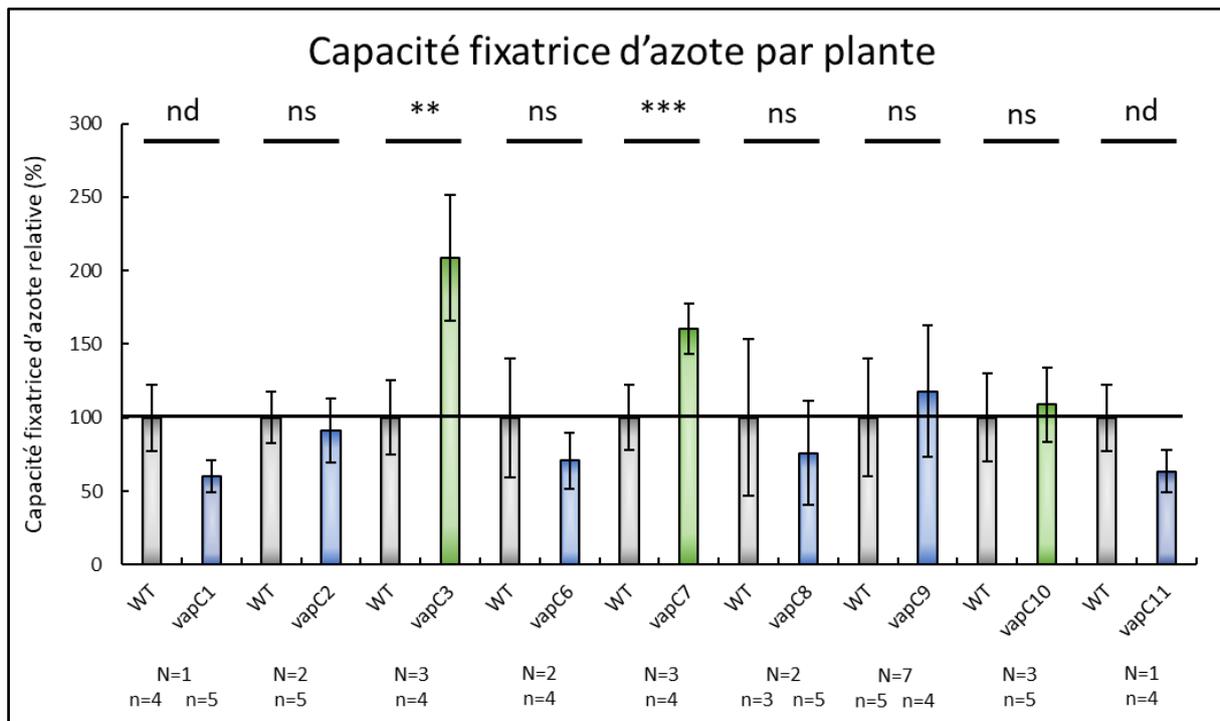
A**B**

Figure 55 : Capacité fixatrice d'azote à 6 spi des mutants invalidés pour la toxine en interaction avec *M. truncatula*

La capacité fixatrice d'azote des plantes inoculées avec les souches mutantes est exprimée en pourcentage relatif de celle obtenue avec la souche sauvage, à 6 spi. Elle est évaluée sur la capacité de la nitrogénase à réduire l'acétylène en éthylène, et chaque mesure correspond à un pool de 3 plantes.

A : Capacité fixatrice d'azote relative exprimée par poids de nodosités. La mesure détermine le nombre de nmoles d'éthylène produites par heure et par mg de nodosités.

B : Capacité fixatrice d'azote relative exprimée par plante. La mesure détermine le nombre de nmoles d'éthylène produites par heure et par plante.

La significativité des différences observées est déterminée à l'aide d'un test-t de Student où la représentation des p-value correspond à nd= non déterminé, ns>0.05, *<0.05, **<0.01 et ***<0.001. N : nombre de répétitions biologiques, n : nombre de mesures effectuées au sein de chaque répétition biologique. Lorsque n est différent entre le WT et le mutant *vapC* considéré, deux valeurs sont représentées. Les barres d'erreur correspondent à l'écart-moyen des réplicats biologiques.

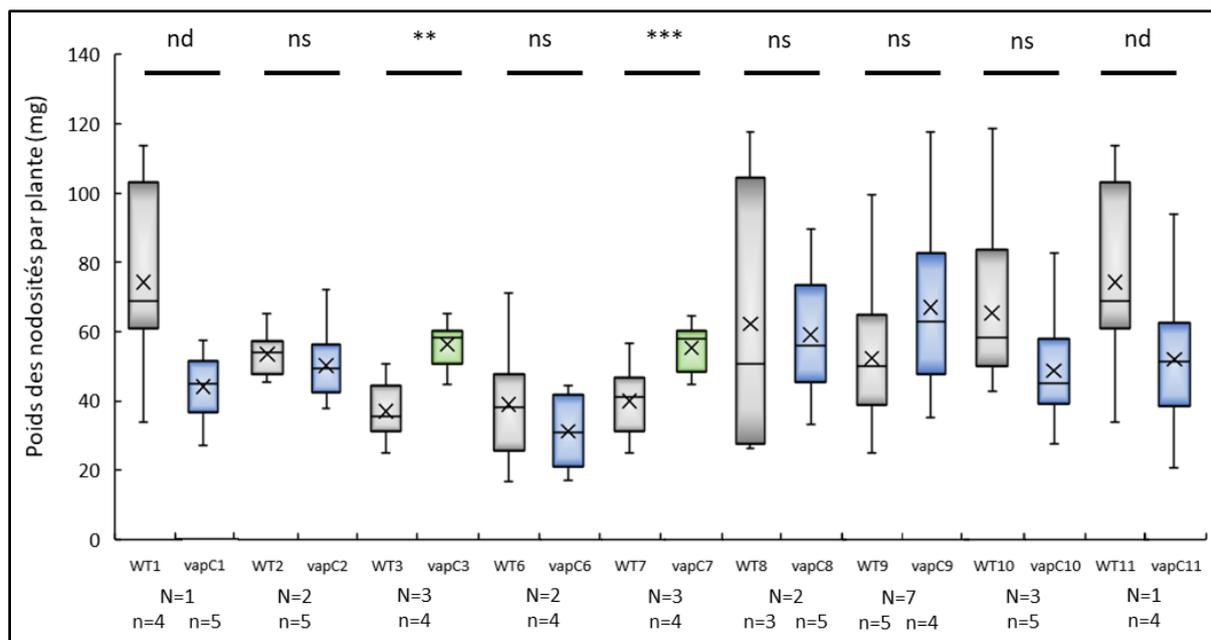


Figure 56 : Poids des nodosités par plante des mutants invalidés pour la toxine en interaction avec *M. truncatula*, à 6 spi.

Le poids des nodosités est exprimé en mg par plante. Chaque pesée (mg) du nombre total de nodosités est effectuée sur un ensemble de 3 plantes.

La significativité des différences observées est déterminée à l'aide d'un test-t de Welch (distribution normale mais sans équivariance) où la représentation des p-value correspond à nd= non déterminé, ns>0.05, *<0.05, **<0.01 et ***<0.001. N : nombre de répétitions biologiques, n : nombre de mesures effectuées au sein de chaque répétition biologique. Lorsque n est différent entre le WT et le mutant *vapC* considéré, deux valeurs sont représentées. Les barres d'erreur correspondent à l'écart-moyen des réplicats biologiques.

Enfin, les plantes inoculées avec les souches mutantes ***vapC1*** et ***vapC11*** présenteraient une diminution de leur capacité fixatrice d'azote lorsque celle-ci est exprimée par plante (-40% et -37% respectivement) mais pas lorsqu'elle est exprimée par poids de nodosités (**Figure 55**). Ces deux mutants présenteraient également une diminution du poids de nodosité par plante (-41% et -30% respectivement) (**Figure 56**). Il se pourrait donc que les mutants *vapC1* et *vapC11* ne soient pas affectés dans leur capacité à fixer l'azote mais plutôt dans celle à induire des nodosités, ce qui expliquerait un apport azoté global par plante diminué. A noter que deux réplicats restent à réaliser avec ces deux mutants pour valider le phénotype observé.

4) Analyse du phénotype symbiotique des mutants d'inactivation des toxines VapC3 et VapC7

Une analyse complémentaire (dénombrement des nodosités, détermination du poids moyen des nodosités et estimation du rendement végétal) des mutants *vapC3*, *vapC7* et *vapC10* présentant une capacité fixatrice d'azote par poids de nodosité améliorée a été réalisée. Les résultats de cette analyse sont présentés ci-après pour les mutants *vapC3* et *vapC7* et au sein de l'article scientifique en cours de rédaction intégré à cette thèse (section Résultats, Partie 2) pour le mutant *vapC10*. La comparaison des résultats des différents mutants sera réalisée à dans la section Discussion.

Afin de déterminer si l'augmentation du poids des nodosités par plante, observée avec les mutants *vapC3* et *vapC7*, est lié à un nombre plus important de nodosités et/ou à des nodosités de taille/masse plus importante, un dénombrement et une estimation du poids moyen des nodosités par plante (ratio poids/nombre) ont été réalisés.

Les mutants *vapC3* et *vapC7* produisent significativement plus de nodosités que la souche sauvage (+40% et + 20% respectivement) (Figure 57A). Par ailleurs, les nodosités induites par le mutant *vapC7* ont un poids moyen significativement plus important (+19%) que celles induites par le sauvage. A l'inverse, le poids moyen des nodosités induites par *vapC3* n'est pas significativement différent (Figure 58B).

Par conséquent, en plus d'avoir une capacité fixatrice intrinsèque améliorée (Figure 55A), les mutants *vapC3* et *vapC7* induisent plus de nodosités, de masse plus importante pour *vapC7*. Ces caractéristiques permettent un meilleur apport azoté à la plante qui se traduit par un rendement végétal amélioré (Figure 57). En effet, à 6 spi, les parties aériennes des plantes inoculées avec *vapC3* et *vapC7* présentent une masse significativement augmentée par rapport à la condition contrôle (+46% et + 48% respectivement) bien que la taille moyenne reste inchangée (Figure 58BC).

Au vu de ces résultats, différentes hypothèses peuvent être émises pour expliquer le phénotype observé. L'inactivation des toxines VapC3 ou VapC7 permet-elle une meilleure efficacité d'infection et/ou de différenciation bactéroïdienne ? Conduit-elle à une aptitude (fitness) bactérienne supérieure dans les différentes zones de la nodosité, à un retard de la sénescence nodositaire ? Afin de répondre à ces questionnements, des approches d'histologie nodositaire, permettant de mesurer les longueurs totales et de zone de sénescence et d'étudier la viabilité bactéroïdienne, et une étude moléculaire d'expression de gènes marqueurs de la fixation d'azote et de la sénescence nodositaire ont été développées.

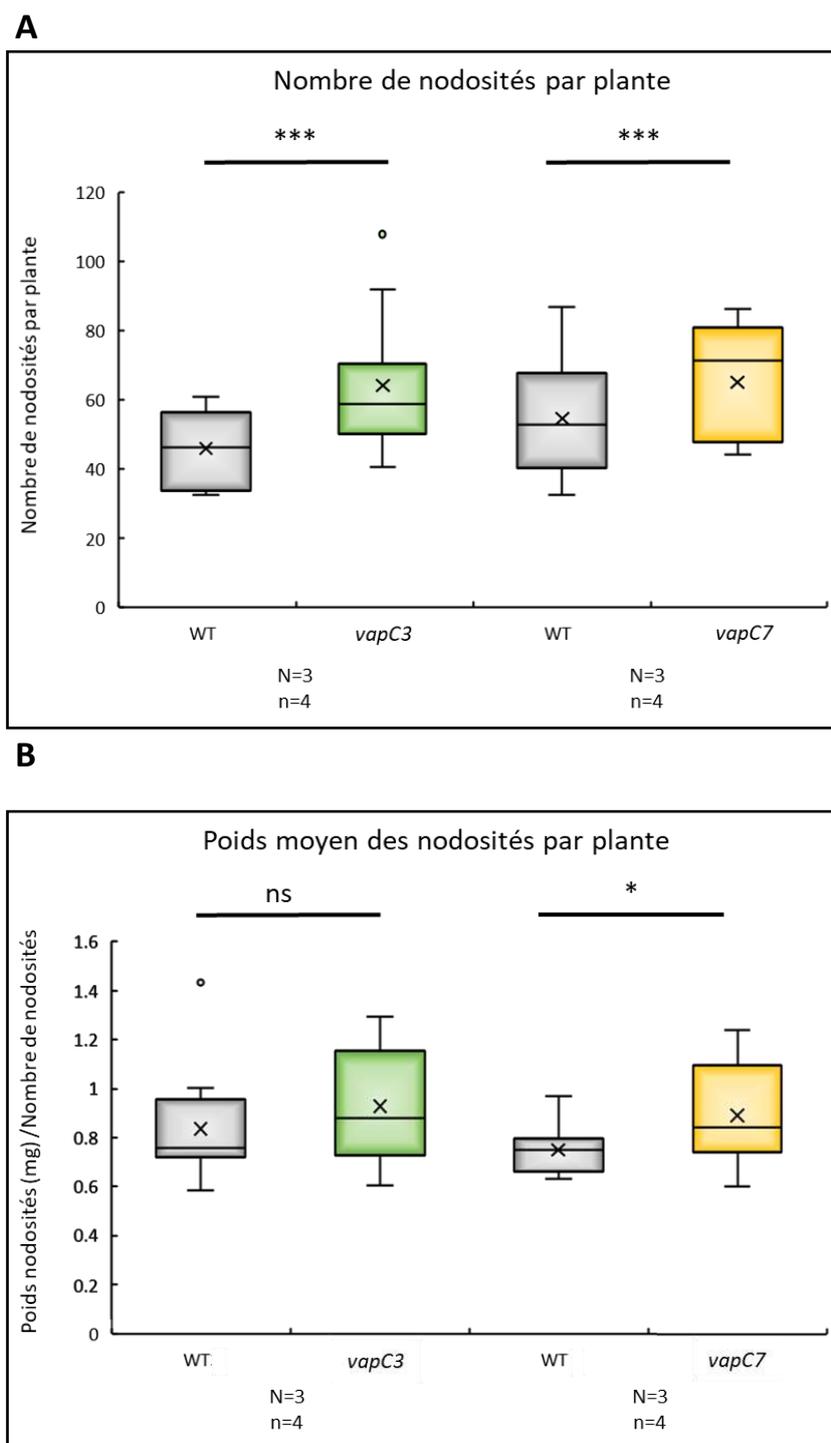


Figure 57: Nombre de nodosités et poids moyen des nodosités induites par les mutants *vapC3* et *vapC7* à 6 spi

A: Nombre de nodosités par plante. La mesure correspond au nombre de nodosités comptées sur trois plantes ramené par plante. La significativité des différences par rapport à la condition sauvage est déterminée à l'aide d'un test χ^2 (distribution des données suivant une loi de Poisson).

B : Poids moyen (mg) des nodosités par plante. Le calcul correspond au poids total des nodosités présentes sur une plante (mg) divisé par le nombre total de nodosités de la plante. La significativité des différences par rapport à la condition sauvage est déterminée à l'aide d'un test t de Student .

La représentation des p-value correspond à ns>0.05, *<0.05, **<0.01 et ***<0.001. N : nombre de répétitions biologiques, n : nombre de mesures effectuées au sein de chaque répétition biologique.

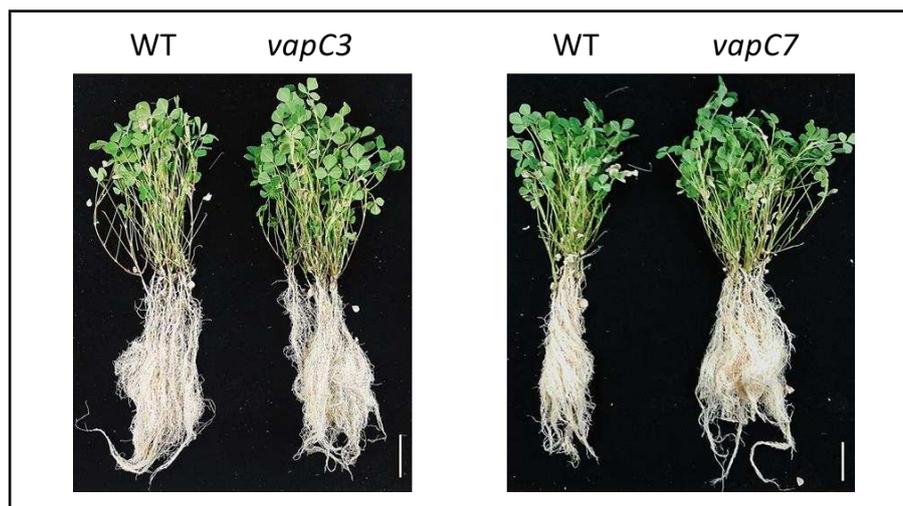
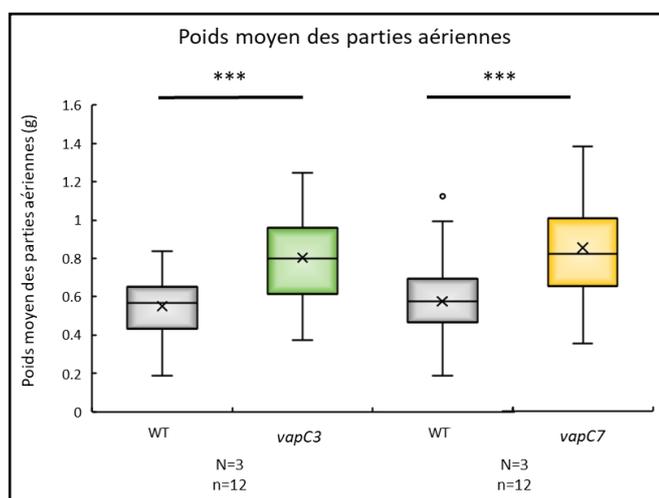
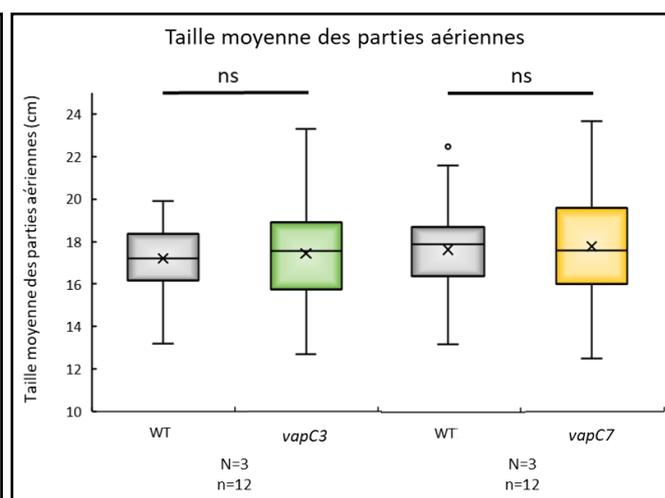
A**B****C**

Figure 58 : Rendement végétal des plantes de *M. truncatula* inoculées par *vapC3* et *vapC7*, à 6 spi.

A : Phénotype des plantes de *M. truncatula* inoculées par la souche sauvage (WT) ou invalidées pour la toxine VapC3 (*vapC3*) ou VapC7 (*vapC7*). La photographie correspond à 12 plantes pour chaque condition. La barre d'échelle correspond à 5cm.

B : Poids moyen (g) des parties aériennes de *M. truncatula* inoculées par la souche sauvage (WT) ou invalidée pour la toxine VapC3 (*vapC3*) ou VapC7 (*vapC7*).

C : Taille moyenne (cm) des parties aériennes de *M. truncatula* inoculées par la souche sauvage (WT) ou invalidée pour la toxine VapC3 (*vapC3*) ou VapC7 (*vapC7*).

Un test de Welch (distribution normale mais non équivalente) a permis de déterminer la significativité des différences.

La représentation des p-value correspond à ns>0.05, *<0.05, **<0.01 et ***<0.001. N : nombre de répétitions biologiques, n : nombre de mesures effectuées au sein de chaque répétition biologique.

- a) Analyse histologique des nodosités induites par les souches sauvage ou mutantes *vapC3* et *vapC7*

L'étude histologique des nodosités induites par les souches sauvage ou mutantes (*vapC3*, *vapC7*) a été menée à 6 spi.

Dans un premier temps, la présence, dans chaque condition, de nodosités sénescents a été quantifiée par observation à la loupe binoculaire. Les nodosités fixatrices, non sénescents, présentent une coloration rosée de par la présence de leghémoglobine fonctionnelle. Les nodosités sénescents, en raison de la dégradation de cette même leghémoglobine présentent, quant à elles, une coloration verte plus ou moins étendue (**Figure 59A**). Dans l'ensemble des conditions testées, seuls 10% environ de nodosités âgées de 6 spi ne présentent pas de zone de sénescence (12.6% avec la souche WT, 9% avec la souche *vapC3* et 7% avec la souche *vapC7*) (**Tableau 10, Figure 59B**). Les mutants *vapC3* et *vapC7* ne semblent donc pas retarder la mise en place de la sénescence nodositaire. Ensuite, parmi les nodosités sénescents, la proportion relative de la zone de sénescence a été estimée par rapport à la longueur totale de la nodosité (**Tableau 10, Figure 59C**). En moyenne, les nodosités induites par la souche WT possèdent 25.6% de tissus sénescents contre 23% et 22.7% pour les nodosités induites par les souches *vapC3* et *vapC7* respectivement (**Figure 59A**). Cette différence significative peut s'expliquer par un enrichissement du nombre de nodosités présentant moins de 20% de sénescence chez ces mutants (**Figure 59C**). Cette diminution de la taille relative de la zone de sénescence s'explique, pour le mutant *VapC7*, par une taille en moyenne significativement plus grande (3.4 mm) des nodosités induites par la souche *vapC7* que celles induites par la souche sauvage (2.9 mm) (**Tableau 10, Figure 60A**). En effet, la zone de sénescence étant, pour les nodosités induites par ces 2 souches, de tailles équivalente (**Figure 60B**) la proportion relative de la zone de sénescence par rapport à la taille totale de la nodosité est donc plus faible dans les nodosités *vapC7* que dans celles induite par la souche sauvage. Concernant le mutant *vapC3*, la zone de sénescence est en moyenne plus grande (+13%) chez le mutant que le sauvage mais la zone de fixation étant encore plus augmentée (+30%) en raison de la taille plus importante des nodosités *vapC3* (3.6 mm) que sauvages (2.9 mm), la proportion relative de la zone de sénescence est significativement inférieure chez le mutant par rapport au sauvage (**Figure 60BC**). L'ensemble des résultats suggèrent donc que les mutants *vapC3* et *vapC7* ne modifient pas la cinétique de la sénescence. Toutefois, la taille supérieure des nodosités mutantes et de la proportion relative de la zone de fixation pourrait permettre un allongement de la durée de fixation.

A

Paramètres analysés	WT	<i>vapC3</i>	Test	p-value ajustée
Nombre total de nodosités	174	174	NA	NA
Nombre de nodosités non-sénescents	22	16	χ^2 binomial	0.6944, ns
Nombre de nodosités sénescents	152	158		
Pourcentage de nodosités sénescents	87.4%	90.8%		
Longueur moyenne des nodosités (mm)	2.93 ± 0.48	3.62 ± 0.70	Wilcoxon	6.9e-16 ***
Longueur moyenne de la zone III (mm)	2.19 ± 0.35	2.85 ± 0.51	Wilcoxon	6.6e-16 ***
Longueur moyenne de la zone IV (mm)	0.74 ± 0.15	0.84 ± 0.19	Wilcoxon	7.08e-4 ***
Pourcentage moyen de sénescence dans les nodosités sénescents	25.62 ± 6.24	23.03 ± 6.35	Wilcoxon	6.9e-4 ***

B

Paramètres analysés	WT	<i>vapC7</i>	Test	p-value ajustée
Nombre total de nodosités	174	200	NA	NA
Nombre de nodosités non-sénescents	22	14	χ^2 binomial	0.2026, ns
Nombre de nodosités sénescents	152	186		
Pourcentage de nodosités sénescents	87.4%	93.0%		
Longueur moyenne des nodosités (mm)	2.93 ± 0.48	3.39 ± 0.52	Wilcoxon	2.7e-15 ***
Longueur moyenne de la zone III (mm)	2.19 ± 0.35	2.62 ± 0.37	Wilcoxon	5.87e-15 ***
Longueur moyenne de la zone IV (mm)	0.74 ± 0.15	0.77 ± 0.21	Wilcoxon	0.7219
Pourcentage moyen de sénescence dans les nodosités sénescents	25.62 ± 6.24	22.73 ± 6.76	Wilcoxon	2.1e-05***

Tableau 10 : Résumé de l'analyse à 6 spi de la sénescence de nodosités de *M. truncatula* induites par les souches mutantes invalidées pour les toxines VapC3 (*vapC3*) et VapC7 (*vapC7*) ou sauvage (WT)

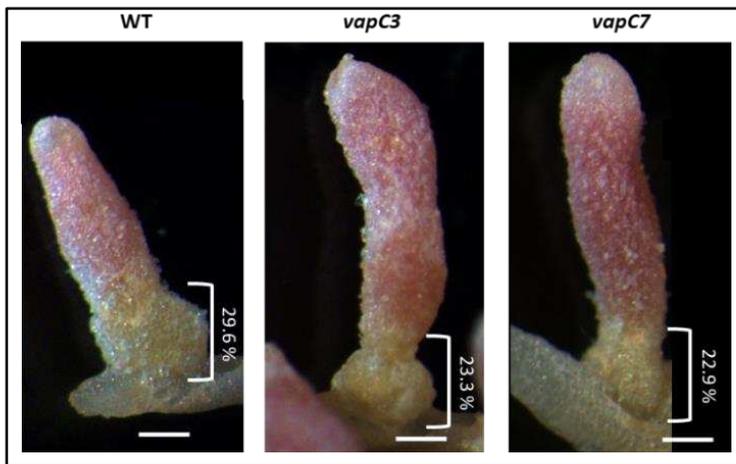
L'ensemble des observations et des mesures (deux réplicats biologiques) a été réalisé à la loupe binoculaire (Leica MZFLIII, 0.8X) puis traité sur le logiciel Axiovision LE.

A: Comparaison des nodosités induites par la souche sauvage (WT) et invalidée pour la toxine VapC3 (*vapC3*).

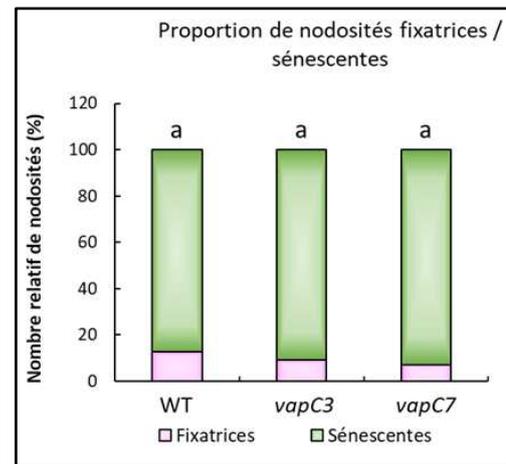
B: Comparaison des nodosités induites par la souche sauvage (WT) et invalidée pour la toxine VapC7 (*vapC7*).

La significativité des différences, entre le nombre de nodosités sénescents et fixatrices, a été déterminée par un test χ^2 (distribution binomiale). La présence de différence, entre les conditions d'inoculation, sur les mesures de longueur totale des nodosités, des zones de sénescence et de fixation, et la détermination de la proportion relative de la zone de sénescence, a été déterminée par un test de multicomparaison non-paramétrique de Kruskal Wallis. Puis, la significativité des différences, entre chaque condition deux à deux, a été déterminée par un test de comparaison par paire de Wilcoxon avec un ajustement de Bonferroni des p-values. p-value : ns>0.05, *<0.05, **<0.01, ***<0.001

A



B



C

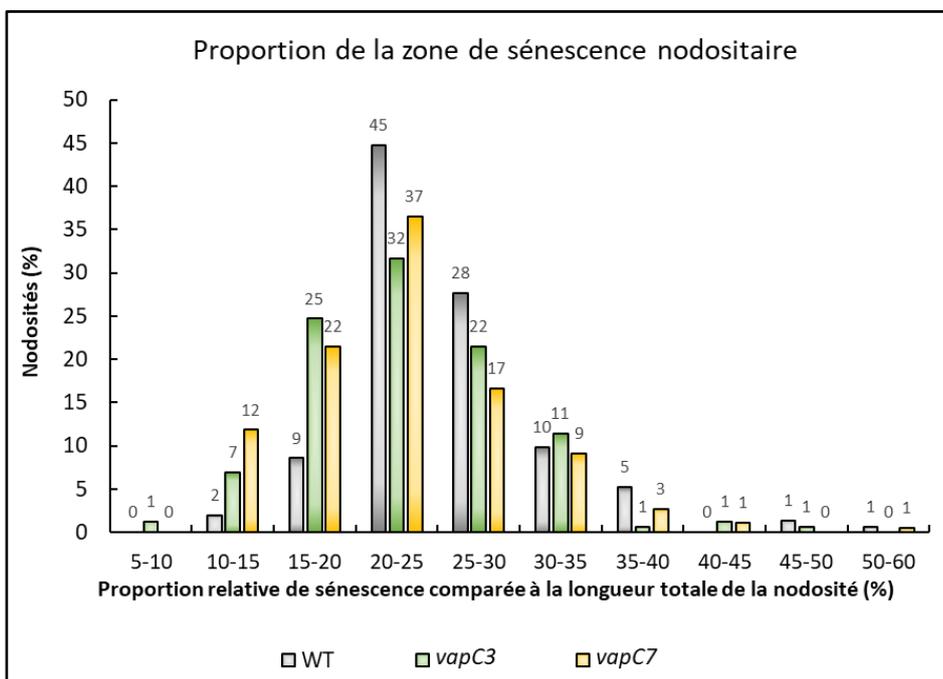


Figure 59 : Analyse à 6 spi de la sénescence de nodosités de *M. truncatula* induites par les souches mutantes invalidées pour les toxines VapC3 (*vapC3*) et VapC7 (*vapC7*) ou sauvage (WT)

L'ensemble des observations et des mesures (deux réplicats biologiques) a été réalisé à la loupe binoculaire (Leica MZFLIII, 0.8X) puis traitées sur le logiciel Axiovision LE.

A: Observation à la loupe binoculaire de nodosités induites par la souche sauvage (WT) ou invalidée pour la toxine VapC3 (*vapC3*) ou VapC7 (*vapC7*). Les nodosités sont des représentants moyens des résultats obtenus à la loupe binoculaire. La barre d'échelle correspond à 500 µm.

B: Nombre relatif de nodosités sénescents (vert) et fixatrices (rose) dans chaque condition (en %). WT : nodosités induites par la souche sauvage, *vapC3* ; *vapC7* : nodosités induites par les souches mutantes *vapC3* ou *vapC7*. La significativité des différences a été déterminée par un test χ^2 (loi binomiale).

C : Pourcentage de nodosités compris dans chaque catégorie de proportion relative de la zone de sénescence par rapport à la longueur totale de la nodosité. WT : nodosités induites par la souche sauvage, *vapC3* ; *vapC7* : nodosités induites par les souches mutantes *vapC3* ou *vapC7*.

La présence de différence, entre les conditions d'inoculation, sur les mesures de longueur totale des nodosités et la détermination de la proportion relative de la zone de sénescence a été déterminée par un test de multicomparaison non-paramétrique de Kruskal Wallis. Puis, la significativité des différences, entre chaque condition deux à deux, a été déterminée par un test de comparaison par paire de Wilcoxon avec un ajustement de Bonferroni des p-values. Une lettre différente est attribuée aux conditions significativement différentes.

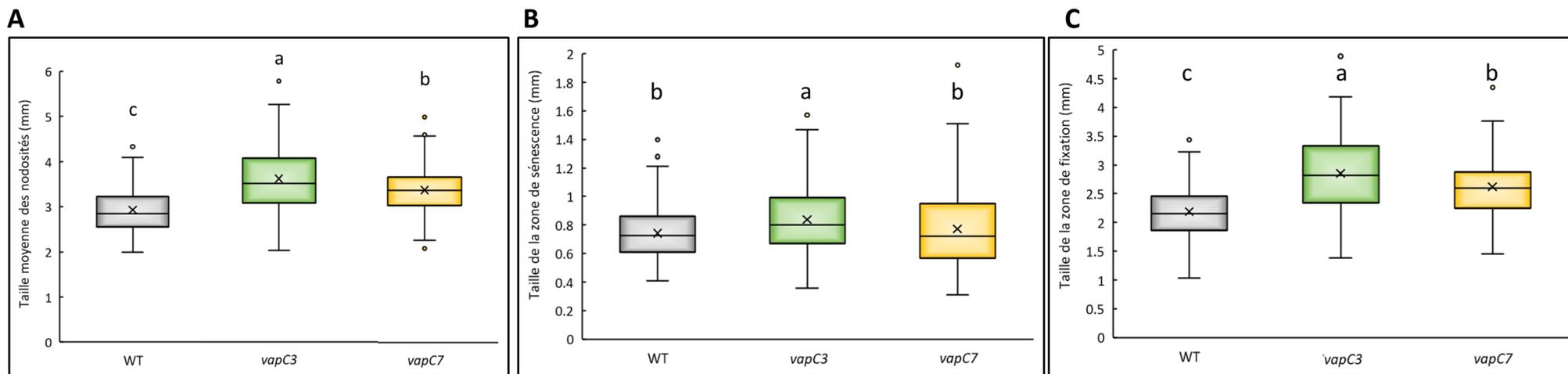


Figure 60 : Analyse de la taille totale ou des zones de fixation et de sénescence des nodosités de *M. truncatula* induites par les souches mutantes invalidées pour les toxines VapC3 (*vapC3*) et VapC7 (*vapC7*) ou sauvage (WT), à 6 spi.

L'ensemble des observations et des mesures (deux réplicats biologiques) ont été réalisées à la loupe binoculaire (Leica MZFLIII, 0.8X) puis traitées sur le logiciel Axiovision LE.

A : Taille (mm) des nodosités induites par les souches sauvage (WT) ou invalidées pour la toxine VapC3 (*vapC3*) ou VapC7 (*vapC7*).

B : Taille (mm) de la zone de sénescence (Zone IV) des nodosités induites par la souche sauvage (WT) ou invalidée pour la toxine VapC3 (*vapC3*) ou VapC7 (*vapC7*).

C : Taille (mm) de la zone fixation (Zone III) des nodosités induites par la souche sauvage (WT) ou invalidée pour la toxine VapC3 (*vapC3*) ou VapC7 (*vapC7*).

La présence de différence, entre les conditions d'inoculation, sur la mesure des zones de sénescence et de fixation a été déterminée par un test de multicomparaison non-paramétrique de Kruskal Wallis. Puis, la significativité des différences, entre chaque condition deux à deux, a été déterminée par un test de comparaison par paire de Wilcoxon avec un ajustement de Bonferroni des p-values. Pour les conditions non différentes, une même lettre est attribuée. si deux conditions diffèrent entre elles, des lettres différentes sont attribuées.

L'étude histologique des nodosités sauvages et mutantes *vapC3* et *vapC7* âgées de 6 spi, est ensuite complétée par la réalisation d'une coloration Live/Dead sur coupes fines longitudinales couplée à une analyse en microscopie confocale. Cette approche permet de distinguer les cellules bactériennes mortes, présentant une membrane plasmique altérée perméable au fluorophore rouge (PI) de celles vivantes, possédant une membrane plasmique intacte, imperméable au fluorophore rouge (PI) mais perméable au fluorophore vert (SYTO9). Cette étude nous permet donc d'estimer la viabilité bactéroïdienne dans les différentes nodosités. Les cellules végétales sont, quant à elles, perméables au PI et par conséquent leur noyau est coloré en rouge. En effet, la perméabilité membranaire des cellules végétales est différente de celle des bactéries.

Des coupes de nodosités représentatives, de longueur totale similaire à la moyenne précédemment définie pour chaque condition (**Figure 60**), sont présentées en **Figure 61**. Les quatre zones caractéristiques d'une nodosité indéterminée mature sont observées (**Figure 61**). La zone I, méristématique, se caractérise par la présence de petites cellules végétales (environ 15 μm), visualisée en rouge en raison de l'abondance des noyaux végétaux. La zone II, d'infection, comprend des cellules végétales de taille moyenne (environ 25-30 μm) au noyau rouge dans lesquelles les bactéries, vivantes (vertes), sont libérées. La zone III, fixatrice d'azote, est la plus grande zone de la nodosité. Elle est constituée de cellules végétales de grande taille (environ 70-90 μm) dans lesquelles les bactéries, totalement différenciées en bactéroïdes (verts), fixent l'azote atmosphérique. Enfin, dans la zone IV de sénescence, les bactéroïdes sont dégradés, les symbiosomes fusionnent pour former des compartiments de lyse puis la cellule végétale, à son tour, est lysée. Au début du processus de sénescence, un mélange de bactéroïdes morts (rouges) et vivants (verts) peut être observé au sein d'une même cellule végétale. Une sénescence plus avancée se traduira par une dégradation totale des bactéroïdes (rouges) qui évoluera ensuite vers une lyse des cellules végétales créant ainsi des méats cellulaires, non fluorescents (flèches en pointillé). Lors de la lyse des cellules végétales, quelques bactéries vivantes (vertes), non différenciées et saprophytiques, peuvent être libérées et ainsi donner une coloration verte.

L'observation, en microscopie confocale, après coloration au LIVE/DEAD, des coupes de nodosités de 6 spi induites par la souche sauvage ou les souches mutantes, ne met pas en évidence de différences nettes au niveau de la zone de sénescence entre le sauvage et les mutants. Quelle que soit la souche utilisée, les nodosités à 6 spi présentent une zone de sénescence caractérisée par des méats cellulaires et des bactéroïdes dégradés (rouge) (**Figure 61**). En revanche, la zone de fixation semble sensiblement plus dense en bactéroïdes dans les nodosités *vapC3* et *vapC7* que dans les nodosités sauvages. Cette observation devra toutefois être confirmée en déterminant l'enrichissement

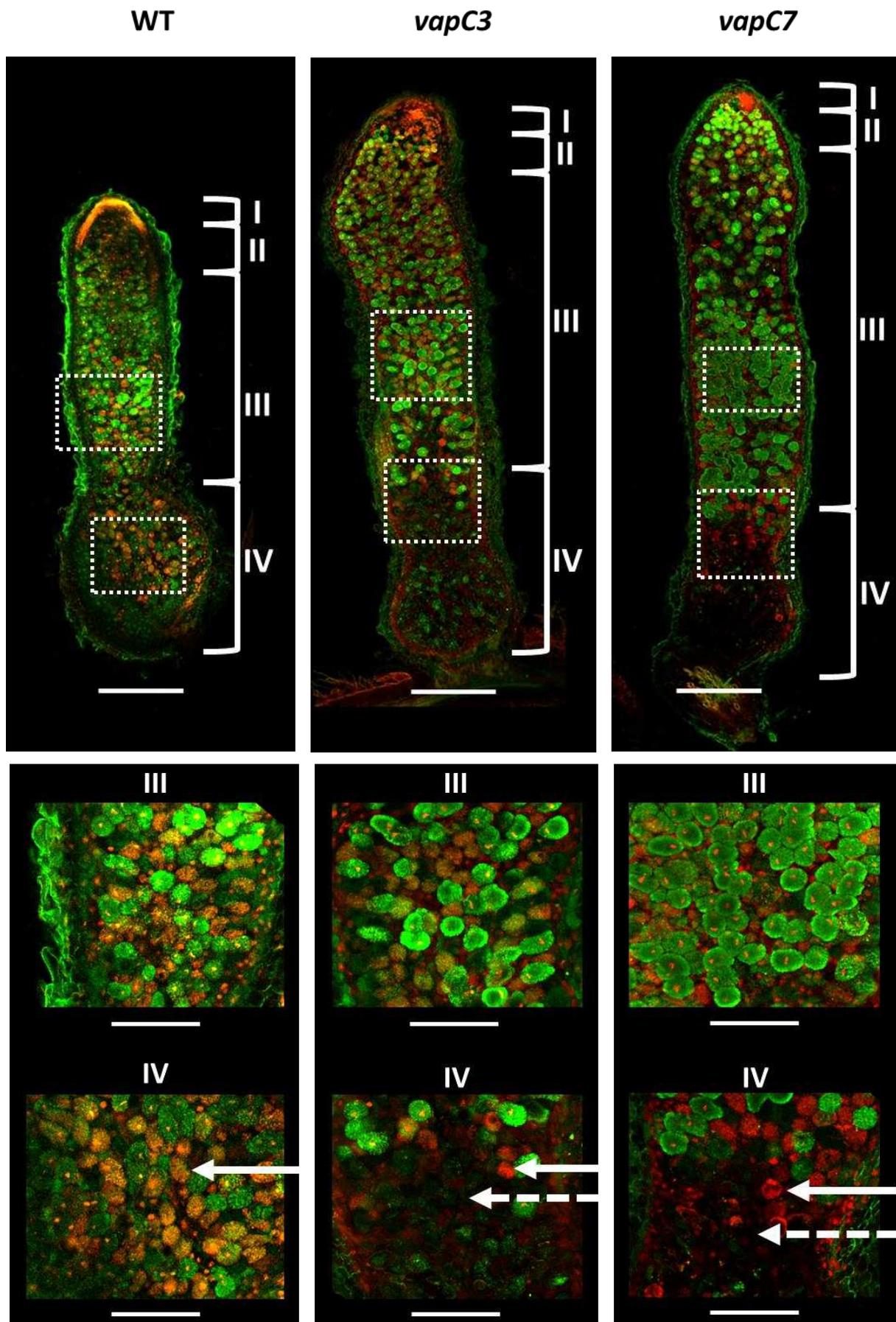


Figure 61 : Comparaison de la viabilité des bactéroïdes de nodosités sauvages ou invalidées pour les toxines VapC3 et VapC7 à 6 spi.

Des coupes fines (120 μm) de nodosités âgées de 6 spi induites par les souche sauvage (WT) ou mutantes (*vapC3*, *vapC7*) sont colorées au LIVE/DEAD (Live/Dead[®]BacLight[™]probe, Invitrogen) et observées au microscope confocal (ZEISS LSM 880, 10X). Les observations ont été réalisées sur trois réplicats biologiques. La barre d'échelle sur nodule entière= 500 μm , zoom des zones III et IV =200 μm ; I : méristème; II : infection; III : fixation; IV : sénescence = zones de la nodosité indéterminée mature. Les encadrés en pointillé correspondent aux zooms de la zone III et IV, présentés en dessous. Les flèches pleines indiquent des cellules végétales contenant des bactéroïdes morts (rouge). Les flèches pointillées pointent méats cellulaires. .

bactéroïdien de chaque catégorie de nodosité. Une première estimation pourrait être obtenue en observant, en microscopie électronique, la taille et le remplissage en bactéroïdes des cellules végétales de zone III, ou encore par cytométrie de flux. Un enrichissement en bactéroïdes serait en accord avec l'amélioration de l'aptitude des bactéroïdes mutants à fixer l'azote décrite précédemment (**Figure 55**).

b) Comparaison de l'expression génique au sein de nodosités induites par la souche WT ou par les souches mutantes *vapC3* et *vapC7*

Pour renforcer ces observations cellulaires et confirmer l'absence de différences significatives quant à la cinétique de sénescence des mutants *vapC3* et *vapC7* et la potentielle amélioration de la « fitness » bactérienne des mutants, l'expression dans la nodosité de gènes marqueurs des zones de fixation (III) et de sénescence (IV) a été analysée par RT-qPCR sur des ARN totaux extraits de nodosités âgées de 6 spi (**Figure 62**). Les gènes marqueurs choisis, témoins de la fonctionnalité de la zone III, d'origine végétale, sont ceux codant la leghémoglobine et un peptide sécrété riche en cystéines impliqué dans la différenciation bactéroïdienne, NCR001 (Mergaert et al., 2003). L'expression des gènes bactériens *nifH*, *nifA* et *fixC* (gènes respectivement impliqués dans la synthèse, la régulation et le fonctionnement de la nitrogénase, surexprimé en zone III) (Alunni and Gourion, 2016; Roux et al., 2014) a également été étudiée. Les gènes d'origine végétale sélectionnés comme marqueurs de la zone de sénescence codent pour des protéines de type cystéines protéases, (CP6 et VPE, fortement induites dans cette zone) (Pierre et al., 2014). Chez les bactéries, aucun marqueur de la sénescence bactéroïdienne n'a, à ce jour, été identifié. Toutefois, un défaut d'expression des gènes *hmp* (codant une flavohémoprotéine permettant une détoxification de l'oxyde nitreux) et *rpoH1* (marqueur de stress notamment impliqué dans l'adaptation au pH acide en zone III) conduisent à une sénescence précoce (Alunni and Gourion, 2016; Meilhoc et al., 2010). L'expression de ces deux gènes, importants dans la fitness bactéroïdienne, a donc également été analysée (Supplementary **Figure 8** de l'article).

En comparant les nodosités induites par les souches *vapC3* et *vapC7* à celles induites par la souche WT, aucune différence significative n'a été retrouvée pour l'ensemble des gènes testés (**Figure 62**). Ce résultat est en accord avec l'absence de différence significative entre les mutants et le sauvage quant à la cinétique de sénescence. En revanche, ce résultat ne permet pas d'expliquer l'amélioration de la fixation observée lors du phénotypage des mutants *vapC3* et *vapC7* ni de renforcer l'hypothèse d'un enrichissement en bactéroïdes des tissus fixateurs des nodosités mutantes.

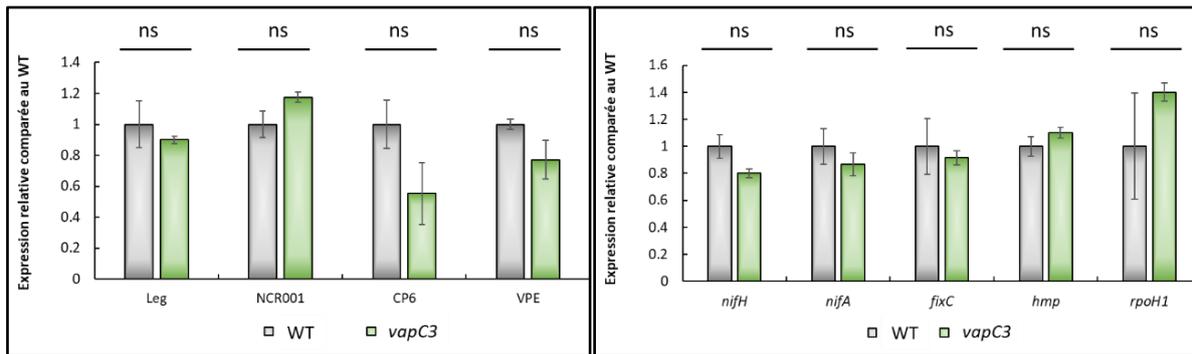
Par conséquent, au vu de l'ensemble des résultats, les mutants *vapC3* et *vapC7* semblent plutôt impacter la capacité d'infection des bactéries (nombre de nodosités plus important) et le

développement nodositaire (nodosités plus longues et, dans le cas de *vapC7*, plus lourdes) que la fixation d'azote ou la sénescence nodositaire puisqu'aucune différence cellulaire ou moléculaire n'est retrouvée à ces étapes. Il reste à comprendre comment des bactéries, mutées dans des toxines de systèmes TA, régulent l'interaction symbiotique et améliorent la production d'azote via des évènements d'infection plus nombreux et une croissance nodositaire améliorée.

A

(1)

(2)



B

(1)

(2)

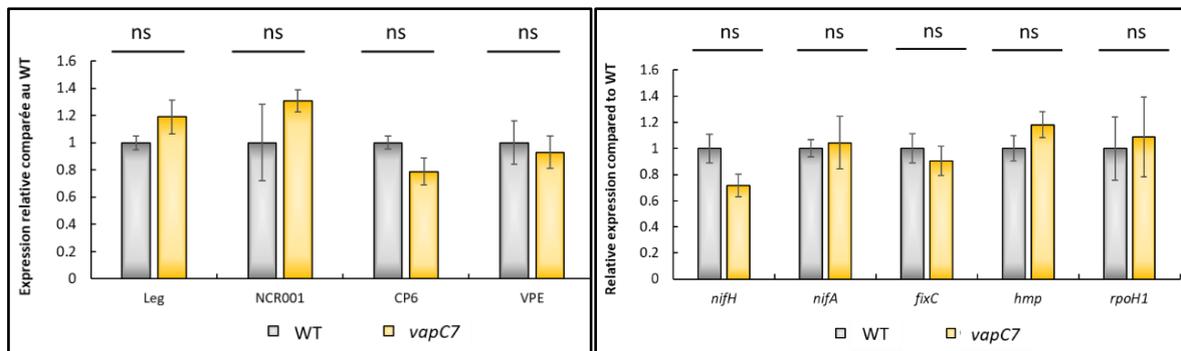


Figure 62 : Expression relative de gènes marqueurs de la fixation et de la sénescence dans des nodosités sauvages (WT) ou mutantes *vapC3* et *vapC7*, à 6 spi

L'expression relative de gènes marqueurs de la plante (1) ou du bactéroïde (2), caractéristiques de la fixation et/ou de la sénescence, est mesurée dans des nodosités sauvages (WT) ou mutantes *vapC3* (A), *vapC7* (B) par RT-qPCR. Les gènes de référence utilisés des marqueurs végétaux sont A38 et A39 (fonctions inconnues), et *bet5* (transporteur de glycine-choline induit lors d'un choc osmotique) et *16S* pour les marqueurs bactériens.

L'ensemble des expressions relatives, mesurées par RT-qPCR sur trois réplicats biologiques, ainsi que leur significativité, ont été traitées par le package RqPCRBase_vs.1.4.R issu de (Hilliou and Tran, 2013). p-value : ns>0.05, *<0.05, **<0.01, ***<0.001

Leg (Leghémoglobine 1), NCR001 (Nodule Cystein-Rich peptide), *ctrA* (Cell cycle Transcriptional Regulator), *nifH* (Nitrogenase iron protein), *nifA* (Nitrogenase transcriptional activator), *fixC* (FixC oxidoreductase), CP6 (Cystein Protease 6), VPE (Vacuolar Processing Enzyme), *hmp* (Hemoflavoprotein), *rpoH1* (RNA polymerase sigma factor 1).

Section Résultats



- **Partie 1** : Etude globale des systèmes VapBC de *S. meliloti*

- **Partie 2** : Article scientifique en préparation

- **Partie 3** : Identification de la cible de VapC7

Section Résultats

Partie 2 : Article scientifique en préparation

Cet article est en préparation. Actuellement, les dernières expériences nécessaires à la validation du MORE RNA-seq ont été entreprises. Cet article ne possède pas de partie Discussion car nous avons préféré, dans le cadre de la thèse, de commenter les cibles des toxines VapC7 et VapC10 ensemble, de même pour les phénotypes symbiotiques obtenus avec les mutants *vapC3*, *vapC7* et *vapC10* en interaction avec *M. truncatula*.

The VapBC10 Toxin Antitoxin system of *Sinorhizobium meliloti* targets a tRNA^{Ser} and contributes to microsymbiote intracellular lifestyle

Camille SYSKA ¹, Aurélie KIERS ¹, Corinne RANCUREL ¹, Marc BAILLY-BECHET ¹, Camille DURAJ ¹,
Justine LIPUMA ², Geneviève ALLOING ¹, Isabelle GARCIA ¹ and Laurence DUPONT ¹

¹ Université Côte d'Azur, INRAE, CNRS, ISA, France.

² Mycophyto, France.

Key-words: rhizobia, legumes, nitrogen-fixation symbiosis, VapBC, toxin–antitoxin, nodule senescence, tRNAse, intracellular adaptation

Abstract

The symbiotic interaction between *Sinorhizobium meliloti* and the model legume *Medicago truncatula* leads to the formation of new root organs, the nodules, where bacteria, differentiated into bacteroids, reduce the atmospheric nitrogen into ammonium. To better understand the intracellular lifestyle adaptation of bacteria during symbiosis, we examine the role of the *S. meliloti* VapBC10 Toxin-Antitoxin (TA) system. Here we show that infection of *M. truncatula* with *vapC10* toxin mutant improves nitrogen fixation capacity and induces less, but more performant, root nodules with a delayed senescence phenotype associated to an improved bacteroid survival in infected plant cells. Then, the use of the MORE RNA-seq method showed that the VapC10 toxin cleaves two tRNA^{Ser} in the (G/U)G[^]AAA site of the anticodon loop. These results suggest that this TA system controls the intracellular behavior of *S. meliloti* by interfering with the synthesis of serine-rich proteins, or more generally bulk protein synthesis, probably to allow an optimized symbiotic adaptation in response to plant nitrogen demand, energy and immunity.

Introduction

Sinorhizobium meliloti is a soil bacterium found either in a free-living state or in symbiosis with particular legume plants. During symbiosis, the bacteria in induced root nodules, reduce atmospheric nitrogen to ammonia through the activity of nitrogenase. The reduced nitrogen is used by the host plant, and the bacteroids are provided with carbon sources from the plant photosynthesis.

The symbiotic interaction between *S. meliloti* and *Medicago truncatula* is well characterized¹⁻³. The mature nitrogen fixing nodules consist of four distinct zones. The root distal meristematic zone (ZI) is responsible for the continuous elongation of the nodule. In the infection zone (ZII), dividing bacteria proceed through an infection thread and are released by endosytosis into the cytoplasm of sub-meristematic plant cells to form a symbiosome. This new entity shortly divides into the distal zone II (II_d). Then, along the cell layers of this zone II, bacteria irreversibly differentiate into nitrogen fixing bacteroids until the proximal zone II (II_p): this involves metabolic reprogramming and a size enlargement related to endoreduplication of the genome until 24C^{4,5}. Concomitant endoreduplication of symbiotic plant cells results in nodule cell ploidy of 64C and larger cell size^{6,7}. In the nitrogen-fixing zone (ZIII), the bacteria encounter microaerophilic and acidic conditions^{8,9}, and their metabolism reprogramming is then devoted to nitrogen fixation. Five to six weeks post-inoculation (wpi), the root proximal zone (ZIV) displays senescence, and the bacteroids degrade and collapse, leading to decreased nitrogen fixation^{10,11}.

We examine the role of toxin-antitoxin (TA) systems of *S. meliloti* during symbiotic interaction to assess the adaptation of bacteria to the intracellular lifestyle. Bacterial TA systems are found in nearly all bacteria and archaea and are encoded by genes organized in operons¹². These are composed of a toxin which targets specific cellular functions and an antitoxin that counteracts the action of the toxin. TA modules are classified into six different types (I-VI), and type II modules are the best characterized^{13,14} and the most abundant type, especially in bacterial species which are exposed to diverse micro-environments^{15,16}. Several biological roles have been assigned to TA modules. They are associated with growth arrest or cell death under stressful conditions¹⁷. They contribute to bacterial persistence associated with antibiotic resistance¹⁸, to biofilm formation¹⁹, to virulence²⁰ and to stress resistance^{15,19,21} in human pathogens. The implication of TA modules in virulence of phytopathogenic bacteria has also been recently demonstrated during plant infection^{22,23}.

One of the most abundant type II TA systems belong to the VapBC family^{24,25}. In human pathogens, they contribute to virulence and bacterial adaptation to an intracellular lifestyle^{15,20,26-28}. The VapC toxin is a site-specific ribosome-independent endoribonuclease²⁹ mainly identified as being

a tRNase³⁰. Its activity is blocked by protein-protein interaction with its cognate antitoxin VapB. The VapBC complex usually exerts a negative autoregulation on the expression of its TA operon by binding to the operator sites of the TA promoter^{31,32}. Under stress conditions, the unstable antitoxin is degraded by bacterial proteases like ClpXP³³ or Lon³⁴ leading to the deregulation of the TA operon and expression of the toxin activity³⁵.

According to the Toxin-Antitoxin Database (TADB 2.0)²⁵, the chromosome of *S. meliloti* carries twenty-nine operons encoding classified type II TA systems of which eleven belong to the VapBC family. The importance of two *vapBC* operons, *ntrPR* and *vapBC-5*, in *S. meliloti* symbiosis has been demonstrated³⁶⁻³⁸: inactivation of the toxin results in improved nitrogen fixation and symbiotic efficiency in *M. sativa* for both *vapC* mutants, and a delayed nodule senescence for the *vapC-5* mutant³⁸. It has been suggested that, in a wild-type context, the corresponding modules, NtrPR and VapBC-5 may influence bacteroid metabolism and could contribute to nodule senescence onset.

Here we investigated the role of the VapBC10 system of *S. meliloti* during symbiotic interaction with *M. truncatula*. We report that VapBC10 is a functional TA module, describe both the symbiotic phenotype of a *vapC10* mutant strain and identify the molecular targets of the VapC10 toxin. Our results show that VapC10 toxin might control bacteroid intracellular adaptation by limiting its global fitness within the host plant. Indeed, *vapC10* mutants induce less but more performant nitrogen fixing root nodules of delayed senescence phenotype, resulting in a satisfied nitrogen demand of the plant since the the global fixation capacity per plant is unchanged. Inside the nodules, *vapC10* bacteroids have a higher intracellular viability in the fixation zone III but do not show a higher expression of genes involved in synthesis and activity of the nitrogenase nor of genes involved in stress responses. We conclude that *vapC10* bacteroids have a better global fitness meaning that, in a wild-type context, the VapBC10 module might control the adaptation of the bacteria in response to plant demand in nitrogen, energy cost and immunity weapons. At the molecular level, we showed for the first time, for a TA system of a plant-interacting bacteria, that VapC10 toxin targets two tRNA^{Ser}. This suggests that VapC10 controls the symbiotic interaction efficiency by transiently inhibiting specific or global translation, necessary to rapid metabolic reprogramming of the bacteria in the fixation zone III.

Methods

Biological material

Plant growth conditions

Seeds of *Medicago truncatula* ecotype A17 were surface sterilized and germinated as previously described ³⁹. *M. truncatula* plants were grown in pots in sand B5 under a 16 h : 8 h, light : dark photoperiod associated with 23/21°C thermoperiod, watered with nitrogen-free nutrient medium ⁴⁰. Plantlets were inoculated 6 days after germination with *S. meliloti* wild-type (WT) or *vapC10* mutant strains (10 mL per plant of resuspended bacteria in water at OD_{600nm}=0.05). Plants and nodules were harvested after 3- and 6-weeks post-inoculation (wpi).

Bacterial strains and growth conditions

Strains used in this study are listed in Supplementary Table 1.

Escherichia coli strains were grown at 37°C, 190 rpm in Luria-Bertani (LB) medium supplemented when appropriate with 100 µg.mL⁻¹ ampicillin, 30 µg.mL⁻¹ kanamycin, 34 µg.mL⁻¹ chloramphenicol, 0.2% glucose, 1% arabinose or 100 µM IPTG.

Sinorhizobium meliloti strains were grown at 30°C, 190 rpm in LB medium supplemented by 2.5 mM MgSO₄ and 2.5 mM CaCl₂(LB_{MC}) and appropriate antibiotics (streptomycin 100 µg.mL⁻¹ and neomycin 200 µg.mL⁻¹).

Plasmid material

The plasmids and oligonucleotides used in this study are listed in Supplementary Table 2 and Table 3 respectively.

Construction of the *vapB10* and *vapC10* expression plasmids

The *vapC10* and *vapB10* genes were PCR-amplified from genomic DNA of *S. meliloti* strain 2011 with appropriate primers (Supplementary Table 3) and cloned into the pJET1.2 cloning vector according to

the standard procedures (ThermoFischer), giving pJET-*vapC10-tox* and pJET-*vapB10-tox* plasmid respectively.

After restriction of the pJET-*vapC10-tox* or the pJET-*vapC10-purif* plasmids, the Bsal-Sall or Bsal-NotI fragments carrying *vapC10* were cloned between the NcoI/Sall sites of pBAD24 ⁴¹, giving pBAD24-VapC10 plasmid, or between the NcoI/NotI sites of pET28a (Novagen), giving pET28a-VapC10-HisTag plasmid, respectively.

After restriction of the pJET-*vapB10-tox* plasmid, the Bsal-XhoI fragment carrying *vapB10* was cloned between the NcoI/Sall sites of pRSF1b (Novagen), giving pRSF1b-VapB10 plasmid.

E. coli DH5 α competent cells was performed as described by ⁴². The plasmids were introduced in DH5 α by thermotransformation and checked by sequencing. When needed, plasmids were introduced in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS by thermotransformation, with competent cells prepared with the same protocol than DH5 α .

Construction of the *S. meliloti vapC10* mutant

An insert of 248 bp of *vapC10* gene was PCR-amplified (Supplementary Table 3) from genomic DNA of *S. meliloti* strain 2011 and inserted into the pJET1.2 cloning vector according to standard procedure (ThermoFisher), giving pJET-*vapC10-Sm*. After restriction of the pJET-*vapC10-Sm* plasmid, the HindIII-BsrGI fragment carrying *vapC10* insert was ligated into the suicide vector pK19mob2 Ω HMB restricted with the same enzymes. The resulting plasmid was introduced into *S. meliloti* strain 2011 by triparental mating ⁴³, giving *S. meliloti* strain invalidated in the *vapC10* gene. This recombination disrupts the open reading frame of the toxin in the last 183 bp on 444.

Viability tests

Two independent cultures of *E. coli* DH5 α carrying pBAD24-*vapC10* or pBAD24-empty (Ctrl) were grown overnight at 37°C in LB supplemented with ampicillin (100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and glucose at 0.2% to prevent leaky expression in stationary phase. Then, each culture was split in two, diluted to an OD_{600 nm}=0.05 and grown to an OD_{600 nm}=0.4. The *vapC10* expression was induced in one culture by adding 1% of L-arabinose, and the other culture, not induced, was supplemented by glucose 0.2% to serve as a control. At chosen time points (1-, 3-, 5- and 6-hours post-induction), 10 μL of several serial dilutions

were plated on LB agar supplemented by glucose at 0.2%, in technical duplicate. After 16 hours of incubation ON at 37°C, the number of viable bacteria (CFU) was determined by the average of the two spots of each independent culture. The rate of toxicity was determined at the last kinetic point as follow:

$$Toxicity = \log(10) \frac{[mean (Ctrl_1 + Ctrl_2 + VapC10_1 + VapC10_2)^{glucose} + (Ctrl_1 + Ctrl_2)^{arabinose}]}{[mean (VapC10_1 + VapC10_2)^{arabinose}]}$$

Those experiments were realized in three independent biological replicates.

The putative VapB10 antidote effect was tested in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS (Cm^R) carrying pBAD24-*vapC10* (Amp^R) or pRSF1b-*vapB10* (Kan^R) or both. Two independent colonies of each strain were grown overnight in LB containing 0.2% of glucose and appropriate antibiotics. Then, cells were diluted at OD_{600nm} =0.05 and grown until OD_{600nm} =0.15 in LB with appropriate antibiotics. To induce plasmids expression, L-arabinose (1%) and IPTG (100 μM) were added to the distinct cultures. Measurements of OD_{600nm} were performed for 4 hours.

Nitrogen fixation capacity assay

Nitrogen fixation activity was determined by the acetylene reduction assay (ARA) as described previously⁴⁴ with some modifications. Briefly, for each condition, roots of 15 plants were pooled by 3 in a pill box of 30 mL with 10% (v/v) of acetylene. The pill boxes were incubated for 30 min at 28°C. Then, the reduction of acetylene to ethylene was measured by gas chromatography. After measurements, nodules are harvested and put on agar plates (0.6%). Total of nodules per pill box are counted and weighted. The activity of nitrogenase is expressed in nmoles of ethylene produced per hour and per mg of nodules or per plant.

Nodule RNA isolation and real-time quantitative PCR (RT-PCR) analysis

Nodules were harvested at 3 and 6 wpi and frozen in liquid nitrogen. Total RNA was extracted from a hundred milligrams of grinded nodules using RNAzol[®] RT (Sigma -Aldrich) and then, 1 μg of RNA was treated with RQ1 RNase-Free DNase (Promega). Following the manufacturer's instructions, cDNAs were synthesized using the GoScript Reverse Transcription System (Promega). The absence of plant genomic DNA contaminations in the cDNAs samples was tested as described by⁴⁵. RT-qPCR was performed in an AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies), using GoTaq qPCR Master Mix

(Promega). For each reaction, performed in triplicate, 5 µl of 40-fold diluted cDNA were used in a final reactional volume of 15 µL. PCR conditions were 95°C for 3 min, followed by 39 cycles of 95°C for 3 s and 60°C for 30 s. The primers used for the qPCR are listed in Supplementary Table 4. The reference genes used for normalization were *MTC27*, *A38*, for plant cDNA, and *betS*, *16S* for bacterial cDNA. Gene expression and statistical analysis were performed using the RqPCRBase package ⁴⁶. The results presented are the means of three independent biological experiments.

Microscopy experiments

Size of the nodule senescent zone

6-weeks old nodule, induced by the wild-type or the *vapC10* mutant strains, were harvested up to the first five centimeters of the root below the collar, and were observed with a Leica MZFLIII binocular magnifier. The length of nodules, the presence or the absence of senescent nodules (estimated by a change of shape and color, green (degraded leghemoglobin) and pink (functional leghemoglobin)) and the relative size of the senescence zone were measured by using AxioVision LE software. The results correspond to a total of 185 and 167 wild-type or *vapC10* induced nodules respectively, obtained from three independent replicates.

Nodule histology using BABB clearing

Histological comparison of the wild-type *vapC10* induced nodules was performed by using BABB clearing as described by ⁴⁷ with minor modifications. Briefly, as 6 wpi-old nodules are thick, the last clearing step in BABB solution (benzyl alcohol /benzyl benzoate mixed in a 1:2 proportion (v/v)) was maintained at least one week at 4°C. Acquisition of images was performed using a Zeiss confocal laser scanning microscope (LSM880) with the same settings than ⁴⁷.

In situ Live/Dead staining

Nodules harvested at 6 wpi were embedded in 6% (w/v) agarose. Sections (120 µm) were prepared with a Leica HM650V vibratome and incubated in Live/Dead staining as described by ⁴⁸. Images were acquired with a Zeiss confocal laser scanning microscope (LSM880).

Statistical analyses of the phenotyping experiments

The significance of differences was assessed using R software. A Shapiro test was used to control the normality of the values and a Bartlett test for the homogeneity of variances. Depending on the p-values obtained, one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey post-hoc test (Gaussian, equivariance) was used for N₂ fixation experiments, the weight of the aerial parts of the plants and the ratio weight/number of nodules. Kruskal-Wallis followed by the generalized linear model χ^2 (Poisson) test with Bonferroni adjustment of p-values was used for the number of nodules, followed by χ^2 (Binomial) test with Bonferroni adjustment of p-values as used for the presence/absence of senescent nodules, and followed by Wilcoxon test with Bonferroni adjustment of p-values was used for the size of the aerial parts of plants, the size of nodules and the relative proportion of senescence zone. The summary of p-values is presented in Supplementary Table 6 and Supplementary Fig. 7.

Identification of the molecular targets of VapC10 toxin

Bacterial growth conditions and RNA extraction method used for the MORE RNA-seq

The plasmids pBAD24 and pBAD24-*vapC10* were introduced into the *E. coli* BW25113 Δ 6 strain, received from Nancy Woychik. Each overnight culture grown at 37°C, 190 rpm, in LB supplemented by 0.2% of glucose, was diluted to OD_{600nm}=0.05. When cultures reached OD_{600nm}=0.4, the medium was changed to LB supplemented by 1% of arabinose and cells were grown for 30 min post-induction. Then, total RNA extraction was performed as described in ⁴⁹ (Supplementary Figure 1). 20 μ g of RNA were treated with RQ1 RNase-Free DNase (Promega), following the manufacturer's instructions. Then, RNA were purified with a phenol:chloroform extraction. The quantity and quality of total RNA were estimated using a Bioanalyser Agilent 2100 (Prokaryote Total RNA nanochip). Total RNA samples were characterized by RIN values ranging from 9.8 to 10 indicating high quality (Supplementary Figure 2). To realize the RNA-seq, 3 μ g of total RNA were sent to Fasteris, sequencing company (Switzerland).

Preparation of cDNA libraries for Illumina RNA-sequencing

RNAs degraded by PIN RNase could produce either 5'-hydroxyl (5'-OH) or 5'-monophosphate (5'-P) ends. To convert 5'-OH into 5'-P ends, the libraries were treated with T4 polynucleotide kinase. Then,

Illumina 5'-adaptors with a barcode were ligated to 5'-P ends of RNAs. This step allows the recognition of the future cDNA banks and discriminates the non-degraded RNAs having 5'-PP or 5'-PPP ends. After ligation, the generation of cDNA banks was performed by reverse transcription using a common 3' Illumina adaptor. Only cDNAs that migrated below 300 nucleotides were isolated after gel excision. Finally, the cDNA libraries were sequenced by a 1 x 150 bp single-end Illumina MiSeq Nano chip. All these steps were realized by Fasteris sequencing platform (Switzerland).

Bioinformatical analysis: cleaning, mapping and counting table of reads

After sequencing, the sequence reads were processed as follow. First, adaptors used for sequencing and sequence reads below 27 nucleotides were trimmed, to avoid a random mapping. Then, trimmed cDNA banks were subjected to quality filtering with FastQC for location and frequency of N positions and sequence length distribution. The trimmed banks were subjected to mapping to the BW25113 genome (CP009273.1), by using bowtie2 (version 2.3.5) within the parameters very-sensitive -D 20 -R 3 -N 0 -L 20 -i S,1,0.50, end-to-end as described in ⁵⁰. For each condition, between 7.5 and 9.6 million of reads were aligned to the BW25113 genome (Supplementary Table 5). Interconversion of SAM and BAM file formats was conducted by using the samtools (version 1.7), with htlib 1.7 (Genome Research Ltd). The normalization of BAM files was performed within deeptools (version 3.1.3), tool = bamCoverage. Finally, alignments and coverage of each bank were observed on the portal "myGenomeBrowser".

Statistical analysis of the MORE RNA-seq data

To identify the target of VapC10, a counting table was performed on the 5'-end reads. As the 5'-end of the read is critical for our analysis, all the sequence reads, in the correct orientation, having at least one mismatch on the first 30 nucleotides were removed before the mapping, as described in ⁴⁹. Multimapped reads were counted as 1/x where x is the number of mapping targets in the genome. As rRNA reads created too much background, they were treated separately from the non rRNA reads. Our observations on myGenomeBrowser showed a "signature" of cleaving, where only in VapC10 condition, 5'-ends of reads are perfectly aligned at the same nucleotidic position, whereas in the control condition, this signature is not observed. Therefore, a home-made R script was elaborated to catch this signature in the counting table (Fig. S3) by evaluating a score, computed for each position *i* as follows:

$$\text{Score (VapC)}i = \frac{(\text{mediane}(\text{number of reads } (R1)_i + (R2)_i)) + 0.5}{\sum_{k=i-1}^{i-10} (\text{mediane}(\text{number of reads } (R1)_k + (R2)_k)) + (10 * 0.5)}$$

$$\text{Score (Ctrl)}i = \frac{(\text{mediane}(\text{number of reads } (R1)_i + (R2)_i)) + 0.5}{\sum_{k=i-1}^{i-10} (\text{mediane}(\text{number of reads } (R1)_k + (R2)_k)) + (10 * 0.5)}$$

$$\text{Cleavage ratio } i = \frac{\text{Score (VapC)}i}{\text{Score (Ctrl)}i}$$

This local peak score is different of a classical fold change between the VapC10 and Control condition, as it is only based on VapC10 reads number at i position and positions located up to 10 nucleotides upstream. The 0.5 factors appearing simply mean that all read counts were incremented by 0.5, to prevent 0 counts. Then, the cleavage ratio at i position between VapC10 and Ctrl is determined. In addition, filters were used in order to keep only data where the cleavage ratio is >50. Accurate analysis of the high scores, i.e 5' ends generated by VapC10 showed that this toxin cuts these three tRNA^{Ser}. To identify homologues, the sequence of these *E. coli* tRNA^{Ser} were then compared to *S. meliloti* tRNA using LocARNA, an alignment algorithm accounting for conservation of structural RNA features⁵¹. To declare that one of the 55 *S. meliloti* tRNA sequences was homologous to the *E. coli* tRNA^{Ser}, they had to be bidirectional best hits in the LocaRNA analysis.

Results

The *vapBC10* operon encodes a functional toxin-antitoxin system.

The *vapBC10* genes, located on the *S. meliloti* chromosome, are organized in operon with the antitoxin gene *vapB10* (SMc02988) partly overlapping the toxin gene *vapC10* (SMc02987). These genes are co-transcribed as one mRNA independently of the two adjacent genes (SMc2986 encoding a hypothetical transmembrane protein, and SMc06911 specifying a non-coding RNA of unknown function) (Sallet *et al.*, 2013) (Supplementary Fig. 3a). In *M. truncatula* induced nodules (Roux *et al.*, 2014), *vapB10* expression is 2.3-fold and 1.7-fold higher in the proximal infection zone (ZIIp) and in the interzone (IZ), respectively, than in the nitrogen fixing zone (ZIII), whereas *vapC10* gene does not show any significant modification of its expression in all the considered zones (Supplementary Fig. 3b and c).

The *vapB10* gene encodes a protein of 8.9 kDa containing an helix-turn-helix (HTH) domain characteristic of transcriptional repressor⁵². It shares 44% identity with the VapB11 antitoxin of *S. meliloti* and is closed to the Rv0623-like transcription factor (VapB30 antitoxin) of the pathogenic bacteria *Mycobacterium tuberculosis* (Supplementary Fig. 4a). The *vapC10* gene encodes a putative PIN (PilT N-terminal) domain of 16.2 kDa most similar to the VapC11 (47% of identity) and VapC9 (32%) putative TA toxins of *S. meliloti*, and also to VapC42 and VapC8 of *M. tuberculosis* (33% of identity) (Supplementary Fig. 4b).

To demonstrate that VapBC10 acts as a TA module, the ability of VapC10 to lead to a bacterial growth arrest in a heterologous host, *E. coli* DH5 α , was assessed (Fig. 1a, b). Colony-forming units (CFU) per mL were determined on bacterial cultures of pBAD24 as a control and pBAD24-*vapC10* (Supplementary Table 2), induced or not by arabinose. A representative example is presented in Fig.1a. A 10³-fold decrease of CFU/mL was observed within two hours post-arabinose induction, in *E. coli* DH5 α carrying pBAD24-*vapC10* plasmid compared to non-induced and empty vector conditions (Fig. 1b). These results confirm the toxicity effect provided by the VapC10 protein.

Then, to test the ability of the antitoxin to counteract the growth arrest due to VapC10 toxicity, co-expression of the *vapB10* and *vapC10* genes was realized. For this purpose, three strains were constructed, one carrying pBAD24-*vapC10* plasmid, one carrying the antitoxin *vapB10* gene under the control of the IPTG-induced promoter of pRSF1b (pRSF1b-*vapB10* plasmid, Supplementary Table 2), and one carrying both constructions. Growth kinetics after IPTG and arabinose induction show that VapB10 overexpression alone does not affect the *E. coli* growth capacity but has an antidote effect when it is co-expressed with VapC10 (Fig. 1c).

These results demonstrate that the *vapBC10* operon encodes a functional TA system.

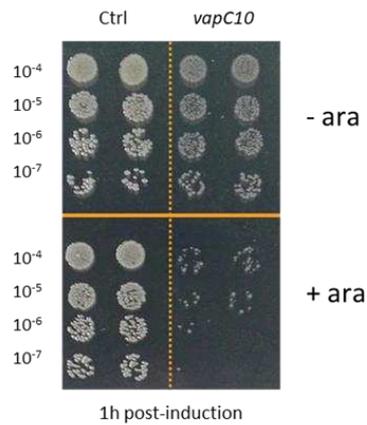
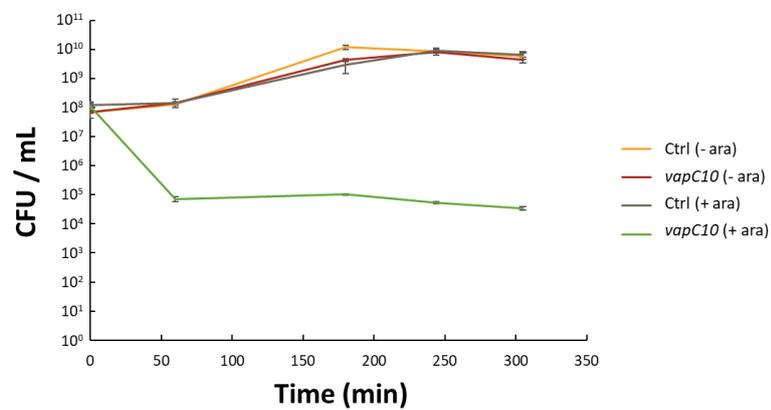
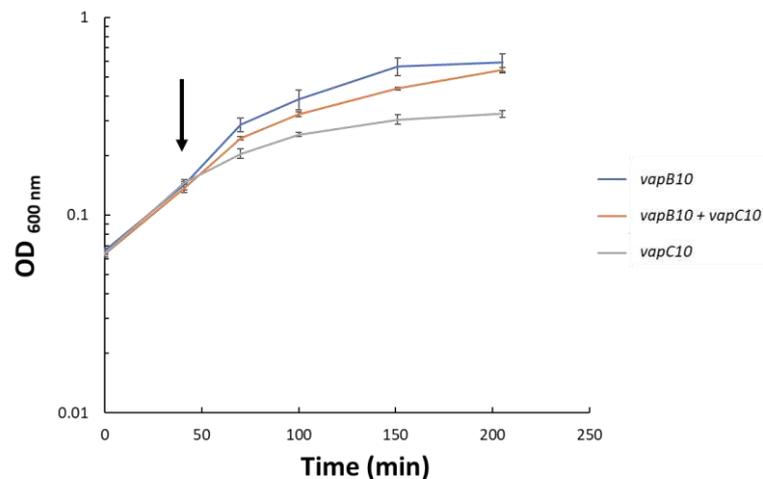
a**b****c**

Figure 1. The *vapBC10* operon encodes a toxin-antitoxin system. (a-b) Toxicity assay of the VapC10 protein. *E. coli* DH5 α was transformed with pBAD24 or pBAD24-*vapC10* plasmids (Supplementary Table 2). Bacterial cultures were induced with 1% of arabinose (+ara) or not (-ara). **(a)** Colony forming unit (CFU) per mL at 1h post-induction by arabinose. Cells grown until OD_{600nm} = 0.4 were induced by arabinose, serially diluted as

indicated, and spotted on LB glucose agar plates. **(b)** Kinetics of viability (CFU/mL) realized for 6 hours post-induction. **(c)** Antitoxicity assay of VapB10 protein. *E. coli* BL21 (DE3) pLysS was transformed with pRSF1b-*vapB10* (IPTG inducible), pBAD24-*vapC10* (arabinose inducible) or co-transformed with both plasmids. Cells were grown until $OD_{600nm} = 0.15$, induced by arabinose and IPTG at the indicated time (black arrow), and their growth capacity was followed by OD_{600nm} measurement for 3 hours.

Results shown are a representative example of three independent biological replicates.

The means and the deviations of the technical duplicates from each condition are shown on the viability (1b) and growth (1c) curves.

vapC10 induced nodules have an improved nitrogen fixation capacity.

To determine the role of the VapC10 toxin, a *S. meliloti vapC10* mutant was constructed (see Methods section). In free-living condition, no growth defect of this mutant compared to the wild-type strain is observed (Supplementary Fig. 5), indicating that the toxin VapC10 is not essential for *S. meliloti* in the experimental condition used. Then, to appreciate the role of the toxin VapC10 during plant interaction, *M. truncatula* plantlets were infected with the wild-type or *vapC10* mutant strains and symbiotic parameters were analyzed at 3 and 6 wpi (Fig. 2). These two time points post-infection have been retained as, in wild-type induced-nodules, they correspond to the optimum of nitrogen fixation capacity, and to the nodule senescence onset, respectively (Fig. 2a). *M. truncatula* inoculated with the wild-type or the *vapC10* mutant strains have aerial plant parts of similar weight and length (Fig. 2b, c and Supplementary Fig. 6a), meaning that a defect in the VapC10 toxin does not impact plant yield. This indicates adequate availability of nitrogen for plant growth in both conditions. In agreement, the nitrogen fixation capacity per plant infected by wild-type or *vapC10* strains is similar (Fig. 2d) and is increased between 3 and 6 wpi for both strains infecting plants. For wild-type infected plants, this can be explained by a higher number of nodules per plant (Fig. 2e), due to bacterial reinfection in response to nitrogen host demand. This is not the case for *vapC10* infected plants since, at 3 and 6 wpi, the number of *vapC10* nodules per plant was significantly reduced (18.4% and 25% lower, respectively) compared to wild-type infected plants (Fig. 2e). Knowing that *vapC10* nodules are not bigger than wild-type ones (Supplementary Fig. 6b), this suggests that they are more efficient to fix nitrogen. Indeed, while a 30% decrease of the nitrogen fixation capacity per mg of nodules is observed with wild-type infected-plants between 3 and 6 wpi, due to natural nodule senescence, *vapC10*-induced nodules do not significantly lose this capacity (Fig. 2f).

Taken together, these results show that less *vapC10* induced nodules contribute to the same (3 wpi) or to a better nitrogen fixation capacity (6 wpi) than wild-type induced nodules. This suggests that the symbiotic interaction is more performant and/or lasts longer in the absence of a functional VapC10 toxin.

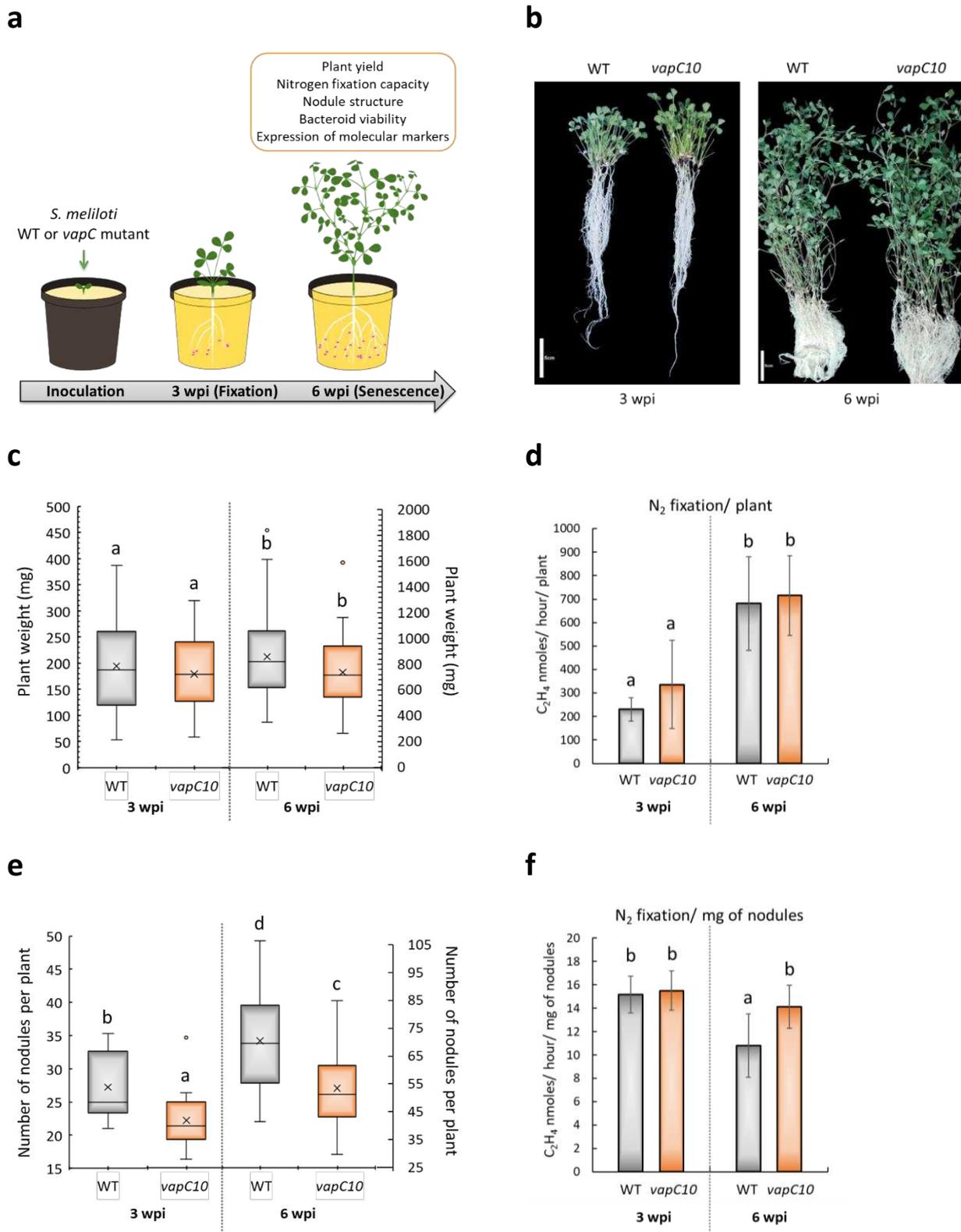


Figure 2. Symbiotic phenotype of *vapC10*-induced nodules. *M. truncatula* plants were inoculated with the wild-type or the *vapC10* mutant strains of *S. meliloti*, and the symbiotic phenotypes were analyzed at 3- and 6-weeks post-inoculation (wpi). (a) Schematic representation of the experimental procedure and symbiotic

parameters analyzed in this study. (b) Phenotype of wild-type and *vapC10* mutant infected plants. 15 plants inoculated with wild-type (left) or *vapC10* (right) strains at 3 wpi and 6 wpi are shown Scale bar= 5 mm. (c) Aerial plant yield (mg/plant) measured at 3 and 6 wpi, (N=3, n=15). (d) Nitrogenase activity per plant determined by acetylene reduction assay (ARA) at 3 and 6 wpi, (N=3; n=5). The nitrogenase activity is expressed in C₂H₄ nmoles produced per hour and per plant. Each measure was realized on a three-plants pool. (e) Number of nodules per plant at 3- and 6-wpi, (N=3; n=5). Each measure was realized on a three-plants pool and then reported by plant. (f) Nitrogenase activity per mg of nodules determined by acetylene reduction assay (ARA) at 3 and 6 wpi, (N=3; n=5). The nitrogenase activity is expressed in C₂H₄ nmoles produced per hour and per mg of nodules.

The nomenclature (N=x) refers to the number of biological replicates and (n=x) refers to the number of measures obtained per replicate. The significance of differences in the plant weight, the N₂ fixation/plant and the N₂ fixation /mg of nodules measurements was estimated by one-way analysis of variance (ANOVA). A post hoc Tukey's test was applied for pairwise comparisons. The significance of differences in the nodule number was tested by generalized linear model, with a Poisson distribution of data. The p-values were adjusted with the Bonferroni method. The bars of standard deviation followed by a same letter did not differ significantly. For more details see Methods section and Supplementary Table S6.

vapC10 mutant induce delayed senescent nodules with increased bacteroid viability

To determine if the phenotype of *vapC10* nodules observed at 6 wpi (less nodules but more efficient) was due to an extended fixation zone and/or to a delayed senescence onset, cellular and molecular approaches have been used, as depicted in Fig 2a. First, a macroscopic observation has been realized to compare the proportion of fixing- and senescent nodules, and in these latter, the proportion of fixation and senescence zones, has been measured and compared between wild-type and *vapC10* induced nodules (Fig. 3 and Supplementary Fig. 7). The fixing non-senescent zone of nodules have a characteristic pink color due to the presence of functional leghemoglobin, whereas in old nodules, the degradation of leghemoglobin confers a green color to the senescent zone IV (Fig. 3a). The *vapC10* mutant strain induced significantly less senescent nodules (67%) than those induced by the wild-type strain (90%) (Fig. 3b, Supplementary Fig 7a). Moreover, in senescent nodules, the average percentage of senescent zone is also significantly lower in *vapC10* induced nodules (18% compared to 27% of senescence in wild-type induced nodules) (Fig. 3a and Supplementary Fig. 7a). This is corroborated by microscopic observation of the basal part of the nodules by the BABB clearing technic, which allows a qualitative estimation of cell density by autofluorescence (Fig. 3f). Non-senescent *vapC10* nodules harbor dense infected cells (F), typical to a fixation zone III, whereas in the senescent nodules, induced by wild-type or *vapC10* strains, the senescence zone is characterized by empty cells (E) (Fig. 3f). As the nodule average length is similar between wild-type and *vapC10* induced nodules (Fig 3c and Supplementary Fig 7a), the lengths of fixation and senescence zones were compared (Fig 3d,e and Supplementary Fig. 7a). The *vapC10*-induced nodules harbor a longer fixation zone, and therefore, a lower senescence zone than wild-type induced nodules. This is consistent with the enrichment in low percentage of senescence in *vapC10*-induced senescent nodules (Supplementary Fig. 7b).

These results demonstrate that *vapC10* mutant strain induces delayed senescent nodules. Thus, the consequences of the *vapC10* mutation on the viability of differentiated bacteroids was examined by *in situ* Live/Dead staining (Haag et al., 2011): living cells were stained by the green fluorescent dye SYTO9, whereas dying cells, due to their altered membrane permeability, were stained by the red fluorescent dye PI. The results show that living green-labelled cells were detected in the infection zone II and fixation zone III of all type of nodules (Fig. 4a). In the basal zone of the nodules, only wild-type nodules and *vapC10* nodules with sign of senescence contain read-dye cells in the senescent zone IV, while the corresponding zone of non-senescent *vapC10* nodules is still full of living green-labelled bacteroids in the host infected cells (Fig. 4a,b). Another feature of wild-type senescence zone is the presence of empty spaces, due to advanced degradation of symbiotic cells (dotted arrow, Fig. 4b).

Taken together, these results strongly suggest that the absence of the functional VapC10 toxin improves the bacteroid fitness and nitrogen-fixing capacity associated to a delay in the senescence onset. However, one cannot exclude that the efficiency of bacterial release from infection threads in plant cells of the infection zone II_d and/or their subsequent capacity to divide in the symbiotic structure, before bacteroid differentiation in the zone II_p, is also improved with the *vapC10* mutant. This would result in nodules containing more infected cells and/or more symbiosomes per infected plant cells.

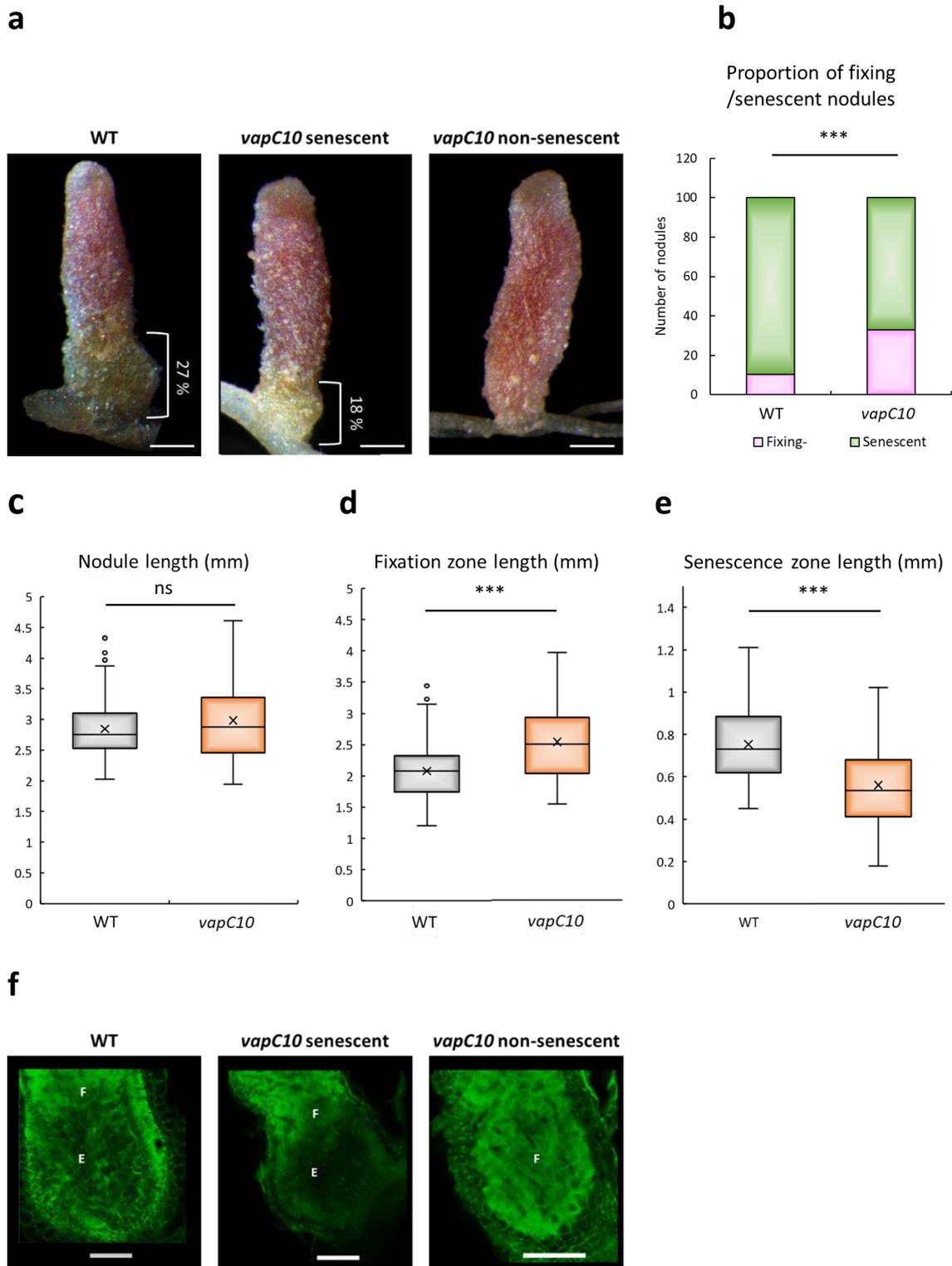


Figure 3. *vapC10* induced nodules are delayed senescent.

Wild-type (left) and *vapC10* (middle and right) induced nodules were harvested at 6 wpi. Representative nodules induced by wild-type or *vapC10* strains (senescent or non-senescent) are shown. (a) Macroscopic observation of nodules. The indicated percentage correspond to the relative size of the senescence zone compared to the nodule full length. (b) Percentage of fixing- (pink) and senescent nodules (green). (c-e) Comparison of (c) nodule length, (d) fixation zone length and (e) senescence zone length between wild-type and *vapC10* induced nodules. (f) Observation of nodules cleared by BABB technique. The closest part to the root was observed by autofluorescence (10 x). E : empty space, F : fixing-cells.

(a-e) Observations and measures were realized on binocular magnifier (Leica MZFLIII, 0.8X) and treated on Axiovision LE software. (f) Observations were realized on ZEISS LSM confocal microscope (objective 10x). Datas correspond to three biological replicates. Scale bars: (a) 500 μm , (f) 200 μm .

The significance of differences between the fixing- and the senescent nodule number was tested by generalized linear model, with a binomial distribution of data. The significance of differences in the nodule length, fixation and senescence zones length, was tested by a Wilcoxon test. The representation of p-values is as follow: ns, non significant, $* < 0.05$, $** < 0.01$, $*** < 0.001$. For more details see material and methods section and Supplementary Fig. 7.

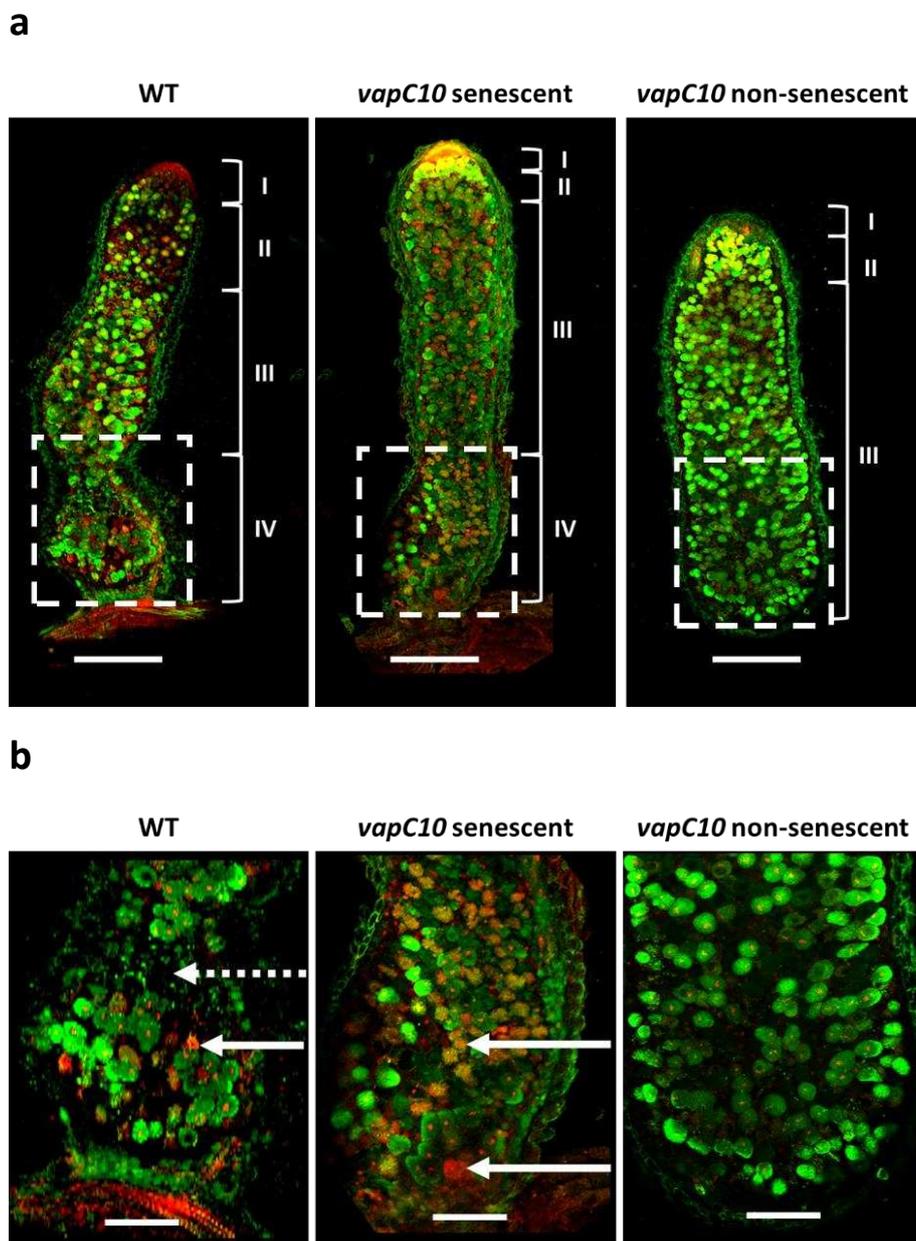


Figure 4. *vapC10* improved bacteroid viability.

Wild-type (WT) (left) and *vapC10* (middle and right) induced nodules were harvested at 6 wpi. Representative nodules induced by wild-type or *vapC10* strains (senescent or non-senescent) are shown. **(a)** **(b)** Bacteroid viability in wild-type and *vapC10* induced nodules. Wild-type and *vapC10* mutant induced nodules (6 wpi) were cut in semi-thin longitudinal sections (120 μm), stained with live/dead fluorescent dyes (Live/Dead[®]BacLightTMprobe, Invitrogen) and observed by confocal microscopy. Bacteroids are green if alive and red if dead. I : meristematic zone, II : infection zone, III : fixation zone, IV : senescence zone. A zoom of the nodule section (dotted framed) was added below the longitudinal cut of each condition. The full arrow shows dead cells and the dotted arrow shows empty cellular spaces.

(a-b) Observations were realized on ZEISS LSM confocal microscope (objective 10x). Scale bars: **(a)** 500 μm **(b)** 200 μm . This experiment was repeated on three biological replicates and one representative result is shown.

The protease plant senescent genes are poorly expressed in *vapC10* induced nodules

To precise the molecular mechanisms associated to the delayed symbiotic phenotype of *vapC10* nodules, the expression of fixation and senescence zone marker genes was realized by RTqPCR on 6 weeks-old nodules (Fig.4). In *M. truncatula*, Lb1 and NCR001 genes encoding leghemoglobin and an Nodule Cysteine-Rich peptide of unknown function, respectively, were selected as markers of the fixation zone III, and the cysteine protease (CP6) and vacuolar processing enzyme (VPE) genes as markers of the senescence zone IV. In *S. meliloti*, three different genes involved in synthesis and activity of the nitrogenase, *nifA*, *nifH*, *fixC*, each belonging to a different operon, were selected as markers of the fixation zone. Then, as bacterial markers are lacking for the senescence zone, the expression of genes differentially expressed in the nodule zones have been chosen: *ctrA*, involved in cell division and mainly expressed in the infection zone II; *rpoH1* involved in stress response whose expression is enhanced in the fixation zone III; and *hmp*, a flavohemoprotein involved in nitric oxide (NO) degradation, whose expression is low in young nodules but which might be stimulated by NO, which production increases in old nodules⁵³. The expression of these markers in the different zones of a young nodule are shown in the Supplementary Fig 8.

Considering plant markers, in *vapC10* nodules, a 1.5-fold decrease of the plant gene NCR001 expression and a significant 2-fold and 5-fold decrease for VPE and CP6 expression, respectively, are observed (Fig. 5a). Low expression of these two proteases confirm the delayed senescent phenotype observed for *vapC10* nodules. The NCR001 expression decrease observed could suggest that NCR defense is lower in mutant nodules. However, as more than 600 NCR peptides targeting the symbiosome are produced in *M. truncatula* nodules, investigation of the expression of other NCR genes should be realized to formally conclude. While mutant nodules have a better nitrogen fixation capacity than wild-type nodules, the expression of *nifA*, *nifH*, *fixC* is not significantly different (Fig. 5b), meaning that individual *vapC10* bacteroids do not fix better nitrogen than wild-type bacteroids. Thus, the increased fixing capacity per mg of nodules could rather be due to an increase of the number of fixing bacteroids per nodule or to the general improved bacteroid fitness observed. More generally, the relative expression of bacterial genes (*ctrA*, *hmp*, *rpoH1*) is similar in the two types of nodules, suggesting that the microenvironment perceived by *vapC10* and wild-type bacteria inside the nodules is not significantly different.

In conclusion, these results confirm that *vapC10* induced nodules are delayed senescent and that improved nitrogen fixation capacity is not linked to a more performant nitrogenase activity per bacteroid but rather to a higher bacteroid fitness and/or to a higher number of bacteroids/nodule.

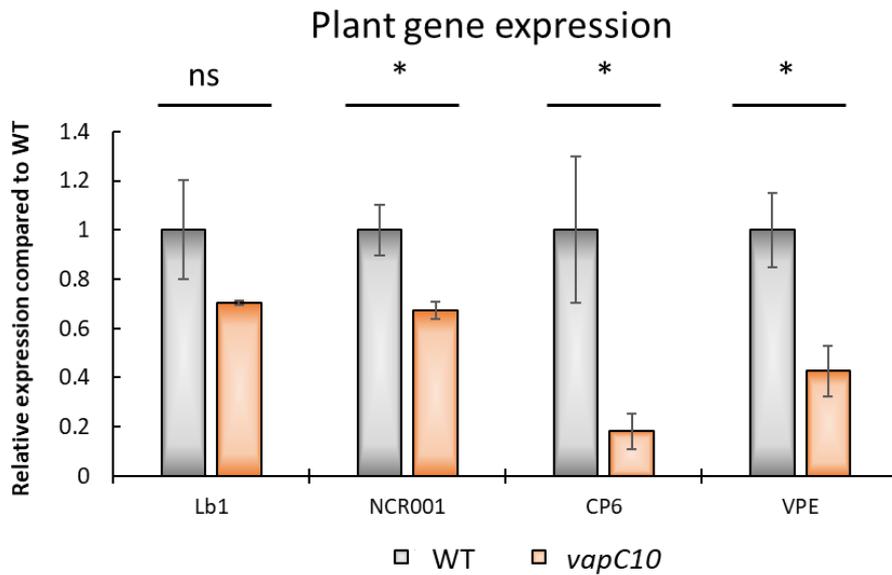
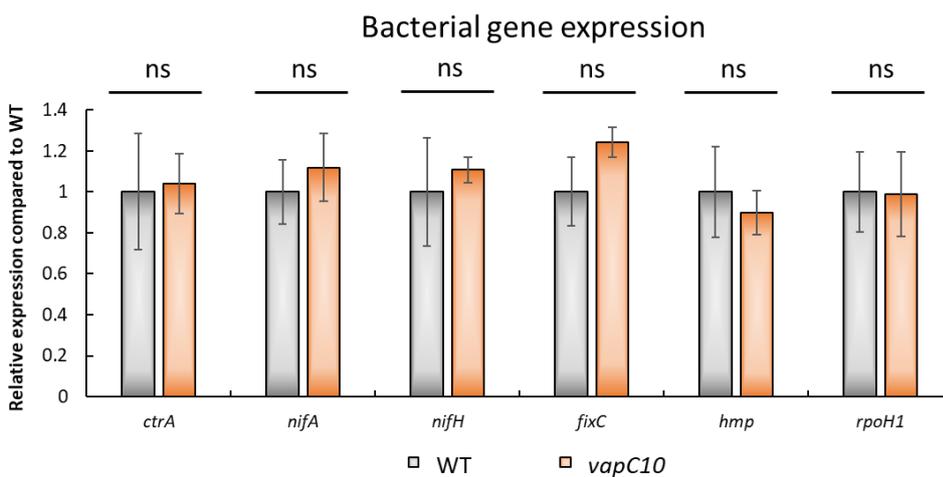
a**b**

Figure 5| Relative expression of fixation and senescence markers in *vapC10* induced nodules by RTqPCR at 6 wpi.

Nodules were harvested six-weeks post-inoculation (wpi). The gene expression is relative to the expression in the wild-type induced nodules. Error bars indicate the standard error of four biological replicates. **(a)** Relative expression of plant gene selected markers. Leghemoglobin (Lb1), Nodule cystein-rich peptide 001 (NCR001), Cystein Protease 6 (CP6), Vacuolar Processing Enzyme (VPE). **(b)** Relative expression of bacterial gene selected markers. Cell cycle transcriptional regulator (*ctrA*), Nitrogenase transcriptional activator (*nifA*), Nitrogenase iron protein (*nifH*), FixC oxidoreductase (*fixC*), Flavohemoprotein (*hmp*), RNA polymerase sigma factor (*rpoH1*). Statistical analysis was performed by a t-test and representation of p-values is as follow : ns, non significant, * <0.05 .

VapC10 cleaves the anticodon loop of two tRNA^{Ser} in *E. coli*

Knowing that VapC toxins are PIN domain proteins with a site-specific RNase activity, the target(s) of the VapC10 toxin have been identified using the MORE RNA-seq method adapted from Schifano et al.⁴⁹ with minor modifications (Supplementary Fig. 1). *E. coli* BW25113Δ6 strain, deleted in the six type II toxin-antitoxin systems, was transformed with pBAD24-empty (Control) and pBAD24-*vapC10* plasmids. After induction of the VapC10 toxin gene by L-arabinose, total RNA was extracted, 5'-OH and 5' monophosphate RNA selected and used to generate cDNA libraries for the single-end 5' RNA-sequencing. The statistical analysis (see Methods section) allowed to identify three VapC10 targets where a high number of 5' read ends, signature of cleavage, are piled precisely on a single nucleotide in *Vapc10* while not in the control (Fig. 6ab). Accurate analysis of the 5'-ends generated showed that VapC10 specifically cleaves two tRNA^{Ser}, the tRNA^{Ser(GGA)} and the tRNA^{Ser(UGA)}, specified by *serW/serX* (two identical copies of the same gene) and *serT* genes of *E. coli*, respectively, in their anticodon loop at the GG^AAA and UG^AAA sites (Fig. 6cd). No VapC10 induced degradation was observed in the two others tRNA^{Ser} of *E. coli*, tRNA^{Ser(GCA)} and tRNA^{Ser(GCU)} specified by *serU* and *serV*, respectively.

To identify if homologues of tRNA^{Ser(GGA)} and tRNA^{Ser(UGA)} of *E. coli*, from *serX* (copy of *serW*) and *serT* genes, respectively, were present in the repertoire of the 55 tRNAs deduced from the *S. meliloti* 2011 genome, the LocaRNA software, which accounts both for sequence and structure similarity, was used (see Methods). SMc02915, SMc03779, SMc01243 and SMc02409 genes of *S. meliloti*, involved in the synthesis of the four tRNA^{Ser} able to decode the six serine codons, share the best scores of homologies with the *E. coli* tRNA^{Ser} from *serT* and *serX*. However, based on the sequence of the anticodon loop, site of the specific VapC10 tRNA cleavage, and on the predicted secondary structure of tRNAs, only the tRNA^{Ser} deduced from SMc02915 and SMc01243 genes were relevant (Fig. 7). In fact, tRNA^{Ser} transcribed by SMc03779 and SMc02409 genes are closer to the tRNA^{Ser(GCA)} (*serU*) and tRNA^{Ser(GCU)} (*serV*) of *E. coli* which are not cleaved by VapC10 in the MORE-RNAseq experiment (Fig. 7a).

Taken together, these results demonstrate that VapC10 specifically cleaves two tRNA^{Ser} in *E. coli* and probably recognized their tRNA^{Ser} homologues specified by SMc02915 and SMc01243 in *S. meliloti*, but this remains to be experimentally demonstrated.

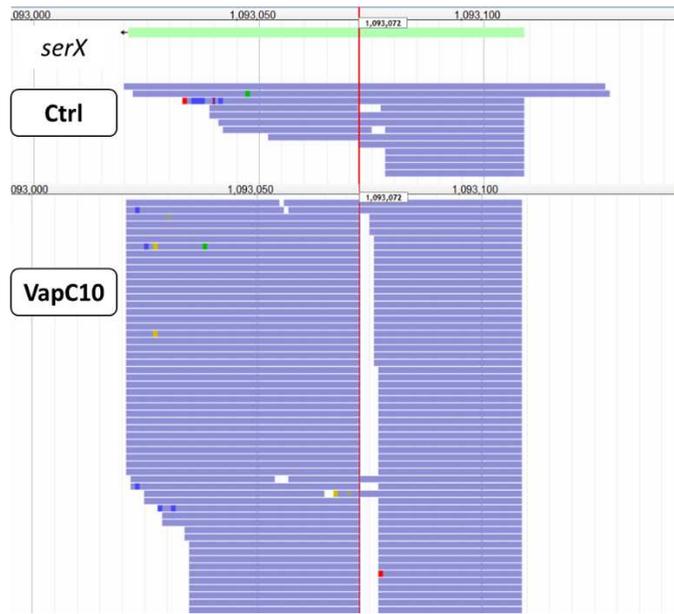
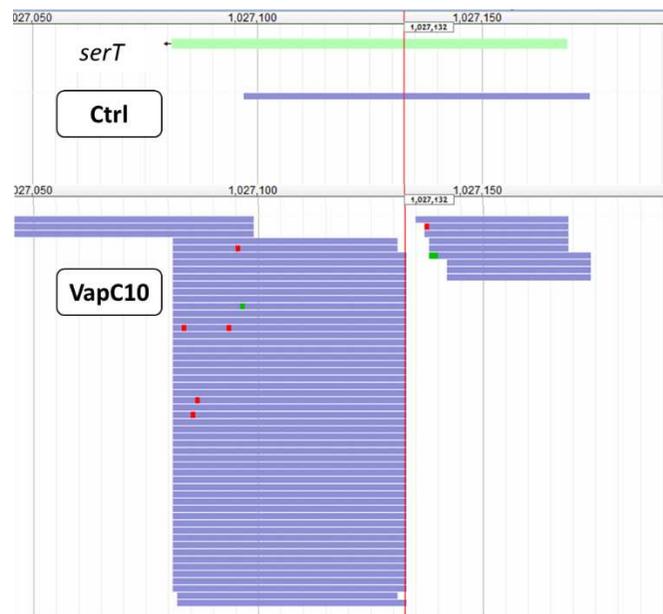
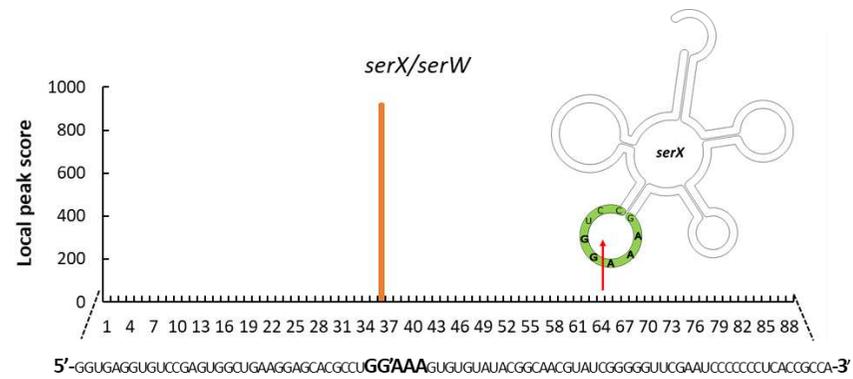
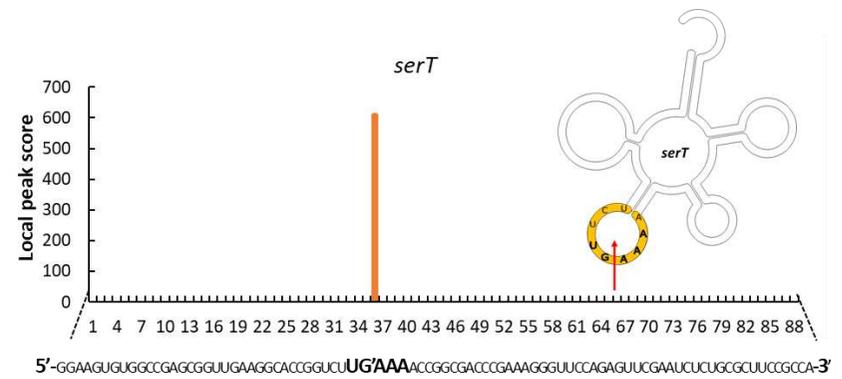
a**b****c****d**

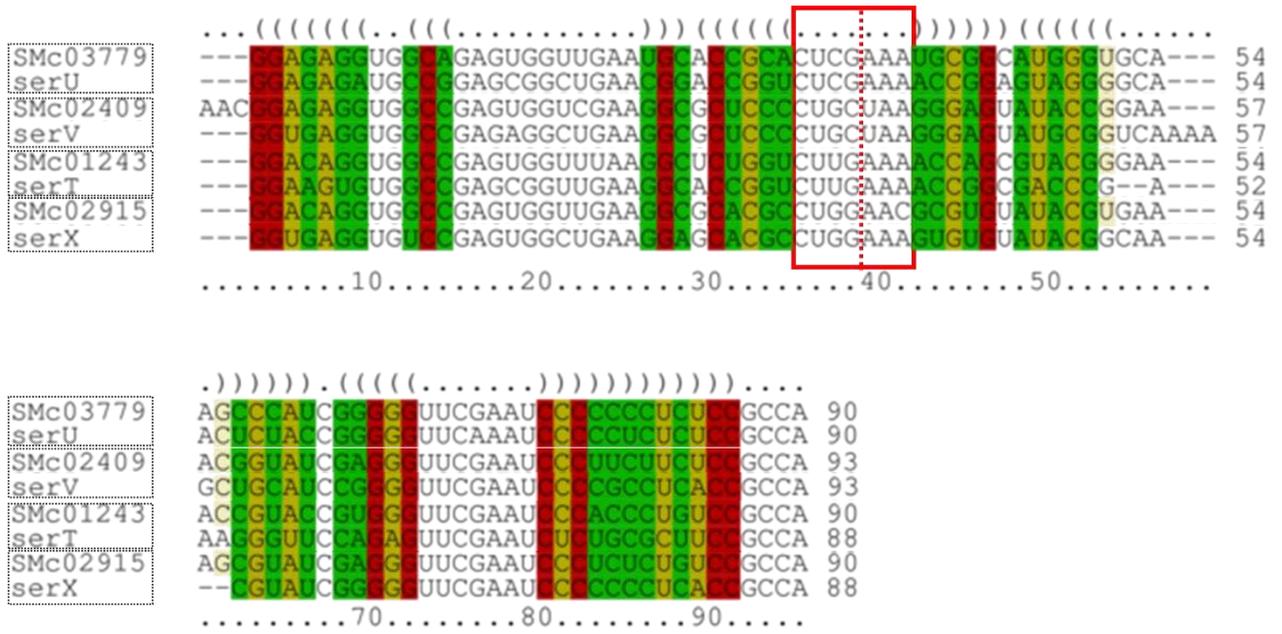
Figure 6 | VapC10 cleaves tRNASer^{GGA} and tRNASer^{UGA} in the (G/U)G'AAA anticodon site in *E. coli*.

E. coli BW25113Δ6 carrying pBAD24-empty (Ctrl) and pBAD24-*vapC10* (VapC10) was grown until OD_{600nm}=0.4, and then, L-arabinose (1%) was added to induce VapC10 production for 30 min. Total RNA was extracted and subjected to a MORE RNA-seq (Mapping by Overexpression of an RNase in *E. coli*) technic, which allows the identification of VapC10 toxin target (for more details see Mat&Meth section).

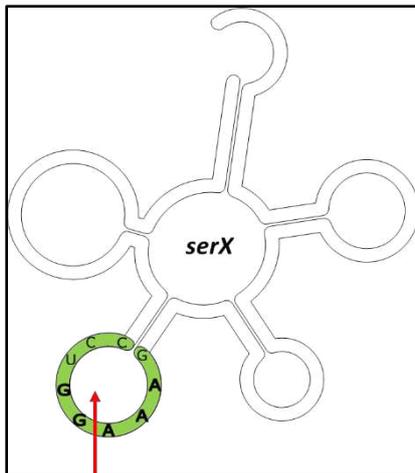
(a-b) Alignment profiles of the mapped reads visualized on myGenomeBrowser. The examples correspond to one replicate obtained for the control, Ctrl (empty plasmid), and for the toxin VapC10., on the *serX* **(a)** and the *serT* **(b)** genes. Red line marks the 1'093'072 nucleotidic position of *serX* gene (a) and the 1'027'132 nucleotidic position of *serT* gene (represented by the green arrow on the right of the gene name), targeted by VapC10 toxin., observed within myGenomeBrowser. The red line shows the cleavage nucleotidic position of VapC10 in the genic sequence

(c-d) Local peak score in the *serX/serW* and *serT* sequence. The local peak score was estimated from the enrichment of reads at a nucleotidic position compared to the ten previous positions and after the VapC10 toxin induction (for more details see Methods section). The sequence of each gene is represented below the graphs, from 5' to 3' and the cleavage site is in bold. The highest scores are found in the two copies of the genes specifying for **(c)** the tRNASer^{GGA} (*serX* and *serW* and another high score is found in the gene specifying for **(d)** tRNASer^{UGA} (*serT*).

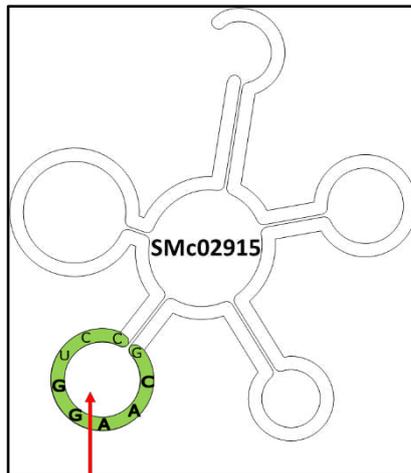
a



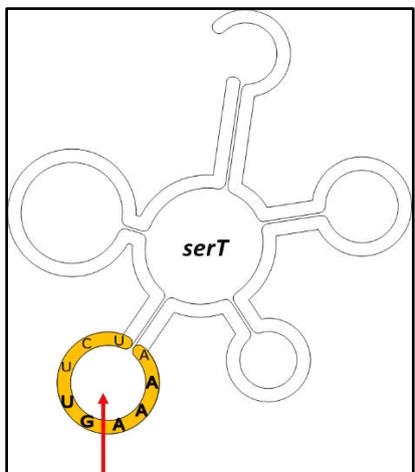
b



c



d



e

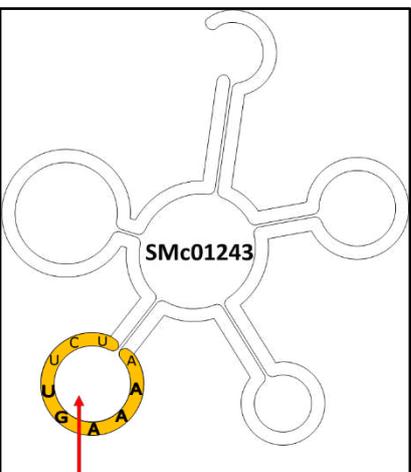


Figure 7 | SMc02915 and SMc01243 of *S. meliloti* are the best homologues of serX and serT of *E. coli* respectively.

A LocARNA analysis was performed on all genes of *S. meliloti* specifying tRNA. LocARNA is a webtool for multiple alignment of RNA molecules (Will et al., 2012). The best homologues found were genes transcribing tRNA^{Ser}. However, the genes SMc03779 and SMc2409 of *S. meliloti* differing in the anticodon loop, and more precisely in the cleavage site of those of *E. coli*, homologues of the non-cut tRNA specified by *serU* and *serV*, were not retained.

(a) LocaRNA alignment of gene sequences coding for tRNA^{Ser} from *E. coli* and *S. meliloti*. The consensus structure is presented as a string of dots (loop) and brackets (stem) on the top of the alignment. The difference of base pair type found only in stem parts of tRNA is highlighted in color as shown in the right bottom of the figure. Under the alignment, the coverage is proportional to the conservation of the base pair. The red line in the alignment represents the cleavage site of VapC10 toxin.

(b-e) Predicted structure of tRNA^{Ser} coded by *E. coli* (**b-c**) and best homologues in *S. meliloti* (**d-e**). The red arrow corresponds to the cleaving site of VapC10, in the anticodon loop.

Supplementary information

Supplementary Table 1 : Bacterial strains used in this study

Strains or Plasmids	Description	Reference
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	<i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20 φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK-mK+)</i>	Sambrook et al., 1989
BL21 (DE3) pLysS	<i>ompT gal dcm lon hsdSB(rB-mB-) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5]) [malB+]K-12(λS) pLysS[T7p20 orip15A], Cm^R</i>	Novagen
BW25113Δ6	<i>[lacIq rrnBT14 Δlac-ZWJ16 hsdR514 ΔaraBADAH33 ΔrhaBADLD78 ΔchpBIK ΔdinJ-yafQ ΔhipBA ΔmazEF ΔrelBE ΔyefM-yoeB]</i>	Prysak et al., 2009; Schifano et al., 2014
<i>Sinorhizobium meliloti</i>		
Sm2011	SU47 derivative, referred to wild-type or Sm2011, Sm ^R	Rosenberg et al., 1981
<i>vapC10</i>	Sm2011 derivative, containing pKmob19Ω2HMB plasmid insertion within <i>vapC10</i> gene, referred to as <i>vapC10</i> mutant, Sm ^R Neo ^R	This work

Supplementary Table 2: Plasmids used in this study.

Plasmids	Description	References
Cloning plasmids construction		
pJET1.2	Cloning vector, Amp ^R	ThermoFisher
pJET- <i>vapC10-Sm</i>	pJET1.2 derivative, containing a fragment of <i>vapC10</i> gene (from 7 th to 255 th nucleotidic position, on a total of 444 nucleotides)	This work
pJET- <i>vapC10-tox</i>	pJET1.2 derivative, containing <i>vapC10</i> gene	This work
pJET- <i>vapB10-tox</i>	pJET1.2 derivative, containing <i>vapB10</i> gene	This work
<i>S. meliloti</i> mutant construction		
pK19mob2ΩHMB	Suicide vector, Kan ^R /Neo ^R	43
pK19mob2ΩHMB- <i>vapC10</i>	pK19mob2ΩHMB derivative, containing a fragment of <i>vapC10</i> gene (from 7 th to 255 th nucleotidic position, on a total of 444 nucleotides)	This work
Expression of <i>vapC10</i> toxin and <i>vapB10</i> antitoxin in <i>E. coli</i>		
pBAD24	Expression vector, arabinose inducible promoter (pBAD), colE1 ori, Amp ^R	41
pBAD24- <i>vapC10</i>	pBAD24 derivative, containing <i>vapC10</i> gene	This work
pRSF1b	Expression vector, IPTG inducible promoter (T7), RSF 1030 ori, Kan ^R	Novagen
pRSF1b- <i>vapB10</i>	pRSF1b derivative, containing <i>vapB10</i> gene	This work

Supplementary Table 3: Primers used in this study for DNA cloning.

Gene	Gene ID	Primer name	Primer sequence	Final Plasmid
<i>Primers used for the vapC10 mutant construction</i>				
<i>vapC10</i>	SMc02987	VapC10-HindIII-pk19-F	5'-TGCA AaGCTt TTTCATTGACGCCTCGGTTAT-3'	pK19mob2ΩHMB
		VapC10-BsrGI-pk19-R	5'-C tgta cAATCATCGCTTCCTTGCAATC-3'	
<i>Primers used for toxicity and antitoxicity</i>				
<i>vapB10</i>	SMc02988	VapB10-BsaI-Tox-F	5'-CCTCGAAAGGA ggTctcGc ATG-3'	pRSF1b
		VapB10-XhoI-Tox-R	5'-GAATGGC ctCGAg AACCGAGG-3'	
<i>vapC10</i>	SMc02987	VapC10-BsaI-Tox-F	5'-TGTGGGGC GgTctCTc ATGCTGTTTCATTG-3'	pBAD24
		VapC10-SalI-Tox-R	5'-CAGGGTTTGGC GtGac TTCCGATAGACC-3'	

The restriction sites, in the primer sequences, are in bold and mismatches needed are in lower cases.

The T7 promoter sequence is underlined.

Supplementary Table 4: List of primers used for RTqPCR analysis.

Gene	Gene ID	Ref	Description	Primer sequence	Primer efficiency
Primers used for RTqPCR of plant gene normalization					
MTC27	Mtr.27459.1.S1_s_at	45	Housekeeping gene	F : 5'-GTGGGAGGTTGAGGGAAAGT-3' R : 5'-TTGAAGGTCCTTGAGCTTGC-3'	1.94
A38	Mtr.10324.1.S1_at	45	Housekeeping gene	F : 5'-TCGTGGTGGTGGTTATCAAA-3' R : 5'-TTCAGACCTTCCCATTGACA-3'	1.85
Primers used for RTqPCR of plant gene expression					
Leg	Mtr.27725.1.S1_s_at	57	Leghemoglobin 1	F : 5'- ATAGCTCATATGAGGCATTCAA-3' R : 5'- GAGTTGAGGACTATCTTGACT-3'	1.83
NCR001	Mtr.10380.1.S1_at	57	Nodule Cystein Rich peptide	F : 5'-CACTTCTGACGCTAACTG-3' R : 5'-TGAACCTTCAATATACCACC-3'	1.97
VPE	Mtr.29213.1.S1_s_at	58	Vacuolar Processing Enzyme	F : 5'-CCAGGGGTTCTTGGTATGCCCG-3' R : 5'-ACTGCCAGATTCACATGCCTCCA-3'	1.95
CP6	Mtr.45750.1.S1_at	58	Cysteine Protease	F : 5'-CCTGCTGCTACTATTGCTGGATATG-3' R : 5'-CACTCGCATCAATGGCTACGG-3'	1.86
Primers used for RTqPCR of bacterial gene normalization					
<i>betS</i>	Smb20333	59	Housekeeping gene	F : 5'-AAATCCACCATGCCAGTAG-3' R : 5'-CGTCCAGAACATCGGTCTCT-3'	1.96
16S	rRNA-16S	60	Housekeeping gene	F : 5'-GATAAGCCGAGAGGAAGGTG-3' R : 5'-GTGTAGCCAGCCCGTAAAG-3'	1.96
Primers used for RTqPCR of bacterial gene expression					
<i>ctrA</i>	Smc00654	61	Cell cycle transcriptional regulator	F : 5'-ATGCCAGTCGGTCATCTC-3' R : 5'-CTGGTATTCCTGCCCGTC-3'	2.03
<i>nifA</i>	Sma0815	62	Nitrogenase transcriptional activator	F : 5'-TCTTTGACCTGGCGAGAGTT-3' R : 5'-ACGGTCGTGATCTCCATTC-3'	1.95
<i>nifH</i>	SMA0825	62	Nitrogenase iron protein	F : 5'-GTTATCACCTCGATCAACTTCCT-3' R : 5'-CGATGTAGATTCCTGAGCCT-3'	2.25
<i>fixC</i>	Sma0817	62	FixC oxidoreductase	F : 5'-TGAAGGATGCGTGATTGAGG-3' R : 5'-TGGATTGAAGGGTGGCGT-3'	2.05
<i>hmp</i>	SMA1191	48	Flavoheмоprotein	F : 5'-CGCCTGTTCTTCAACCTG-3' R : 5'-GACGACCTTCTCCTCACTG-3'	2.08
<i>rpoH1</i>	SMc00646	63	RNA polymerase sigma factor RpoH	F : 5'-CGCCTGTTCTTCAACCTG-3' R : 5'-GACGACCTTCTCCTCACTG-3'	2.05
<i>vapB10</i>	SMc02988	This work	Antitoxin of VapBC10 system	F : 5'-CTTATCAGCCTGACCAAATCCA-3' R : 5'-TCTCGGACAGGAAGAACGG-3'	2.17

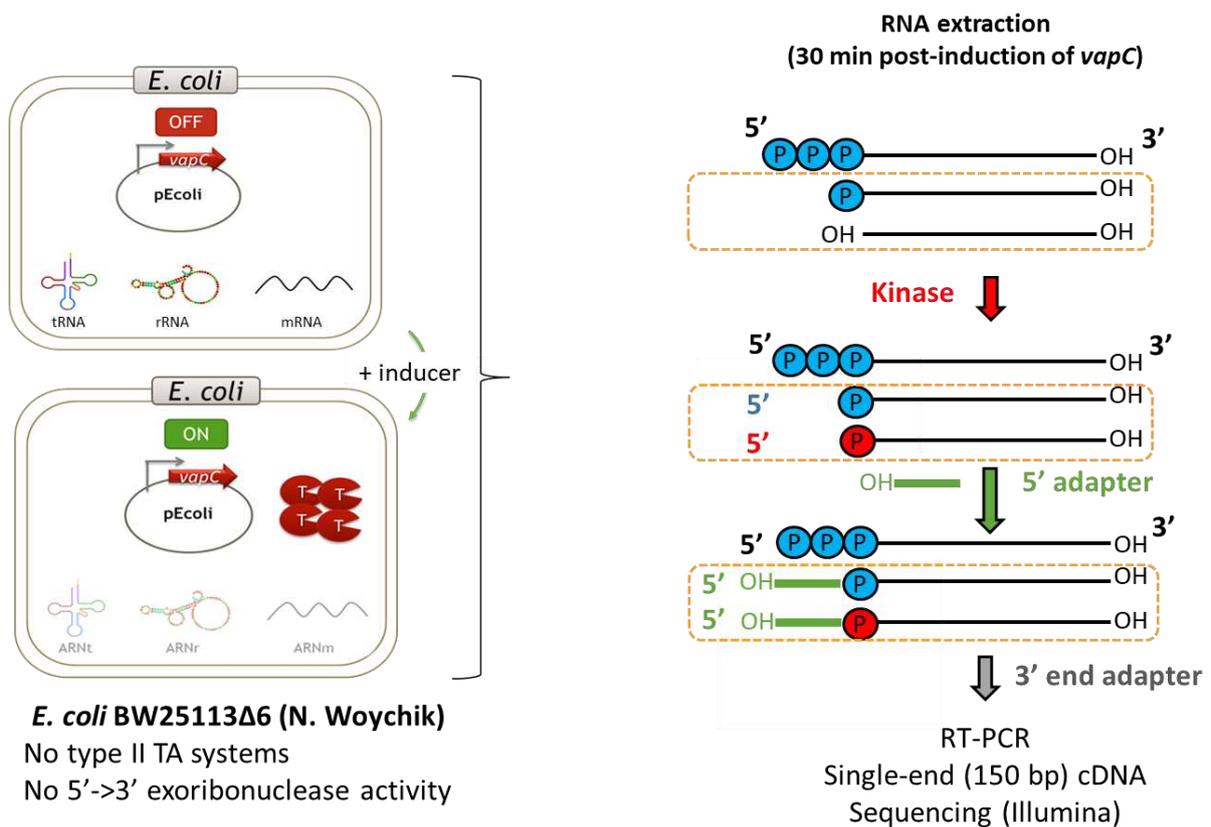
Supplementary Table 5 : Summary of sequencing read counts of each replicate obtained in the MORE RNA-seq analysis for the Control and the VapC10 induction condition.

<i>Biological replicate</i>	<i>Condition</i>	<i>Total raw reads</i>	<i>Total trimmed reads</i>	<i>Total mapped reads</i>	<i>rRNA %</i>	<i>non rRNA %</i>
1	pBAD24	18'768'230	9'326'821	7'554'725	71.32	28.68
	pBAD24- <i>vapC10</i>	20'727'253	10'548'784	8'781'863	71.63	28.37
2	pBAD24	19'231'192	10'959'367	9'614'653	76.52	23.48
	pBAD24- <i>vapC10</i>	15'285'300	9'244'037	8'321'482	77.1	22.9

Supplementary Table 6 : Summary of p-values obtained for the datas from the Fig2. about the phenotyping analyses of *vapC10* mutant

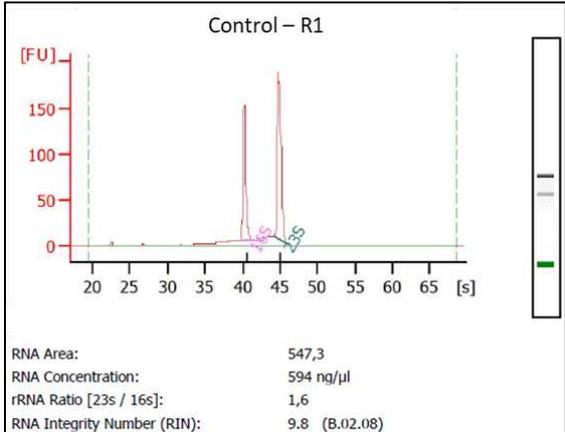
Compared conditions	N ₂ fixation / mg of nodules		N ₂ fixation / plant		Plant weight		Number of nodules per plant	
	<i>p</i> -value adjusted	Significance	<i>p</i> -value adjusted	Significance	<i>p</i> -value adjusted	Significance	<i>p</i> -value adjusted	Significance
<i>vapC10</i> 6 wpi - <i>vapC10</i> 3 wpi	4.93E-01	ns	1.06E-05	***	8.36E-14	***	8.88E-16	***
WT 3 wpi - <i>vapC10</i> 3 wpi	9.87E-01	ns	3.33E-01	ns	9.87E-01	ns	5.7784E-06	***
WT 6 wpi - <i>vapC10</i> 3 wpi	4.94E-05	***	1.28E-04	***	8.09E-14	***	8.88E-16	***
WT 3 wpi - <i>vapC10</i> 6 wpi	6.86E-01	ns	1.42E-08	***	8.72E-14	***	8.88E-16	***
WT 6 wpi - <i>vapC10</i> 6 wpi	5.42E-03	**	8.54E-01	ns	5.07E-02	ns	8.88E-16	***
WT 6 wpi -WT 3 wpi	1.19E-04	***	2.00E-07	***	8.09E-14	***	8.88E-16	***

Supplementary Figure 1. The MORE RNA-seq method applied to VapC10 toxin. Adapted from the MORE RNA-seq published by Schifano et al., 2014. The *E. coli* strain BW25113Δ6 was received from Nancy Woychik's lab. After transformation with pBAD24-*vapC10*, the induction by L-arabinose allows the VapC10 toxin production. After 30 minutes post-induction, total RNA was extracted and subjected to DNase and kinase treatment to keep only degraded RNAs (represented by the dotted orange rectangle). The 5'-OH ends of degraded RNAs were transformed into 5'-P ends by a kinase treatment. After, ligation of the 5' and 3'-adapter, the cDNA banks were prepared by RT-PCR and then subjected to a single-end (150 bp) Illumina sequencing, performed by Fasteris Platform, Switzerland (see Methods section for more details).

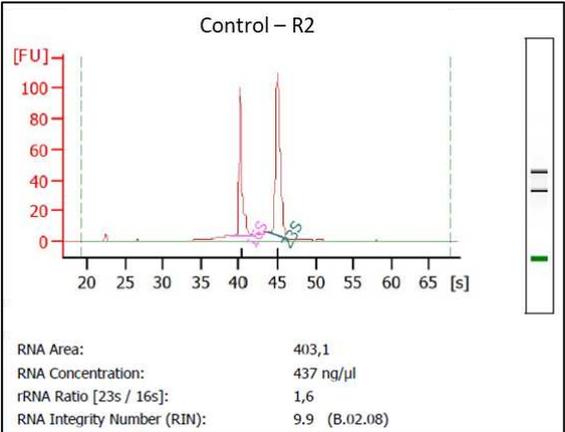


Supplementary Figure 2. Quality control of RNA extractions after DNase treatment measured within the Bioanalyzer.

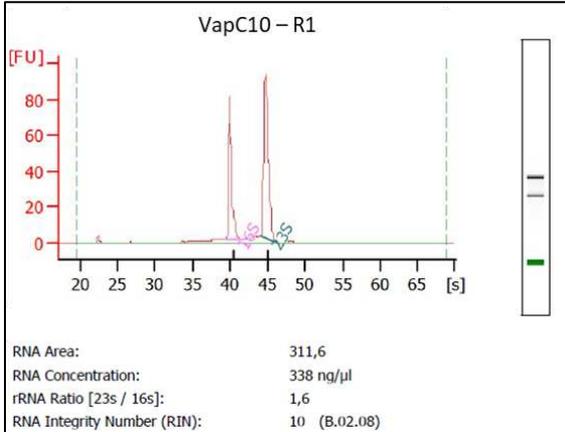
a



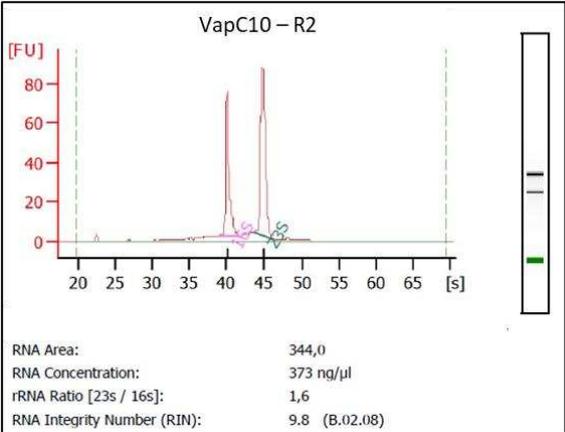
b



c

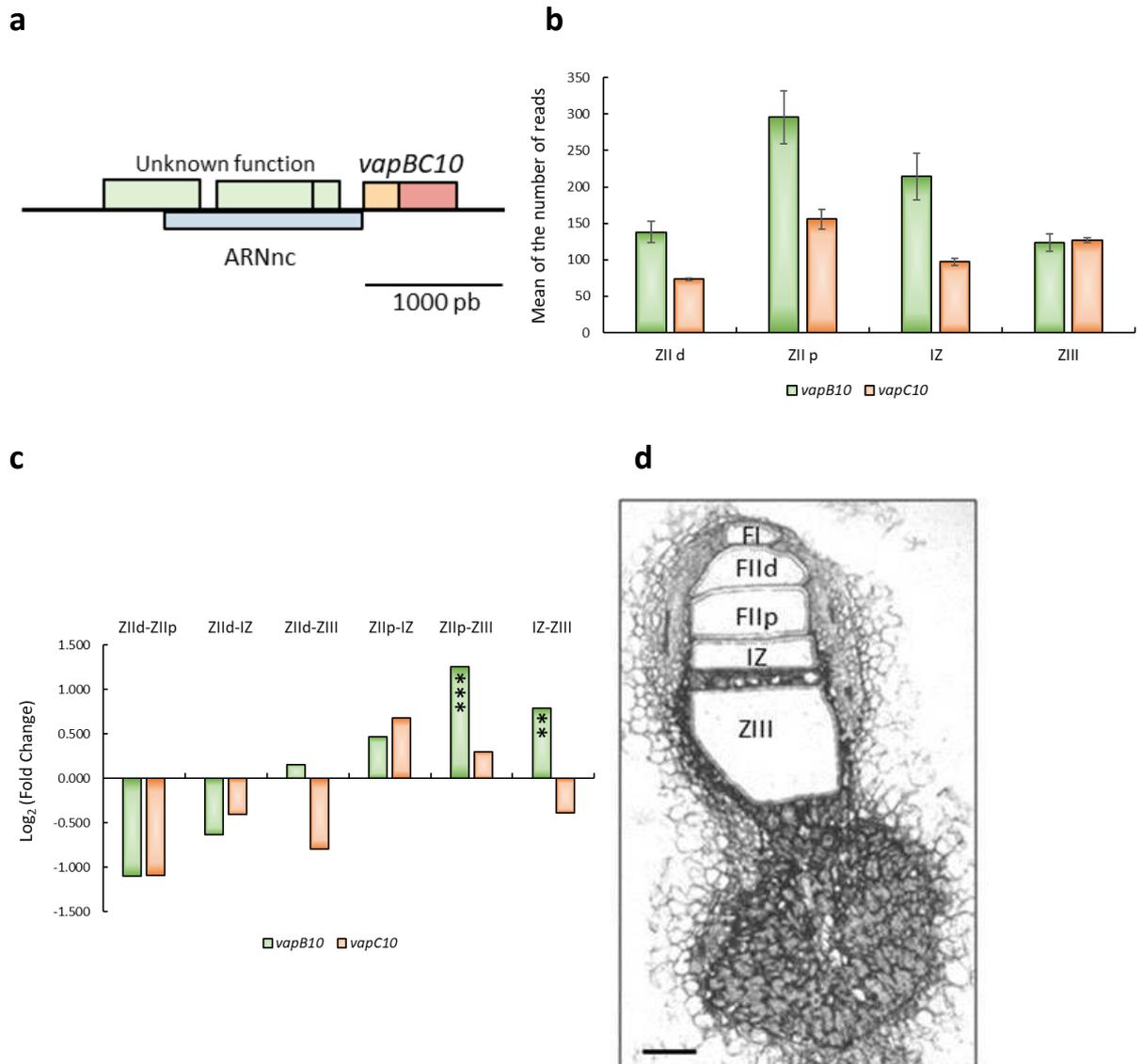


d



Results obtained for the two biological replicates of the control condition(**a-b**) or the VapC10 condition (**c-d**)..

Supplementary Figure 3. The *S. meliloti vapBC10* genic environment and its expression within the nodules during the symbiosis with *M. truncatula*.

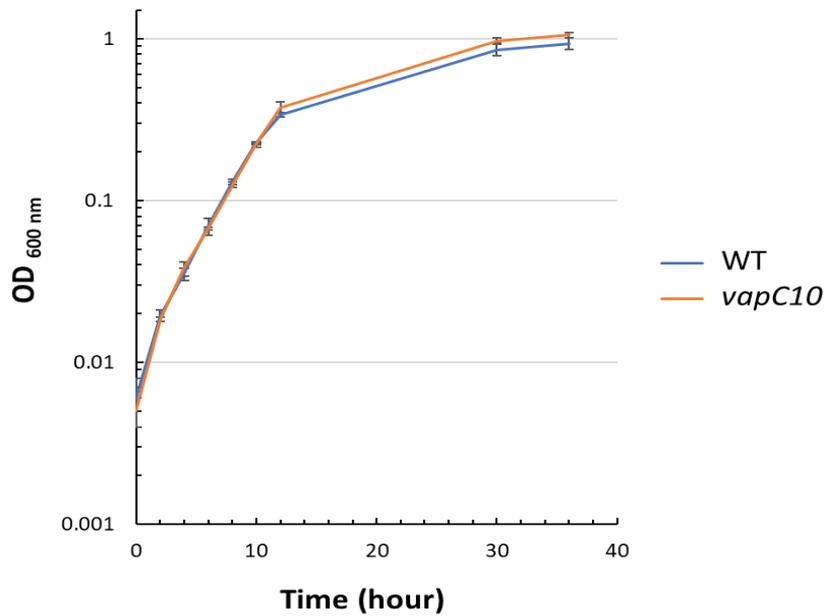


(a) Representation of *vapBC10* genic environment. The operon is located on the positive strand and is below three genes coding for unknown function proteins and, on the negative strand, one long non-coding RNA. Scale bar: 1'000 bp.

(b-d) The data (deseq-normalized RNA-seq reads) and the FoldChange, were obtained from the study of Roux *et al.* (2014). **(b-c)** *vapBC10* expression of *S. meliloti* strain 2011 in the different zones of young induced nodules (15 dpi) of *M. truncatula*. **(b)** Mean of deseq-normalized RNA-seq reads of *vapB10* and *vapC10* genes. The bars correspond to standard errors of three biological replicates. **(c)** Comparison of FoldChange expression of *vapB10* and *vapC10* genes relative to each zone. The FoldChange is expressed in Log₂. The asterisk correspond to p-value as follow : *<0.05, **<0.01, ***<0.001. **(d)** Position of the five zones used for RNA sequencing after laser-capture microdissection

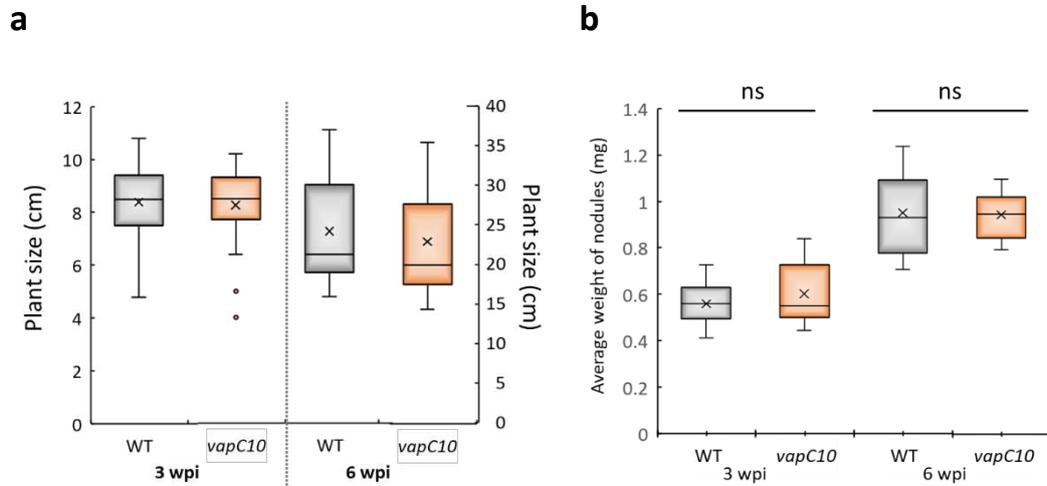
(picture from Symbimics, <https://iant.toulouse.inra.fr/symbimics/>). Legend : ZIIId, distal infection zone II; ZIIp, proximal infection zone II; IZ, interzone II-III; ZIII, fixation zone III.

Supplementary Figure 5. Bacterial growth kinetics of wild-type and *vapC10* strains.



The culture of the wild-type and *vapC10* mutant strains was performed in rich medium (LB_{MC}) at 30°C and growth was followed by OD_{600nm} measurements for 35 hours. Results shown are a representative example of three independent biological replicates. The means and the deviations of the technical duplicates from each condition are shown on the growth curves.

Supplementary Figure 6. Plant size and average weight of nodules measured in the wild-type and the *vapC10* mutant interaction with *M. truncatula* at 3 and 6 wpi.



M. truncatula plants were inoculated with the wild-type or the *vapC10* mutant strains of *S. meliloti*, and the symbiotic phenotypes were analyzed at 3- and 6-weeks post-inoculation (wpi). **(a)** Aerial plant size (cm) measured at 3 and 6 wpi, (N=3, n=15). **(b)** Average weight of nodules per plant at 3- and 6-wpi, (N=3; n=5). Each measure was realized on a three-plants pool and then reported by plant.

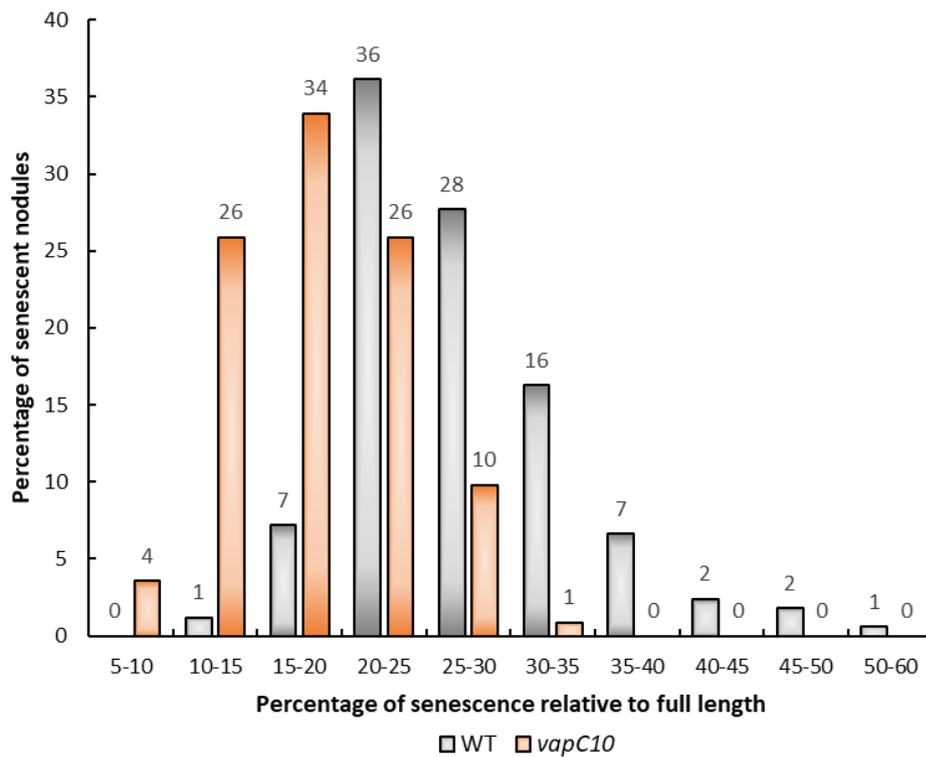
The nomenclature (N=x) refers to the number of biological replicates and (n=x) refers to the number of measures obtained per replicate. The significance of differences in the plant size and the average weight of nodules was estimated by one-way analysis of variance (ANOVA). A post hoc Tukey's test was applied for pairwise comparisons. The bars of standard deviation followed by a same letter did not differ significantly. For more details see material and methods section and Supplementary Table SX

Supplementary Figure 7. *vapC10* induces less senescent nodules and delays senescence.

a

Parameters analyzed	Wild-type	<i>vapC10</i>	Test	p-value
Total number of nodules	185	167	NA	NA
Number of non-senescent nodules	19	55	χ^2 binomial	9.887e-08 ***
Number of senescent nodules	166	112		
Percentage of senescent nodules	89.7%	67.1%		
Average length of nodule (mm)	2.85 ± 0.46	2.99 ± 0.62	Wilcoxon	0.07077, ns
Average length of fixation zone (mm)	2.08 ± 0.33	2.53 ± 0.45	Wilcoxon	4.458e-11 ***
Average length of senescence zone (mm)	0.75 ± 0.14	0.56 ± 0.15	Wilcoxon	1.894e-14 ***
Average percentage of senescence in senescent nodules	27.15 ± 6.79	18.21 ± 5.00	Wilcoxon	2.2e-16 ***

b



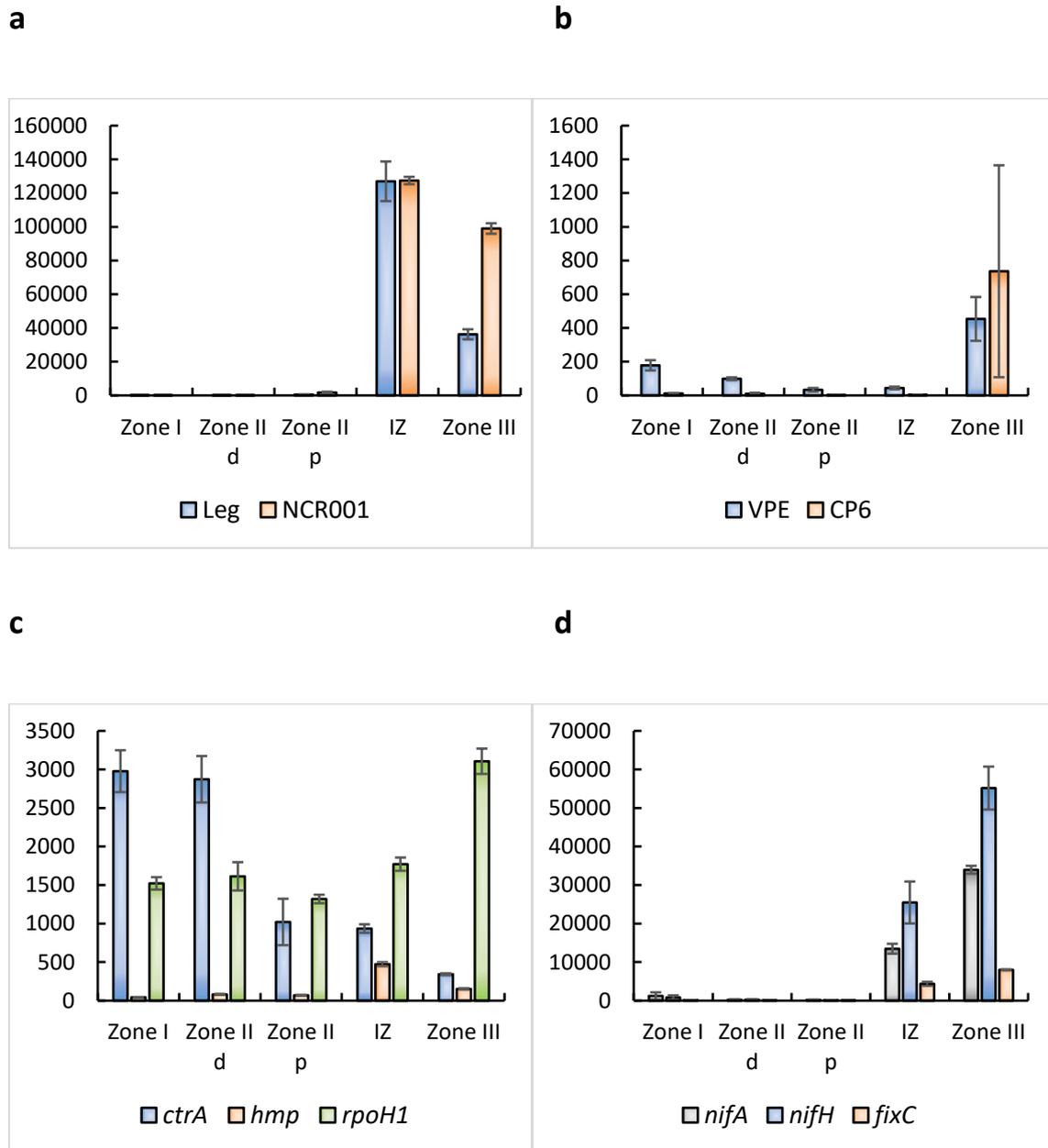
Wild-type (WT) and *vapC10*- induced nodules were harvested at 6 wpi. (a) Summary of the analysis of nodules senescence of *M. truncatula* induced by the wild-type or *vapC10* mutant strains at 6 wpi. (b) Percentage of nodules included in each category of relative proportion of the senescence zone, compared to the nodule full length.

The estimation of fixing- and senescent zones and nodules was based on macroscopic observation of their color. Pink : fixing zone/nodule , Green : senescent zone/nodule. The mean and standard deviation of nodule, fixation and senescence zones lengths were calculated for the wild-type and the *vapC10* induced nodules. The indicated percentages correspond to the relative proportion of senescent nodules compared to the total number of analyzed nodules and to the relative size of the senescence zone compared to the nodule full length.

Measures were realized on binocular magnifier (Leica MZFLIII, 0.8X) and treated on Axiovision LE software. Datas correspond to three biological replicates.

The significance of differences between the fixing- and the senescent nodule number was tested by generalized linear model, with a binomial distribution of datas. The significance of differences in the nodule, fixation and senescence zones length and the average percentage of senescence in senescent nodules was tested by a Wilcoxon test. The representation of p-values is as follow: ns, non significant, * <0.05 , ** <0.01 , *** <0.001 . For more details see material and methods section.

Supplementary Figure 8. Markers gene expression in young nodules.



The data (deseq-normalized RNA-seq reads) and the FoldChange, were obtained from the study of Roux *et al.* (2014). **(a-d)** Markers gene expression of *S. meliloti* strain 2011 in the different zones of young induced-nodules (15 dpi) of *M. truncatula*. Mean of deseq-normalized RNA-seq reads of **(a-b)** plant markers genes and **(c-d)** bacterial markers genes. The bars correspond to standard errors of three biological replicates. Legend : ZII d, distal infection zone II; ZII p, proximal infection zone II; IZ, interzone II-III; ZIII, fixation zone III. Leghemoglobin (Lb1), Nodule cystein-rich peptide 001 (NCR001), Cystein

Protease 6 (CP6), Vacuolar Processing Enzyme (VPE), Cell cycle transcriptional regulator (*ctrA*), Nitrogenase transcriptional activator (*nifA*), Nitrogenase iron protein (*nifH*), FixC oxidoreductase (*fixC*), Flavohemoprotein (*hmp*), RNA polymerase sigma factor (*rpoH1*).

References

1. Oldroyd, G. E. D. Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. (2013). doi:10.1038/nrmicro2990
2. Downie, J. A. *et al.* Legume nodulation. *Curr. Biol.* **24**, R184–R190 (2014).
3. Via, V. D., Zanetti, M. E. & Blanco, F. How legumes recognize rhizobia. *Plant Signal. Behav.* **11**, (2016).
4. Mergaert, P. *et al.* Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the Rhizobium-legume symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 5230–5235 (2006).
5. Kondorosi, E., Mergaert, P. & Kereszt, A. A Paradigm for endosymbiotic life: Cell differentiation of rhizobium bacteria provoked by host plant factors. *Annu. Rev. Microbiol.* **67**, 611–628 (2013).
6. Vinardell, J. M. *et al.* Endoreduplication mediated by the anaphase-promoting complex activator CCS52A is required for symbiotic cell differentiation in *Medicago truncatula* nodules. *Plant Cell* **15**, 2093–2105 (2003).
7. González-Sama, A. *et al.* Nuclear DNA endoreduplication and expression of the mitotic inhibitor Ccs52 associated to determinate and lupinoid nodule organogenesis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **19**, 173–180 (2006).
8. Gibson, K. E., Kobayashi, H. & Walker, G. C. Molecular determinants of a symbiotic chronic infection. *Annual Review of Genetics* **42**, 413–441 (2008).
9. Pierre, O. *et al.* Peribacteroid space acidification: a marker of mature bacteroid functioning in *Medicago truncatula* nodules. *Plant. Cell Environ.* **36**, 2059–70 (2013).
10. Van De Velde, W. *et al.* Aging in legume symbiosis. A molecular view on nodule senescence in *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.* **141**, 711–720 (2006).
11. Vasse, J., De Billy, F., Camut, S. & Truchet, G. Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules. *J. Bacteriol.* **172**, 4295–4306 (1990).
12. Harms, A., Brodersen, D. E., Mitarai, N. & Gerdes, K. Toxins, Targets, and Triggers: An Overview of Toxin-Antitoxin Biology. *Mol. Cell* **70**, 768–784 (2018).
13. Leplae, R. *et al.* Diversity of bacterial type II toxin-antitoxin systems: A comprehensive search and functional analysis of novel families. *Nucleic Acids Res.* **39**, 5513–5525 (2011).
14. Chan, W. T., Espinosa, M. & Yeo, C. C. Keeping the Wolves at Bay: Antitoxins of Prokaryotic Type II Toxin-Antitoxin Systems. *Front. Mol. Biosci.* **3**, 9 (2016).
15. Ramage, H. R., Connolly, L. E. & Cox, J. S. Comprehensive functional analysis of Mycobacterium tuberculosis toxin-antitoxin systems: implications for pathogenesis, stress responses, and evolution. *PLoS Genet.* **5**, e1000767 (2009).
16. Georgiades, K. & Raoult, D. Genomes of the most dangerous epidemic bacteria have a virulence repertoire characterized by fewer genes but more toxin-antitoxin modules. *PLoS One* **6**, e17962–e17962 (2011).
17. Hall, A. M., Gollan, B. & Helaine, S. Toxin–antitoxin systems: reversible toxicity. *Current Opinion in Microbiology* **36**, 102–110 (2017).

18. Page, R. & Peti, W. Toxin-antitoxin systems in bacterial growth arrest and persistence. *Nat. Chem. Biol.* **12**, 208–214 (2016).
19. Wang, X. & Wood, T. K. Toxin-Antitoxin Systems Influence Biofilm and Persister Cell Formation and the General Stress Response. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 5577–5583 (2011).
20. Lobato-Márquez, D., Díaz-Orejas, R. & García-del Portillo, F. Toxin-antitoxins and bacterial virulence. *FEMS Microbiol. Rev.* **40**, 592–609 (2016).
21. Cooper, C. R., Daugherty, A. J., Tachdjian, S., Blum, P. H. & Kelly, R. M. Role of vapBC toxin-antitoxin loci in the thermal stress response of *Sulfolobus solfataricus*. *Biochem. Soc. Trans.* **37**, 123–126 (2009).
22. Shidore, T. & Triplett, L. R. Toxin-Antitoxin Systems: Implications for Plant Disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* **55**, 161–179 (2017).
23. Martins, P. M. M., Merfa, M. V, Takita, M. A. & De Souza, A. A. Persistence in Phytopathogenic Bacteria: Do We Know Enough? *Front. Microbiol.* **9**, 1099 (2018).
24. Pandey, D. P. & Gerdes, K. Toxin-antitoxin loci are highly abundant in free-living but lost from host-associated prokaryotes. *Nucleic Acids Res.* **33**, 966–76 (2005).
25. Xie, Y. *et al.* TADB 2.0: an updated database of bacterial type II toxin-antitoxin loci. *Nucleic Acids Res.* **46**, D749–D753 (2018).
26. Audoly, G. *et al.* Effect of rickettsial toxin vapC on its eukaryotic host. *PLoS One* **6**, (2011).
27. Helaine, S. *et al.* Internalization of Salmonella by macrophages induces formation of nonreplicating persisters. *Science* **343**, 204–8 (2014).
28. Ren, D., Walker, A. N. & Daines, D. A. Toxin-antitoxin loci vapBC-1 and vapXD contribute to survival and virulence in nontypeable *Haemophilus influenzae*. *BMC Microbiol.* **12**, 1 (2012).
29. Masuda, H. & Inouye, M. Toxins of Prokaryotic Toxin-Antitoxin Systems with Sequence-Specific Endoribonuclease Activity. *Toxins (Basel)*. **9**, (2017).
30. Jurėnas, D. & Van Melderen, L. The Variety in the Common Theme of Translation Inhibition by Type II Toxin–Antitoxin Systems. *Frontiers in Genetics* **11**, 262 (2020).
31. Hayes, F. & Kędzierska, B. Regulating Toxin-Antitoxin Expression: Controlled Detonation of Intracellular Molecular Timebombs. *Toxins (Basel)*. **6**, 337–358 (2014).
32. Bendtsen, K. L. & Brodersen, D. E. Higher-order structure in bacterial vapBC toxin-antitoxin complexes. *Subcell. Biochem.* **83**, 381–412 (2017).
33. Ning, D. *et al.* Transcriptional and Proteolytic Regulation of the Toxin-Antitoxin Locus vapBC10 (ssr2962/slr1767) on the Chromosome of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *PLoS One* **8**, e80716 (2013).
34. Winther, K. S. & Gerdes, K. Regulation of enteric vapBC transcription: induction by VapC toxin dimer-breaking. *Nucleic Acids Res.* **40**, 4347–57 (2012).
35. Gerdes, K., Christensen, S. K. & Løbner-Olesen, A. Prokaryotic toxin–antitoxin stress response loci. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 371–382 (2005).
36. Oláh, B. *et al.* Mutation in the ntrR gene, a member of the vap gene family, increases the symbiotic efficiency of *Sinorhizobium meliloti*. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **14**, 887–94 (2001).

37. Bodogai, M. *et al.* The ntrPR operon of *Sinorhizobium meliloti* is organized and functions as a toxin-antitoxin module. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **19**, 811–22 (2006).
38. Lipuma, J. *et al.* A vapBC-type toxin-antitoxin module of *Sinorhizobium meliloti* influences symbiotic efficiency and nodule senescence of *Medicago sativa*. *Environ. Microbiol.* **16**, 3714–29 (2014).
39. Boisson-Dernier, A. *et al.* *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Medicago truncatula* for the study of nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **14**, 695–700 (2001).
40. Puppo, A., Dimitrijevic, L. & Rigaud, J. Possible involvement of nodule superoxide dismutase and catalase in leghemoglobin protection. *Planta* **156**, 374–379 (1982).
41. Guzman, L. M., Belin, D., Carson, M. J. & Beckwith, J. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J. Bacteriol.* **177**, 4121–30 (1995).
42. Inoue, H., Nojima, H. & Okayama, H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**, 23–8 (1990).
43. Luo, L. *et al.* Two new *Sinorhizobium meliloti* LysR-type transcriptional regulators required for nodulation. *J. Bacteriol.* **187**, 4562–72 (2005).
44. Hérouart, D. *et al.* Cloning and characterization of the katA gene of *Rhizobium meliloti* encoding a hydrogen peroxide-inducible catalase. *J. Bacteriol.* **178**, 6802–9 (1996).
45. del Giudice, J. *et al.* Nitric oxide is required for an optimal establishment of the *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium meliloti* symbiosis. *New Phytol.* **191**, 405–17 (2011).
46. Hilliou, F. & Tran, T. RqPCRAnalysis: Analysis of quantitative real-time PCR data. 202–211 (2013).
47. Cabrera, J. *et al.* A phenotyping method of giant cells from root-knot nematode feeding sites by confocal microscopy highlights a role for chitinase-like 1 in arabidopsis. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, (2018).
48. Cam, Y. *et al.* Nitric oxide (NO): a key player in the senescence of *Medicago truncatula* root nodules. *New Phytol.* **196**, 548–60 (2012).
49. Schifano, J. M. *et al.* An RNA-seq method for defining endoribonuclease cleavage specificity identifies dual rRNA substrates for toxin MazF-mt3. *Nat. Commun.* **5**, 3538 (2014).
50. Culviner, P. H. & Laub, M. T. Global Analysis of the *E. coli* Toxin MazF Reveals Widespread Cleavage of mRNA and the Inhibition of rRNA Maturation and Ribosome Biogenesis. *Mol. Cell* **70**, 868–880.e10 (2018).
51. Will, S., Joshi, T., Hofacker, I. L., Stadler, P. F. & Backofen, R. LocARNA-P: Accurate boundary prediction and improved detection of structural RNAs. *RNA* **18**, 900–914 (2012).
52. Brennan, R. G. & Matthews, B. W. The Helix-Turn-Helix DNA Binding Motif. *J. Biol. Chem.* **264**, 1903–1906 (1989).
53. Bruand, C., Meilhoc, E. & Brouquisse, R. Nitric oxide in plants: Pro- or anti-senescence. *Journal of Experimental Botany* **70**, 4419–4427 (2019).
54. Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. Molecular cloning: a laboratory manual. *Mol. cloning a Lab. manual.* (1989).

55. Prysak, M. H. *et al.* Bacterial toxin YafQ is an endoribonuclease that associates with the ribosome and blocks translation elongation through sequence-specific and frame-dependent mRNA cleavage. *Mol. Microbiol.* **71**, 1071–1087 (2009).
56. Rosenberg, C., Boistard, P., Dénarié, J. & Casse-Delbart, F. Genes controlling early and late functions in symbiosis are located on a megaplasmid in *Rhizobium meliloti*. *Mol. Gen. Genet.* **184**, 326–33 (1981).
57. Mergaert, P. *et al.* A novel family in *Medicago truncatula* consisting of more than 300 nodule-specific genes coding for small, secreted polypeptides with conserved cysteine motifs. *Plant Physiol.* **132**, 161–73 (2003).
58. Pierre, O. *et al.* Involvement of papain and legumain proteinase in the senescence process of *Medicago truncatula* nodules. *New Phytol.* **202**, 849–63 (2014).
59. Bosdari, A., Mandon, K., Dupont, L., Poggi, M. C. & Le Rudulier, D. Bets is a major glycine betaine/proline betaine transporter required for early osmotic adjustment in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **184**, 2654–2663 (2002).
60. Yang, L. *et al.* 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 (2020).
61. Pini, F. *et al.* Cell Cycle Control by the Master Regulator CtrA in *Sinorhizobium meliloti*. *PLoS Genet.* **11**, e1005232 (2015).
62. Cabanes, D., Boistard, P. & Batut, J. Identification of *Sinorhizobium meliloti* genes regulated during symbiosis. *J. Bacteriol.* **182**, 3632–3637 (2000).
63. Alunni, B. & Gourion, B. Terminal bacteroid differentiation in the legume–rhizobium symbiosis: nodule-specific cysteine-rich peptides and beyond. *New Phytol.* **211**, 411–417 (2016).
64. Pei, J., Kim, B. H. & Grishin, N. V. PROMALS3D: A tool for multiple protein sequence and structure alignments. *Nucleic Acids Res.* **36**, 2295–2300 (2008).

Section Résultats



- **Partie 1** : Etude globale des systèmes VapBC de *S. meliloti*
- **Partie 2** : Article scientifique en préparation
- **Partie 3** : Identification de la cible de VapC7

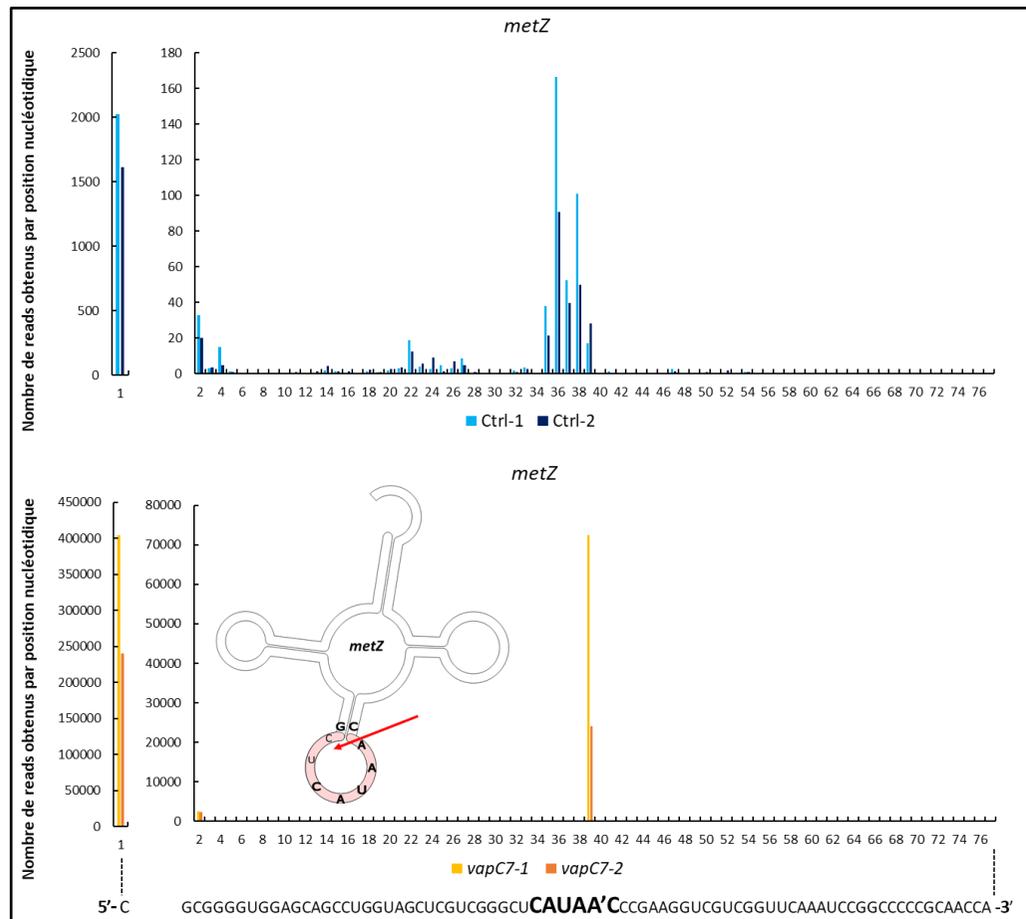
Section Résultats

Partie 3 : Identification de la cible de VapC7

VapC7 cible la boucle anticodon de l'ARNt^{fMet} chez *E. coli*

Pour identifier les cibles de la toxine VapC7, disposant d'un domaine PIN lui conférant une activité RNase site-spécifique, la technique du MORE RNA-seq (Mapping by Overexpression of an RNase in *E. coli*) a été utilisée comme précédemment décrit pour la toxine VapC10 (Technique détaillée dans le Supplementary Fig. 1 de l'article scientifique). La souche BW25113Δ6 d'*E. coli* a été choisie pour cette expérience car elle est délétée pour ses six systèmes TA de type II et est dépourvue d'activité exoribonucléasique 5'→3' ce qui permet de limiter les activités RNase aspécifiques. Cette souche a été transformée avec le plasmide pBAD24 vide (Contrôle) ou le plasmide pBAD24-*vapC7*, permettant la production de la toxine. Après 30 min d'induction du gène de la toxine VapC7 par le L-arabinose, l'ARN clivé a été discriminé des ARN totaux extraits, en ciblant les ARN ayant une extrémité 5' mono-phosphate ou 5'-OH. Cette dernière sous-population a été phosphorylée par une kinase avant de générer les banques d'ADNc nécessaires au 5' RNA-seq. Après traitement bioinformatique, un script, élaboré pour cette étude (voir la section Méthodes de l'article scientifique), permettant de cibler les positions où un clivage important, non retrouvé dans la condition contrôle, avait lieu après induction de la toxine VapC7, a permis d'identifier la cible principale de VapC7. VapC7 clive le site CAUAA[^]C de la boucle d'anticodon des ARNt^{fMet} d'*E. coli*, spécifié par les gènes *metZ/metW/metV* (trois copies d'un même gène répété en tandem dans le génome d'*E. coli*), puisqu'environ 48 000 reads en moyenne sont retrouvés en présence de la toxine, contre 22 dans le contrôle à cette position ; et celui issu de *metY*, avec environ 875 000 reads alignés en moyenne en présence de VapC7, contre 420 dans le contrôle. Ce dernier ARNt^{fMet}, spécifié par *metY*, diffère des ARNt^{fMet} spécifiés par *metZ/metW/metV* au niveau d'une seule substitution nucléotidique (G/A⁴⁶) (Govindan et al., 2018) (Figure 63). L'ARNt^{Met(CAU)}, spécifié par les gènes *metU* et *metT* chez *E. coli*, n'est quant à lui pas spécifiquement dégradé (Figure 64AB).

A



B

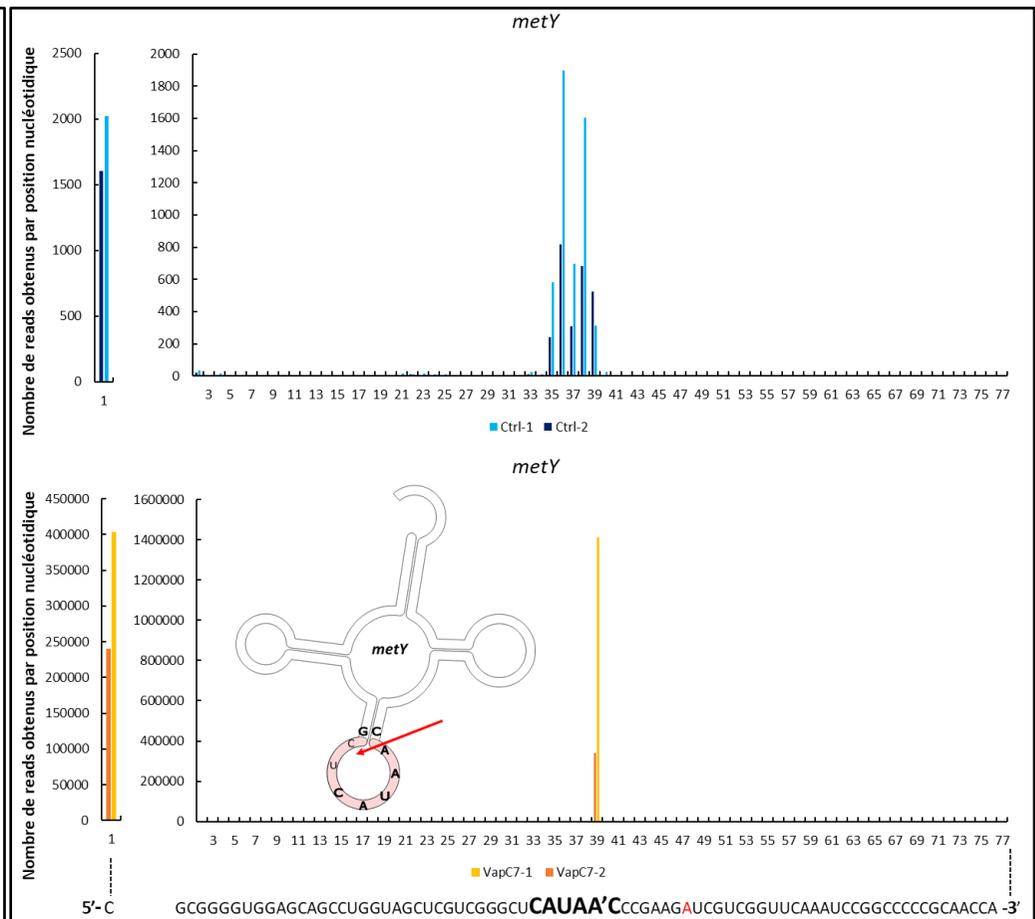


Figure 63 : VapC7 clive l'ARNt^{fMet CAU} dans le site CAUAA^C au niveau de la jonction tige-boucle de l'anticodon chez *E. coli*.

La souche BW25113Δ6 d'*E. coli*, portant le plasmide pBAD24-vide (Ctrl) ou pBAD24-*vapC7* (VapC7), est cultivée jusqu'à $DO_{600nm}=0.4$ puis induite 30 min par ajout de L-arabinose (1%) pour permettre la production de la toxine VapC7. L'ARN total extrait est traité par la technique du MORE RNA-seq (Mapping by Overexpression of an RNase in *E. coli*) afin d'identifier les cibles de VapC7 (pour plus de détails voir la section Méthodes de l'article scientifique).

Une table de comptage est établie sur l'ensemble des extrémités 5' des ARNs dégradés pour chaque position nucléotidique du génome. Après analyse, la cible majoritaire identifiée de la toxine VapC7 est l'ARNt^{fMet} spécifié par trois gènes identiques *metZ*, *metW* et *metV* et, à une substitution près, par *metY*. La structure de l'ARNt illustre la boucle de l'anticodon clivée (flèche rouge) par la toxine.

Les nombres de reads obtenus en fonction de la position nucléotidique dans le gène de *metZ* (A) ou *metY* (B) sont illustrés dans les conditions Ctrl-1 et Ctrl-2 (en bleu, en haut) d'une part et *vapC7-1* et *vapC7-2* (en orange, en bas) d'autre part. Ils correspondent aux résultats obtenus pour les dupliques biologiques réalisées dans chacune des conditions. La séquence du gène, de 5' vers 3', est représentée en dessous du graphique et l'anticodon suivi du site de clivage est en gras.

NB : Le nombre très important de reads obtenus avec la condition VapC7 n'a pas permis la réalisation d'une représentation graphique de leur alignement ou de leur couverture sur myGenomeBrowser.

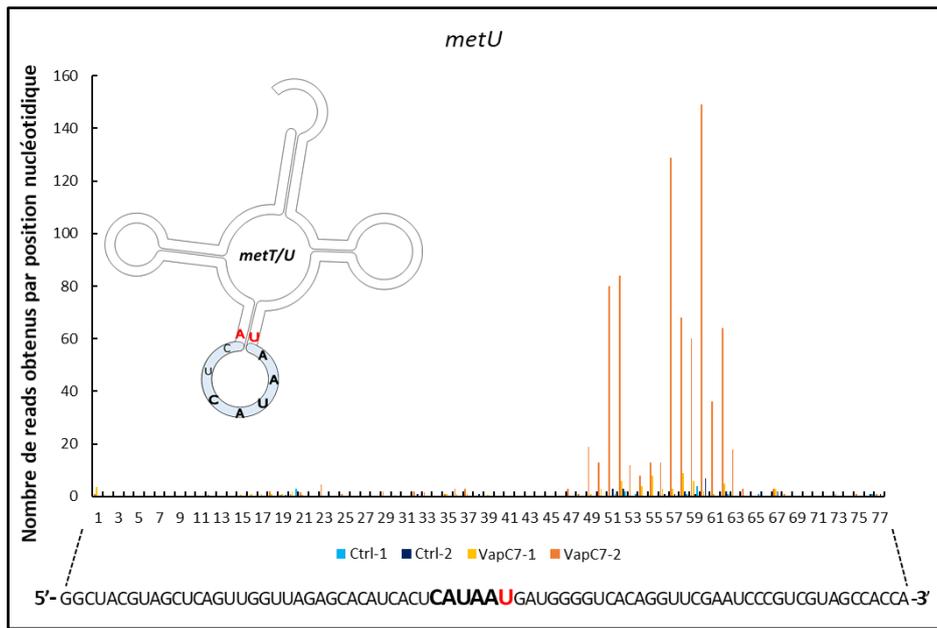
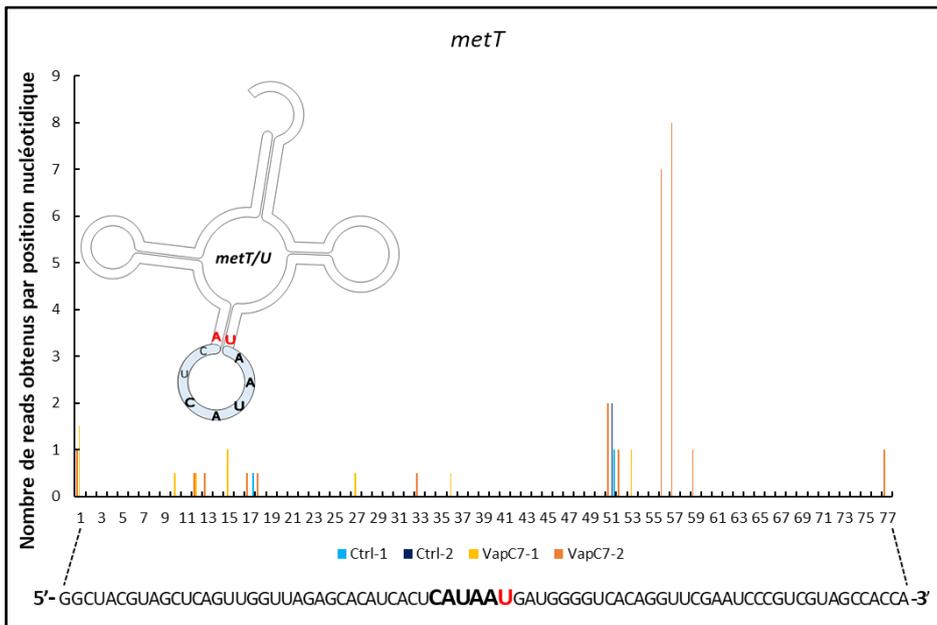
A**B**

Figure 64 : VapC7 ne clive pas le site CAUAA^U au niveau de la jonction tige-boucle de l'anticodon des ARNt^{Met} transcrits par *metU* et *metT* chez *E. coli*.

L'expérience et l'analyse ont été menées comme décrit en Figure 63 .

Alors que la toxine VapC7 clive l'ARNt^{fMet} codé par *metZ*, *metW*, *metV* et, *metY*, les ARNt^{Met} transcrits par les gènes *metU* et *metT* ne sont pas clivés par VapC7. Les structures des ARNt illustrent la boucle de l'anticodon non clivée par la toxine, où la jonction tige-boucle diffère de celle des ARNt^{fMet} au niveau des nucléotides représentés en rouge.

A,B : Nombre de reads obtenus en fonction de la position nucléotidique dans les gènes de *metT* et *metU*. Le graphique montre pour chaque réplicat la condition contrôle (Ctrl-1, Ctrl-2) en bleu et la condition d'induction de la toxine VapC7 en orange (VapC7-1, VapC7-2). Les gènes *metU* et *metT*, spécifiant des ARNt^{Met}, possèdent une substitution nucléotidique (C/U⁴⁰) dans le site de reconnaissance de la toxine VapC7 (rouge).

Pour identifier les homologues des ARNt^{fMet} chez *S. meliloti* 2011, les deux ARNt^{fMet} issus de *metZ* (copie de *metW* et *metV*) et *metY* ont été comparés aux 55 ARNt déduits du génome de *S. meliloti*, à l'aide du logiciel LocaRNA (Will et al., 2012). Les gènes, SMc02455, SMc02623 et SMc03075, possédant tous trois la même séquence nucléotidique, transcrits en ARNt^{(f?)Met} chez *S. meliloti*, présentent la meilleure homologie de séquence et de structure avec les ARNt^{fMet} issus de *metZ/metW/metV* d'*E. coli*. Ces gènes ne diffèrent de *metZ/metW/metV* d'*E. coli* que par 7 substitutions nucléotidiques (U/C¹⁷, G/A²⁹, C/U⁴¹, U/C⁴⁷, U/C⁵⁰, C/A⁵¹ et G/U⁶⁴) et de *metY* par une substitution supplémentaire (G/A⁴⁶) (Figure 65A). Parmi les autres ARNt^{Met} produits par *S. meliloti*, l'ARNt^{Met} transcrit à partir du gène SMc00758 présente plus d'homologies avec les ARNt^{Met} élongateurs transcrit à partir de *metT/metU* d'*E. coli*, non clivés par la toxine VapC7 dans l'expérience de MORE-RNAseq. Quant aux ARNt^{Met} transcrits à partir des gènes SMc01596 et SMA2168 de *S. meliloti*, ils sont plus divergents des ARNt^{fMet} des gènes *metZ/metW/metV* et des ARNt^{Met} des gènes *metT/metU* que des ARNt provenant des autres gènes de *S. meliloti* (Figure 65A). Il est probable que les gènes SMc01596 et SMA2168 spécifient des ARNt^{Met} élongateurs. Par conséquent, **les ARNt^{(f)Met} de *S. meliloti* homologues aux ARNt^{fMet} d'*E. coli* les plus fiables sont SMc02455, SMc02623 et SMc03075 (Figure 65AB).**

Au vu de l'absence de publications concernant l'identification de l'ARNt^{fMet} initiateur de la traduction chez *S. meliloti*, l'environnement génique a été étudié. De manière intéressante, contrairement à *E. coli*, où les gènes *metZ*, *metW* et *metV* sont organisés en opéron, les gènes SMc02455, SMc02623 et SMc03075 sont chacun présents, individuellement, sur l'une des trois copies de la région du génome permettant la synthèse de pré-ARN 16S-23S-5S. Ce n'est pas le cas pour les autres gènes (SMc01596 et SMA2168) spécifiant des ARNt^{Met} chez *S. meliloti* qui ne présentent aucune caractéristique particulière au niveau de leur environnement génique (Figure 65C).



Section Discussion et Perspectives



Section Discussion et Perspectives

I. VapC7 et VapC10, des tRNases inhibitrices de la traduction

Nous avons vu précédemment que les toxines VapC7 et VapC10 de *S. meliloti*, qui possèdent un domaine PIN leur conférant une activité RNase site-spécifique, ciblent respectivement les ARNt^{fMet} et des ARNt^{Ser} chez *E. coli*.

En clivant l'ARNt^{fMet}, qui est l'ARNt initiateur de la traduction, VapC7 permet donc l'inhibition globale de la traduction. Cette inhibition totale permet d'expliquer l'arrêt brutal de croissance observé lors de la surexpression de cette toxine chez *E. coli*. En effet, rappelons que parmi les 9 VapC de *S. meliloti* testées en surexpression chez *E. coli*, seule VapC7 a un effet bactéricide observable en moins de 15 min.

Bien qu'il reste à démontrer que VapC7 clive également l'ARNt^{fMet} chez *S. meliloti*, plusieurs éléments semblent conforter cette hypothèse. Tout d'abord, malgré l'absence de la définition de l'ARNt initiateur de la traduction chez *S. meliloti*, les ARNt^{Met}, issus des gènes Smc02455, Smc02623 et Smc03075, présentent un fort taux d'identité (90.9%) avec les ARNt^{fMet} transcrits à partir des gènes *metZ/metW/metV* d'*E. coli* (**Figure 66A**). D'autre part, ces ARNt^{Met} sont, contrairement aux autres gènes d'ARNt^{Met} de *S. meliloti*, transcrits, comme l'ARNt^{fMet} de *E. coli*, par trois copies identiques du gène. Toutefois, ces copies ne sont pas répétées en tandem comme chez *E. coli* (**Figure 66B**), mais sont situées en aval des trois copies du gène spécifiant l'ARNr 5S (**Figure 66C**). Chez les bactéries, les gènes des ARNr 23S, 16S et 5S sont organisés au sein d'un locus génétique et transcrits sous forme d'un pré-ARN ribosomique contenant des ARNt dans les régions intergéniques, séparés des ARNr lors de la maturation du pré-ARNr. Ces ARNt sont le plus souvent entre le 23S et le 16S, et parfois après le 5S (**Apirion and Miczak, 1993**), comme c'est le cas chez *E. coli* pour l'ARNt^{Asp}, l'ARNt^{Thr} et l'ARNt^{Trp} (**Figure 66D**). Les ARNt^{Ile} et ARNt^{Ala} sont fréquemment rencontrés dans la région intergénique 16S-23S chez de nombreuses bactéries (**Anda et al., 2015**), notamment chez *E. coli* (**Figure 66D**) et également chez *S. meliloti* (**Figure 66C**). En revanche, retrouver l'ARNt^{(f?)Met} au sein de ce pré-ARN ribosomique est, à notre connaissance, une caractéristique qui n'a encore jamais été décrite. Chez *S. meliloti*, l'ARNt initiateur pourrait ainsi être régulé en même temps que les ARNr pour la production des ribosomes et ce, en fonction des besoins de production des protéines de la bactérie (**Jinks-Robertson et al., 1983**). Enfin, pour conforter l'idée que VapC7 ciblerait l'ARNt^{fMet} chez *S. meliloti*, il faut rappeler que, comme décrit dans la section Résultats, les homologues de VapC7, caractérisés chez d'autres bactéries, sont des toxines ciblant également l'ARNt^{fMet} : VapC1 et 2 de *Haemophilus influenzae* (**Walling and Butler, 2018**), VapC de *Shigella flexneri* et VapC_{LT2} de *Salmonella typhimurium* (**Winther and Gerdes, 2011**).

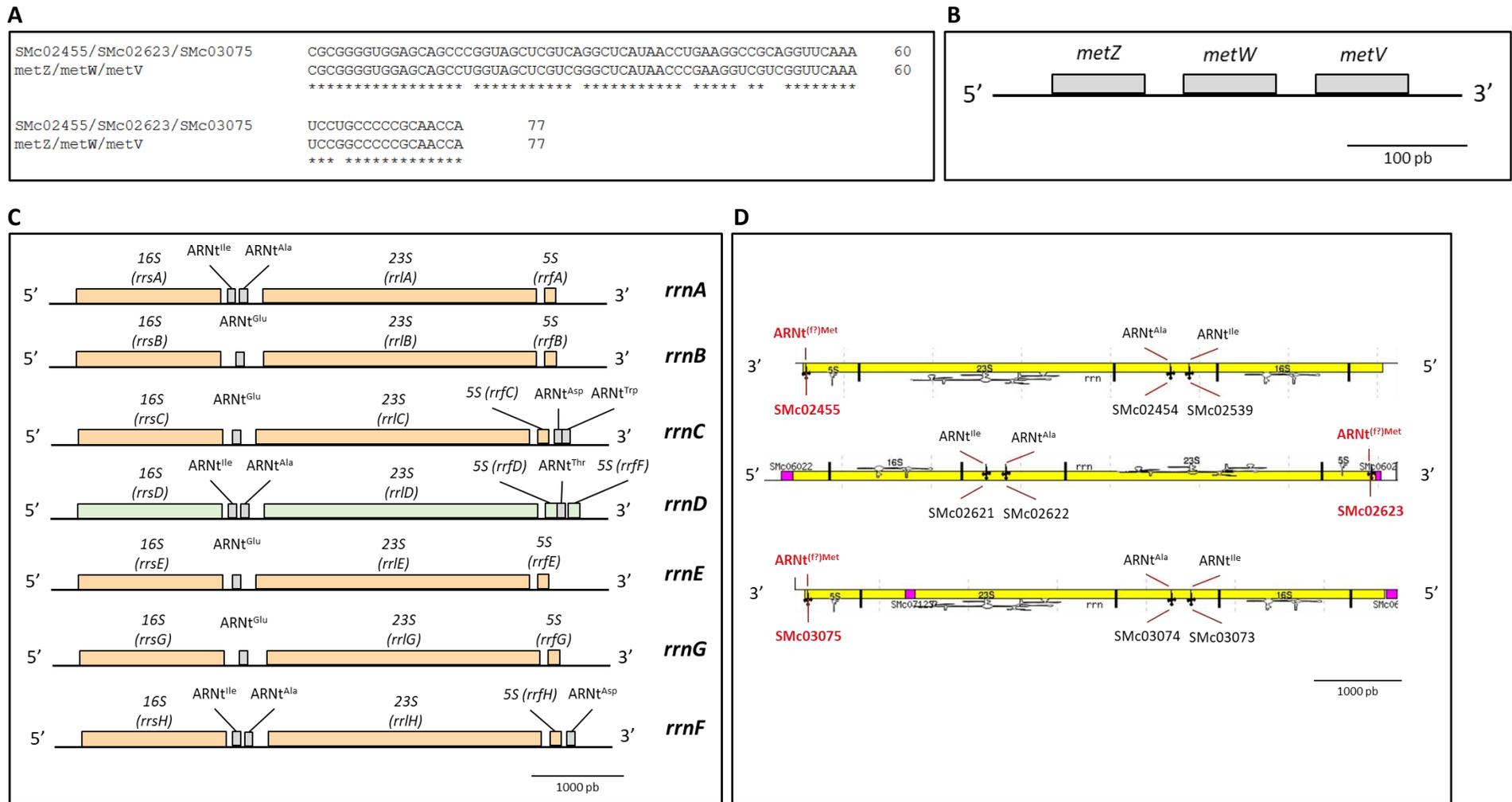


Figure 66 : Comparaison des séquences d'ARNt^{(f?)Met}, de la localisation des gènes d'ARNt^{(f?)Met} et des loci *rrn* chez *E. coli* et *S. meliloti*.

A : Alignement des séquences des ARNt spécifiés par *metZ/metW/metV* d'*E. coli* avec celles des ARNt spécifiés par *SMc02455/SMc02623/SMc03075*. L'alignement présente seulement 7 substitutions nucléotidiques, correspondant à une identité de 90.9% entre les différentes copies des gènes d'*E. coli* et de *S. meliloti*.

B : Organisation génétique de la région *metZ-metW-metV* présente sur le brin positif chez *E. coli*.

C-D : Opérons *rrn* chez *E. coli* et *S. meliloti*. C : Chez *S. meliloti*, les ARNr sont transcrits à partir de 3 régions *rrn*. Le pré-ARN ribosomique contient des ARNt^{Ile} et ARNt^{Ala} entre le 16S et le 23S. De plus, de manière originale, le potentiel ARNt^{(f?)Met} est retrouvé après le gène de l'ARNr 5S dans les trois opérons *rrn*. D : Chez *E. coli*, les ARNr sont transcrits depuis 6 opérons *rrn* (*rrnA*, *rrnB*, *rrnC*, *rrnD*, *rrnE*, *rrnG* et *rrnH*) sur le brin positif (orange) sauf *rrnD* qui est sur le brin négatif (vert). Au sein de ces opérons, le pré-ARN ribosomique contient, en plus des futurs ARNr 23S, 16S et 5S, des ARNt (ARNt^{Ile}, ARNt^{Ala} et ARNt^{Glu}).

La toxine VapC10, quant à elle, cible deux ARNt^{Ser} : l'ARNt^{Ser(GGA)} et l'ARNt^{Ser(UGA)} chez *E. coli*.

Chez *E. coli* et *S. meliloti*, il existe 6 codons sérine, pouvant être décodés par 4 ARNt^{Ser}, d'après les règles « Wobble » de flottement sur la 3^{ème} base du codon. Ces règles de complémentarité moins strictes permettent la reconnaissance de plusieurs codons à partir d'un même anticodon, par « mésappariement » de la première base en 5' de l'anticodon avec la troisième base en 3' du codon (**Tableau 11**). Par conséquent le codon sérine UCU ne peut être reconnu que grâce à la règle du Wobble par l'ARNt^{Ser(GGA)}, reconnaissant normalement le codon UCC. De même, le codon AGU ne peut être reconnu que par l'ARNt^{Ser(GCU)}, grâce à la règle du Wobble. Les codons sérines UCA, UCG et AGC sont reconnus par l'ARNt^{Ser(UGA)}, l'ARNt^{Ser(CGA)} et l'ARNt^{Ser(GCU)}, respectivement. Par conséquent, la traduction d'ARNm possédant les codons UCU, UCC et UCA, dont la fréquence représente un tiers des codons sérine de *S. meliloti* (5% + 24% + 6% = 35% de codons sérine dans les séquences codantes de *S. meliloti*), serait interrompue au niveau de ces codons, lorsque la toxine VapC10 serait active. Cette toxine permettrait donc **l'inhibition partielle de la traduction**, et pourrait ainsi limiter la production de protéines contenant des sérines décodées à partir des codons Sérine fréquents UCC (24%) ou rares, comme UCA (6%) et UCU (5%). Cette hypothèse d'inhibition partielle, et non globale, de la traduction est confortée par l'obtention d'une cinétique d'arrêt de croissance bactérienne plus lente lors de la surexpression de VapC10 (2h) que VapC7 (15 min) chez *E. coli*, témoignant d'une toxicité plus modérée. Enfin, nous avons vu que la toxine VapC10 présente les plus fortes homologues de séquence avec la toxine VapC9, qui elle-même partage une forte homologie avec la toxine VapC30 de *M. tuberculosis* (**Supplementary Figure 4 de l'article scientifique**). Or, cette dernière a été caractérisée comme une RNase ciblant spécifiquement les ARNt^{Ser(UGA et CGA)} reconnaissant le site (U/C)G^A, au niveau de la boucle de l'anticodon.

Codon	Anticodon	Gène <i>E. coli</i>	Fréquence <i>E. coli</i>	Gène <i>S. meliloti</i>	Fréquence <i>S. meliloti</i>	Règle Wobble
UCC	GGA	<i>serX</i>	11%	SMc02915	24 %	non
UCA	UGA	<i>serT</i>	15 %	SMc01243	6 %	non
AGC	GCU	<i>serV</i>	33 %	SMc02409	27 %	non
UCG	CGA	<i>serU</i>	16 %	SMc03779	32 %	non
<u>UCU</u>	<u>GGA</u>	<i>serX</i>	11 %	SMc02915	5 %	oui
<u>AGU</u>	<u>GCU</u>	<i>serV</i>	14 %	SMc2409	5 %	oui

Tableau 11 : Reconnaissance des 6 codons sérine par les 4 ARNt^{Ser} et fréquence des codons sérine chez *E. coli* et *S. meliloti*.

Les bases soulignées correspondent au flottement sur la 3^{ème} base du codon, correspondant au mésappariement en 5' de la première base de l'anticodon.

En conclusion, bien qu'une validation par des approches génétiques et/ou biochimiques, des cibles identifiées soit nécessaire (voir section Perspectives), les deux toxines étudiées, VapC7 et VapC10, impactent la traduction, de manière globale ou partielle, en ciblant des ARNt. Lors de l'introduction, nous avons souligné que la majorité des VapC caractérisées *in vivo* ciblaient également des ARNt. Il est donc envisageable que les 9 autres VapC de *S. meliloti*, à l'exception de VapC1 (inactive), ciblent également des ARNt, identiques à ceux ciblés par VapC7 (VapC4 et VapC5 sont des homologues de VapC7) ou VapC10 (VapC9 et VapC11 sont des homologues de VapC10) ou différents, pouvant au moins en partie expliquer les différences observées dans les profils de toxicité.

II. Les systèmes VapBC3, VapBC7 et VapBC10 limitent l'efficacité symbiotique

1) Phénotypes des mutants *vapC* et stades symbiotiques affectés

Sur les 11 VapC chromosomiques de *S. meliloti*, 5 mutants invalidés pour des toxines VapC présentent un phénotype en interaction avec *Medicago spp* : *vapC3*, *vapC4* (Bodogai et al., 2006; Oláh et al., 2001), *vapC5* (Lipuma et al., 2014), *vapC7* et *vapC10*. Dans cette thèse, les mutants *vapC3*, *vapC7* et *vapC10* en interaction avec *M. truncatula*, partagent tous les trois un phénotype de capacité fixatrice d'azote par mg de nodosités améliorée à 6 spi, comme c'est également le cas pour les mutants *vapC4* (*ntrR*) (Bodogai et al., 2006; Oláh et al., 2001) et *vapC5* (Lipuma et al., 2014), précédemment décrits. Toutefois, cette amélioration de la capacité fixatrice peut avoir des origines et des conséquences différentes, comme cela est résumé pour les mutants *vapC3*, *vapC7* et *vapC10* étudiés au cours de cette thèse (Tableau 12).

L'amélioration de la capacité fixatrice d'azote par mg de nodosités induites par les mutants *vapC3* et *vapC7*, est liée à un allongement de ces nodosités, et plus particulièrement de la zone de fixation, puisqu'aucune différence dans la cinétique de la sénescence n'est retrouvée. Le mutant *vapC10*, quant à lui, induit un retard dans la cinétique de sénescence nodositaire naturelle puisque, à 6 spi, moins de nodosités sénescentes sont retrouvées et que, pour les nodosités sénescentes, la zone de fixation est plus grande pour une même longueur de nodosité.

Paramètres analysés	<i>vapC3</i>	<i>vapC7</i>	<i>vapC10</i>
Nombre de nodosités	+	+	-
Poids moyen d'une nodosité	=	+	=
N ₂ fixé par mg de nodosités	+	+	+
N ₂ fixé par plante	+	+	=
Rendement végétal	+	+	=
Longueur moyenne des nodosités	+	+	=
Longueur de la zone de fixation	+	+	+
Proportion de nodosités sénescences	=	=	-

Tableau 12: Comparaison des phénotypes symbiotiques des mutants *vapC3*, *vapC7* et *vapC10* en interaction avec *M. truncatula* à 6 spi.

L'amélioration du paramètre analysé, avec la souche mutante par rapport à la souche contrôle, est représentée par une case verte (+) tandis que la diminution est indiquée par une case rouge (-). Une case blanche (=) traduit aucun changement significatif.

Les mutants *vapC3* et *vapC7* induisent plus de nodosités que la souche WT, permettant ainsi d'augmenter l'apport azoté de la plante (N₂ fixé / plante supérieur) et donc le rendement végétal. Ces mutants semblent donc plutôt **impacter l'interaction au niveau de la zone II**, au vu du nombre d'évènements d'infection augmenté, contrairement à *vapC10*, qui conduit à un nombre de nodosités inférieur à la souche sauvage, et qui par conséquent, ne permet pas d'améliorer le rendement végétal. **Le mutant *vapC10* semble agir au niveau de la zone III**, par amélioration de la viabilité bactéroïdienne retardant ainsi l'apparition de la sénescence.

Par conséquent, dans un contexte sauvage, les toxines VapC3 et VapC7 limiteraient le nombre de cellules infectées, et/ou de bactéroïdes par cellule infectée notamment en contrôlant la capacité du pré-symbiosome à se diviser au niveau de la zone II distale (**Figure 67**). **La toxine VapC10 participerait à la baisse de viabilité bactéroïdienne** observée lors de la sénescence naturelle (**Figure 68**).

Dans un contexte sauvage, l'ensemble de ces systèmes diminue donc l'efficacité symbiotique.

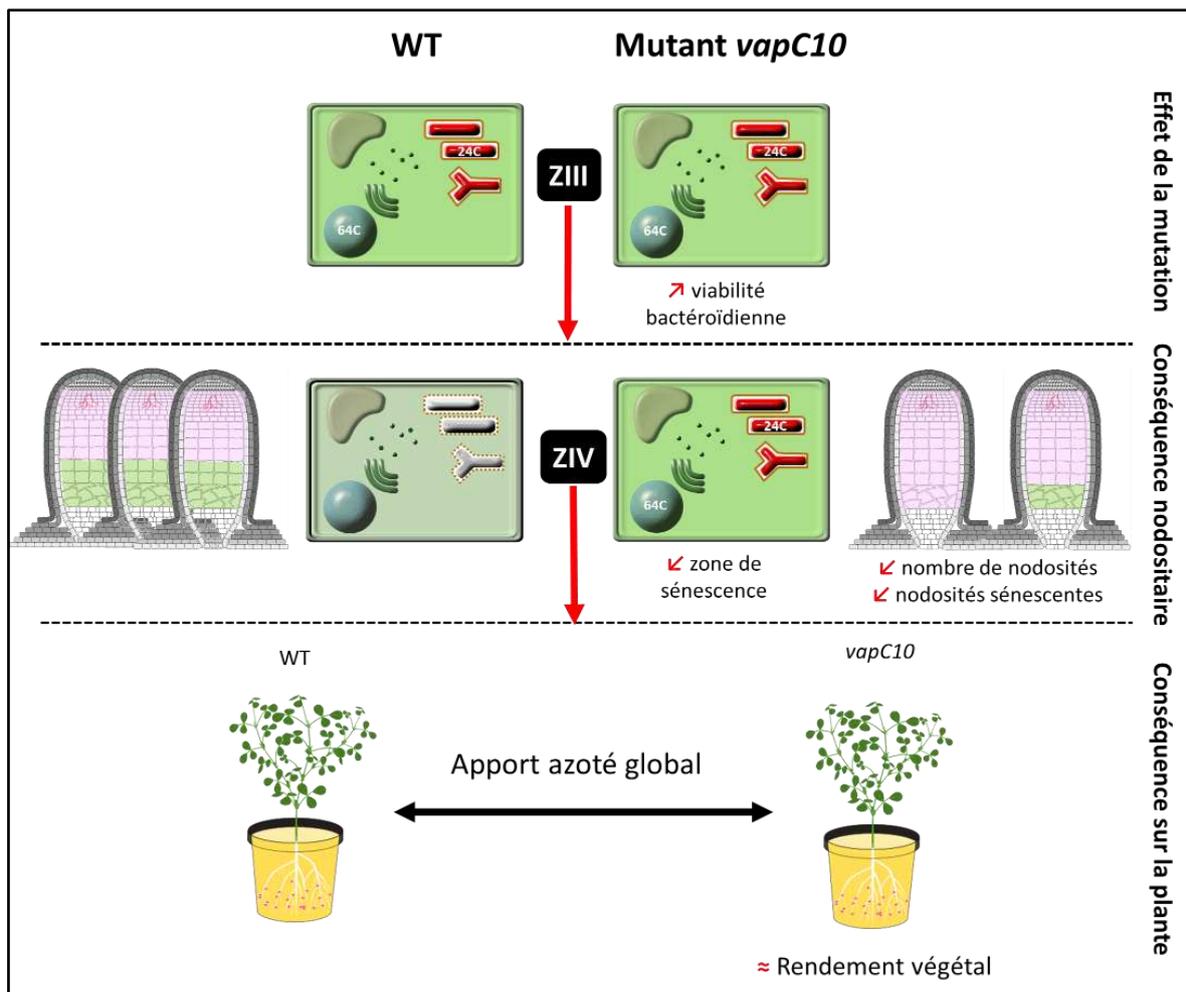


Figure 68 : Rôle de la toxine VapC10 dans la symbiose.

Le mutant *vapC10* pourraient influencer sur le nombre d'évènement infectieux et sur la viabilité bactéroïdienne, conduisant à un nombre de nodosités fixatrices diminué mais présentant une sénescence retardée et/ou limitée. Par conséquent, ces deux évènements permettent un apport azoté global identique à la souche WT, expliquant un rendement végétal comparable avec les deux souches. La toxine VapC10, dans un contexte sauvage, permettrait donc d'initier la sénescence bactéroïdienne en zone III, ce qui favoriserait les évènements de réinfection racinaire conduisant à la formation de nouvelles nodosités.

Il est important de souligner que l'étude phénotypique de ces systèmes VapBC a été menée par invalidation de la toxine et non par délétion complète de l'opéron. Il est alors possible que le phénotype observé ne soit pas lié à l'absence de la toxine mais à la dérégulation de l'expression de l'antitoxine qui, dans le cas où la toxine serait un corépresseur, ne pourrait plus réprimer la transcription de l'opéron et conduirait à une surproduction de l'antitoxine. Cette surproduction pourrait alors inhiber d'autres systèmes TA, puisque des interactions croisées ont déjà été observées (Goeders and Van Melder, 2014). Toutefois, lors de l'étude du mutant *vapC10*, l'expression de l'antitoxine VapB10 n'était pas détectable dans les nodosités induites par le mutant *vapC10*, ni par la souche sauvage (RT-qPCR, non montré), suggérant que le phénotype observé n'est pas lié à une surabondance de l'antitoxine VapB10.

2) Pourquoi limiter l'efficacité symbiotique ?

a) Quel bénéfice pour la plante ?

a.1 Retour sur investissement pour la plante : coût versus bénéfice !

Lors d'interaction procaryote-eucaryote pathogène, il est important pour l'organisme hôte de contrôler l'infection bactérienne afin d'empêcher le succès parasitaire tout en optimisant les ressources énergétiques nécessaires à sa réponse immunitaire. De même, pour une interaction symbiotique, l'hôte doit contrôler la prolifération bactérienne intracellulaire pour satisfaire un rapport coût / bénéfice qui, dans notre cas, correspond au rapport entre le coût en substrats carbonés issus de la photosynthèse fournis au bactéroïde, et le bénéfice de l'apport azoté issu de la fixation d'azote (Figure 69AB). L'hôte doit conserver de l'énergie pour sa croissance, sa floraison, le remplissage des gousses et éventuellement pour lui permettre de lutter contre de potentiels stress biotiques et abiotiques.

La nodulation peut donc devenir plus coûteuse que bénéfique pour la plante si la souche rhizobienne est mauvaise fixatrice, si la plante dispose d'azote assimilable dans le sol ou enfin si le nombre de nodosités formé est trop élevé (Sachs et al., 2018).

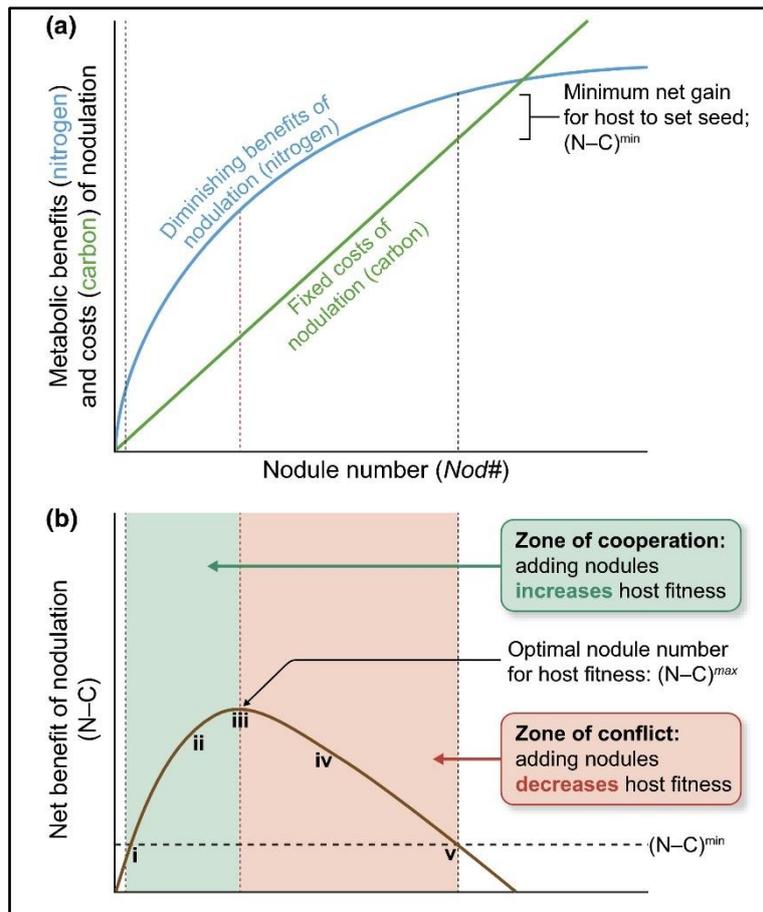


Figure 69: Rapport bénéfice/coût de la symbiose pour la plante, issu de Sachs et al., 2018.

A : Evolution des coûts et bénéfices de la nodulation pour la plante. Le coût en substrats carbonés issus de la photosynthèse (carbon, C) augmente proportionnellement avec le nombre de nodosités tandis que les bénéfices azotés de la nodulation (nitrogen, N,) augmentent de façon exponentielle pour atteindre un plateau. Un nombre trop important de nodosités peut donc s'avérer non rentable pour la plante.

B : Bénéfice net de la nodulation. Le bénéfice net de la nodulation correspond à la soustraction du coût au bénéfice de la fixation d'azote. Ainsi, l'augmentation du nombre de nodosités conduit à une augmentation du bénéfice net (zone de coopération) jusqu'à atteindre un nombre optimal de nodosités au-delà duquel le bénéfice supplémentaire est inférieur au coût. Le bénéfice net décroît (zone de conflit).

a.2 Immunité et interaction symbiotique

L'interaction symbiotique doit être finement régulée pour identifier le partenaire approprié, contrôler sa prolifération intracellulaire, équilibrer le rapport coût/bénéfice et conserver de l'énergie pour faire face à de potentiels stress biotiques ou abiotiques. La plante, pour réguler l'interaction symbiotique va avoir recours à des armes moléculaires similaires à celles utilisées lors d'interaction pathogène. Les ROS (reactive oxygen species), les RNS (reactive nitrogen species) et les NCR (équivalents de peptides antimicrobiens) jouent notamment un rôle crucial dans le succès de l'interaction symbiotique, en permettant un contrôle des bactéries dans les premières étapes de l'infection, puis tout au long de l'interaction (Kazmierczak et al., 2020; Syska et al., 2019), en plus de la

limitation de la fitness bactérienne induite par le pH acide du symbiosome qui héberge le bactéroïde, et des conditions de microoxie dans la zone III dues aux barrières de diffusion à l'oxygène nodositaire.

La première étape d'un évènement infectieux, à savoir la **reconnaissance** entre les deux partenaires, présente des caractéristiques communes entre les interactions symbiotiques et pathogènes. En effet, comme vu en introduction, la frontière entre reconnaissance pathogène et symbiotique est très mince et repose sur un même modèle dit en Zig-Zag. Ce modèle, parfois appelé « course à l'armement », repose initialement sur un dialogue moléculaire entre des molécules associées aux pathogènes (PAMP, Pathogens-Associated Molecular Pattern) ou aux microbes (MAMP, Microbs-Associated Molecular Pattern) pour les bactéries symbiotiques, et un récepteur de reconnaissance de ces molécules (PRR) de l'hôte. Il a été montré que cette immunité baissait dans les premières heures de l'interaction parallèlement à l'augmentation des fonctions symbiotiques (**Figure 70**) (Cao et al., 2017).

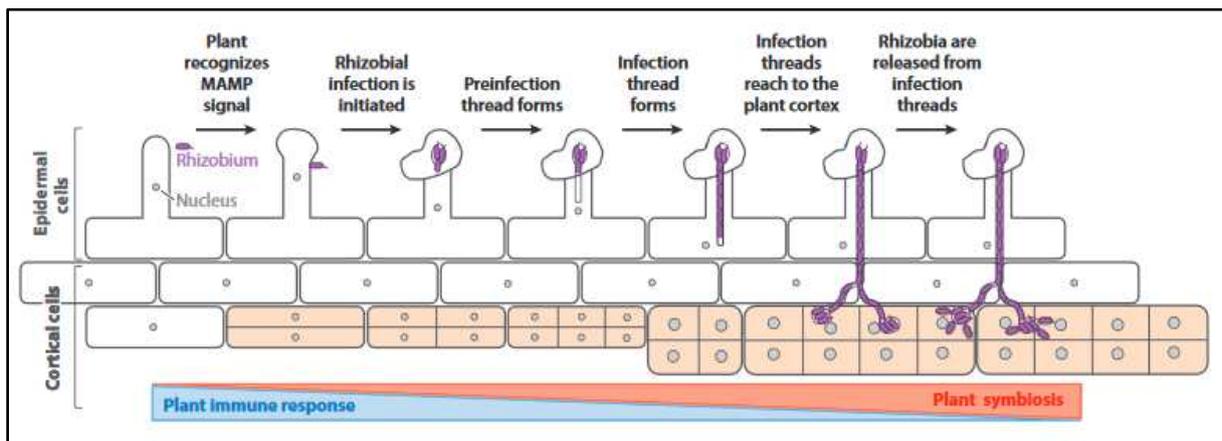


Figure 70 : La balance entre la réponse immunitaire et la symbiose au cours du développement de la nodosité, issue de Cao et al., 2017.

Les MAMPs (Microbe Associated Molecular Pattern) rhizobien active une réponse immune transitoire (bleu) chez les plantes, nommée MTI (Microbe Triggered Immunity). Les rhizobia s'échappent de cette réponse en produisant les facteurs Nod pour supprimer la MTI. Pour envahir avec succès les racines des légumineuses, les rhizobia sécrètent des effecteurs pour moduler l'immunité de l'hôte, permettant l'établissement de la symbiose (rouge).

Lors de la symbiose, la reconnaissance dépend notamment des facteurs Nod synthétisés par la bactérie selon un spectre plus ou moins étroit suivant la souche considérée. Ces facteurs Nod vont participer au spectre d'hôte de l'interaction (Dénarié et al., 1996; Downie et al., 2014; Spaink, 2000;

Zipfel and Oldroyd, 2017) et leur expression constante au cours de la symbiose participerait également à la diminution de la réponse immunitaire de la plante (Cao et al., 2017). Un deuxième niveau de contrôle de l'interaction est apporté par les peptides NCR (Nodule Cystein-rich), spécifiquement synthétisés par la plante dans la nodosité, présentant, pour certains, une activité antimicrobienne *in vitro* et des similarités avec des défensines. Il faut rappeler que, dans les nodosités indéterminées où la différenciation terminale des bactéries (Terminal Bacteroid Differentiation ou TBD) a lieu (comme c'est le cas ici chez *Medicago*), plus de 600 peptides NCR sont produits et dirigés vers le symbiosome et/ou le bactéroïde. Certains d'entre eux jouent un rôle dans la différenciation bactérie/bactéroïde, et sont au cœur de l'immunité de l'hôte, contrôlant chaque étape clé de l'organogénèse de la nodosité (Mergaert et al., 2003; Pan and Wang, 2017; Syska et al., 2019). Par exemple, ces NCRs participent à la discrimination des « bonnes » bactéries symbiotiques, résistantes à ces molécules (Haag et al., 2011). A l'inverse, d'autres peuvent s'avérer nécessaires à la survie des bactéries pour le succès symbiotique (Pan and Wang, 2017). Ainsi, un mauvais symbiote et/ou mauvais fixateur sera éliminé soit par une absence de résistance à ces NCR, soit par une mise en place précoce du processus de sénescence.

Notre étude met en relief un rôle possible du partenaire bactérien dans cette régulation de l'interaction. VapC3 et VapC7 limitent l'efficacité d'infection et/ou le nombre de bactéroïdes par nodosité. Ces toxines permettraient donc à la bactérie de limiter sa prolifération, lui évitant, d'une part, d'être perçue comme un agent pathogène dont la multiplication doit être contrôlée et d'autre part, cela éviterait à la plante d'épuiser trop de ressources, ce qui pourrait nuire à son développement. En effet, même si dans nos conditions expérimentales, l'absence de ces toxines semblent globalement avantageuse pour le rendement végétal, nous ne pouvons pas exclure que cette augmentation de l'efficacité symbiotique avec les souches mutantes *vapC* soit défavorable à la plante dans des conditions de culture plus contraignantes tel qu'un stress biotique ou abiotique. De plus, il est important de souligner que, dans nos conditions expérimentales, aucune source d'azote exogène n'est apportée à la plante : celle-ci est donc contrainte d'entrer en interaction avec nos mutants *vapC* pour se développer. Enfin, la capacité à infecter les plantes et à fixer l'azote étant deux caractéristiques indépendantes (Bourion et al., 2018; Dicenzo et al., 2019), dans un contexte de compétition dans la rhizosphère, ces mutants *vapC* pourraient être de mauvais compétiteurs et dans ce cas, être moins efficaces pour infecter les plantes, par rapport à la souche sauvage ou par rapport à une autre souche de Rhizobia.

A noter qu'un rôle du partenaire bactérien dans la régulation de l'interaction symbiotique avait précédemment été mis en relief par l'étude d'un autre mutant d'inactivation d'une toxine, *vapC4*. En effet, il est important de rappeler que ce mutant également nommé *ntrP*, pour Nitrogen Regulator, a été obtenu sur la base d'un criblage d'une banque de mutants de *S. meliloti* capables de former des

nodosités en présence d'une source d'azote exogène (NH_4^+), fournie expérimentalement à la plante (Dusha et al., 1989). Chez la souche sauvage, cette source d'azote directement assimilable par la plante réprime l'expression des gènes de nodulation (*nod*) impliqués dans la production des facteurs Nod, conduisant à une diminution de la formation des nodosités racinaires. Le phénotype de ce mutant démontre là encore le rôle du partenaire bactérien via un système TA dans la régulation de l'interaction. La bactérie ne se contente pas de subir l'interaction en fonction des besoins de la plante, il s'agit d'un acteur à part entière.

b) Quel bénéfice pour la bactérie ?

Les nodosités induites par *S. meliloti* sont dites de type indéterminé. Elles ont une croissance continue du fait de la présence d'un méristème apical persistant. Au sein de ce type de nodosités, les bactéries subissent une différenciation terminale irréversible (TBD). Dans l'évolution symbiotique, ce type de différenciation est énergétiquement intéressant pour la plante car les nodosités sont de plus petite taille, la masse globale de nodosités racinaires est plus faible (moins coûteux en énergie pour la plante), et car elles offrent une meilleure capacité fixatrice d'azote, en comparaison avec les symbioses fixatrices d'azote à nodosités déterminées sans TBD (Alunni and Gourion, 2016). De plus, la TBD empêche les bactéries de s'échapper de la nodosité et de revenir à un mode de vie libre puisqu'elles sont incapables de se différencier en bactéries cultivables. La bactérie est alors, pour certains, perçue comme une sorte d'esclave, à la merci de la plante qui l'exploite à son profit (Oono and Denison, 2010). Une diminution de la viabilité bactéroïdienne, comme celle vraisemblablement induite par la toxine VapC10, pourrait conférer un avantage à la bactérie et lui permettre, au moins en partie, de contourner la contrainte imposée par la TBD. En effet, cette mort bactéroïdienne pourrait être profitable à l'échelle populationnelle en permettant, d'une part, de nourrir les bactéries saprophytiques et, d'autre part, d'éviter que les bactéries en cours d'infection dans les cordons ne se différencient de manière irréversible. De plus, même si la nodulation offre aux Rhizobia une niche écologique et nutritive substantielle, au regard de la compétition qui s'exerce dans le sol et la rhizosphère, les nombreux cordons d'infection dans la zone II et les cordons de la zone V saprophytique constituent des portes de sortie vers l'extérieur, qui permettent d'enrichir la communauté microbienne de manière significative.

3) Pourquoi multiplier les systèmes VapBC?

La souche 2011 de *S. meliloti* possède 53 systèmes TA, dont 29 sur le chromosome, 17 sur le pSymA et 7 sur le pSymB. Parmi les 29 systèmes TA chromosomiques, 11 sont des VapBC dont 10 fonctionnels. Cette multiplication des systèmes TA pourrait être liée à la variabilité des stress perçus, conduisant à une activation transcriptionnelle différentielle entre les systèmes, à l'activation locale et/ou chronologique des protéases, à la nature des cibles des toxines, ou à la diversité des espèces de légumineuses partenaires possibles.

a) Adaptation à différents microenvironnements

La multitude des stress perçus par la bactérie, dans le sol, en vie libre, ou en interaction, dans les différents microenvironnements de la nodosité peut expliquer un si grand nombre de systèmes TA. En effet, comme décrit en introduction, les systèmes VapBC peuvent spécifiquement être activés par un stress donné. Par exemple, chez *M. tuberculosis*, bactérie pathogène de l'homme contenant 79 systèmes TA dont 50 systèmes VapBC, les toxines VapC-mt11/15 sont induites lors d'un stress hypoxie et/ou lors de l'infection des macrophages (Ramage et al., 2009) alors que VapC-mt2/32/38 le sont lors d'un stress antibiotique à la streptomycine et VapC-mt1/3/4/8/11/13/16/24/39/40 après une exposition prolongée à la rifampicine.

Chez *S. meliloti*, tous les systèmes VapBC ne sont pas exprimés de la même façon dans les différentes zones de la nodosité. VapBC7 est préférentiellement exprimé en zone III tandis que pour VapBC10 le niveau d'expression le plus fort est observé en zone II. A noter d'ailleurs que seule l'expression de l'antitoxine VapB10 est significativement augmentée en zone II et ce, bien que le module soit codé par un opéron. Le système VapBC3 quant à lui ne semble que peu exprimé, quelle que soit la zone considérée. Aussi, bien que ces trois systèmes aient un rôle dans la symbiose comme démontré dans cette étude, le lien entre leur expression et leur rôle potentiel au cours de la symbiose n'est pas si simple à appréhender. La toxine VapC7 pourrait être activée dans la zone II pour arrêter la division des pré-symbiosomes en cours de formation et en zone III pour influencer sur la reprogrammation métabolique du bactéroïde vers un métabolisme dévolu à la fixation d'azote. Pour les autres modules, VapBC10 et VapBC3, l'analyse de leurs profils d'expression est insuffisante pour déduire un rôle potentiel de ces systèmes.

Les profils d'expression différentiels entre l'antitoxine et la toxine, comme observés pour le module VapBC10, pourraient s'expliquer par la présence d'un terminateur de transcription entre

l'antitoxine et la toxine ou une dégradation post-transcriptionnelle, créant ainsi un ARNm polycistronique tronqué dans la transcription de la toxine (Cf [Figure 14](#), antitoxine de classe III) ([Deter et al., 2017](#)). Enfin, l'absence d'activation transcriptionnelle observée pour la grande majorité de ces modules peut s'expliquer (1) par une activation à un stade de développement de la nodosité plus tardif que ceux étudiés (sénescence) ou (2) une activation des systèmes indépendante d'une régulation transcriptionnelle. En effet, il est communément admis que le niveau de transcription ne constitue pas un marqueur fiable de l'activation des systèmes TA ([LeRoux et al., 2020](#)). Dans le modèle généralement admis, bien que récemment critiqué ([Song and Wood, 2020](#)), d'une activation de la toxine par dégradation préférentielle de l'antitoxine, une détermination du ratio protéique des deux composants (toxine, antitoxine) ou des acteurs de la protéolyse semble donc plus approprié ([Yang et al., 2020a](#)).

b) Activation des toxines par la protéolyse des antitoxines VapB

Un rôle de la protéase Lon dans l'activation, par dégradation de l'antitoxine, de systèmes TA a été proposé ([Brzowska and Zielenkiewicz, 2013](#); [Christensen et al., 2001, 2004](#)). La régulation de l'activité de Lon par des adaptateurs protéiques accessoires, comme cela a été montré lors du cycle cellulaire de *C. crescentus* et de la motilité de *Bacillus subtilis*, pourrait apporter à cette protéase, dite de ménage, la spécificité indispensable à cette régulation de l'activation des modules TA ([Ruangprasert et al., 2017](#)). La diminution de la capacité fixatrice d'azote et de l'organogénèse des nodosités (pseudonodosités) observée lors de l'interaction de *Medicago* avec une souche de *S. meliloti* mutante pour le gène *lon* ([Summers et al., 2000](#)) pourrait donc, au moins en partie, être liée à un défaut d'activation de systèmes TA. De même, une autre classe de protéases de la famille AAA+, Clp(X/A)P, semble jouer un rôle dans la symbiose fixatrice d'azote ([Kobayashi et al., 2009](#); [Rodriguez et al., 2006](#)). Dans une étude récente portant sur la recherche chez *S. meliloti* des interactants des protéases ClpXP1 et HslUV (également appelée ClpYQ) par co-immunoprécipitation, plusieurs antitoxines VapBs ont ainsi été identifiées ([Ogden et al., 2019](#)). Un résumé des interactions obtenues est proposé en [Table 13](#). Bien que l'activité protéasique n'ait pas directement été démontrée, ces interactions suggèrent une possible dégradation de VapB2, VapB7 et VapB4 par ClpXP1 et de VapB2 et VapB7 par ClpYQ. Comme il existe chez *S. meliloti* deux autres gènes codant des sous unités protéasiques ClpP, il serait intéressant de vérifier si les antitoxines VapB8 et VapB9, capables d'interagir avec la sous-unité ATPasique ClpX, se lient à ClpP2 ou ClpP3.

Interaction	ClpX (ATPase)	ClpP1 (protéase)	ClpY (ATPase)	ClpQ (protéase)
VapB2	+	+	+	+
VapB4	+	+	-	-
VapB6	-	-	+	-
VapB7	+	+	+	+
VapB8	+	-	+	-
VapB9	+	-	-	-

Tableau 13 : Résumé des interactions entre les antitoxines VapB et les sous-unités des protéases AAA+ ClpXP et ClpYQ (Ogden et al., 2019)

Lorsque l'antitoxine a pu être identifiée par co-immunoprécipitation avec au moins une sous-unité de la protéase d'intérêt, la case est orange, sinon la case est blanche. Les antitoxines n'interagissant avec aucune de ces sous-unités ne figurent pas dans le tableau (VapB1, VapB3, VapB5, VapB10 et VapB11).

Enfin, outre une activation différentielle en fonction du signal et/ou du stade de développement, la multiplication des systèmes VapBC peut également se justifier par la diversité des cibles visées.

c) Diversité des cibles moléculaires des toxines

Pour rappel, nous venons de démontrer que VapC7 cible probablement l'ARNt initiateur de la traduction (ARNt^{fMet}) tandis que VapC10 clive des ARNt^{Ser}. La cible de VapC3 n'a quant à elle pas été déterminée mais il est probable qu'elle reconnaisse également un ARNt, les toxines VapCs étant majoritairement des tRNases. La dégradation des ARNt permet une inhibition de la traduction totale, dans le cas de VapC7 puisque toute initiation du processus est alors impossible, ou partielle, dans le cas de VapC10. L'inhibition de la traduction conduit à un arrêt de croissance, permet de recycler l'énergie et d'effectuer un « switch »/reprogrammation métabolique. Ces critères sont fondamentaux pour l'adaptation à de nouveaux microenvironnements, fréquemment rencontrés lors de la symbiose. En effet, rappelons que lors de cette interaction, les bactéries passent de la vie libre dans le sol à une vie en progression dans le poil absorbant, puis infectent les cellules végétales par endocytose, se divisent dans la zone II avant d'arrêter toute division, subissent une reprogrammation transcriptionnelle et traductionnelle afin de dévouer leur métabolisme à la fixation d'azote et enfin meurent, permettant aux bactéries saprophytiques de se nourrir. L'inhibition partielle de la traduction comme celle réalisée par VapC10, pourrait permettre une reprogrammation du protéome. En effet, chez *M. tuberculosis* par exemple, l'activation de la toxine MazF-mt9, qui clive spécifiquement l'ARNt^{Leu(UUU)}, permet de bloquer l'élongation de la traduction au niveau des codons AAA, ce qui

entraîne la dégradation de l'ARNm pour débloquent le ribosome. Ainsi, les protéines riches en lysine codée par AAA ne sont plus produites. Cette reprogrammation serait essentielle dans l'adaptation au stress de *M. tuberculosis* (Barth et al., 2019). Dans le cas de notre symbiose, il se pourrait donc que la toxine VapC10, ciblant l'ARNt^{Ser}, entraîne une reprogrammation du protéome qui serait alors dépourvu de protéines riches en sérine (dont les ARNm possèdent les codons sérine correspondants aux ARNt^{Ser} clivés par VapC10), diminuant ainsi la viabilité bactéroïdienne. Concernant la toxine VapC7, ciblant très efficacement l'ARNt^{Met}, elle pourrait permettre une adaptation au stress génomique (24C), en limitant le nombre de copies intracellulaires de l'ARNt initiateur de la traduction dans le bactéroïde (génome endoredupliqué, 24 fois 3 copies d'ARNt) ou en régulant la quantité de ribosomes puisque ce gène est présent sur l'unité 5S. En effet, l'existence de phénomènes de régulation négative entre la quantité d'ARNt et la transcription des ARNr a été démontrée (Jinks-Robertson et al., 1983).

Autres rôles des ARNt ?

Outre leur rôle majeur dans la synthèse de protéines, les ARNt sont également impliqués dans la régulation de processus biologiques tels que l'expression génique, notamment via la réponse stringente, l'étiquetage de protéines reconnues par des protéases, ou encore la biosynthèse de la paroi (ponts peptidiques), la synthèse de certains antibiotiques, ou la formation de fragments d'ARNt régulateurs (tRFs) (Raina and Ibbá, 2014). Les toxines de systèmes TA comme VapC10 clivant des ARNt^{Ser} pourraient indirectement interférer avec de tels processus chez *S. meliloti*.

Enfin, il a été montré dans le cadre de la symbiose fixatrice d'azote, *Bradyrhizobium japonicum-Glycine max*, que la dégradation d'ARNt par des tRNases (non identifiés) permettait la production de petits ARNs (tRFs) pouvant agir comme ARN interférant, capables d'éteindre l'expression spécifique de gènes du partenaire plante (Ren et al., 2019). Dans cette étude, les auteurs montrent que les tRFs favorisent ainsi la nodulation et la déformation du poil absorbant. Nous ne pouvons donc pas exclure que certaines VapC de *S. meliloti* puissent ainsi participer à la régulation d'étapes précoces de la nodulation ou alors agir plus tardivement au sein de la nodosité, en permettant le clivage d'ARNt, qui pourraient ensuite être dégradés en tRFs 5' ou 3', et manipuleraient la cellule hôte.

III. Perspectives

1) Validation des cibles de VapC7 et VapC10 identifiées par MORE RNA-seq

A court terme, les cibles des toxines VapC7 et VapC10 soit respectivement les ARNt^{Met} et ARNt^{Ser} devront être validées chez *S. meliloti*. Pour cela, deux approches ont déjà été initiées.

La première repose sur la surexpression de la cible ARNt afin d'atténuer l'effet bactériostatique ou bactéricide de la toxine (Walling and Butler, 2018). L'ARNt d'*E. coli* ciblé par la toxine VapC et son homologue identifié chez *S. meliloti* sont surexprimés seuls ou en présence de la toxine, chez *E. coli*. Après vérification que la surexpression de l'ARNt seul n'altère pas la cinétique de croissance d'*E. coli*, celle-ci est déterminée lors de la co-expression de l'ARNt et de la toxine. Lors de la co-expression, une amélioration de la cinétique de croissance est attendue par rapport à celle obtenue lors de l'expression de la toxine seule (Figure 71). Afin de vérifier la spécificité de cible des toxines, une expérience similaire sera réalisée en surexprimant un ARNt non-cible de la toxine étudiée. Cette stratégie est actuellement en cours de calibration au laboratoire.

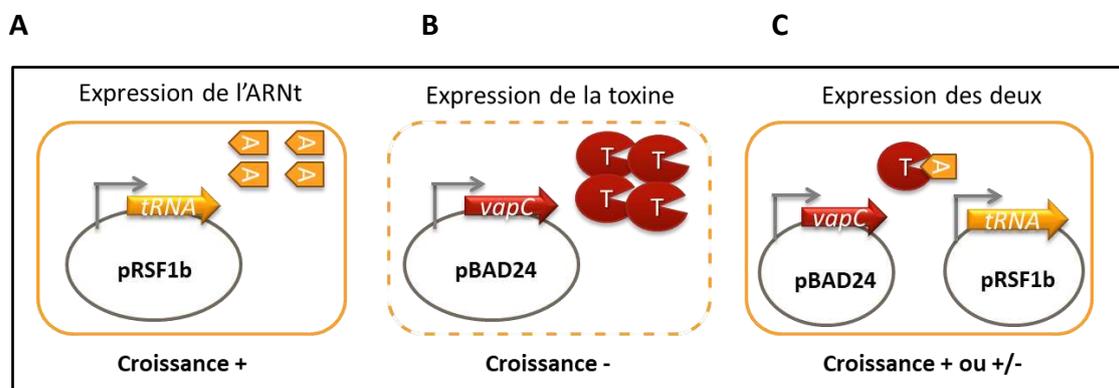


Figure 71: Validation des ARNt cibles des toxines VapCs : stratégie de co-expression cible/toxine (adaptée de Walling and Butler, 2018)

L'ARNt cible est exprimé seul (A) ou en présence de la toxine (C) chez *E. coli*. La cinétique de croissance est évaluée dans chaque condition et comparée à celle obtenue lors de l'expression de la toxine seule (B). Une amélioration de la croissance est attendue lorsque la cible de la toxine est surproduite.

La seconde approche consiste à tester l'activité RNase de la toxine purifiée directement sur l'ARNt cible produit par transcription *in vitro* (Figure 72A). La spécificité de l'activité sera vérifiée à l'aide d'ARNt non-cibles également produits par transcription *in vitro*. L'inactivation de la toxine, par ajout de l'antitoxine purifiée, sera également vérifiée. La purification de la toxine VapC10 et une fraction enrichie de la toxine VapC7 (contaminée par son antitoxine) ont déjà été obtenues au laboratoire à l'aide d'une étiquette histidine à l'extrémité C-terminale (Figure 72B). La calibration de la transcription *in vitro* des ARNt et leur visualisation sur un gel d'acrylamide au SYBR Gold (plus sensible que le BET) est actuellement en cours. La purification des antitoxines VapB7 et VapB10 doit encore être réalisée.

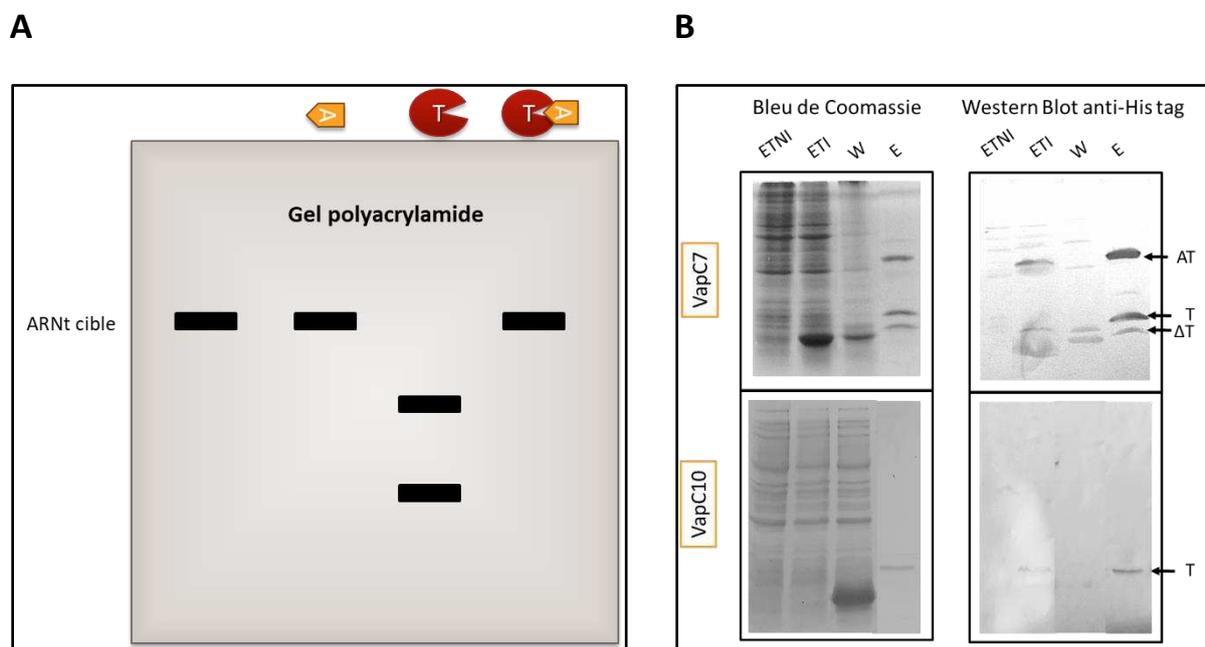


Figure 72: Validation des ARNt cibles des toxines VapCs : test de l'activité RNase des toxines sur les ARNt cibles produits par transcription *in vitro*

A : Schéma représentatif du gel d'activité RNase attendu. Les ARNt cibles et non cibles, transcrits *in vitro*, serviront de substrat pour effectuer le test de l'activité RNase de la toxine. La dégradation de l'ARNt sera visualisée sur le gel d'acrylamide.

B : Purification des toxines VapC7 et VapC10. En raison de la forte toxicité de VapC7, cette toxine ne peut être produite chez *E. coli* qu'en présence de son antitoxine, VapB7. La fraction d'élution après purification de la toxine est contaminée par de l'antitoxine. Seule une fraction enrichie en toxine VapC7 a pour le moment été obtenue. La toxine VapC10 quant à elle a pu être produite seule dans *E. coli*. Le rendement de la purification reste à optimiser. ETNI : extrait total non induit, ETI : extrait total induit, W : Wash, E : Elution.

Après validation des cibles ARNt de *S. meliloti* des deux VapC, une approche bio-informatique sera développée de sorte à définir la probabilité que la production d'une protéine soit diminuée du fait de la dégradation d'ARNt^{Ser} par VapC10. Rappelons que VapC10 clive vraisemblablement deux ARNt^{Ser} permettant la traduction des codons sérine **UCU**, **UCC** et **UCA**. Aussi, suivant la fréquence de ces codons dans les séquences, nous pourrions estimer, pour des transcrits d'intérêt voire le transcriptome complet, l'impact de l'activation de VapC10 sur la production de la protéine correspondante. Cette analyse bio-informatique pourrait ainsi nous permettre de prédire une ou plusieurs fonctions biologiques associées à l'activation de VapC10 dans la nodosité. La toxine VapC7 induisant une inhibition globale de la traduction, une analyse bio-informatique équivalente ne semble pas pertinente pour cette toxine.

2) Etude du mécanisme d'activation des systèmes VapBC de *S. meliloti* ?

A plus long terme, il serait intéressant d'étudier les mécanismes d'activation des systèmes VapBC et plus particulièrement définir les enzymes impliquées dans la protéolyse des antitoxines. Dans la littérature, l'implication de plusieurs protéases de la famille AAA+, ClpXP et Lon, dans la protéolyse d'antitoxines de type VapB a été démontrée (Ning et al., 2013; Winther and Gerdes, 2012). Lors d'une expérience de co-immunoprécipitation des protéines de *S. meliloti* avec les protéases bactériennes ClpXP1 et ClpYQ (HslUV), une interaction entre les sous-unités de ces protéases et plusieurs VapB a été constatée (Ogden et al., 2019). Par conséquent, aucun *a priori* ne peut être effectué quant à la ou les protéases responsables de la protéolyse des différentes VapB de *S. meliloti*. De plus, la protéolyse peut dépendre d'une condition physiologique donnée, comme vu lors la protéolyse de l'antitoxine MazE, chez *E. coli*, qui peut être réalisée par Lon en phase exponentielle et ClpAP en phase stationnaire, ce qui implique qu'une même antitoxine peut être dégradée par deux protéases différentes (Aizenman et al., 1996; Christensen et al., 2003).

Chez *S. meliloti*, la protéase Lon est codée par un gène unique sur le chromosome bactérien. De manière originale, le chromosome dispose également de trois gènes codant des sous-unités ClpP. Le gène *clpP1* est retrouvé sur le même locus que les gènes *lon* et *clpX* tandis que *clp2* et *clpP3* sont répartis sur d'autres régions du chromosome. L'analyse du niveau de transcription des différents gènes codant des protéases ou des sous-unités constitutives de ces protéases, dans les différentes zones de la nodosité (Tableau 14 issu de Yang et al., 2020) montre que l'expression du gène *clpP3* est augmentée d'un facteur 10 entre la zone II et la zone III tandis que les deux autres gènes *clp* ne sont que peu exprimés, quelle que soit la zone de la nodosité. Les gènes *clpY* et *clpQ* sont, quant à eux, plus fortement exprimés en zone IIp, ce qui suggère une activité de la protéase ClpYQ dans ce

compartiment. L'expression du gène *lon* est principalement retrouvée de la zone IIp à la zone III et celle des gènes *clpX*, *clpA* et *clpB* dans les zones IIp et IZ, suggérant la présence de signaux d'activation dans ces compartiments. La capacité des sous-unités protéasiques ClpP à interagir avec plusieurs types de sous-unités ATPasiques, pouvant ainsi former jusqu'à six complexes protéiques (ClpAP1/2/3, ClpXP1/2/3), permettrait d'apporter un certain niveau de spécificité de la protéolyse à un microenvironnement donné, représentatif de la zone de la nodosité étudiée.

Famille de protéase	Gène	FIID	FIIP	IZ	FIII
AAA+					
Lon	<i>SMc01905</i>	834	2053.9	1331.5	1466.2
ClpP1	<i>SMc01903</i>	275.2	397.5	348.8	230
ClpP2	<i>SMc02720</i>	234.5	391.8	497.1	498.3
ClpP3	<i>SMc03841</i>	22.7	17.9	160.4	1621.9
ClpX	<i>SMc01904</i>	2601.5	3479.9	2363.6	1016.3
ClpA	<i>SMc02109</i>	459.8	1399.4	1019.3	953
ClpB	<i>SMc02433</i>	439.3	2289.8	1585.2	3835
HslU-ClpY	<i>SMc02577</i>	77.5	944.5	380.5	100.2
HslV-ClpQ	<i>SMc02575</i>	89.3	707.3	331.7	78.8

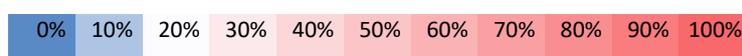


Tableau 14 : Expression relative des protéases de la famille AAA+ dans les différentes zones de la nodosité.

L'expression des gènes de protéases a été déterminée par une analyse en RNA-seq couplé à une micro-dissection au laser de nodosités âgées de 2 spi depuis le méristème apical jusqu'à la zone de fixation (Roux et al., 2014). Les valeurs présentées dans le tableau, issu de Yang et al., 2020a, correspondent au nombre de reads, et les couleurs, à leur abondance relative (échelle en pourcentage en dessous de la table). L'abondance relative des transcrits est estimée par le pourcentage des reads normalisés, dans chaque fraction, relatif au nombre de reads normalisés total.

Une perspective ambitieuse à ce travail de thèse pourrait consister en l'identification des protéases responsables de la dégradation de certaines toxines VapB ainsi que de leurs signaux d'activation spatio-temporelle.

Une première indication quant à l'efficacité des différentes protéases vis-à-vis des différentes VapB pourrait être obtenue en déterminant la demi-vie de l'antitoxine exprimée en présence de la toxine et de la protéase comme décrits par Ning et al., 2011. Une diminution de la demi-vie de l'antitoxine, potentiellement spécifique à une protéase ou à une VapB donnée pourrait peut-être ainsi être observée.

Enfin, il serait intéressant d'étudier le phénotype symbiotique de mutants de chacune de ces protéases au niveau des sous-unités protéasiques et/ou ATPasiques chez *S. meliloti* 2011 pour définir leur rôle et de comparer leur importance relative dans la symbiose avec *M. truncatula*.

3) Les systèmes VapBC : un outil pour l'amélioration de l'interaction symbiotique

Nous avons vu que les mutants invalidés dans les toxines VapC3 et VapC7 permettent une hausse du rendement végétal liée à une amélioration de la fixation d'azote grâce à une augmentation du nombre et de la taille des nodosités. Le mutant invalidé pour la toxine VapC10 présente quant à lui une sénescence nodositaire retardée. Ces modules VapBC apparaissent donc comme des outils prometteurs pour l'amélioration des performances et/ou de la durabilité de l'interaction symbiotique. Il nous semble donc primordial de poursuivre la caractérisation de ces mutants afin de déterminer leur potentiel en culture « réelle ».

Le coût supplémentaire pour la plante, engendré par l'augmentation du nombre de nodosités formées avec les mutants *vapC3* et *vapC7*, ne risque-t-il pas d'être préjudiciable à la plante lorsque celle-ci doit remobiliser son énergie pour son développement, par exemple lors du remplissage des gousses ou pour résister à un stress ? Aussi, il serait intéressant d'évaluer le comportement de ces mutants lors d'un stress abiotique (stress hydrique, salin...) ou à un stade de culture plus avancé (floraison, remplissage des gousses). Enfin, il serait également important d'évaluer si l'immunité de la plante, amoindrie lors de l'interaction symbiotique pour permettre l'accueil de la bactérie, reste suffisamment efficace pour permettre des réactions de défense vis-à-vis de pathogènes.

Notre évaluation des conséquences des mutations *vapC* sur la performance de l'interaction s'est limitée à la mesure de l'efficacité de nodulation, de la capacité fixatrice d'azote et du rendement végétal ; ce qui est effectivement intéressant pour des plantes fourragères comme la luzerne ; mais pas forcément pour des plantes à graines comme le pois, la féverole... Aussi, il serait intéressant de transférer notre concept d'inactivation des toxines VapC à des espèces d'intérêt agronomique à graines tel que le pois (*Pisum sativum*), qui représente l'une des légumineuses les plus cultivées en Europe. Le pois interagit avec *Rhizobium leguminosarum* *bv. viciae* dont certaines souches possèdent jusqu'à 66 systèmes TA. Des souches dérivées, inactivées pour la toxine de systèmes TA, pourraient être, de la même façon, potentiellement plus performantes, améliorer le rendement, assez faible en Europe, ainsi que d'autres paramètres tel que le remplissage des gousses et/ou la qualité nutritive des graines.

Enfin, pour disposer du meilleur inoculum bactérien, il faut également tenir compte de la compétitivité de la souche sélectionnée vis-à-vis des souches indigènes présentes dans la rhizosphère. En effet, les meilleurs fixateurs ne sont pas forcément les meilleurs compétiteurs et inversement. La plante agit « en aveugle » en sélectionnant des souches bactériennes de *Rhizobia* compétitrices dans la rhizosphère qui peuvent s'avérer être de mauvais fixateurs ; qui seront alors « éliminés » par la plante, par induction d'une sénescence nodositaire précoce. Ainsi, il serait pertinent d'estimer la capacité des mutants *vapC* à entrer en compétition avec la souche sauvage dans un premier temps, puis avec d'autres souches de *S. meliloti*. Des expériences de co-inoculation de différentes espèces de légumineuses avec différentes souches, sauvages et mutantes, permettraient de définir les interactions les plus performantes.

Evaluer le phénotype des mutants *vapC* en interaction avec d'autres écotypes ou bien d'autres espèces partenaires de *S. meliloti* appartenant aux genres *Medicago spp.*, ou *Melilotus spp.* ou *Trigonella spp.*, permettrait de répondre à la question de la multiplicité des systèmes VapBC, qui pourraient être liés à un rôle spécifique chez un partenaire donné.

4) Autres systèmes TA à caractériser pour le développement d'outils d'amélioration de l'interaction Rhizobia-Légumineuses ?

A ce jour, peu d'études sur les systèmes TA ont été rapportées lors d'interactions plante-bactérie, et encore moins lors d'interactions symbiotiques. Pourtant, les bactéries symbiotiques ou phytopathogènes possèdent de nombreux systèmes TA (Shidore and Triplett, 2017).

Chez les Rhizobia, l'ensemble des génomes accessibles dans la base de données de TADB2 (outil de prédiction des systèmes TA de type II) ont été analysés, soit au total 30 espèces (Figure 73). Les Rhizobia possèdent toutes des systèmes TA, avec une moyenne d'environ 40 systèmes TA par souche, allant de 7 systèmes dans la souche *Mesorhizobium sp. BNC1* jusqu'à 66 chez *Rhizobium leguminosarum bv. viciae* 3841 (Tableau 15).

Espèce bactérienne	Nombre de TA
<i>Azorhizobium caulinodans</i> ORS 571	17
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110	31
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 6	26
<i>Bradyrhizobium</i> sp. BTAi1	32
<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS 278	16
<i>Bradyrhizobium</i> sp. S23321	18
<i>Mesorhizobium australicum</i> WSM2073.	39
<i>Mesorhizobium ciceri</i> biovar <i>biserrulae</i> WSM1271	31
<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099	42
<i>Mesorhizobium opportunistum</i> WSM2075	48
<i>Mesorhizobium</i> sp. BNC1	7
<i>Rhizobium etli</i> bv. <i>mimosae</i> str. Mim1.	51
<i>Rhizobium etli</i> CFN 42	34
<i>Rhizobium etli</i> CIAT 652	41
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> WSM1325	59
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> WSM2304	48
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> 3841	66
<i>Rhizobium</i> sp. IRBG74	35
<i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899.	45
<i>Sinorhizobium fredii</i> HH103	37
<i>Sinorhizobium fredii</i> NGR234	48
<i>Sinorhizobium fredii</i> USDA 257	33
<i>Sinorhizobium medicae</i> WSM419	28
<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021	46
<i>Sinorhizobium meliloti</i> 2011	53
<i>Sinorhizobium meliloti</i> AK83	55
<i>Sinorhizobium meliloti</i> BL225C	52
<i>Sinorhizobium meliloti</i> GR4.	48
<i>Sinorhizobium meliloti</i> Rm41	48
<i>Sinorhizobium meliloti</i> SM11 chromosome	57

Tableau 15 : Distribution des systèmes TA dans les espèces du genre *Rhizobium*

L'identification des systèmes TA de 30 espèces du genre *Rhizobium* symbiotiques a été réalisée grâce à la base de données TADB2. Les données correspondent à la somme des systèmes TA chromosomiques et plasmidiques. Les espèces en gras correspondent aux espèces possédant le plus (rouge) ou le moins (vert) de systèmes TA dans leur génome. Notre souche d'intérêt est également présentée en gras. Il en résulte de ce tableau que les *Rhizobia* possèdent en moyenne 39.7 systèmes TA dans leur génome.

En regardant de plus près la répartition des systèmes TA chez les Rhizobia, nous pouvons remarquer qu'ils sont majoritairement chromosomiques (**Figure 73**). Dans cette analyse, les systèmes VapBC sont les modules les plus abondants dans les génomes (**Figure 73**). En effet, la forte présence de cette famille dans les génomes bactériens a déjà été montrée, comme par exemple chez *M. tuberculosis* possédant 79 systèmes TA dont 50 appartiennent à la famille des VapBC (Sala et al., 2014).

En deuxième position, sont retrouvés les systèmes TA de la famille RelBE, qui, comme les VapBC, sont largement distribués dans les génomes bactériens (**Figure 9** de l'introduction (Coray et al., 2017), et **Figure 73**). En rappel, les systèmes RelBE codent une toxine de type RNase d'ARNm, ribosome-dépendante. Ces toxines n'ont jamais été étudiées dans le cadre de la symbiose et constitueraient donc une piste intéressante, puisque leur importance dans l'adaptation bactérienne à lutter face à des stress environnementaux ou dans la virulence de la bactérie phytopathogène *Xylella fastidiosa* a déjà été démontrée (Burbank and Stenger, 2017; Goeders et al., 2013).

Enfin, de manière originale, les troisième et quatrième systèmes TA les plus abondants chez les Rhizobia appartiennent à des familles où la fonction et/ou le mécanisme de la toxine sont inconnus telles que les toxines COG3832 et COG5654.

Le domaine COG3832 correspond à un domaine AHSA1/START, AHSA1 pour « Activator of Hsp90 ATPase homolog-like protein » et START pour StAR-related lipid transfer. Ces domaines appartiennent à la superfamille Bet v 1-like, un allergène avec une forte similarité de séquence avec une protéine de plante impliquée dans la réponse à une infection microbienne (Stark et al., 2010). Bien que de tels systèmes soient présents chez d'autres espèces bactériennes, il est à noter qu'ils le sont toujours de manière minoritaire. Par exemple, *M. tuberculosis* H37Rv possède un seul système COG3832 parmi ses 79 systèmes TA et *Ralstonia solanacearum* 1 seul sur 10 systèmes TA. Il serait donc intéressant de définir si les toxines de type COG3832 de systèmes TA ne pourraient pas être associées à une fonction biologique adaptative particulière aux Rhizobia.

Contrairement au domaine COG3832, **le domaine COG5654**, a récemment été caractérisé (Skjærning et al., 2019). Il s'agit d'un domaine RES possédant trois acides aminés conservés (R : arginine, E : aspartate, S : sérine = RES) qui présente une similitude avec la famille des ADP-ribosyl transférases (ARTs). Il se pourrait que la toxine contribue à diminuer la concentration cellulaire du NAD⁺, impactant alors de multiples réactions enzymatiques comme la synthèse d'ADN, d'ARN ou de protéines. Par un mécanisme inconnu, elle agirait en tant que NAD⁺ glycohydrolase (NADase) (Skjærning et al., 2019).

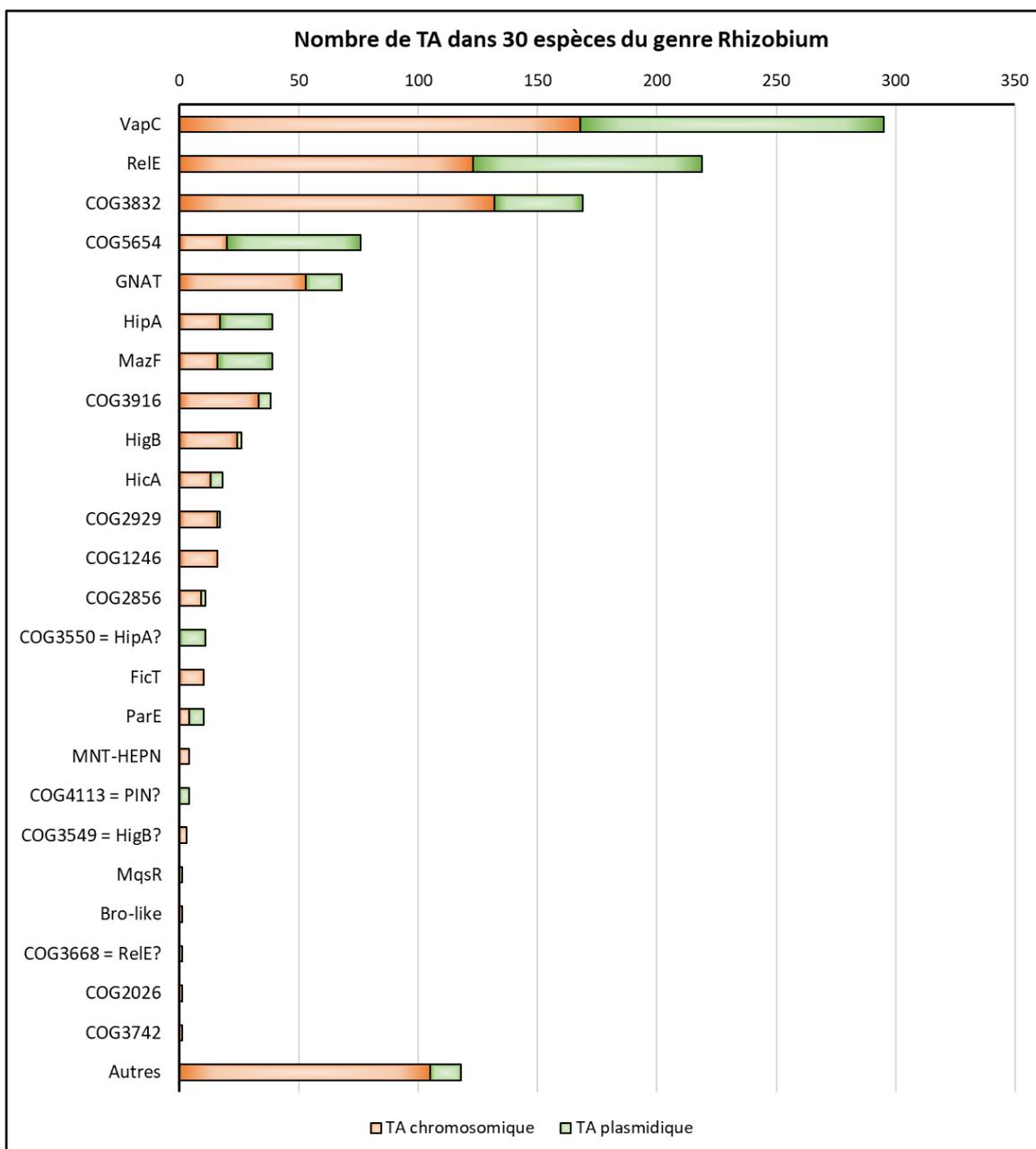


Figure 73 : Distribution totale des systèmes TA classés en fonction de la famille de la toxine chez 30 espèces rhizobiennes.

La distribution a été estimée grâce à l’outil TADB2, prédisant la présence de systèmes TA au sein de génomes séquencés. Seuls les systèmes dont la toxine a au moins une prédiction de domaine protéique conservé ont été retenus, sinon ils ont été placés dans la catégorie « Autres ». Les systèmes TA ont été classés en fonction de la toxine, puisque l’antitoxine associée peut être de nature différente. Certains domaines protéiques conservés au sein d’une superfamille peuvent englober des toxines déjà décrites, comme par exemple COG3550 qui pourrait correspondre à une toxine HipA. Les données présentées correspondent aux TA dénombrés sur les chromosomes (C, en orange) et sur les plasmides (P, en vert).

Chez *S. meliloti*, la délétion d'un des 4 systèmes Xre/RES, distribués 2 par 2 sur les plasmides pSymA et pSymB, n'a pas conduit à un phénotype en interaction (Milunovic et al., 2014). Dans cette même étude, la délétion complète des opérons de 3 systèmes TA présents sur le plasmide pSymA, dont un VapBC, et un système Xre/RES sur le plasmide pSymB n'a pas non plus conduit à un phénotype symbiotique. Toutefois, les auteurs n'ont étudié la fixation d'azote de leur mutant que sur de jeunes nodosités, et n'excluent pas que ces TA aient un rôle plus tardif, lors de la sénescence nodositaire. A contrario, en comparaison avec notre étude, où nous avons obtenu un phénotype symbiotique pour 5 mutants invalidés dans la toxine VapC, il est important de préciser que ces systèmes sont chromosomiques et étudiés jusqu'à des étapes tardives de la symbiose.

En conclusion, les toxines de systèmes TA les plus abondantes sont des RNases, qui comme décrit précédemment, devraient permettre une reprogrammation métabolique et post-transcriptionnelle rapide nécessaire à leur adaptation au sein de la nodosité et/ou en réponse à des plantes hôtes spécifiques. L'étude de systèmes TA encore non (COG3832) ou peu (COG5654) caractérisés pourrait fournir des pistes quant à la présence de ces systèmes chez les Rhizobia, et si oui, leur implication symbiotique. En effet, il serait intéressant d'étudier le phénotype symbiotique de mutants invalidés dans ces gènes particulièrement fréquents chez les Rhizobia. Une telle étude permettrait, à terme, d'optimiser les couples fixateurs vis-à-vis d'une plante hôte donnée et/ou un environnement donné.

Conclusion générale du travail de thèse

Au cours de la thèse, deux objectifs principaux étaient fixés : l'analyse globale des systèmes VapBC de *S. meliloti* en interaction avec *M. truncatula*, et l'identification des cibles de deux toxines VapC, VapC7 et VapC10.

Le premier objectif a permis d'apporter une meilleure compréhension du rôle des systèmes TA VapBC au cours de la symbiose fixatrice. Les trois systèmes identifiés comme jouant un rôle dans l'interaction (VapBC3, VapBC7 et VapBC10) n'affectent pas les mêmes étapes symbiotiques et démontrent l'importance du partenaire bactérien, au niveau de l'efficacité d'infection des cellules végétales, du maintien du bactéroïde et de la rupture symbiotique. Par conséquent, il restera à étudier l'interaction dans des conditions plus « naturelles », de sorte à déterminer si les souches *vapC* mutantes obtenues permettraient une amélioration du rendement végétal et/ou seraient plus adaptées à une interaction spécifique ou à un environnement donné. Ce concept pourrait également être élargi aux autres interactions Rhizobia-Légumineuses, apportant un gain de productivité et/ou une meilleure résistance aux stress abiotiques lors des interactions symbiotiques. Ces symbioses fixatrices d'azote représentent un enjeu primordial dans le contexte sociétal actuel. En effet, la population mondiale augmentant, il est indispensable d'améliorer les pratiques culturales de sorte à favoriser une agriculture durable et raisonnée, où les légumineuses permettent à la fois de nourrir la population et de limiter la pollution des sols ainsi que l'usage très coûteux d'engrais azotés.

Le second objectif a permis d'identifier, pour la première fois, les cibles de toxines VapC d'une bactérie interagissant avec une plante. Cette découverte permet de conforter le parallèle entre bactéries (phyto)pathogènes et symbiotiques, et pourrait, en plus d'être profitable à l'étude de la symbiose fixatrice d'azote, amener à la définition de nouvelles stratégies de lutte antimicrobienne dans le cadre de maladies infectieuses.

En conclusion, ces travaux, originaux et innovants, ont conduit à une meilleure connaissance du rôle des systèmes Toxine-Antitoxine dans l'établissement, le fonctionnement et le maintien de l'interaction symbiotique entre la bactérie et la plante. D'un point de vue fondamental, ces travaux contribueront également à la communauté scientifique qui s'intéresse aux systèmes TA bactériens en général, notamment concernant la compréhension de leur mode d'action et de leurs fonctions biologiques.



Section Matériel et Méthodes



Section Matériel et Méthodes

I. Matériel biologique

a) Matériel végétal

Les expériences sont réalisées sur la plante modèle *Medicago truncatula*, écotype A17. Afin de favoriser la germination, les graines sont scarifiées 5 min dans un bain d'acide sulfurique (H_2SO_4) suivi de 7 rinçages dans de l'eau osmosée stérile. La germination est réalisée sur agar 0.4 %. Les graines sont ensuite placées 24 h à 4°C pour favoriser la synchronisation de la germination puis 48 h à 16°C. Les plants sont ensuite repiqués en pots, dans du sable fin de type B5, et cultivés en chambre de culture (photopériode : 16 h/18 h (jour/nuit) ; température : 26°C/21°C (jour/nuit) ; intensité lumineuse : 360 $\mu E/m^2/s$). Six jours après repiquage, chaque plantule est inoculée avec 10 mL de culture de *S. meliloti* ($DO_{600nm}=0,05$). Le matériel est récolté pour les différentes manipulations entre 21 et 42 jours post-inoculation (jpi).

b) Matériel bactérien

Les différentes souches bactériennes utilisées dans ce travail sont présentées dans le [Tableau 16](#).

Les souches d'*Escherichia coli* sont cultivées sous agitation (190 rpm), à 37°C, en milieu Luria-Bertani (LB) additionné, quand approprié, d'ampicilline, 100 $\mu g/mL$; de kanamycine, 30 $\mu g/mL$; de chloramphénicol, 34 ou 20 $\mu g/mL$; de glucose, 0.2 % ; de L-arabinose, 1 % ; d'IPTG, 0.1 mM.

Les souches de *S. meliloti* sont cultivées sous agitation (190 rpm), à 30°C, en milieu LB supplémenté avec 2.5 mM $MgSO_4$ et 2.5 mM $CaCl_2$ (LB_{MC}), additionné, quand approprié, de streptomycine, 100 $\mu g/mL$; de néomycine, 200 $\mu g/mL$.

Souches	Description	Référence
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	<i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20 φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK-mK+)</i>	(Sambrook et al., 1989)
BL21 (DE3) pLysS	<i>ompT gal dcm lon hsdSB(rB-mB-) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5]) [malB+]K-12(λS) pLysS[T7p20 orip15A], Cm^R</i>	Novagen
BW25113Δ6	<i>[lacIq rrnBT14 Δlac-ZWJ16 hsdR514 ΔaraBADAH33 ΔrhaBADLD78 ΔchpBIK ΔdinJ-yafQ ΔhipBA ΔmazEF ΔrelBE ΔyefM-yoeB]</i>	(Schifano et al., 2014)
UNE52	S17-1 derivative, containing pK19mob2ΩHMB- <i>vapC3</i> plasmid, Kan ^R , Sm ^R	(Pobigaylo et al., 2006)
UNE54	S17-1 derivative, containing pK19mob2ΩHMB plasmid, Kan ^R , Sm ^R	(Pobigaylo et al., 2006)
MT616	<i>Pro-82, thi-1, hsdR17, supE44, recA56, pRK600</i> , Cm ^R	(Finan et al., 1986)
<i>Sinorhizobium meliloti</i>		
Sm2011	Dérivée de SU47, nommée sauvage ou Sm2011, Sm ^R	(Rosenberg et al., 1981)
<i>vapC1</i>	Dérivée de Sm2011, contenant l'insertion du plasmide pKmob19Ω2HMB au sein du gène <i>vapC1</i> , nommée mutant <i>vapC1</i> , Sm ^R Neo ^R	(Lipuma, 2015)
<i>vapC2</i>	Dérivée de Sm2011, contenant l'insertion du plasmide pKmob19Ω2HMB au sein du gène <i>vapC2</i> , nommée mutant <i>vapC2</i> , Sm ^R Neo ^R	This work
<i>vapC2::Tn5</i>	Dérivée de Sm2011, contenant l'insertion du Tn5 au sein du gène <i>vapC2</i> , nommée mutant <i>vapC2-Tn5</i> , Sm ^R Neo ^R	(Pobigaylo et al., 2006)
<i>vapC3</i>	Dérivée de Sm2011, contenant l'insertion du plasmide pKmob19Ω2HMB au sein du gène <i>vapC3</i> , nommée mutant <i>vapC3</i> , Sm ^R Neo ^R	This work
<i>vapC6</i>	Dérivée de Sm2011, contenant l'insertion du plasmide pKmob19Ω2HMB au sein du gène <i>vapC6</i> , nommée mutant <i>vapC6</i> , Sm ^R Neo ^R	(Lipuma, 2015)
<i>vapC7</i>	Dérivée de Sm2011, contenant l'insertion du plasmide pKmob19Ω2HMB au sein du gène <i>vapC7</i> , nommée mutant <i>vapC7</i> , Sm ^R Neo ^R	(Lipuma, 2015)
<i>vapC8</i>	Dérivée de Sm2011, contenant l'insertion du plasmide pKmob19Ω2HMB au sein du gène <i>vapC8</i> , nommée mutant <i>vapC8</i> , Sm ^R Neo ^R	(Lipuma, 2015)
<i>vapC9</i>	Dérivée de Sm2011, contenant l'insertion du plasmide pKmob19Ω2HMB au sein du gène <i>vapC9</i> , nommée mutant <i>vapC9</i> , Sm ^R Neo ^R	This work
<i>vapC10</i>	Dérivée de Sm2011, contenant l'insertion du plasmide pKmob19Ω2HMB au sein du gène <i>vapC10</i> , nommée mutant <i>vapC10</i> , Sm ^R Neo ^R	(Lipuma, 2015)
<i>vapC11</i>	Dérivée de Sm2011, contenant l'insertion du plasmide pKmob19Ω2HMB au sein du gène <i>vapC11</i> , nommée mutant <i>vapC11</i> , Sm ^R Neo ^R	(Lipuma, 2015)

Tableau 16 : Souches bactériennes utilisées dans cette étude

c) Matériel plasmidique

Les plasmides et oligonucléotides utilisés dans cette étude sont listés dans les [Tableaux 17 et 18](#).

Plasmides	Description	Références
Construction des plasmides de clonage		
pJET1.2	Vecteur de clonage, Amp^R	ThermoFisher
pJET- <i>vapC2-Sm</i>	Dérivé du pJET1.2, contenant un fragment du gène <i>vapC2</i> (de la 18 ^{ème} à la 228 ^{ème} position nucléotidique, sur un total de 366 nucléotides), Amp ^R	This work
pJET- <i>vapC9-Sm</i>	Dérivé du pJET1.2, contenant un fragment du gène <i>vapC9</i> (de la 29 ^{ème} à la 316 ^{ème} position nucléotidique, sur un total de 384 nucléotides), Amp ^R	This work
pJET- <i>vapC1-tox</i>	Dérivé du pJET1.2, contenant le gène <i>vapC1</i> , Amp ^R	This work
pJET- <i>vapC2-tox</i>	Dérivé du pJET1.2, contenant le gène <i>vapC2</i> , Amp ^R	This work
pJET- <i>vapC3-tox</i>	Dérivé du pJET1.2, contenant le gène <i>vapC3</i> , Amp ^R	This work
pJET- <i>vapC6-tox</i>	Dérivé du pJET1.2, contenant le gène <i>vapC6</i> , Amp ^R	This work
pJET- <i>vapC8-tox</i>	Dérivé du pJET1.2, contenant le gène <i>vapC8</i> , Amp ^R	This work
pJET- <i>vapC9-tox</i>	Dérivé du pJET1.2, contenant le gène <i>vapC9</i> , Amp ^R	This work
pJET- <i>vapC10-tox</i>	Dérivé du pJET1.2, contenant le gène <i>vapC10</i> , Amp ^R	This work
pJET- <i>vapC11-tox</i>	Dérivé du pJET1.2, contenant le gène <i>vapC11</i> , Amp ^R	This work
pJET- <i>vapB1-tox</i>	Dérivé du pJET1.2, contenant le gène <i>vapB1</i> , Amp ^R	This work
pJET- <i>vapB2-tox</i>	Dérivé du pJET1.2, contenant le gène <i>vapB2</i> , Amp ^R	This work
pJET- <i>vapB3-tox</i>	Dérivé du pJET1.2, contenant le gène <i>vapB3</i> , Amp ^R	This work
pJET- <i>vapB6-tox</i>	Dérivé du pJET1.2, contenant le gène <i>vapB6</i> , Amp ^R	This work
pJET- <i>vapB7-tox</i>	Dérivé du pJET1.2, contenant le gène <i>vapB7</i> , Amp ^R	This work
pJET- <i>vapB8-tox</i>	Dérivé du pJET1.2, contenant le gène <i>vapB8</i> , Amp ^R	This work
pJET- <i>vapB9-tox</i>	Dérivé du pJET1.2, contenant le gène <i>vapB9</i> , Amp ^R	This work
pJET- <i>vapB10-tox</i>	Dérivé du pJET1.2, contenant le gène <i>vapB10</i> , Amp ^R	This work
pJET- <i>vapB11-tox</i>	Dérivé du pJET1.2, contenant le gène <i>vapB11</i> , Amp ^R	This work
Construction des mutants de <i>S. meliloti</i>		
pK19mob2ΩHMB	Vecteur suicide, Kan^R/Neo^R	Tauch et al., 1998
pK19mob2ΩHMB- <i>vapC2</i>	Dérivé de pK19mob2ΩHMB, contenant un fragment du gène <i>vapC2</i> (de la 18 ^{ème} à la 228 ^{ème} position nucléotidique, sur un total de 366 nucléotides), Kan ^R /Neo ^R	This work
pK19mob2ΩHMB- <i>vapC3</i>	Dérivé du pJET1.2, contenant un fragment du gène <i>vapC3</i> , Kan ^R /Neo ^R	(Pobigaylo et al., 2006)
pK19mob2ΩHMB- <i>vapC9</i>	Dérivé du pJET1.2, contenant un fragment du gène <i>vapC9</i> (de la 29 ^{ème} à la 316 ^{ème} position nucléotidique, sur un total de 384 nucléotides), Kan ^R /Neo ^R	This work
Expression des toxines VapC et des antitoxines VapB chez <i>E. coli</i>		
pBAD24	Vecteur d'expression, promoteur (pBAD) inductible à l'arabinose, colE1 ori, Amp^R	Guzman et al. 1995
pBAD24- <i>vapC1</i>	Dérivé du pBAD24, contenant le gène <i>vapC1</i>	This work
pBAD24- <i>vapC2</i>	Dérivé du pBAD24, contenant le gène <i>vapC2</i>	This work
pBAD24- <i>vapC3</i>	Dérivé du pBAD24, contenant le gène <i>vapC3</i>	This work
pBAD24- <i>vapC6</i>	Dérivé du pBAD24, contenant le gène <i>vapC6</i>	This work
pBAD24- <i>vapC7</i>	Dérivé du pBAD24, contenant le gène <i>vapC7</i>	Dusha Ilona
pBAD24- <i>vapC8</i>	Dérivé du pBAD24, contenant le gène <i>vapC8</i>	This work
pBAD24- <i>vapC9</i>	Dérivé du pBAD24, contenant le gène <i>vapC9</i>	This work
pBAD24- <i>vapC10</i>	Dérivé du pBAD24, contenant le gène <i>vapC10</i>	This work
pBAD24- <i>vapC11</i>	Dérivé du pBAD24, contenant le gène <i>vapC11</i>	This work
pRSF1b	Vecteur d'expression, promoteur (T7) inductible à l'IPTG, RSF 1030 ori, Kan^R	Novagen
pRSF1b- <i>vapB2</i>	Dérivé du pRSF1b, contenant le gène <i>vapB2</i>	This work
pRSF1b- <i>vapB3</i>	Dérivé du pRSF1b, contenant le gène <i>vapB3</i>	This work
pRSF1b- <i>vapB6</i>	Dérivé du pRSF1b, contenant le gène <i>vapB6</i>	This work
pRSF1b- <i>vapB7</i>	Dérivé du pRSF1b, contenant le gène <i>vapB7</i>	This work
pRSF1b- <i>vapB8</i>	Dérivé du pRSF1b, contenant le gène <i>vapB8</i>	This work
pRSF1b- <i>vapB9</i>	Dérivé du pRSF1b, contenant le gène <i>vapB9</i>	This work
pRSF1b- <i>vapB10</i>	Dérivé du pRSF1b, contenant le gène <i>vapB10</i>	This work
pRSF1b- <i>vapB11</i>	Dérivé du pRSF1b, contenant le gène <i>vapB11</i>	This work

Tableau 17 : Plasmides utilisés dans cette étude

Gène	ID du gène	Nom de l'amorce	Séquence nucléotidique des amorces	Plasmide final
Amorces utilisées pour la construction des mutants chez <i>S. meliloti</i>				
<i>vapC2</i>	SMc01932	VapC2-HindIII-pk19	5'-CGATACCAAT AagCTT ATCGATCATCTG-3'	pK19mob2ΩHMB
		VapC2-BsrGI-pk19	5'-GGCGATCTCATT GtACa AGGCGATCG-3'	
<i>vapC9</i>	SMc00900	VapC9-HindIII-pk19	5'-tgcaa GCtt CGATTGCCTTCAATGAACAG-3'	pK19mob2ΩHMB
		VapC9-BsrGI-pk19	5'-ctg Taca CCAGGGCATAGGAAAAACAA-3'	
<i>vapC10</i>	SMc02987	VapC10-HindIII-pk19-F	5'-TGCA AaGCTt TTCATTGACGCCTCGGTTAT-3'	pK19mob2ΩHMB
		VapC10-BsrGI-pk19-R	5'- Ctgtac AATCATCGCTTCCTTGCAATC-3'	
Amorces utilisées pour les tests de toxicité et d'antitoxicité				
<i>vapB2</i>	SMc01933	VapB2-BsaI-Tox-F	5'-GTGCATATCATTGGg GtctcCca TGCGAGCC-3'	pRSF1b
		VapB2-SalI-Tox-R	5'-GGATATTGGT gTCGAc CAGTGCCTACC-3'	
<i>vapB3</i>	SMc01176	VapB3-BsaI-Tox-F	5'-GTAAAATGTAAGGg GtcTcGCa TGCC-3'	pRSF1b
		VapB3-SalI-Tox-R	5'-GGTTCGT GTCGAC GCCGATCATT-3'	
<i>vapB6</i>	SMc03136	VapB6-NcoI-Tox-F	5'-CTACTGATGAGGTATT GCCaTGGA -3'	pRSF1b
		VapB6-SalI-Tox-R	5'-ACGTTGGT gTCGAC CGCGA-3'	
<i>vapB7</i>	SMc04408	VapB7-BsaI-Tox-F	5'-GGg GtctcCC ATGCCCCATC-3'	pRSF1b
		VapB7-XhoI-Tox-R	5'-GGCGTTGGT cTCGAGA ATATGGGAGATCACC-3'	
<i>vapB8</i>	SMc00392	VapB8-NcoI-Tox-F	5'-GTCAGGAGGGT GcCaTGGA CG-3'	pRSF1b
		VapB8-SalI-Tox-R	5'-GACAAT CgTCGAC GTGTCCAGATAGA-3'	
<i>vapB9</i>	SMc00899	VapB9-NcoI-Tox-F	5'-CCAGGAAGCAT CccATGGCG -3'	pRSF1b
		VapB9-SalI-Tox-R	5'-ATGGCGGATGT GTCGAc GACCATTA-3'	
<i>vapB10</i>	SMc02988	VapB10-BsaI-Tox-F	5'-CCTCGAAAGG AgTctcGc ATG-3'	pRSF1b
		VapB10-XhoI-Tox-R	5'-GAATGGC ctCGA AACCGAGG-3'	
<i>vapB11</i>	SMc02716	VapB11-NcoI-Tox-F	5'-GGATATCC ccATGG CTCTCTAC-3'	pRSF1b
		VapB11-SalI-Tox-R	5'-ATCGCAACGATGACGGAGCC-3' ***	
<i>vapC1</i>	SMc02657	VapC1-BsaI-Tox-F	5'-GCGT GGTctcGCa TGACGCTGGTCGA-3'	pBAD24
		VapC1-SalI-Tox-R	5'-TCG AgTCGAC GATCTGCTATTTC-3'	
<i>vapC2</i>	SMc01932	VapC2-BsaI-Tox-F	5'-GAGAAGGT GgGtctCGc ATGGTAGGCGCAC-3'	pBAD24
		VapC2-SalI-Tox-R	5'-GATCACTAAGTTTAG GTcgac AAGCTCGCGAT-3'	
<i>vapC3</i>	SMc01177	VapC3-BsaI-Tox-F	5'-CGGAGCC GgtctCGc ATGATCGGCGTCGA-3'	pBAD24
		VapC3-SalI-Tox-R	5'-TCAGGGCC Agtcgac GCTGCC-3'	
<i>vapC6</i>	SMc03137	VapC6-BsaI-Tox-F	5'-ATGAGCTTTACGAG GgtctcCca TGAGGGTCGCG-3'	pBAD24
		VapC6-SalI-Tox-R	5'-GCGCGCGAA gtcGAC GGATTACTC-3'	
<i>vapC8</i>	SMc00393	VapC8-BsaI-Tox-F	5'-GCGGGATGACGAT gGtctCTc ATGCTCTATC-3'	pBAD24
		VapC8-XhoI-Tox-R	5'-GAGGCTCC CtcgAGT CAGTCGCGA-3'	
<i>vapC9</i>	SMc00900	VapC9-BsaI-Tox-F	5'-ACGAGGATGGACT gggtctTc ATGGTCATCGAC-3'	pBAD24
		VapC9-SalI-Tox-R	5'-GCTTCCT GTCgac CAGCTGCGCG-3'	
<i>vapC10</i>	SMc02987	VapC10-BsaI-Tox-F	5'-TGTGGGG GgTctCTc ATGCTGTTTATTG-3'	pBAD24
		VapC10-SalI-Tox-R	5'-CAGGGTTTGG CGTcGac TTTCCGATAGACC-3'	
<i>vapC11</i>	SMc02715	VapC11-BsaI-Tox-F	5'-GAGCTTTGGGAG GgtctCGc aTGAGCTTCGTCG-3'	pBAD24
		VapC11-SalI-Tox-R	5'-TTTTCG Gtcgac GGCGCAAGTGCTCTAAC-3'	

Tableau 18 : Amorces utilisées dans cette étude

Les nucléotides en gras correspondent aux sites de restriction utilisés, nommés dans l'amorce, et ceux en minuscule correspondent aux mismatches introduits pour la création du site ou pour favoriser la production de la protéine lorsque le codon initiateur est différent de ATG. Les astérisques signifient qu'aucun site de restriction n'a été créé car naturellement présent après le codon stop.

II. Tests de viabilité bactérienne chez *E. coli*

1) Test de toxicité des toxines VapC1, VapC2, VapC3, VapC6, VapC7, VapC8, VapC9, VapC10 et VapC11 de *S. meliloti* chez *E. coli*

a) Clonage des gènes *vapC* dans le vecteur d'expression pBAD24

Afin de produire chez *E. coli* les protéines VapC de *S. meliloti*, la séquence codante des gènes d'intérêt est introduite dans le vecteur d'expression pBAD24, dont le promoteur pBAD est inducible de façon dose dépendante par l'arabinose (**Annexe 1**, (Guzman et al., 1995)), au niveau des sites de restriction *NcoI/SalI*. Pour ce faire, les sites 5' *NcoI* ou *BsaI* compatible avec *NcoI*, et 3' *SalI* ou *XhoI* compatible avec *SalI* ont été créés dans la séquence codante des gènes *vapC* respectivement au niveau du site d'initiation de la traduction et après le codon STOP, par amplification PCR. L'amplification est réalisée à l'aide des couples d'amorces spécifiques des gènes *vapC* (**Tableau 18**) en utilisant une Taq polymérase d'haute-fidélité (Advantage®, Clontech) dans les conditions recommandées par le fournisseur. Les séquences amplifiées sont ensuite clonées dans le plasmide pJET1.2 (Thermo Fisher Scientific) en suivant le protocole du fournisseur et introduites dans une souche d'*E. coli* DH5α thermo-compétente préparée selon le protocole d'Inoue et al., 1990. Après vérification des clones par séquençage (Beckman Coulter Genomics devenu Genewiz), les plasmides recombinants purifiés (Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System, Promega) sont digérés par *BsaI* ou *NcoI* et *SalI* ou *XhoI* (New England Biolabs). Le fragment *vapC* extrait est ensuite cloné dans le plasmide pBAD24 doublement digéré par *NcoI* et *SalI* (T4 DNA ligase, Promega ; 4°C, ON, rapport vecteur/insert : 1/ 3). Les plasmides pBAD24-*vapC* ainsi obtenus sont introduits dans la souche d'*E. coli* DH5α thermo-compétente et vérifiés par séquençage (Genewiz).

b) Test de viabilité bactérienne des toxines VapC

Les souches d'*E. coli* porteuses des plasmides pBAD24-*vapC* sont cultivées en duplicata biologique, à 37°C, ON, en milieu LB supplémenté d'ampicilline et de glucose 0.2%. Les cultures, diluées à $DO_{600nm}=0,05$ sont ensuite, pour chaque duplicata, cultivées en milieu LB seul jusqu'à $DO_{600nm}=0,4$ qui constitue le temps 0 de cinétique (T0). A T0, les cultures dépourvues sont supplémentées en L-arabinose (1%, induction dose dépendante) afin d'induire l'expression de *vapC* ou supplémentées en glucose 0.2%. Le glucose empêche toute expression du promoteur inducible à l'arabinose (*araBAD*) en absence d'inducteur. Pour chaque expérience, la souche d'*E. coli* contenant le plasmide pBAD24

sans gène d'intérêt (pBAD24 vide) est utilisée comme contrôle. Pour chaque temps étudié, un aliquot de culture est prélevé, dilué (dilutions sérielles entre 10^{-1} et 10^{-9}) et déposé (10 μ L) en duplicata technique sur milieu LB agar (1,5%) glucose (0,2%). La viabilité bactérienne est estimée par dénombrement des colonies après 18 h de culture à 37°C selon la formule suivante :

$$\text{Toxicité} = \log(10) \frac{[\text{moyenne} (\text{Ctrl}_1 + \text{Ctrl}_2 + \text{VapC10}_1 + \text{VapC10}_2)^{\text{glucose}} + (\text{Ctrl}_1 + \text{Ctrl}_2)^{\text{arabinose}}]}{[\text{moyenne} (\text{VapC10}_1 + \text{VapC10}_2)^{\text{arabinose}}]}$$

2) Test d'antitoxicité des systèmes VapBC2, VapBC3, VapBC6, VapBC7, VapBC8, VapBC9, VapBC10 et VapBC11 de *S. meliloti* chez *E. coli*

a) Clonage des gènes *vapB* dans le vecteur d'expression pRSF1b

Afin de produire chez *E. coli* les protéines VapB de *S. meliloti*, la séquence codante des gènes d'intérêt est introduite dans le vecteur d'expression pRSF1b, dont le promoteur T7 est inductible de façon dose dépendante par l'IPTG (**Annexe 2**, Novagen), au niveau des sites de restriction *NcoI/SalI*. Pour ce faire, les sites 5' *NcoI* ou *BsaI* compatible avec *NcoI*, et 3' *SalI* ou *XhoI* compatible avec *SalI* ont été créés dans la séquence codante des gènes *vapB* respectivement au niveau du site d'initiation de la traduction et après le codon STOP, par amplification PCR. L'amplification est réalisée à l'aide des couples d'amorces spécifiques des gènes *vapB* (**Tableau 18**) en utilisant une Taq polymérase d'haute-fidélité (Advantage®, Clontech) dans les conditions recommandées par le fournisseur. Les séquences amplifiées sont ensuite clonées dans le plasmide pJET1.2 (Thermo Fisher Scientific) en suivant le protocole du fournisseur et introduites dans une souche d'*E. coli* DH5 α thermo-compétente préparée selon le protocole d'*Inoue et al., 1990*. Après vérification des clones par séquençage (Beckman Coulter Genomics devenu Genewiz), les plasmides recombinants purifiés (Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System, Promega) sont digérés par *BsaI* ou *NcoI* et *SalI* ou *XhoI* (New England Biolabs). Le fragment *vapB* extrait est ensuite cloné dans le plasmide pRSF1b doublement digéré par *NcoI* et *SalI* (T4 DNA ligase, Promega ; 4°C, ON, rapport vecteur/insert : 1/ 3). Les plasmides pRSF1b-*vapB* ainsi obtenus sont introduits dans la souche d'*E. coli* DH5 α thermo-compétente et vérifiés par séquençage (Genewiz).

b) Test de viabilité bactérienne des modules VapBC

Les plasmides pRSF1b-*vapB* et pBAD24-*vapC* sont introduits dans la souche d'*E. coli* BL21 (DE3) pLysS thermo-compétente soit seul soit ensemble. Les souches sont cultivées en duplicata biologique, à 37°C, ON, en milieu LB supplémenté de glucose 0.2% et de chloramphenicol, d'ampicilline et/ou de kanamycine. Les cultures, diluées à $DO_{600nm}=0,05$ sont ensuite, pour chaque duplicata, cultivées en milieu LB seul supplémenté des antibiotiques appropriés jusqu'à $DO_{600nm}=0,15$ qui constitue le temps 0 de cinétique (T0). A T0, les trois souches sont supplémentées en L-arabinose (1%, induction dose dépendante) et d'IPTG (100 μ M) afin d'induire l'expression de *vapC* et de *vapB* respectivement. Pour chaque module étudié, la DO_{600nm} est mesurée toutes les 30 min.

III. Analyse phénotypique de la capacité fixatrice d'azote lors de l'interaction entre *M. truncatula* et les mutants d'inactivation *vapC1*, *vapC2*, *vapC3*, *vapC6*, *vapC7*, *vapC8*, *vapC9*, *vapC10* et *vapC11*

1) Construction des mutants *vapC2*, *vapC3* et *vapC9* chez *S. meliloti*

a) Clonage des gènes *vapC2* et *vapC9*

Afin d'invalider les gènes codant pour les protéines VapC2 et VapC9 de *S. meliloti*, un fragment interne de la séquence codante des gènes d'intérêt est introduit dans le vecteur pk19mob2 Ω HMB suicide qui servira à effectuer une simple recombinaison homologue chez *S. meliloti* (Annexe 3, (Luo et al., 2005)) au niveau des sites de restriction *HindIII*/*BsrGI*. Pour ce faire, les sites 5' *HindIII* et 3' *BsrGI* ont été créés dans le fragment interne des gènes *vapC*, respectivement en début de la séquence codante et avant la position d'au moins un des derniers codons des acides aminés essentiels au site actif, par amplification PCR. L'amplification est réalisée à l'aide des couples d'amorces spécifiques des gènes *vapC* (Tableau 18) en utilisant une Taq polymérase d'haute-fidélité (Advantage®, Clontech) dans les conditions recommandées par le fournisseur. Les séquences amplifiées sont ensuite clonées dans le plasmide pJET1.2 (Thermo Fisher Scientific) en suivant le protocole du fournisseur et introduites dans une souche d'*E. coli* DH5 α thermo-compétente préparée selon le protocole d'Inoue et al., 1990. Après vérification des clones par séquençage (Beckman Coulter Genomics devenu Genewiz), les plasmides recombinants purifiés (Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System, Promega) sont digérés par *HindIII* et *BsrGI* (New England Biolabs). Le fragment *vapC* extrait est ensuite cloné par ligation dans le plasmide pk19mob2 Ω HMB doublement digéré par *HindIII* et *BsrGI* (T4 DNA ligase,

Promega ; 4°C, ON, rapport vecteur/insert : 1/ 3). Les plasmides pk19mob2ΩHMB-*vapC* ainsi obtenus sont introduits dans la souche d'*E. coli* DH5α thermo-compétente et vérifiés par séquençage (Genewiz).

b) Recombinaison homologue par conjugaison triparentale

La conjugaison triparentale utilisée pour le transfert de plasmides depuis une souche d'*E. coli* vers une souche de *S. meliloti*, a été décrite par Ditta et al., 1980. Elle fait intervenir trois partenaires : une souche donneuse d'*E. coli*, contenant un fragment du gène d'intérêt cloné dans un plasmide suicide pour *S. meliloti*, une souche auxiliaire (Helper) d'*E. coli* contenant le plasmide pRK600 nécessaire à la mobilisation en *trans* du plasmide de la souche donneuse, et une souche receveuse de *S. meliloti* présentant en général une résistance antibiotique permettant la sélection des exconjugants (Figure 74). La souche donneuse DH5α porteuse du plasmide pk19mob2ΩHMB-*vapC* (Kan^R/Neo^R), la souche auxiliaire MT616 (Cm^R) et la souche receveuse *S. meliloti* 2011 (Sm^R) sont cultivées en milieu riche pendant 16h sous agitation (190 rpm) avec les antibiotiques appropriés. La conjugaison est obtenue par mélange de 20 µL de chacune des trois souches sur des filtres de nitrocellulose (0.45 µm) placé sur un milieu LB agar (1.5%) et incubé 18h à 30°C. Les filtres sont ensuite introduits dans 1 mL de LB et les cellules, remises en suspension, sont ensuite déposées sur milieu solide LB_{MC} contenant les antibiotiques streptomycine et néomycine pour la sélection des transconjugants.

Les clones ainsi obtenus sont vérifiés par amplification PCR des gènes natifs (contrôle négatif) et des jonctions gènes-plasmides à l'aide des amorces universelles M13F et M13R du plasmide, et des amorces utilisées pour la réalisation du clonage.

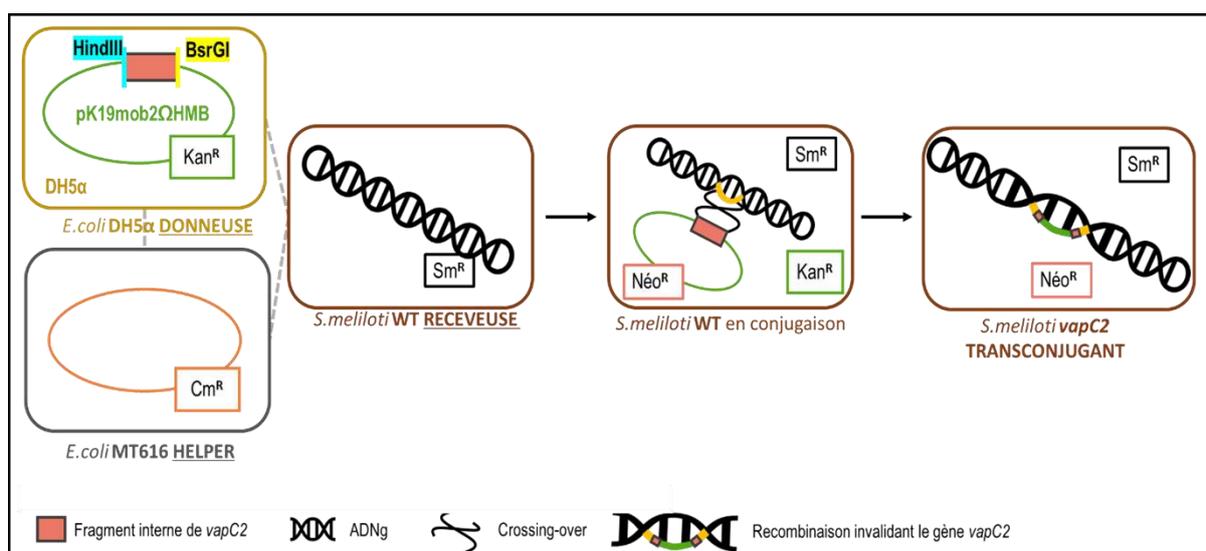


Figure 74 : Exemple de l'invalidation de la toxine VapC2 obtenue par conjugaison triparentale

2) Test de croissance de l'ensemble des mutants *vapC* chez *S. meliloti*

Les souches sauvage et mutantes invalidées dans le gène de la toxine *vapC* sont cultivées en dupliqua biologique, en milieu LB_{MC} supplémenté avec les antibiotiques appropriés, à 30°C, sous agitation (190 rpm) pendant 16 h. La croissance des cultures bactériennes, à partir des précultures diluées à une DO_{600nm}=0.01, est estimée par un suivi de la DO_{600nm} effectué toutes les 2h pendant 36 h. Cette expérience a été répétée trois fois.

3) Mesure de la capacité fixatrice d'azote pour l'ensemble des interactions

La capacité fixatrice d'azote des racines de *M. truncatula* inoculées par les souches mutantes ou sauvage est déterminée de manière indirecte en exploitant l'aptitude de la nitrogénase à réduire l'acétylène (C₂H₂) en éthylène (C₂H₄). Cette activité réductrice d'acétylène (A.R.A) est mesurée par chromatographie en phase gazeuse (ATI-Unicam, model 610, Cambridge, UK) à l'aide d'une colonne Porapak T. Les mesures sont réalisées, pour chaque interaction, sur les parties racinaires de 12 à 15 plantes réparties par 3 au sein de chaque pilulier de 30 mL contenant 10% d'acétylène et placés à 28°C pendant 30 min. 200 µL de gaz prélevés dans chaque pilulier sont injectés dans le chromatographe afin de séparer l'éthylène de l'acétylène (gaz vecteur : azote ; détecteur à ionisation de flamme). L'activité fixatrice d'azote est exprimée en nmoles d'éthylène formées/heure/mg de poids frais de nodosités, ou par nmoles d'éthylène formées/heure/plante. Les nodosités sont prélevées et directement pesées (mutant *vapC1*, *vapC2*, *vapC6*, *vapC8*, *vapC9* et *vapC11*) ou comptées avant la pesée (mutant *vapC3*, *vapC7* et *vapC10*).

4) Rendement végétal des plantes en interaction avec les mutants *vapC3*, *vapC7* et *vapC10*

Afin de mesurer l'effet sur le rendement végétal des mutants d'invalidation des toxines VapC3, VapC7 et VapC10 en interaction avec *M. truncatula*, la taille et le poids frais des parties aériennes de 15 plantes par souche sont déterminés 6 semaines post-inoculation (spi). Le mutant *vapC10* est également étudié à 3 spi.

5) Analyses statistiques de la caractérisation phénotypique des mutants *vapC* en interaction avec *M. truncatula*

Le test Shapiro est utilisé pour tester la normalité de la distribution des valeurs et le test de Bartlett l'homogénéité des variances. Lorsque ces deux conditions sont respectées (p-values > 0.05), un test t de Student est utilisé. Si seule l'équivalence n'est pas respectée (poids des nodosités), les deux échantillons sont comparés à l'aide d'un test de Welch. Enfin, si la distribution ne suit pas une loi normale (taille, nombre de nodosités), le test non paramétrique de Wilcoxon est choisi.

La significativité des différences de la capacité fixatrice d'azote des mutants *vapC1*, *vapC2*, *vapC3*, *vapC6*, *vapC7*, *vapC8*, *vapC9*, *vapC10* et *vapC11*, par rapport au contrôle, a été estimée par un test t de Student. La significativité des différences du poids des nodosités par plante induit par ces mutants par rapport au contrôle a été estimée par un test de Welch.

La significativité des différences du nombre de nodosités des mutants *vapC3* et *vapC7* par rapport à la condition sauvage a été estimée à l'aide d'un test χ^2 (distribution des données suivant une loi de Poisson). Celle du poids moyen des nodosités et de la taille et du poids des parties aériennes de la condition *vapC3* ou *vapC7* par rapport à la condition sauvage a été estimée par un test de Welch.

Pour l'ensemble des tests décrits ci-dessus, la représentation des p-value, calculées à l'aide du logiciel R, correspond à ns>0.05, *<0.05, **<0.01 et ***<0.001. Dans les figures, le nombre de répétitions biologiques (N) et le nombre de mesures effectuées au sein de chaque répétition biologique (n) sont représentés.

IV. Caractérisation histologique et moléculaire des nodosités de *M. truncatula* induites par les mutants d'inactivation *vapC3*, *vapC7* et *vapC10*

1) Phénotype macroscopique des nodosités

Les nodosités, induites par la souche sauvage ou les souches mutantes *vapC3* et *vapC7*, âgées de 6 spi, sont récoltées sur les cinq premiers cm en dessous du collet, puis sont observées à la loupe binoculaire Leica MZFLIII. La longueur des nodosités, la présence ou absence de nodosités sénescents (estimée par un changement de forme et de couleur, verte (leghémoglobine dégradée) et rose (leghémoglobine fonctionnelle)) et la taille des zones de sénescence et de fixation sont mesurées à l'aide du logiciel AxioVision LE. Les résultats correspondent à un total de 174 nodosités induites par la souche sauvage ou par la souche mutante *vapC3* et de 200 nodosités induites par la souche mutante *vapC7*, obtenues à partir de deux réplicats biologiques.

2) Analyse statistique des phénotypes macroscopiques des nodosités

La significativité des différences, entre le nombre de nodosités sénescents et fixatrices induites par les mutants *vapC3* et *vapC7* par rapport à la condition sauvage, a été déterminée par un test χ^2 (distribution binomiale). La présence de différence, entre les conditions d'inoculation, sur les mesures de longueur totale des nodosités, des zones de sénescence et de fixation, et la détermination de la proportion relative de la zone de sénescence, a été déterminée par un test de multicomparaison non-paramétrique de Kruskal Wallis. Puis, la significativité des différences, entre chaque condition deux à deux, a été déterminée par un test de comparaison par paire de Wilcoxon avec un ajustement de Bonferroni des p-values. p-value : ns>0.05, *<0.05, **<0.01, ***<0.001.

3) Estimation de la viabilité bactéroïdienne par la technique du Live/Dead

Les nodosités, âgées de 6 spi, induites par les souches sauvage ou mutantes *vapC3* et *vapC7*, sont prélevées sur les cinq premiers cm depuis le collet. Les nodosités sont incluses dans de l'agarose à 6%, à 80°C. Des coupes de 120 μm d'épaisseur sont réalisées à l'aide du vibratome Leica HM650V. Ces coupes sont ensuite incubées 20 min à température ambiante dans du tampon phosphate supplémenté avec un mélange de SYTO9 (pénétrant dans toutes les cellules engendrant une

fluorescence verte des cellules) et d'iode de propidium (pénétrant seulement les cellules endommagées) à l'aide du kit Live/Dead BaLight™, Invitrogen, selon les recommandations du fournisseur. Les coupes sont ensuite lavées trois fois dans du tampon phosphate puis observées au microscope confocal LSM880. Les conditions de détection sont décrites dans l'article (Yang et al., 2020b). Cette expérience a été réalisée en trois répétitions biologiques.

4) Analyse de l'expression de gènes marqueurs de la nodosité

a) Extraction des ARNs totaux

Les nodosités broyées (80mg) dans l'azote liquide sont incubées dans 1 mL de RNazol RT (Sigma) et 400 µL d'eau DEPC pendant 15 min, à température ambiante. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation (12000 g, 15 min, 4°C). Les ARNs sont précipités par addition de 500 µL d'isopropanol (10 min, température ambiante) puis centrifugés (12'000 g, 15 min, 4°C). Le culot d'ARNs obtenu est lavé par deux fois 1 mL d'éthanol 75% puis centrifugé (12'000 g, 5 min, 4°C). Le culot est séché 5 min à température ambiante puis resuspendu dans 30 µL d'eau DEPC. Les ARNs sont conservés à -80°C.

Pour quantifier les ARNs et normaliser les échantillons, une analyse par spectrophotométrie est effectuée à l'aide d'un Nanodrop® (balayage spectral de 220 à 320 nm). La qualité des ARNs est déterminée par calcul des ratios DO_{260nm}/DO_{280nm} et DO_{260nm}/DO_{230nm} , et visualisée par migration électrophorétique des échantillons (1 µg) sur gel d'agarose 1% /TAE 1X additionnée de BET. Afin d'éliminer une éventuelle contamination par de l'ADNg, les échantillons sont traités à la DNase à l'aide du kit RQ1 RNase-Free DNase selon les recommandations du fournisseur (Promega®).

b) Reverse Transcription et PCR quantitative

La synthèse des brins d'ADNc est réalisée à l'aide du kit GoScript™ Reverse Transcription System (Promega®) en présence d'un oligonucléotide poly-dT et de Random Primers selon les recommandations du fournisseur.

L'amplification par PCR (GoTaq® qPCR Master Mix, Promega) est réalisée en 3 réplicats techniques pour chaque réplicat biologique. Les séquences des amorces spécifiques des gènes étudiés sont présentées en **Tableau 19**. Les mélanges réactionnels contiennent dans un volume final de 15 µL: 7.5 µL de qPCR Master Mix (GoTaq® Hot Start Polymerase, dNTPs, dsDNA-binding dye, MgCl₂), 0.15 µL de CXR (carboxy-X-rhodamine), 1 µM des amorces sens et antisens et 5 µL (5 ng) d'ADNc. La réaction

de PCR quantitative (Agilent Aria Mx[®]) est réalisée selon le protocole suivant : 3 min à 95°C, 40 cycles: 3s à 95°C, 30s à 60°C, melting curves : de 65°C à 95°C par incrément de 0.5°C. Les intensités de fluorescence sont traitées avec le logiciel Aria MX[®]. Le nombre de cycles effectués (Ct) pour atteindre est déterminé pour chaque réplicat technique. Le Ct des gènes d'intérêt est normalisé par rapport aux Ct des gènes « constitutifs », MTC27 et A38 (*vapC10*) ou A38 et A39 (*vapC3* et *vapC7*) (del Giudice et al., 2011). La différence d'expression d'un gène cible entre des plantes inoculées avec la souche WT ou mutante est analysée à l'aide d'un package RqPCRBase_vs.1.4.R du logiciel R (Hilliou and Tran, 2013).

Gène	ID du gène	Référence	Description	Séquence de l'amorce	Efficacité
Amorces de RTqPCR utilisées pour la normalisation de l'expression des gènes de plante					
MTC27	Mtr.27459.1.S1_s_at	(del Giudice et al., 2011)	Gène de ménage	F : 5'-GTGGGAGGTTGAGGGAAAGT-3' R : 5'-TTGAAGGTCCTTGAGCTTGC-3'	1.94
A38	Mtr.10324.1.S1_at	(del Giudice et al., 2011)	Gène de ménage	F : 5'-TCGTGGTGGTGGTTATCAAA-3' R : 5'-TTCAGACCTCCATTGACA-3'	1.85
Amorces de RTqPCR utilisées l'expression des gènes de plante					
Leg	Mtr.27725.1.S1_s_at	(Mergaert et al., 2003)	Légghémoglobine 1	F : 5'- ATAGCTCATATGAGGCATTCAA-3' R : 5'- GAGTTGAGGACTATCTTGTACT-3'	1.83
NCR001	Mtr.10380.1.S1_at	(Mergaert et al., 2003)	Nodule Cystein Rich peptide	F : 5'-CACTTCTGACGCTAACTG-3' R : 5'-TGAACCTTCAATATACCACC-3'	1.97
VPE	Mtr.29213.1.S1_s_at	(Pierre et al., 2014)	Vacuolar Processing Enzyme	F : 5'-CCAGGGGTTCTTGGTATGCCCG-3' R : 5'-ACTGCCAGATTCACATGCCCTCCA-3'	1.95
CP6	Mtr.45750.1.S1_at	(Pierre et al., 2014)	Cysteine Protease	F : 5'-CCTGCTGCTACTATTGCTGGATATG-3' R : 5'-CACTCGCATCAATGGCTACGG-3'	1.86
Amorces de RTqPCR utilisées pour la normalisation de l'expression des gènes bactériens					
betS	Smb20333	(Boscari et al., 2002)	Gène de ménage	F : 5'-AAATCCACCATGCCAGTAG-3' R : 5'-CGTCCAGAACATCGGTCTCT-3'	1.96
16S	rRNA-16S	(Yang et al., 2020b)	Gène de ménage	F : 5'-GATAAGCCGAGAGGAAGGTG-3' R : 5'-GTGTAGCCAGCCCGTAAG-3'	1.96
Amorces de RTqPCR utilisées l'expression des gènes bactériens					
ctrA	Smc00654	(Pini et al., 2015)	Régulateur transcriptionnel du cycle cellulaire	F : 5'-ATGCCAGTCGGTCATCTC-3' R : 5'-CTGGTATTCCTTGCCCGTC-3'	2.03
nifA	Sma0815	(Cabanes et al., 2000)	Activateur transcriptionnel de la nitrogénase	F : 5'-TCTTTGACCTGGCGAGAGTT-3' R : 5'-ACGGTCGTGATCTCCATTTTC-3'	1.95
nifH	SMa0825	(Cabanes et al., 2000)	Protéine Fe de la nitrogénase	F : 5'-GTTATCACCTCGATCAACTTCT-3' R : 5'-CGATGTAGATTTCTGAGCCT-3'	2.25
fixC	Sma0817	(Cabanes et al., 2000)	Oxydoréductase FixC	F : 5'-TGAAGGATGCGTGATTGAGG-3' R : 5'-TGGATTGAAGGGTGGCGT-3'	2.05
hmp	SMa1191	(Cam et al., 2012)	Flavohémoprotéine	F : 5'-CGCCTGTTCTTCAACCTG-3' R : 5'-GACGACCTTCTTCTCACTG-3'	2.08
rpoH1	SMc00646	(Alunni and Gourion, 2016)	Facteur sigma RpoH de l'ARN polymérase	F : 5'-CGCCTGTTCTTCAACCTG-3' R : 5'-GACGACCTTCTTCTCACTG-3'	2.05
vapB10	SMc02988	This work	Antitoxine du système VapBC10	F : 5'-CTTATCAGCCTGACCAAATCCA-3' R : 5'-TCTCGGACAGGAAGAACGG-3'	2.17

Tableau 19 : Liste des amorces utilisées pour les expériences de RTqPCR.

V. Identification des cibles des toxines VapC7 et VapC10 par MORE RNA-seq

1) Expression des toxines en BW25113Δ6 et extraction des ARNs pour le MORE RNA-seq

Les plasmides pBAD24, pBAD24-*vapC7* et pBAD24-*vapC10* ont été introduits dans la souche BW25113Δ6 d'*E. coli*, reçue depuis le laboratoire de Nancy Woychik. Les précultures de chaque souche, poussées à 37°C, 190 rpm en milieu LB supplémenté par 0.2% de glucose et de l'ampicilline, sont diluées à une $DO_{600nm} = 0.05$. Lorsque les cultures atteignent une $DO_{600nm} = 0.4$, phase exponentielle, le milieu est remplacé par du LB supplémenté par 1% de L-arabinose et d'ampicilline, puis les bactéries sont cultivées pendant 30 min. Ensuite, l'extraction d'ARN total a été effectuée comme précédemment décrite par Schifano et al., 2014. 20 µg d'ARN sont traités avec la DNase RQ1 RNase-free (Promega), selon les recommandations du fournisseur. Pour éliminer la DNase et son tampon, les ARNs sont purifiés à l'aide de phénol:chloroforme puis précipités à l'éthanol. La quantité et la qualité des ARNs ont été estimées à l'aide d'un Bionalyzer Agilent 2100 (puce Prokaryote Total RNA). Les ARNs totaux obtenus possèdent des scores d'intégrité (RIN) compris entre 9.6 et 10, indiquant une haute qualité d'extraction (VapC7 : [Figure 75](#), VapC10 : [Supplementary Figure 2](#) de l'article scientifique).

2) MORE RNA-seq : préparation des banques d'ADNc pour le séquenceur Illumina

Les ARNs dégradés par une RNase de domaine PIN peuvent produire soit des extrémités 5'-hydroxyl (5'-OH) soit 5'-monophosphate (5'-P). Pour convertir les extrémités 5'-OH en 5'-P, les banques ARNs ont été traitées avec la kinase polynucléotide T4. Ensuite, les adaptateurs 5' Illumina, possédant une séquence (code barre) spécifique à chaque banque, sont ligués sur les extrémités 5'-P des ARNs dégradés. Cette étape permet la reconnaissance des futures banques d'ADNc et de discriminer les ARNs non dégradés possédant des extrémités 5'-PP ou 5'-PPP. Après ligation, la génération des banques d'ADNs a été réalisée par une reverse transcription utilisant un adaptateur 3' commun Illumina. Seulement les ADNc migrant en dessous des 300 nucléotides ont été isolés par une excision sur gel. Enfin, les banques d'ADNc ont été séquencées à l'aide d'une puce Illumina MiSeq, dans un seul sens (single-end) et sur une profondeur de 150 pb (1 x 150). Toutes ces étapes ont été réalisées par l'entreprise de séquençage Fasteris (Suisse).

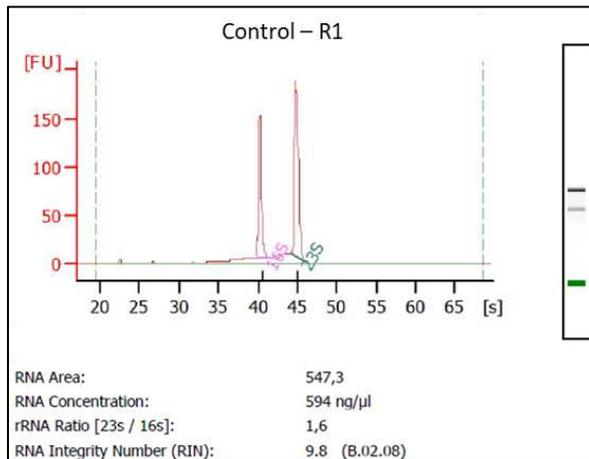
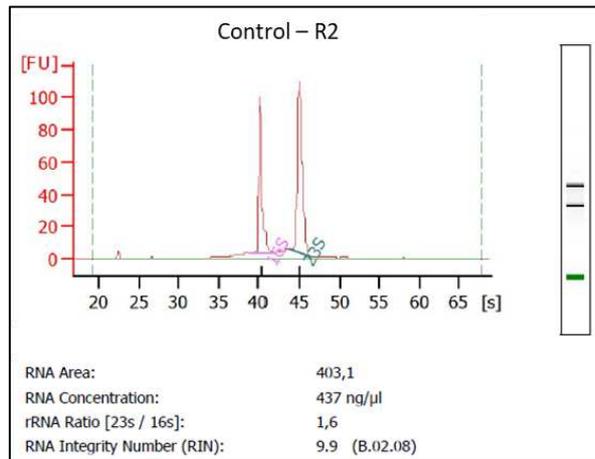
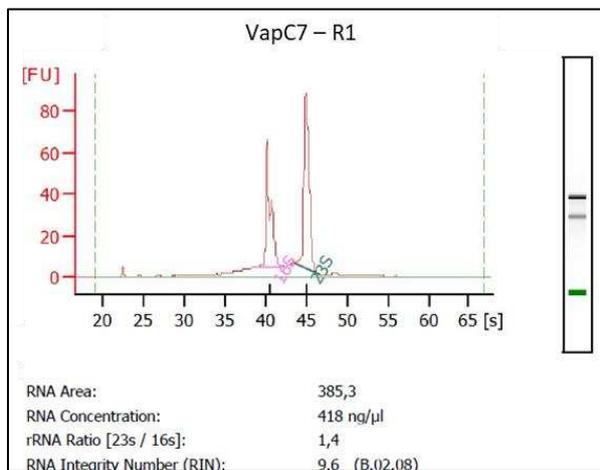
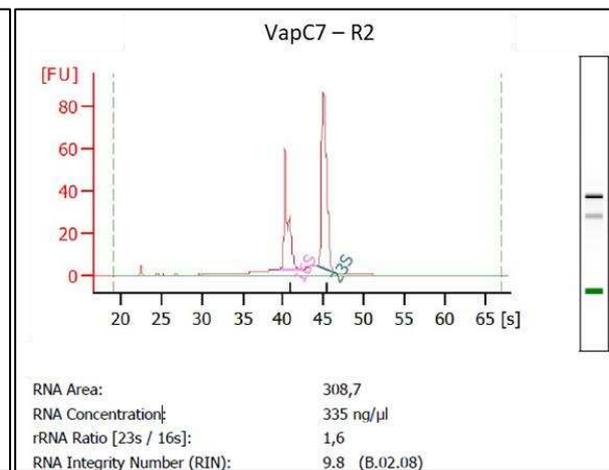
A**B****C****D**

Figure 75 : Contrôle qualité des extractions d'ARNs après traitement DNase mesuré par le Bioanalyzer.

Les résultats obtenus correspondent aux deux répliqués de la condition contrôle (A,B) et de l'induction de la toxine VapC7 (C,D).

3) Traitement bioinformatique : nettoyage, alignement et table de comptage des “reads”

Après séquençage, les séquences des reads obtenus ont été traités comme suit. Tout d’abord, les adaptateurs utilisés pour le séquençage et les séquences inférieures à 27 nucléotides ont été éliminés, de sorte à éviter un alignement aléatoire des séquences sur le génome d’*E. coli*. Puis, un contrôle qualité des banques d’ADNc a été effectué avec l’outil FastQC pour estimer la localisation et la fréquence des positions N (nucléotide non identifié) ainsi que la distribution des longueurs des séquences. Les banques nettoyées sont soumises à un alignement sur le génome de la souche BW25113 (CP009273.1), grâce à l’outil bowtie2 (version 2.3.5) à l’aide des paramètres suivants : very-sensitive -D 20 -R 3 -N 0 -L 20 -i S,1,0.50, end-to-end comme décrits par (Culviner and Laub, 2018), générant des fichiers au format SAM. Pour chaque condition, entre 7.5 and 10.6 millions de reads sont alignés sur le génome BW25113 (VapC7 : **Tableau 20**). L’interconversion des formats des fichiers SAM et BAM est réalisée avec samtools (version 1.7), à l’aide de htslib 1.7 (Genome Research Ltd), pour permettre les étapes suivantes. La normalisation des fichiers BAM s’effectue avec deeptools (version 3.1.3), tool = bamCoverage. Enfin, les alignements et la couverture des reads de chaque banque sont observés sur le portail “myGenomeBrowser”.

Réplikat biologique	Condition	Nombre total de reads	Nombre total de reads nettoyés	Nombre total de reads alignés	ARNr %	non ARNr %
1	pBAD24	18'768'230	9'326'821	7'554'725	71.32	28.68
	pBAD24-vapC7	17'465'470	11'317'830	9'517'488	38.81%	61.19%
2	pBAD24	19'231'192	10'959'367	9'614'653	76.52	23.48
	pBAD24-vapC7	19'162'415	12'235'137	10'661'927	62.09%	37.91%

Tableau 20 : Résumé du nombre de reads séquencés obtenus dans les conditions contrôle et d’induction de la toxine VapC7 lors de l’analyse du MORE RNA-seq, pour chaque réplikat.

4) Analyse statistique

Pour identifier la cible de la toxine VapC7, une table de comptage a été réalisée sur la position des extrémités 5’ des reads. Comme cette extrémité est critique pour notre analyse, toutes les séquences des reads alignés, orientées dans le bon sens, possédant au moins un mésappariement sur les 30 premiers nucléotides sont retirées dans la table de comptage, comme précédemment décrit par Schifano et al., 2014. Les reads alignés à des positions multiples sont comptés 1/x où x est le nombre

des cibles d'alignement dans le génome. Comme les ARNr engendrent un bruit de fond trop important, ils ont été traités séparément des autres ARN. Nos observations sur myGenomeBrowser montrent une signature de clivage où, seulement dans la condition VapC7, les extrémités 5' des reads sont parfaitement alignées à une même position nucléotidique, tandis que dans la condition contrôle, cette signature n'est pas observée. Par conséquent un script "maison" sous R a été élaboré pour repérer cette signature dans la table de comptage par évaluation d'un score, calculé pour chaque position i comme décrit ci-dessous :

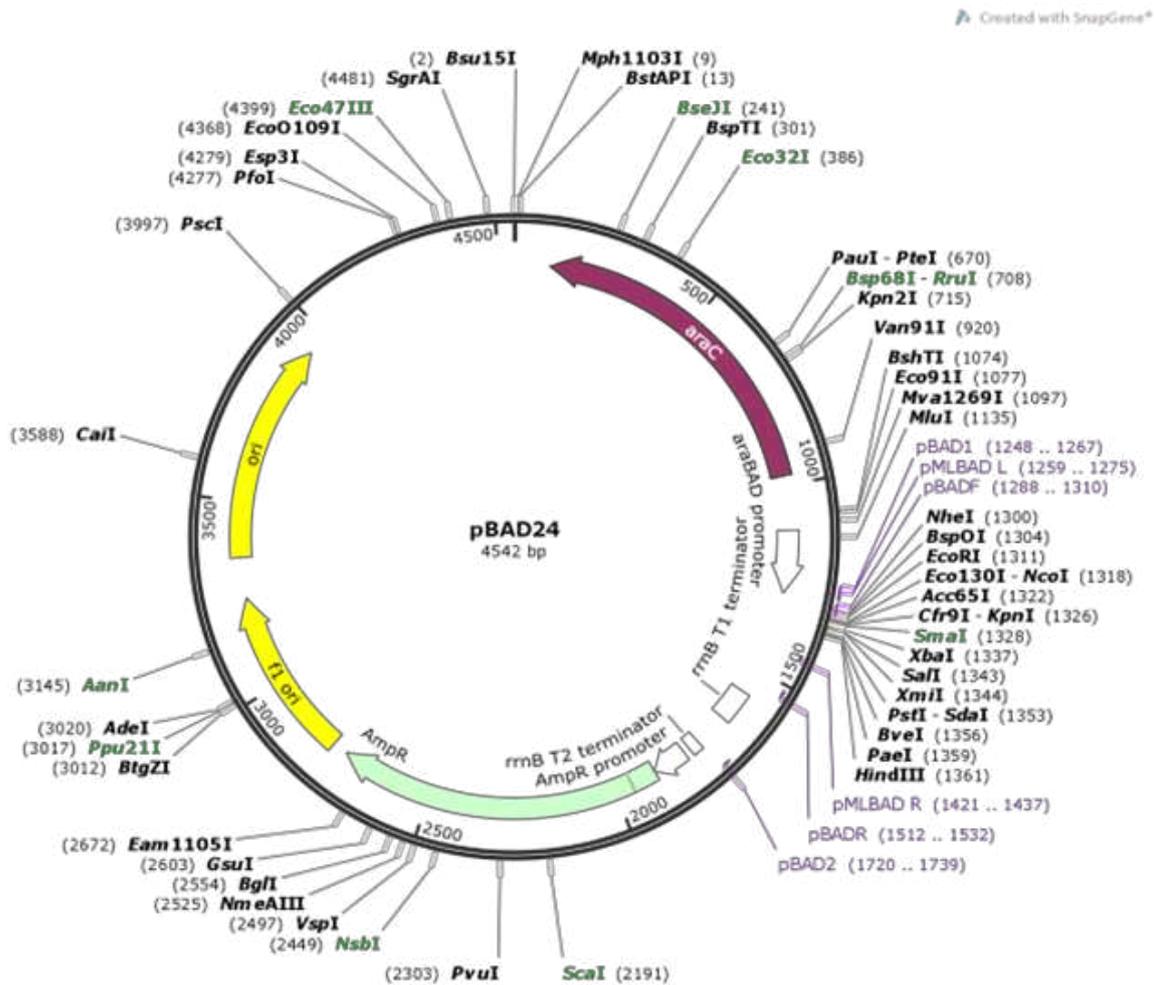
$$Score (VapC)_i = \frac{(mediane(nombre\ de\ reads\ (R1)_i + (R2)_i)) + 0.5}{\sum_{k=i-1}^{i-10} (mediane\ (nombre\ de\ reads\ (R1)_k + (R2)_k)) + (10 * 0.5)}$$

$$Score (Ctrl)_i = \frac{(mediane(nombre\ de\ reads\ (R1)_i + (R2)_i)) + 0.5}{\sum_{k=i-1}^{i-10} (mediane\ (nombre\ de\ reads\ (R1)_k + (R2)_k)) + (10 * 0.5)}$$

$$Ratio\ de\ clivage\ i = \frac{Score\ (VapC)_i}{Score\ (Ctrl)_i}$$

Ce score local est différent d'un fold change classique entre les conditions contrôle et VapC, puisqu'il est seulement basé sur le nombre de reads dans la condition VapC7 à une position i et les positions situées jusqu'à 10 nucléotides en amont. Le facteur 0.5 présent dans la formule permet d'incrémenter chaque read de 0.5 pour éviter les comptes nuls. Ensuite, le ratio de clivage entre les conditions VapC et Ctrl est déterminé. Puis, des filtres sont ajoutés pour garder uniquement données où le ratio de clivage est > 50 . Une analyse des scores les plus forts des positions nucléotidiques des extrémités 5' générées par la toxine VapC7 montre que cette toxine clive quatre ARNt^{fMet}. De sorte à identifier les homologues, les séquences spécifiant ces ARNt d'*E. coli* ont été comparés à l'ensemble des séquences spécifiant les 55 ARNt de *S. meliloti* à l'aide de l'algorithme LocaRNA, permettant un alignement basé sur la conservation des séquences et des structures prédites des ARN (Will et al., 2012). Pour s'assurer qu'un seul ou plusieurs des 55 ARNt de *S. meliloti* étaient homologues aux ARNt^{fMet} d'*E. coli*, l'analyse menée est bidirectionnelle. L'analyse des scores les plus forts dans la condition VapC10 est décrite dans la section Méthodes de l'article scientifique.

Annexe 1 – Plasmide pBAD24

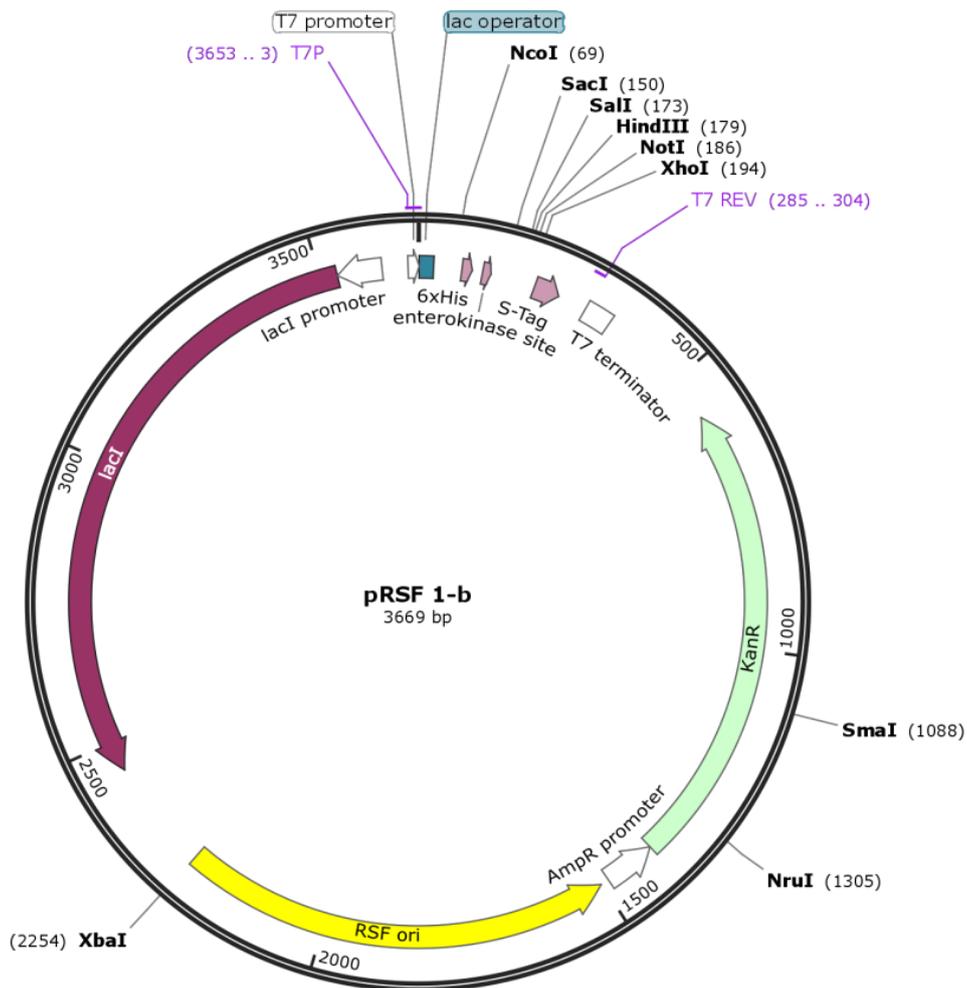


Le plasmide pBAD24 est un vecteur d'expression protéique sous le contrôle du promoteur *araBAD* activé par l'arabinose. Le promoteur *araBAD* est sous le contrôle du régulateur transcriptionnel AraC. En absence d'arabinose, AraC agit sous la forme d'un inhibiteur. L'ajout de L-arabinose modifie la conformation du régulateur, il devient alors activateur de la transcription. Les niveaux de transcrits non induits peuvent être réprimés en présence de glucose qui exerce le rôle de répresseur catabolique.

Il possède le gène de résistance à l'ampicilline. Il s'agit d'un plasmide low-medium copy.

Annexe 2-Plasmide pRSF1b

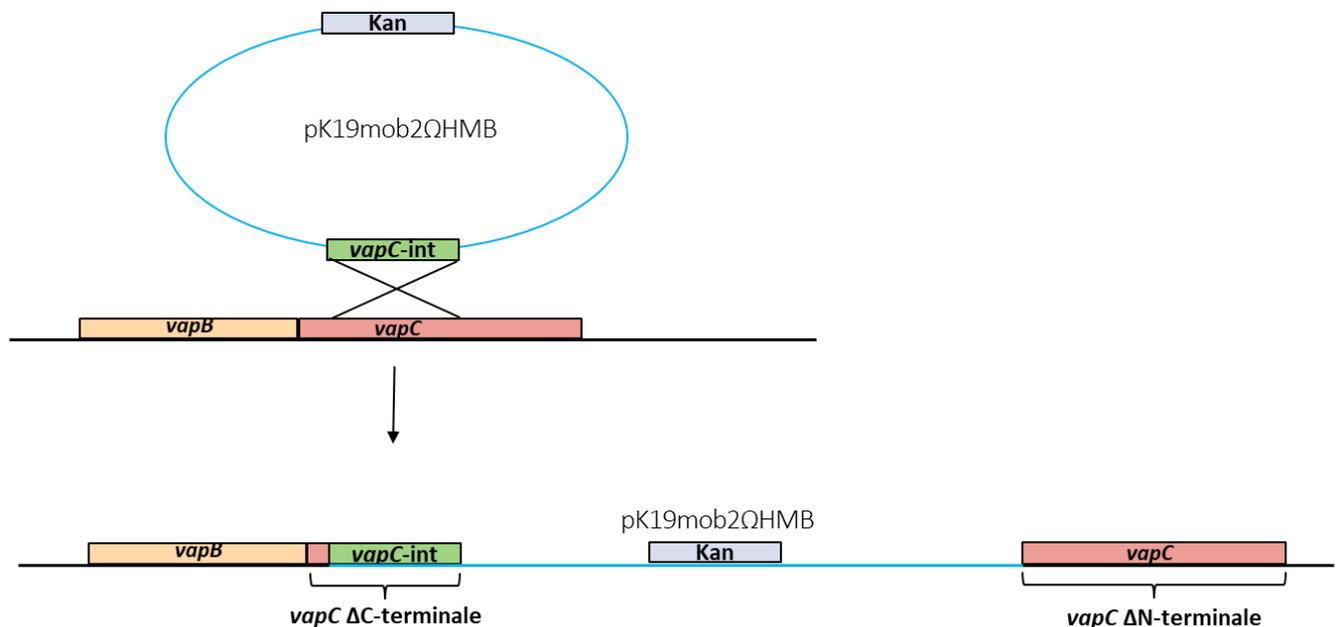
Created with SnapGene®



Le plasmide pRSF1b est un vecteur d'expression protéique sous le contrôle du promoteur T7, activé par l'IPTG, nécessitant la T7 polymérase lors de la transcription. Il est donc introduit dans la souche BL21 (DE3) pLysS qui possède cette enzyme contrairement à la DH5 α . Ce promoteur est régulé comme celui de l'opéron lactose. L'opérateur du promoteur est réprimé par LacI de manière constitutive. L'addition d'IPTG permet indirectement, une séquestration de LacI, ce qui l'empêche de bloquer l'accès de la polymérase au promoteur et donc la transcription est activée. Les niveaux de transcrits non induits peuvent être réprimés en présence de glucose qui exerce le rôle de répresseur catabolique.

Il possède le gène de résistance à la kanamycine. Il est high-copy.

Annexe 3-Recombinaison homologue par le plasmide pK19mob2ΩHMB



Le plasmide pk19mob2ΩHMB, porteur d'un fragment interne du gène *vapC* va s'insérer par recombinaison homologue au niveau de la région génique de *S. meliloti* porteuse de la même séquence que celle du fragment interne. Par conséquent, la toxine VapC est invalidée puisque, au niveau de son opéron, seule une protéine dépourvue de sa partie C-terminale, et donc d'au moins un acide aminé essentiel à son activité, est produite, et après plusieurs kilobases le reste de la séquence du gène *vapC* étant dépourvu d'ATG ne serait vraisemblablement pas traduit, et cas échéant, la protéine ne serait pas fonctionnelle.

Annexe 4-Etude du mutant *vapC2::miniTn5*

À mon arrivée au laboratoire, plusieurs mutants dans les gènes *vapC* étaient disponibles dans une banque de mutant Tn5 chez *S. meliloti* de la souche 2011 de Pobigaylo et al., 2006, à savoir les mutants *vapC2::Tn5* et *vapC7::Tn5*. Pour ma part, j'ai entrepris la caractérisation du mutant *vapC2::Tn5*. L'analyse du rendement végétal (taille et poids des parties aériennes), de la capacité fixatrice d'azote et du nombre de nodosités à 3 semaines post-inoculation (spi) de plantes de *M. truncatula* inoculées par le mutant *vapC2::Tn5* a été réalisée en trois répétitions biologiques. Les résultats obtenus sont présentés en **Figure 76** et **77**.

Les plantes inoculées avec la souche mutante *vapC2::Tn5* présentent une baisse modérée du rendement végétal dès 3 semaines post-inoculation (taille : - 25% ; poids : - 33%) (**Figure 76A-C**). Cette diminution du rendement végétal est corrélée à une forte diminution de la capacité fixatrice d'azote par plante (-60%) (**Figure 76D**). La réduction de l'apport azoté total n'est pas lié à un défaut de nodulation puisque le mutant *vapC2::Tn5* induit autant de nodosités que la souche sauvage, et, à 3 spi, la masse nodositaire produite est comparable entre les deux souches (**Figure 76FG**). La mutation *vapC2* n'affecte donc pas les étapes précoces de la symbiose (nodulation). Par conséquent, la diminution du rendement végétal est uniquement liée à la réduction de la capacité fixatrice d'azote par mg de nodosités (-53%) (**Figure 76E**). Dans un contexte sauvage, la toxine VapC2 semblait donc participer au maintien de la survie bactéroïdienne et au maintien de la symbiose.

Afin de vérifier si la diminution de la capacité fixatrice d'azote pouvait être associée à la mise en place d'un processus de sénescence accélérée, une étude macroscopique puis une analyse de la viabilité bactéroïdienne avaient été conduites dans des nodosités induites par le mutant *vapC2::Tn5*.

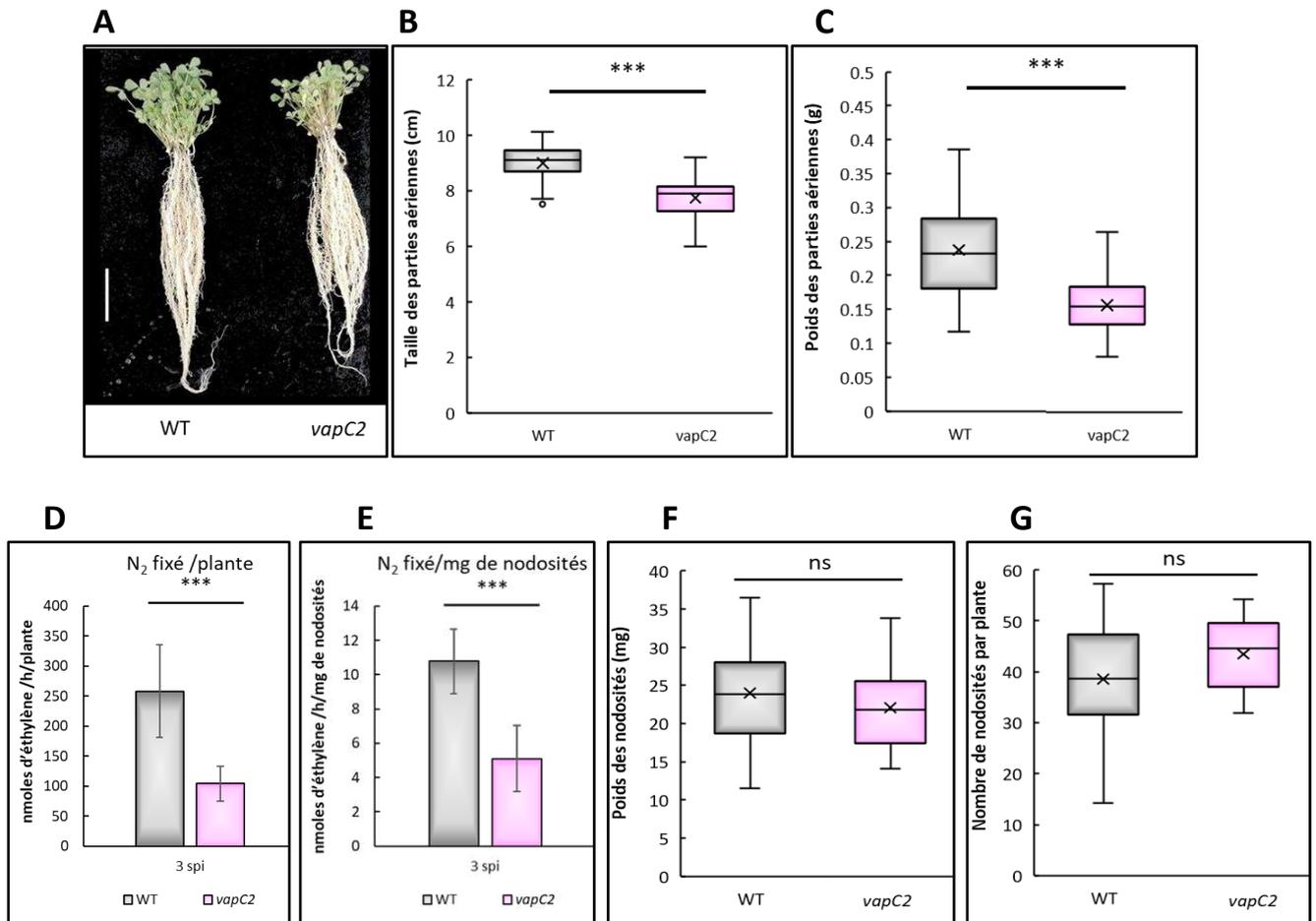


Figure 76: Rendement végétal des plantes de *M. truncatula* inoculées par le mutant *vapC2::Tn5* à 3 spi.

A: Phénotype des plantes de *M. truncatula* inoculées par la souche sauvage (WT) ou invalidées pour la toxine VapC2 (*vapC2*). La photographie correspond à 15 plantes pour chaque condition à 3 spi. La barre d'échelle correspond à 5cm.

B : Taille (cm) des parties aériennes de *M. truncatula* inoculées par la souche sauvage (WT) ou invalidée pour la toxine VapC2 (*vapC2*) à 3 spi (N=3, n=15).

C : Poids (mg) des parties aériennes de *M. truncatula* inoculées par la souche sauvage (WT) ou invalidée pour la toxine la toxine VapC2 (*vapC2*) à 3 spi (N=3, n=15).

D,E: Capacité fixatrice d'azote relative exprimée par plante ou par poids de nodosité (N=3, n=5). La mesure détermine à 3 spi le nombre de moles d'éthylène produites par heure et par mg de nodosités (D) ou par plante (E).

F : Poids (mg) des nodosités induites par la souche sauvage (WT) ou invalidée pour la toxine VapC2 (*vapC2*) à 3 spi (N=3, n=5).

G: Nombre des nodosités induites par la souche sauvage (WT) ou invalidée pour la toxine VapC2 (*vapC2*) à 3 spi (N=3, n=5).

D-G : les mesures sont effectuées sur un total de 15 plantes par condition, regroupées par des lots de 3 plantes. La significativité des différences a été estimée, pour la taille des parties aériennes, le poids et le nombre de nodosités par un test t de Student (distribution normale et équivalente) et pour le poids des parties aériennes et la capacité fixatrice d'azote par un test de Welch (distribution normale mais non équivalente). La représentation des p-value correspond à ns>0.05, *<0.05, **<0.01 et ***<0.001. N=: nombre de répétitions biologiques, n =: nombre de mesures effectuées au sein de chaque répétition biologique et de chaque condition.

Les plantes inoculées avec la souche mutante *vapC2::Tn5* induisent des nodosités plus petites que celles obtenues avec la souche WT (**Figure 77A**). A 3 spi, dans les nodosités induites par la souche *vapC2::Tn5* (**Figure 77B**), une zone de fixation contenant des bactéroïdes, mais de taille plus petite que celle obtenu avec la souche WT, est observée. Ce mutant est donc capable d'envahir les cellules végétales et de se différencier, mais semble affecté dans le processus ultérieur de développement et de maintien de la nodosité. Ces observations étaient donc en accord avec l'hypothèse d'un processus de sénescence précoce, puisque la zone de fixation présentait déjà des bactéroïdes morts (rouge) dans les cellules végétales et que les nodosités présentaient une zone de sénescence reconnaissable par les méats cellulaires (flèche).

Les mutants *vapC2::Tn5* (ce travail) et *vapC7::Tn5* (caractérisé précédemment par l'ancienne doctorante) présentent tous deux un phénotype de sénescence accélérée lors d'une interaction avec *M. truncatula*. Par la suite, après discussion avec la communauté scientifique travaillant sur *S.meliloti*, nous avons réalisé que tous les mutants miniTn5 de cette banque induisaient un phénotype de sénescence accélérée artificielle avec *M. truncatula*. Par conséquent, il est probable que le transposon Tn5 ne soit pas stable au moment de la différenciation bactéroïdienne et engendre des insertions aléatoires supplémentaires pouvant conduire à la mort bactéroïdienne. Cette étape semble être responsable du phénotype, puisqu'en culture pure aucun défaut de croissance n'est observé et que les évènements de nodulation sont similaires entre les mutants Tn5 et la souche sauvage. Par conséquent, le phénotype observé n'est pas lié à la mutation dans le gène *vapC* d'intérêt mais plutôt à la présence du transposon Tn5 dans le génome de *S. meliloti* et lors d'une interaction avec *M. truncatula*. Ainsi, j'ai reconstruit le mutant *vapC2* par l'insertion du plasmide pk19mob2ΩHMB par recombinaison homologue (*vapC7* était déjà créé par l'ancienne doctorante), et obtenu les résultats décrits dans la partie 1 de la section Résultats.

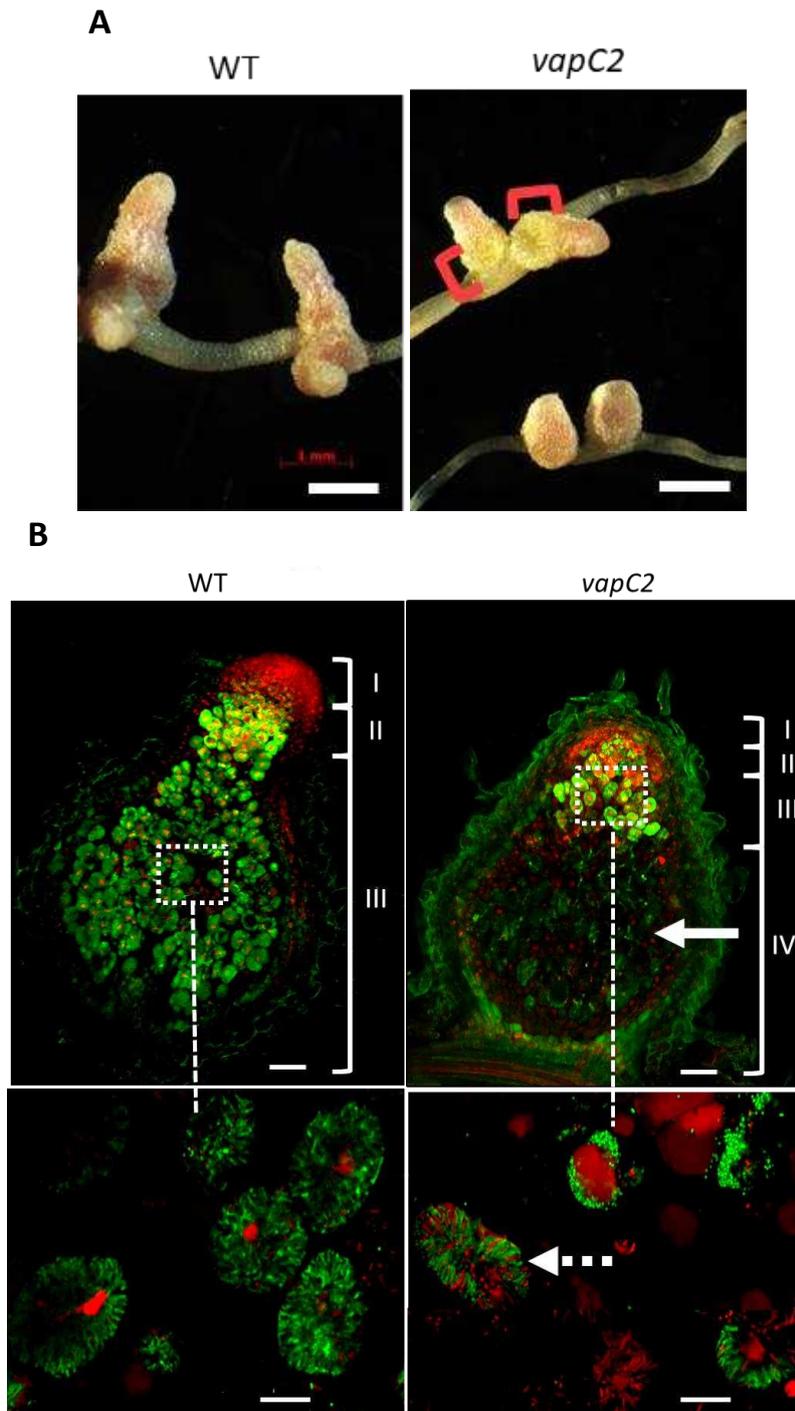


Figure 77: Comparaison de la viabilité des bactéroïdes de nodosités sauvages ou invalidées pour la toxine VapC2 à 3 spi.

A: Observation à la loupe binoculaire de nodosités induites par la souche sauvage (WT) ou invalidée pour la toxine VapC2 (*vapC2*). Les nodosités sont observées à la loupe binoculaire (Leica MZFLIII, 0.8X). La barre d'échelle correspond à 1 mm.

B : Observation de la viabilité bactéroïdienne des nodosités induites par la souche WT ou pour la toxine VapC2 (*vapC2*). Des coupes fines (80 μm) de nodosités âgées de 3spi induites par les souches sauvage (WT) ou mutante *vapC2* sont colorées au LIVE/DEAD (Live/Dead® BacLight™ probe, Invitrogen) et observées au microscope confocal (ZEISS LSM 880, 10X, zoom 63x). Les observations ont été réalisées sur trois réplicats biologiques. La barre d'échelle sur nodule entière = 100 μm, zoom des zones III = 20 μm; I : méristème; II : infection; III : fixation; IV : sénescence = zones de la nodule indéterminée mature. Les encadrés en pointillé correspondent aux zooms de la zone III présentés en dessous. Les flèches pointillées indiquent des cellules végétales contenant des bactéroïdes morts (rouge). Les flèches pleines pointent méats cellulaires.

Références

A

- Aakre, C.D., Phung, T.N., Huang, D., and Laub, M.T. (2013). A bacterial toxin inhibits DNA replication elongation through a direct interaction with the β sliding clamp. *Mol. Cell* 52, 617–628.
- Ahn, D.H., Lee, K.Y., Lee, S.J., Park, S.J., Yoon, H.J., Kim, S.J., and Lee, B.J. (2017). Structural analyses of the MazEF4 toxin-antitoxin pair in *Mycobacterium tuberculosis* provide evidence for a unique extracellular death factor. *J. Biol. Chem.* 292, 18832–18847.
- Aizenman, E., Engelberg-Kulka, H., and Glaser, G. (1996). An *Escherichia coli* chromosomal “addiction module” regulated by 3',5'-bispyrophosphate: A model for programmed bacterial cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 6059–6063.
- Akiyama, K., Fujisawa, K., Kondo, H., Netsu, Y., Nishikawa, K., Takata, Y., Nakamura, Y., Kino, Y., Ayukawa, S., Yamamura, M., et al. (2020). MazF activation causes ACA sequence-independent and selective alterations in RNA levels in *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.* 202, 105–114.
- Albrethsen, J., Agner, J., Piersma, S.R., Højrup, P., Pham, T. V., Weldingh, K., Jimenez, C.R., Andersen, P., and Rosenkrands, I. (2013). Proteomic profiling of *Mycobacterium tuberculosis* identifies nutrient-starvation-responsive toxin-antitoxin systems. *Mol. Cell. Proteomics* 12, 1180–1191.
- Alunni, B., and Gourion, B. (2016). Terminal bacteroid differentiation in the legume–rhizobium symbiosis: nodule-specific cysteine-rich peptides and beyond. *New Phytol.* 211, 411–417.
- Anda, M., Ohtsubo, Y., Okubo, T., Sugawara, M., Nagata, Y., Tsuda, M., Minamisawa, K., and Mitsui, H. (2015). Bacterial clade with the ribosomal RNA operon on a small plasmid rather than the chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 14343–14347.
- Andrews, E.S. V., and Arcus, V.L. (2020). PhoH2 proteins couple RNA helicase and RNase activities. *Protein Sci.* pro.3814.
- Andrews, M., and Andrews, M.E. (2017). Specificity in legume-rhizobia symbioses. *Int. J. Mol. Sci.* 18.
- Andrews, M., Scholefield, D., Abberton, M.T., McKenzie, B.A., Hodge, S., and Raven, J.A. (2007). Use of white clover as an alternative to nitrogen fertiliser for dairy pastures in nitrate vulnerable zones in the UK: productivity, environmental impact and economic considerations. *Ann. Appl. Biol.* 151, 11–23.
- Antonets, K.S., Onishchuk, O.P., Kurchak, O.N., Volkov, K. V., Lykholay, A.N., Andreeva, E.A., Andronov, E.E., Pinaev, A.G., Provorov, N.A., and Nizhnikov, A.A. (2018). Proteomic Profile of the Bacterium *Sinorhizobium meliloti* Depends on Its Life Form and Host Plant Species. *Mol. Biol. (Mosk).* 52, 898–904.
- Apirion, D., and Miczak, A. (1993). RNA processing in prokaryotic cells. *BioEssays* 15, 113–120.
- Arbing, M.A., Handelman, S.K., Kuzin, A.P., Verdon, G., Wang, C., Su, M., Rothenbacher, F.P., Abashidze, M., Liu, M., Hurley, J.M., et al. (2010). Crystal structures of Phd-Doc, HigA, and YeeU establish multiple evolutionary links between microbial growth-regulating toxin-antitoxin systems. *Structure* 18, 996–1010.
- Arcus, V.L., McKenzie, J.L., Robson, J., and Cook, G.M. (2011). The PIN-domain ribonucleases and the prokaryotic VapBC toxin-antitoxin array. *Protein Eng. Des. Sel.* 24, 33–40.
- Arsene, F., Kaminski, P.A., and Elmerich, C. (1996). Modulation of NifA activity by P(II) in *Azospirillum*

brasilese: Evidence for a regulatory role of the NifA N-terminal domain. *J. Bacteriol.* *178*, 4830–4838.

Azani, N., Babineau, M., Bailey, C.D., Banks, H., Barbosa, A.R., Pinto, R.B., Boatwright, J.S., Borges, L.M., Brown, G.K., Bruneau, A., et al. (2017). A new subfamily classification of the leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. *Taxon* *66*, 44–77.

B

Barnett, M.J., Fisher, R.F., Jones, T., Komp, C., Abola, A.P., Barloy-Hubler, F., Bowser, L., Capela, D., Galibert, F., Gouzy, J., et al. (2001). Nucleotide sequence and predicted functions of the entire *Sinorhizobium meliloti* pSymA megaplasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 9883–9888.

Barth, V.C., Zeng, J.M., Vvedenskaya, I.O., Ouyang, M., Husson, R.N., and Woychik, N.A. (2019). Toxin-mediated ribosome stalling reprograms the *Mycobacterium tuberculosis* proteome. *Nat. Commun.* *10*.

Batut, J., and Boistard, P. (1994). Oxygen control in *Rhizobium*. *Antonie Van Leeuwenhoek* *66*, 129–150.

Bendtsen, K.L., and Brodersen, D.E. (2017). Higher-order structure in bacterial vapBC toxin-antitoxin complexes. *Subcell. Biochem.* *83*, 381–412.

Berger, A., Brouquisse, R., Pathak, P.K., Hichri, I., , I., Bhatia, S., Boscari, A., Igamberdiev, A.U., and Gupta, K.J. (2018). Pathways of nitric oxide metabolism and operation of phytolegoglobins in legume nodules: Missing links and future directions. *Plant. Cell Environ.*

Berger, A., Guinand, S., Boscari, A., Puppo, A., and Brouquisse, R. (2020). *Medicago truncatula* Phytolegoglobin 1.1 controls symbiotic nodulation and nitrogen fixation via the regulation of nitric oxide concentration. *New Phytol.* *227*, 84–98.

Berrabah, F., Ratet, P., and Gourion, B. (2019). Legume nodules: Massive infection in the absence of defense induction. *Mol. Plant-Microbe Interact.* *32*, 35–44.

Bhandari, V., Wong, K.S., Zhou, J.L., Mabanglo, M.F., Batey, R.A., and Houry, W.A. (2018). The Role of ClpP Protease in Bacterial Pathogenesis and Human Diseases. *ACS Chem. Biol.* *13*, 1413–1425.

Bibi-Triki, S., de la Sierra-Gallay, I.L., Lazar, N., Leroy, A., Van Tilbeurgh, H., Sebbane, F., and Pradel, E. (2014). Functional and structural analysis of HicA3-HicB3, a novel toxin-antitoxin system of *Yersinia pestis*. *J. Bacteriol.* *196*, 3712–3723.

Blower, T.R., Pei, X.Y., Short, F.L., Fineran, P.C., Humphreys, D.P., Luisi, B.F., and Salmond, G.P.C. (2011). A processed noncoding RNA regulates an altruistic bacterial antiviral system. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *18*, 185–191.

Blower, T.R., Short, F.L., Rao, F., Mizuguchi, K., Pei, X.Y., Fineran, P.C., Luisi, B.F., and Salmond, G.P.C. (2012). Identification and classification of bacterial Type III toxin-antitoxin systems encoded in chromosomal and plasmid genomes. *Nucleic Acids Res.* *40*, 6158–6173.

Bodogai, M., Ferenczi, S., Bashtovyy, D., Miclea, P., Papp, P., and Dusha, I. (2006). The *ntfPR* operon of *Sinorhizobium meliloti* is organized and functions as a toxin-antitoxin module. *Mol. Plant. Microbe Interact.* *19*, 811–822.

Bonaldi, K., Gourion, B., Fardoux, J., Hannibal, L., Cartieaux, F., Boursot, M., Vallenet, D., Chaintreuil, C., Prin, Y., Nouwen, N., et al. (2010). Large-scale transposon mutagenesis of photosynthetic *Bradyrhizobium* sp. strain ORS278 reveals new genetic loci putatively important for nod-independent symbiosis with *Aeschynomene indica*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* *23*, 760–770.

Bordes, P., and Genevaux, P. (2017). Addiction des systèmes toxine-antitoxine envers un chaperon

chez *Mycobacterium tuberculosis*. *Medecine/Sciences* 33, 486–488.

Bordes, P., Sala, A.J., Ayala, S., Texier, P., Slama, N., Cirinesi, A.-M., Guillet, V., Mourey, L., and Genevaux, P. (2016). Chaperone addiction of toxin–antitoxin systems. *Nat. Commun.* 7, 13339.

Boscari, A., Mandon, K., Dupont, L., Poggi, M.C., and Le Rudulier, D. (2002). Bets is a major glycine betaine/proline betaine transporter required for early osmotic adjustment in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 184, 2654–2663.

Boss, L., Labudda, Ł., Węgrzyn, G., Hayes, F., and Kędzierska, B. (2013). The Axe-Txe Complex of *Enterococcus faecium* Presents a Multilayered Mode of Toxin-Antitoxin Gene Expression Regulation. *PLoS One* 8, e73569.

Bourion, V., Heulin-Gotty, K., Aubert, V., Tisseyre, P., Chabert-Martinello, M., Pervent, M., Delaitre, C., Vile, D., Siol, M., Duc, G., et al. (2018). Co-inoculation of a Pea Core-Collection with Diverse Rhizobial Strains Shows Competitiveness for Nodulation and Efficiency of Nitrogen Fixation Are Distinct traits in the Interaction. *Front. Plant Sci.* 8, 2249.

Brown, B.L., Grigoriu, S., Kim, Y., Arruda, J.M., Davenport, A., Wood, T.K., Peti, W., and Page, R. (2009). Three dimensional structure of the MqsR:MqsA complex: A novel TA pair comprised of a toxin homologous to RelE and an antitoxin with unique properties. *PLoS Pathog.* 5.

Brown, B.L., Lord, D.M., Grigoriu, S., Peti, W., and Pages, R. (2013). The *Escherichia coli* toxin MqsR destabilizes the transcriptional repression complex formed between the antitoxin MqsA and the *mqsRA* operon promoter. *J. Biol. Chem.* 288, 1286–1294.

Brzozowska, I., and Zielenkiewicz, U. (2013). Regulation of toxin–antitoxin systems by proteolysis. *Plasmid* 70, 33–41.

Budde, P.P., Davis, B.M., Yuan, J., and Waldor, M.K. (2007). Characterization of a *higBA* toxin-antitoxin locus in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 189, 491–500.

Burbank, L.P., and Stenger, D.C. (2017). The DinJ/RelE toxin-antitoxin system suppresses bacterial proliferation and virulence of *Xylella fastidiosa* in grapevine. *Phytopathology* 107, 388–394.

Butt, A., Higman, V.A., Williams, C., Crump, M.P., Hemsley, C.M., Harmer, N., and Titball, R.W. (2014). The HicA toxin from *Burkholderia pseudomallei* has a role in persister cell formation. *Biochem. J.* 459, 333–344.

C

Cabanes, D., Boistard, P., and Batut, J. (2000). Identification of *Sinorhizobium meliloti* genes regulated during symbiosis. *J. Bacteriol.* 182, 3632–3637.

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.

Cao, Y., Halane, M.K., Gassmann, W., and Stacey, G. (2017). The Role of Plant Innate Immunity in the Legume-Rhizobium Symbiosis.

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. U. S. A.* 98, 9877–9882.

Cárdenas-Mondragón, M.G., Ares, M.A., Panunzi, L.G., Pacheco, S., Camorlinga-Ponce, M., Girón, J.A., Torres, J., and De la Cruz, M.A. (2016). Transcriptional profiling of type II toxin-antitoxin genes of *Helicobacter pylori* under different environmental conditions: Identification of hp0967-hp0968 system.

Front. Microbiol. 7.

Castro-Roa, D., Garcia-Pino, A., De Gieter, S., Van Nuland, N.A.J., Loris, R., and Zenkin, N. (2013). The Fic protein Doc uses an inverted substrate to phosphorylate and inactivate EF-Tu. *Nat. Chem. Biol.* 9, 811–817.

Chan, W.T., Nieto, C., Harikrishna, J.A., Khoo, S.K., Othman, R.Y., Espinosa, M., and Yeo, C.C. (2011). Genetic regulation of the yefM-yoeB toxin-antitoxin locus of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 193, 4612–4625.

Chan, W.T., Espinosa, M., and Yeo, C.C. (2016). Keeping the Wolves at Bay: Antitoxins of Prokaryotic Type II Toxin-Antitoxin Systems. *Front. Mol. Biosci.* 3, 9.

Cherny, I., Rockah, L., and Gazit, E. (2005). The YoeB toxin is a folded protein that forms a physical complex with the unfolded YefM antitoxin: Implications for a structural-based differential stability of toxin-antitoxin systems. *J. Biol. Chem.* 280, 30063–30072.

Cheverton, A.M., Gollan, B., Przydacz, M., Wong, C.T., Mylona, A., Hare, S.A., and Helaine, S. (2016). A Salmonella Toxin Promotes Persister Formation through Acetylation of tRNA. *Mol. Cell* 63, 86–96.

Christensen-Dalsgaard, M., and Gerdes, K. (2006). Two *higBA* loci in the *Vibrio cholerae* superintegron encode mRNA cleaving enzymes and can stabilize plasmids. *Mol. Microbiol.* 62, 397–411.

Christensen-Dalsgaard, M., Jørgensen, M.G., and Gerdes, K. (2010). Three new RelE-homologous mRNA interferases of *Escherichia coli* differentially induced by environmental stresses. *Mol. Microbiol.* 75, 333–348.

Christensen, S.K., Mikkelsen, M., Pedersen, K., and Gerdes, K. (2001). RelE, a global inhibitor of translation, is activated during nutritional stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 14328–14333.

Christensen, S.K., Pedersen, K., Hansen, F.G., and Gerdes, K. (2003). Toxin-antitoxin Loci as Stress-response-elements: ChpAK/MazF and ChpBK Cleave Translated RNAs and are Counteracted by tmRNA. *J. Mol. Biol.* 332, 809–819.

Christensen, S.K., Maenhaut-Michel, G., Mine, N., Gottesman, S., Gerdes, K., and Van Melderen, L. (2004). Overproduction of the Lon protease triggers inhibition of translation in *Escherichia coli*: involvement of the yefM-yoeB toxin-antitoxin system. *Mol. Microbiol.* 51, 1705–1717.

Cintrón, M., Zeng, J.M., Barth, V.C., Cruz, J.W., Husson, R.N., and Woychik, N.A. (2019). Accurate target identification for *Mycobacterium tuberculosis* endoribonuclease toxins requires expression in their native host. *Sci. Rep.* 9.

Cline, S.D., Saleem, S., and Daines, D.A. (2012). Regulation of the vapBC-1 Toxin-antitoxin locus in Nontypeable *Haemophilus influenzae*. *PLoS One* 7.

Cook, D.R. (1999). *Medicago truncatula* - A model in the making! *Curr. Opin. Plant Biol.* 2, 301–304.

Cook, G.M., Robson, J.R., Frampton, R.A., McKenzie, J., Przybilski, R., Fineran, P.C., and Arcus, V.L. (2013). Ribonucleases in bacterial toxin-antitoxin systems. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* 1829, 523–531.

Coray, D.S., Wheeler, N.E., Heinemann, J.A., and Gardner, P.P. (2017). Why so narrow: Distribution of anti-sense regulated, type I toxin-antitoxin systems compared with type II and type III systems. *RNA Biol.* 14, 275–280.

Cruz, J.W., Rothenbacher, F.P., Maehigashi, T., Lane, W.S., Dunham, C.M., and Woychik, N.A. (2014).

Doc toxin is a kinase that inactivates elongation factor Tu. *J. Biol. Chem.* **289**, 7788–7798.

Culviner, P.H., and Laub, M.T. (2018). Global Analysis of the *E. coli* Toxin MazF Reveals Widespread Cleavage of mRNA and the Inhibition of rRNA Maturation and Ribosome Biogenesis. *Mol. Cell* **70**, 868–880.e10.

D

Daimon, Y., Narita, S., and Akiyama, Y. (2015). Activation of Toxin-Antitoxin System Toxins Suppresses Lethality Caused by the Loss of σ^E in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **197**, 2316–2324.

Dalebroux, Z.D., and Swanson, M.S. (2012). ppGpp: Magic beyond RNA polymerase. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**, 203–212.

Dalton, K.M., and Crosson, S. (2010). A conserved mode of protein recognition and binding in a ParD-ParE toxin - antitoxin complex. *Biochemistry* **49**, 2205–2215.

Deep, A., Kaundal, S., Agarwal, S., Singh, R., and Thakur, K.G. (2017). Crystal structure of *Mycobacterium tuberculosis* VapC20 toxin and its interactions with cognate antitoxin, VapB20, suggest a model for toxin-antitoxin assembly. *FEBS J.* **284**, 4066–4082.

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

Deter, H.S., Jensen, R. V., Mather, W.H., and Butzin, N.C. (2017). Mechanisms for differential protein production in toxin-antitoxin systems. *Toxins (Basel)*. **9**.

Dicenzo, G.C., Zamani, M., Checcucci, A., Fondi, M., Griffiths, J.S., Finan, T.M., and Mengoni, A. (2019). Multidisciplinary approaches for studying rhizobium-legume symbioses. *Can. J. Microbiol.* **65**, 1–33.

Dienemann, C., Bøggild, A., Winther, K.S., Gerdes, K., and Brodersen, D.E. (2011). Crystal structure of the VapBC toxin-antitoxin complex from *Shigella flexneri* reveals a hetero-octameric DNA-binding assembly. *J. Mol. Biol.* **414**, 713–722.

Ditta, G., Stanfield, S., Corbin, D., and Helinski, D.R. (1980). Broad host range DNA cloning system for Gram-negative bacteria: Construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **77**, 7347–7351.

Domergue, O. (2019). Diversité fonctionnelle des rhizobia associés à la féverole en agro-écosystème Sud de France Odile Domergue To cite this version : HAL Id : tel-02107043 THÈSE DE DOCTORAT de l'Université de recherche Paris Sciences et Lettres.

Domka, J., Lee, J., Bansal, T., and Wood, T.K. (2007). Temporal gene-expression in *Escherichia coli* K-12 biofilms. *Environ. Microbiol.* **9**, 332–346.

Donegan, N.P., Thompson, E.T., Fu, Z., and Cheung, A.L. (2010). Proteolytic regulation of toxin-antitoxin systems by ClpPC in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **192**, 1416–1422.

Downie, J.A., and Young, J.P.W. (2001). The ABC of symbiosis. *Nature* **412**, 597–598.

Downie, J.A., Couzigou, J.-M., Zhukov, V., Mondy, S., Heba, G.A. el, Cosson, V., Ellis, T.H.N., Ambrose, M., Wen, J., Tadege, M., et al. (2014). Legume nodulation. *Curr. Biol.* **24**, R184–R190.

Dubiel, A., Wegrzyn, K., Kupinski, A.P., and Konieczny, I. (2018). ClpAP protease is a universal factor that activates the parDE toxin-antitoxin system from a broad host range RK2 plasmid. *Sci. Rep.* **8**, 1–12.

Dupont, L., Alloing, G., Pierre, O., El, S., Hopkins, J., Hrouart, D., and Frendo, P. (2012). The Legume Root Nodule: From Symbiotic Nitrogen Fixation to Senescence. In *Senescence*, (InTech), p.

Dusha, I., Bakos, A., Kondorosi, A., de Bruijn, F.J., and Schell, J. (1989). The *Rhizobium meliloti* early nodulation genes (nodABC) are nitrogen-regulated: Isolation of a mutant strain with efficient nodulation capacity on alfalfa in the presence of ammonium. *Mol. Gen. Genet.* *219*, 89–96.

Dy, R.L., Przybilski, R., Semeijn, K., Salmond, G.P.C., and Fineran, P.C. (2014). A widespread bacteriophage abortive infection system functions through a Type IV toxin-antitoxin mechanism. *Nucleic Acids Res.* *42*, 4590–4605.

F Ferrari, A., Maggi, S., Montanini, B., Levante, A., Lazzi, C., Yamaguchi, Y., Rivetti, C., and Folli, C. (2019). Identification and first characterization of DinJ-YafQ toxin-antitoxin systems in *Lactobacillus* species of biotechnological interest. *Sci. Rep.* *9*.

Fijalkowska, I.J., Schaaper, R.M., and Jonczyk, P. (2012). DNA replication fidelity in *Escherichia coli*: A multi-DNA polymerase affair. *FEMS Microbiol. Rev.* *36*, 1105–1121.

Finan, T.M., Kunkel, B., De Vos, G.F., and Signer, E.R. (1986). Second symbiotic megaplasmid in *Rhizobium meliloti* carrying exopolysaccharide and thiamine synthesis genes. *J. Bacteriol.* *167*, 66–72.

Finan, T.M., Weidner, S., Wong, K., Buhrmester, J., Chain, P., Vorhölter, F.J., Hernandez-Lucas, I., Becker, A., Cowie, A., Gouzy, J., et al. (2001). The complete sequence of the 1,683-kb pSymB megaplasmid from the N₂-fixing endosymbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 9889–9894.

Fineran, P.C., Blower, T.R., Foulds, I.J., Humphreys, D.P., Lilley, K.S., and Salmond, G.P.C. (2009). The phage abortive infection system, ToxIN, functions as a protein-RNA toxin-antitoxin pair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 894–899.

Fischer, H.M. (1994). Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbiol. Rev.* *58*, 352–386.

Fivian-Hughes, A.S., and Davis, E.O. (2010). Analyzing the regulatory role of the *higA* antitoxin within *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* *192*, 4348–4356.

Fraikin, N., Rousseau, C.J., Goeders, N., and Van Melderen, L. (2019). Reassessing the role of the type II MqsRA toxin-antitoxin system in stress response and biofilm formation: MqsA is transcriptionally uncoupled from *mqsR*. *MBio* *10*.

Freire, D.M., Gutierrez, C., Garza-Garcia, A., Grabowska, A.D., Sala, A.J., Ariyachaokun, K., Panikova, T., Beckham, K.S.H., Colom, A., Pogenberg, V., et al. (2019). An NAD⁺ Phosphorylase Toxin Triggers *Mycobacterium tuberculosis* Cell Death. *Mol. Cell* *73*, 1282–1291.e8.

G Gage, D.J. (2004). Infection and Invasion of Roots by Symbiotic, Nitrogen-Fixing Rhizobia during Nodulation of Temperate Legumes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *68*, 280–300.

Galibert, F., Finan, T.M., Long, S.R., Pühler, A., Abola, P., Ampe, F., Barloy-Hubler, F., Barnett, M.J., Becker, A., Boistard, P., et al. (2001). The Composite Genome of the Legume Symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science* (80-). *293*.

Garcia-Pino, A., Dao-Thi, M.H., Gazit, E., Magnuson, R.D., Wyns, L., and Loris, R. (2008). Crystallization of Doc and the Phd-Doc toxin-antitoxin complex. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* *64*, 1034–1038.

Garcia-Pino, A., Balasubramanian, S., Wyns, L., Gazit, E., De Greve, H., Magnuson, R.D., Charlier, D., van

- Nuland, N.A.J., and Loris, R. (2010). Allostery and Intrinsic Disorder Mediate Transcription Regulation by Conditional Cooperativity. *Cell* 142, 101–111.
- Garcia-Pino, A., De Gieter, S., Talavera, A., De Greve, H., Efremov, R.G., and Loris, R. (2016). An intrinsically disordered entropic switch determines allostery in Phd-Doc regulation. *Nat. Chem. Biol.* 12, 490–496.
- Gerdes, K., Bech, F.W., Jørgensen, S.T., Løbner-Olesen, A., Rasmussen, P.B., Atlung, T., Boe, L., Karlstrom, O., Molin, S., and von Meyenburg, K. (1986). Mechanism of postsegregational killing by the hok gene product of the parB system of plasmid R1 and its homology with the relF gene product of the E. coli relB operon. *EMBO J.* 5, 2023–2029.
- Gerdes, K., Helin, K., Christensen, O.W., and Løbner-Olesen, A. (1988). Translational control and differential RNA decay are key elements regulating postsegregational expression of the killer protein encoded by the parB locus of plasmid R1. *J. Mol. Biol.* 203, 119–129.
- Germain, E., Castro-Roa, D., Zenkin, N., and Gerdes, K. (2013). Molecular Mechanism of Bacterial Persistence by HipA. *Mol. Cell* 52, 248–254.
- De Gieter, S., Konijnenberg, A., Talavera, A., Butterer, A., Haesaerts, S., De Greve, H., Sobott, F., Loris, R., and Garcia-Pino, A. (2014). The intrinsically disordered domain of the antitoxin phd chaperones the toxin doc against irreversible inactivation and misfolding. *J. Biol. Chem.* 289, 34013–34023.
- 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.
- Goeders, N., and Van Melderen, L. (2014). Toxin-antitoxin systems as multilevel interaction systems. *Toxins (Basel)*. 6, 304–324.
- Goeders, N., Drèze, P.L., and Van Melderen, L. (2013). Relaxed cleavage specificity within the rele toxin family. *J. Bacteriol.* 195, 2541–2549.
- Goeders, N., Chai, R., Chen, B., Day, A., and Salmond, G. (2016). Structure, Evolution, and Functions of Bacterial Type III Toxin-Antitoxin Systems. *Toxins (Basel)*. 8, 282.
- Gollan, B., Grabe, G., Michaux, C., and Helaine, S. (2019). Bacterial Persisters and Infection: Past, Present, and Progressing. *Annu. Rev. Microbiol.* 73, 359–385.
- Govindan, A., Ayyub, S.A., and Varshney, U. (2018). Sustainance of *Escherichia coli* on a single tRNAMet. *Nucleic Acids Res.* 46, 11566–11574.
- Greendyk, J.R. (2017). Genome scale tracking of *Mycobacterium tuberculosis* MazF toxin targets.
- Griffin, M.A., Davis, J.H., and Strobel, S.A. (2013). Bacterial toxin RelE: A highly efficient ribonuclease with exquisite substrate specificity using atypical catalytic residues. *Biochemistry* 52, 8633–8642.
- Guillet, V., Bordes, P., Bon, C., Marcoux, J., Gervais, V., Sala, A.J., Dos Reis, S., Slama, N., Mares-Mejía, I., Cirinesi, A.M., et al. (2019). Structural insights into chaperone addiction of toxin-antitoxin systems. *Nat. Commun.* 10.
- Guo, Y., Quiroga, C., Chen, Q., McAnulty, M.J., Benedik, M.J., Wood, T.K., and Wang, X. (2014). RaIR (a DNase) and RaIA (a small RNA) form a type I toxin-antitoxin system in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 42, 6448–6462.
- Gupta, A., Venkataraman, B., Vasudevan, M., and Gopinath Bankar, K. (2017). Co-expression network

analysis of toxin-antitoxin loci in *Mycobacterium tuberculosis* reveals key modulators of cellular stress. *Sci. Rep.* **7**, 5868.

Guzman, L.M., Belin, D., Carson, M.J., and Beckwith, J. (1995). Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J. Bacteriol.* **177**, 4121–4130.

H

Haag, A.F., Baloban, M., Sani, M., Kerscher, B., Pierre, O., Farkas, A., Longhi, R., Boncompagni, E., Hérouart, D., Dall'Angelo, S., et al. (2011). Protection of sinorhizobium against host cysteine-rich antimicrobial peptides is critical for symbiosis. *PLoS Biol.* **9**, 1001169.

Haag, A.F., Arnold, M.F.F., Myka, K.K., Kerscher, B., Dall'Angelo, S., Zanda, M., Mergaert, P., and Ferguson, G.P. (2013). Molecular insights into bacteroid development during Rhizobium-legume symbiosis. *FEMS Microbiol. Rev.* **37**, 364–383.

Hadži, S., Garcia-Pino, A., Haesaerts, S., Jurenas, D., Gerdes, K., Lah, J., and Loris, R. (2017). Ribosome-dependent *Vibrio cholerae* mRNAse HigB2 is regulated by a β -strand sliding mechanism. *Nucleic Acids Res.* **45**, 4972–4983.

Hallez, R., Geeraerts, D., Sterckx, Y., Mine, N., Loris, R., and Van Melderen, L. (2010). New toxins homologous to ParE belonging to three-component toxin-antitoxin systems in *Escherichia coli* O157:H7. *Mol. Microbiol.* **76**, 719–732.

Ham, J.H. (2013). Intercellular and intracellular signalling systems that globally control the expression of virulence genes in plant pathogenic bacteria. *Mol. Plant Pathol.* **14**, 308–322.

Hampton, H.G., Jackson, S.A., Fagerlund, R.D., Vogel, A.I.M., Dy, R.L., Blower, T.R., and Fineran, P.C. (2018). AbiEi Binds Cooperatively to the Type IV abiE Toxin–Antitoxin Operator Via a Positively-Charged Surface and Causes DNA Bending and Negative Autoregulation. *J. Mol. Biol.* **430**, 1141–1156.

Han, K.D., Matsuura, A., Ahn, H.C., Kwon, A.R., Min, Y.H., Park, H.J., Won, H.S., Park, S.J., Kim, D.Y., and Lee, B.J. (2011). Functional identification of toxin-antitoxin molecules from *Helicobacter pylori* 26695 and structural elucidation of the molecular interactions. *J. Biol. Chem.* **286**, 4842–4853.

Hansen, S., Vulić, M., Min, J., Yen, T.J., Schumacher, M.A., Brennan, R.G., and Lewis, K. (2012). Regulation of the *Escherichia coli* HipBA toxin-antitoxin system by proteolysis. *PLoS One* **7**.

Harms, A., Stanger, F. V., and Dehio, C. (2016). Biological Diversity and Molecular Plasticity of FIC Domain Proteins. *Annu. Rev. Microbiol.* **70**, 341–360.

Harms, A., Brodersen, D.E., Mitarai, N., and Gerdes, K. (2018). Toxins, Targets, and Triggers: An Overview of Toxin-Antitoxin Biology. *Mol. Cell* **70**, 768–784.

Hayes, F. (2003). Toxins-antitoxins: Plasmid maintenance, programmed cell death, and cell cycle arrest. *Science* (80-.). **301**, 1496–1499.

Hayes, F., and Kędzierska, B. (2014). Regulating Toxin-Antitoxin Expression: Controlled Detonation of Intracellular Molecular Timebombs. *Toxins* (Basel). **6**, 337–358.

Hayes, F., and Van Melderen, L. (2011). Toxins-antitoxins: diversity, evolution and function. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **46**, 386–408.

Heaton, B.E., Herrou, J., Blackwell, A.E., Wysocki, V.H., and Crosson, S. (2012). Molecular structure and function of the novel BrnT/BrnA toxin-antitoxin system of *Brucella abortus*. *J. Biol. Chem.* **287**, 12098–12110.

Helaine, S., and Kugelberg, E. (2014). Bacterial persisters: formation, eradication, and experimental

systems. *Trends Microbiol.* **22**, 417–424.

Helaine, S., Cheverton, A.M., Watson, K.G., Faure, L.M., Matthews, S.A., and Holden, D.W. (2014). Internalization of *Salmonella* by macrophages induces formation of nonreplicating persisters. *Science* **343**, 204–208.

Heller, D.M., Tavag, M., and Hochschild, A. (2017). CbtA toxin of *Escherichia coli* inhibits cell division and cell elongation via direct and independent interactions with FtsZ and MreB. *PLoS Genet.* **13**.

Hilliou, F., and Tran, T. (2013). RqPCRAnalysis: Analysis of quantitative real-time PCR data. 202–211.

Hirsch, S., Kim, J., Muñoz, A., Heckmann, A.B., Downie, J.A., and Oldroyd, G.E.D. (2009). GRAS Proteins Form a DNA Binding Complex to Induce Gene Expression during Nodulation Signaling in *Medicago truncatula*. *Plant Cell* **21**, 545–557.

Hoffer, E.D., Miles, S.J., and Dunham, C.M. (2017). The structure and function of *Mycobacterium tuberculosis* MazF-mt6 toxin provide insights into conserved features of MazF endonucleases. *J. Biol. Chem.* **292**, 7718–7726.

Huang, C.Y., Gonzalez-Lopez, C., Henry, C., Mijakovic, I., and Ryan, K.R. (2020). hipBA toxin-antitoxin systems mediate persistence in *Caulobacter crescentus*. *Sci. Rep.* **10**, 2865.

Hurley, J.M., and Woychik, N.A. (2009). Bacterial toxin HigB associates with ribosomes and mediates translation-dependent mRNA cleavage at A-rich sites. *J. Biol. Chem.* **284**, 18605–18613.

Hurley, J.M., Cruz, J.W., Ouyang, M., and Woychik, N.A. (2011). Bacterial toxin RelE mediates frequent codon-independent mRNA cleavage from the 5' end of coding regions in vivo. *J. Biol. Chem.* **286**, 14770–14778.

Hwang, J.Y., and Buskirk, A.R. (2017). A ribosome profiling study of mRNA cleavage by the endonuclease RelE. *Nucleic Acids Res.* **45**, D327–D336.

I Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**, 23–28.

Ishida, Y., Inouye, K., Ming, O., and Inouye, M. (2019). A CUGGU/UUGGU-specific MazF homologue from *Methanohalobium evestigatum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **518**, 533–540.

J Jaffe, A., Ogura, T., and Hiraga, S. (1985). Effects of the ccd function of the F plasmid on bacterial growth. *J. Bacteriol.* **163**, 841–849.

Jinks-Robertson, S., Gourse, R.L., and Nomura, M. (1983). Expression of rRNA and tRNA genes in *Escherichia coli*: Evidence for feedback regulation by products of rRNA operons. *Cell* **33**, 865–876.

Jones, J.D.G., and Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. *Nature* **444**, 323–329.

Jones, K.M., Kobayashi, H., Davies, B.W., Taga, M.E., and Walker, G.C. (2007). How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium*–*Medicago* model. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**, 619–633.

De Jonge, N., Garcia-Pino, A., Buts, L., Haesaerts, S., Charlier, D., Zangger, K., Wyns, L., De Greve, H., and Loris, R. (2009). Rejuvenation of CcdB-Poisoned Gyrase by an Intrinsically Disordered Protein Domain. *Mol. Cell* **35**, 154–163.

De Jonge, N., Simic, M., Buts, L., Haesaerts, S., Roelants, K., Garcia-Pino, A., Sterckx, Y., De Greve, H., Lah, J., and Loris, R. (2012). Alternative interactions define gyrase specificity in the CcdB family. *Mol. Microbiol.* **84**, 965–978.

Jørgensen, M.G., Pandey, D.P., Jaskolska, M., and Gerdes, K. (2009). HicA of *Escherichia coli* defines a novel family of translation-independent mRNA interferases in bacteria and archaea. *J. Bacteriol.* *191*, 1191–1199.

Jurenas, D., Chatterjee, S., Konijnenberg, A., Sobott, F., Droogmans, L., Garcia-Pino, A., and Van Melderen, L. (2017). AtaT blocks translation initiation by N-acetylation of the initiator tRNA^{Met}. *Nat. Chem. Biol.* *13*, 640–646.

Jurénas, D., Garcia-Pino, A., and Van Melderen, L. (2017). Novel toxins from type II toxin-antitoxin systems with acetyltransferase activity. *Plasmid*.

Jurénas, D., Van Melderen, L., and Garcia-Pino, A. (2019). Mechanism of regulation and neutralization of the AtaR–AtaT toxin–antitoxin system. *Nat. Chem. Biol.* *15*, 285–294.

K

Kamada, K., and Hanaoka, F. (2005). Conformational change in the catalytic site of the ribonuclease YoeB toxin by YefM antitoxin. *Mol. Cell* *19*, 497–509.

Kang, S.-M., Kim, D.-H., Jin, C., and Lee, B.-J. (2018). A Systematic Overview of Type II and III Toxin-Antitoxin Systems with a Focus on Druggability. *Toxins (Basel)*. *10*.

Kaspy, I., Rotem, E., Weiss, N., Ronin, I., Balaban, N.Q., and Glaser, G. (2013). HipA-mediated antibiotic persistence via phosphorylation of the glutamyl-tRNA-synthetase. *Nat. Commun.* *4*, 3001.

Kawano, M., Aravind, L., and Storz, G. (2007). An antisense RNA controls synthesis of an SOS-induced toxin evolved from an antitoxin. *Mol. Microbiol.* *64*, 738–754.

Kazmierczak, T., Yang, L., Boncompagni, E., Meilhoc, E., Frugier, F., Frenedo, P., Bruand, C., Gruber, V., and Brouquisse, R. (2020). Legume nodule senescence: a coordinated death mechanism between bacteria and plant cells (Elsevier Ltd).

Khoo, K.S., Loll, B., Wai, T.C., Shoeman, R.L., Ngoo, L., Chew, C.Y., and Meinhart, A. (2007). Molecular and structural characterization of the PezAT chromosomal toxin-antitoxin system of the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* *282*, 19606–19618.

Kim, D.H., Kang, S.M., Park, S.J., Jin, C., Yoon, H.J., and Lee, B.J. (2018). Functional insights into the *Streptococcus pneumoniae* HicBA toxin-antitoxin system based on a structural study. *Nucleic Acids Res.* *46*, 6371–6386.

Klonowska, A., Melkonian, R., Miché, L., Tisseyre, P., and Moulin, L. (2018). Transcriptomic profiling of *Burkholderia phymatum* STM815, *Cupriavidus taiwanensis* LMG19424 and *Rhizobium mesoamericanum* STM3625 in response to *Mimosa pudica* root exudates illuminates the molecular basis of their nodulation competitiveness and symbiotic ev. *BMC Genomics* *19*, 105.

Kobayashi, H., De Nisco, N.J., Chien, P., Simmons, L.A., and Walker, G.C. (2009). *Sinorhizobium meliloti* CpdR1 is critical for co-ordinating cell cycle progression and the symbiotic chronic infection. *Mol. Microbiol.* *73*, 586–600.

L

De La Hoz, A.B., Ayora, S., Sitkiewicz, I., Fernández, S., Pankiewicz, R., Alonso, J.C., and Ceglowski, P. (2000). Plasmid copy-number control and better-than-random segregation genes of pSM19035 share a common regulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 728–733.

De La Peña, T.C., Fedorova, E., Pueyo, J.J., and Mercedes Lucas, M. (2018). The symbiosome: Legume and rhizobia co-evolution toward a nitrogen-fixing organelle? *Front. Plant Sci.* *8*.

Latch, J.N., and Margolin, W. (1997). Generation of buds, swellings, and branches instead of filaments

after blocking the cell cycle of *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* *179*, 2373–2381.

Laursen, B.S., Sorensen, H.P., Mortensen, K.K., and Sperling-Petersen, H.U. (2005). Initiation of Protein Synthesis in Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *69*, 101–123.

Lee, K.-Y., and Lee, B.-J. (2016). Structure, Biology, and Therapeutic Application of Toxin-Antitoxin Systems in Pathogenic Bacteria. *Toxins (Basel)*. *8*.

Lee, I.-G., Lee, S.J., Chae, S., Lee, K.-Y., Kim, J.-H., Lee, B.-J., A.T., B., W.L., D., N.R., G., G., M., et al. (2015). Structural and functional studies of the *Mycobacterium tuberculosis* VapBC30 toxin-antitoxin system: implications for the design of novel antimicrobial peptides. *Nucleic Acids Res.* *43*, 7624–7637.

Lehnherr, H., and Yarmolinsky, M.B. (1995). Addiction protein phd of plasmid prophage P1 is a substrate of the ClpXP serine protease of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 3274–3277.

Lehnherr, H., Maguin, E., Jafri, S., and Yarmolinsky, M.B. (1993). Plasmid addiction genes of bacteriophage P1: doc, which causes cell death on curing of prophage, and phd, which prevents host death when prophage is retained. *J. Mol. Biol.* *233*, 414–428.

Leplae, R., Geeraerts, D., Hallez, R., Guglielmini, J., Drze, P., and Van Melderen, L. (2011). Diversity of bacterial type II toxin-antitoxin systems: A comprehensive search and functional analysis of novel families. *Nucleic Acids Res.* *39*, 5513–5525.

Lerouge, P., Roche, P., Faucher, C., Maillet, F., Truchet, G., Promé, J.C., and Dénarié, J. (1990). Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature* *344*, 781–784.

LeRoux, M., Culviner, P.H., Liu, Y.J., Littlehale, M.L., and Laub, M.T. (2020). Stress Can Induce Transcription of Toxin-Antitoxin Systems without Activating Toxin. *Mol. Cell* *79*, 280–292.e8.

Li, G.Y., Zhang, Y., Inouye, M., and Ikura, M. (2008). Structural Mechanism of Transcriptional Autorepression of the *Escherichia coli* RelB/RelE Antitoxin/Toxin Module. *J. Mol. Biol.* *380*, 107–119.

Li, G.Y., Zhang, Y., Inouye, M., and Ikuma, M. (2009). Inhibitory mechanism of *Escherichia coli* RelE-RelB toxin-antitoxin module involves a helix displacement near an mRNA interferase active site. *J. Biol. Chem.* *284*, 14628–14636.

Li, P., Tai, C., Deng, Z., Gan, J., Oggioni, M.R., and Ou, H.Y. (2016). Identification and characterization of chromosomal relBE toxin-Antitoxin locus in *Streptomyces cattleya* DSM46488. *Sci. Rep.* *6*, 1–13.

Liang, Y., Gao, Z., Wang, F., Zhang, Y., Dong, Y., and Liu, Q. (2014). Structural and functional characterization of *Escherichia coli* toxin-antitoxin complex dinJ-yafQ. *J. Biol. Chem.* *289*, 21191–21202.

Limpens, E., Lvanov, S., Van Esse, W., Voets, G., Fedorova, E., and Bisseling, T. (2009). Medicago N₂-Fixing symbiosomes acquire the endocytic identity marker Rab7 but delay the acquisition of vacuolar identity. *Plant Cell* *21*, 2811–2828.

Lindström, K., and Mousavi, S.A. (2020). Effectiveness of nitrogen fixation in rhizobia. *Microb. Biotechnol.* *13*, 1314–1335.

Lioy, V.S., Martín, M.T., Camacho, A.G., Lurz, R., Antelmann, H., Hecker, M., Hitchin, E., Ridge, Y., Wells, J.M., and Alonso, J.C. (2006). pSM19035-encoded ζ toxin induces stasis followed by death in a subpopulation of cells. *Microbiology* *152*, 2365–2379.

Lipuma, J. (2015). Rôle des systèmes toxine antitoxine de *Sinorhizobium meliloti* au cours de

l'interaction symbiotique avec *Medicago* sp. [Http://Www.Theses.Fr](http://www.theses.fr).

Lipuma, J., Cinege, G., Bodogai, M., Oláh, B., Kiers, A., Endre, G., Dupont, L., and Dusha, I. (2014). A vapBC-type toxin-antitoxin module of *Sinorhizobium meliloti* influences symbiotic efficiency and nodule senescence of *Medicago sativa*. *Environ. Microbiol.* *16*, 3714–3729.

Liu, C.W., Breakspear, A., Stacey, N., Findlay, K., Nakashima, J., Ramakrishnan, K., Liu, M., Xie, F., Endre, G., de Carvalho-Niebel, F., et al. (2019). A protein complex required for polar growth of rhizobial infection threads. *Nat. Commun.* *10*, 1–17.

Liu, W.Y.Y., Ridgway, H.J., James, T.K., James, E.K., Chen, W.M., Sprent, J.I., Young, J.P.W., and Andrews, M. (2014). *Burkholderia* sp. Induces Functional Nodules on the South African Invasive Legume *Dipogon lignosus* (Phaseoleae) in New Zealand Soils. *Microb. Ecol.* *68*, 542–555.

Lobato-Márquez, D., Díaz-Orejas, R., and García-del Portillo, F. (2016). Toxin-antitoxins and bacterial virulence. *FEMS Microbiol. Rev.* *40*, 592–609.

Lopes, A.P.Y., Lopes, L.M., Fraga, T.R., Chura-Chambi, R.M., Sanson, A.L., Cheng, E., Nakajima, E., Morganti, L., and Martins, E.A.L. (2014). VapC from the Leptospiral VapBC Toxin-Antitoxin Module Displays Ribonuclease Activity on the Initiator tRNA. *PLoS One* *9*, e101678.

Luo, L., Yao, S.-Y., Becker, A., Rüberg, S., Yu, G.-Q., Zhu, J.-B., and Cheng, H.-P. (2005). Two new *Sinorhizobium meliloti* LysR-type transcriptional regulators required for nodulation. *J. Bacteriol.* *187*, 4562–4572.

M

Ma, D., Mandell, J.B., Donegan, N.P., Cheung, A.L., Ma, W., Rothenberger, S., Shanks, R.M.Q., Richardson, A.R., and Urish, K.L. (2019). The toxin-antitoxin mazEF drives *Staphylococcus aureus* biofilm formation, antibiotic tolerance, and chronic infection. *MBio* *10*.

Madsen, E.B., Madsen, L.H., Radutoiu, S., Olbryt, M., Rakwalska, M., Szczyglowski, K., Sato, S., Kaneko, T., Tabata, S., Sandal, N., et al. (2003). A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. *Nature* *425*, 637–640.

Maehigashi, T., Ruangprasert, A., Miles, S.J., and Dunham, C.M. (2015). Molecular basis of ribosome recognition and mRNA hydrolysis by the *E. coli* YafQ toxin. *Nucleic Acids Res.* *43*, 8002–8012.

Magnusson, L.U., Farewell, A., and Nyström, T. (2005). ppGpp: A global regulator in *Escherichia coli*. *Trends Microbiol.* *13*, 236–242.

Makarova, K.S., Wolf, Y.I., and Koonin, E. V. (2013). Comparative genomics of defense systems in archaea and bacteria. *Nucleic Acids Res.* *41*, 4360–4377.

Markovski, M., and Wickner, S. (2013). Preventing bacterial suicide: A novel toxin-antitoxin strategy. *Mol. Cell.*

Maróti, G., and Kondorosi, É. (2014). Nitrogen-fixing *Rhizobium*-legume symbiosis: Are polyploidy and host peptide-governed symbiont differentiation general principles of endosymbiosis? *Front. Microbiol.* *5*.

Martins, P.M.M., Merfa, M. V, Takita, M.A., and De Souza, A.A. (2018). Persistence in Phytopathogenic Bacteria: Do We Know Enough? *Front. Microbiol.* *9*, 1099.

Masson-Boivin, C., Giraud, E., Perret, X., and Batut, J. (2009). Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? *Trends Microbiol.* *17*, 458–466.

Masuda, H., Tan, Q., Awano, N., Yamaguchi, Y., and Inouye, M. (2012b). A novel membrane-bound

toxin for cell division, CptA (YgfX), inhibits polymerization of cytoskeleton proteins, FtsZ and MreB, in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **328**, 174–181.

Masuda, H., Tan, Q., Awano, N., Wu, K.-P., and Inouye, M. (2012a). YeeU enhances the bundling of cytoskeletal polymers of MreB and FtsZ, antagonizing the CbtA (YeeV) toxicity in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **84**, 979–989.

Maté, M.J., Vincentelli, R., Foos, N., Raoult, D., Cambillau, C., and Ortiz-Lombardía, M. (2012). Crystal structure of the DNA-bound VapBC2 antitoxin/toxin pair from *Rickettsia felis*. *Nucleic Acids Res.* **40**, 3245–3258.

Mattison, K., Wilbur, J.S., So, M., and Brennan, R.G. (2006). Structure of FitAB from *Neisseria gonorrhoeae* bound to DNA reveals a tetramer of toxin-antitoxin heterodimers containing pin domains and ribbon-helix-helix motifs. *J. Biol. Chem.* **281**, 37942–37951.

McKenzie, J.L., Robson, J., Berney, M., Smith, T.C., Ruthe, A., Gardner, P.P., Arcus, V.L., and Cook, G.M. (2012). A VapBC Toxin-Antitoxin Module Is a Posttranscriptional Regulator of Metabolic Flux in *Mycobacteria*. *J. Bacteriol.* **194**, 2189–2204.

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.

Van Melderen, L., and Wood, T.K. (2017). Commentary: What Is the Link between Stringent Response, Endoribonuclease Encoding Type II Toxin-Antitoxin Systems and Persistence? *Front. Microbiol.* **8**.

Van Melderen, L., Bernard, P., and Couturier, M. (1994). Lon-dependent proteolysis of CcdA is the key control for activation of CcdB in plasmid-free segregant bacteria. *Mol. Microbiol.* **11**, 1151–1157.

Van Melderen, L., Jurenas, D., and Garcia-Pino, A. (2018). Messing up translation from the start: How AtaT inhibits translation initiation in *E. coli*. *RNA Biol.* **15**, 303–307.

Mergaert, P., Nikovics, K., Kelemen, Z., Maunoury, N., Vaubert, D., Kondorosi, A., and Kondorosi, E. (2003). A novel family in *Medicago truncatula* consisting of more than 300 nodule-specific genes coding for small, secreted polypeptides with conserved cysteine motifs. *Plant Physiol.* **132**, 161–173.

Mergaert, P., Uchiumi, T., Alunni, B., Evanno, G., Cheron, A., Catrice, O., Mausset, A.-E., Barloy-Hubler, F., Galibert, F., Kondorosi, A., et al. (2006). Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the *Rhizobium-legume* symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 5230–5235.

Mets, T., Lippus, M., Schryer, D., Liiv, A., Kasari, V., Paier, A., Maiväli, Ü., Remme, J., Tenson, T., and Kaldalu, N. (2017). Toxins MazF and MqsR cleave *Escherichia coli* rRNA precursors at multiple sites. *RNA Biol.* **14**, 124–135.

Mets, T., Kasvandik, S., Saarma, M., Maiväli, Ü., Tenson, T., and Kaldalu, N. (2019). Fragmentation of *Escherichia coli* mRNA by MazF and MqsR. *Biochimie* **156**, 79–91.

Miclea, P.S., Péter, M., Végh, G., Cinege, G., Kiss, E., Váró, G., Horváth, I., and Dusha, I. (2010). Atypical Transcriptional Regulation and Role of a New Toxin-Antitoxin-Like Module and Its Effect on the Lipid Composition of *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **23**, 638–650.

Milunovic, B., diCenzo, G.C., Morton, R.A., and Finan, T.M. (2014). Cell growth inhibition upon deletion of four toxin-antitoxin loci from the megaplasmids of *sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **196**, 811–824.

Miyamoto, T., Kato, Y., Sekiguchi, Y., Tsuneda, S., and Noda, N. (2016). Characterization of MazF-

Mediated Sequence-Specific RNA Cleavage in *Pseudomonas putida* Using Massive Parallel Sequencing. *PLoS One* *11*, e0149494.

Miyamoto, T., Ota, Y., Yokota, A., Suyama, T., Tsuneda, S., and Noda, N. (2017). Characterization of a *Deinococcus radiodurans* MazF: A UACA-specific RNA endoribonuclease. *Microbiologyopen* *6*.

Molinaro, A.L., Kashipathy, M.M., Lovell, S., Battaile, K.P., Coussens, N.P., Shen, M., and Daines, D.A. (2019). Crystal structure of vapbc-1 from nontypeable haemophilus influenzae and the effect of PIN domain mutations on survival during infection. *J. Bacteriol.* *201*.

Moreno-Del Álamo, M., Tabone, M., Muñoz-Martínez, J., Valverde, J.R., and Alonso, J.C. (2019). Toxin ζ reduces the atp and modulates the uridine diphosphate-n-acetylglucosamine pool. *Toxins (Basel)*. *11*.

Moyed, H.S., and Bertrand, K.P. (1983). hipA, a newly recognized gene of *Escherichia coli* K-12 that affects frequency of persistence after inhibition of murein synthesis. *J. Bacteriol.* *155*, 768–775.

Mukherjee, A., Wheaton, G.H., Counts, J.A., Ijeomah, B., Desai, J., and Kelly, R.M. (2017). VapC toxins drive cellular dormancy under uranium stress for the extreme thermoacidophile *Metallosphaera prunae*. *Environ. Microbiol.* *19*, 2831–2842.

Murayama, K., Orth, P., De La Hoz, A.B., Alonso, J.C., and Saenger, W. (2001). Crystal structure of ω transcriptional repressor encoded by *Streptococcus pyogenes* plasmid pSM19035 at 1.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.* *314*, 789–796.

Muthuramalingam, M., White, J.C., and Bourne, C.R. (2016). Toxin-Antitoxin Modules Are Pliable Switches Activated by Multiple Protease Pathways. *Toxins (Basel)*. *8*.

Mutschler, H., and Meinhart, A. (2013). Type II toxin-antitoxin loci: The epsilon/zeta family. In *Prokaryotic Toxin-Antitoxins*, (Springer-Verlag Berlin Heidelberg), pp. 205–223.

Mutschler, H., Reinstein, J., and Meinhart, A. (2010). Assembly dynamics and stability of the pneumococcal epsilon zeta antitoxin toxin (PezAT) system from *Streptococcus pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* *285*, 21797–21806.

Mutschler, H., Gebhardt, M., Shoeman, R.L., and Meinhart, A. (2011). A novel mechanism of programmed cell death in bacteria by toxin-antitoxin systems corrupts peptidoglycan synthesis. *PLoS Biol.* *9*.

N

Nariya, H., Inouye, M., The, J.S., Zhang, J., Connell, N., Rubin, H., Inouye, M., White, E., Inouye, M., and Alonso, J.C. (2008). MazF, an mRNA interferase, mediates programmed cell death during multicellular *Myxococcus* development. *Cell* *132*, 55–66.

Nash, D.T., and Schulman, H.M. (1976). The absence of oxidized leghemoglobin in soybean root nodules during nodule development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *68*, 781–785.

Nielsen, S.V., Turnbull, K.J., Roghanian, M., Bærentsen, R., Semanjski, M., Brodersen, D.E., Macek, B., and Gerdes, K. (2019). Serine-threonine kinases encoded by split hipA homologs inhibit tryptophanyl-tRNA synthetase. *MBio* *10*.

Nigam, A., Kumar, S., and Engelberg-Kulka, H. (2018). Quorum Sensing Extracellular Death Peptides Enhance the Endoribonucleolytic Activities of *Mycobacterium tuberculosis* MazF Toxins. *MBio* *9*, e00685-18.

Ning, D., Ye, S., Liu, B., and Chang, J. (2011). The proteolytic activation of the relNEs (ssr1114/slr0664) toxin-antitoxin system by both proteases Lons and ClpP2s/Xs of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Curr.*

Microbiol. 63, 496–502.

Ning, D., Liu, S., Xu, W., Zhuang, Q., Wen, C., and Tang, X. (2013). Transcriptional and Proteolytic Regulation of the Toxin-Antitoxin Locus vapBC10 (*ssr2962/slr1767*) on the Chromosome of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *PLoS One* 8, e80716.

O Oberer, M., Zangger, K., Gruber, K., and Keller, W. (2007). The solution structure of ParD, the antidote of the ParDE toxin-antitoxin module, provides the structural basis for DNA and toxin binding. *Protein Sci.* 16, 1676–1688.

Ogden, A.J., McAleer, J.M., and Kahn, M.L. (2019). Characterization of the sinorhizobium meliloti HslUV and ClpXP protease systems in free-living and symbiotic states. *J. Bacteriol.* 201.

Ogura, T., and Hiraga, S. (1983). Mini-F plasmid genes that couple host cell division to plasmid proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80, 4784–4788.

Oláh, B., Kiss, E., Györgypál, Z., Borzi, J., Cinege, G., Csanádi, G., Batut, J., Kondorosi, a, and Dusha, I. (2001). Mutation in the *ntrR* gene, a member of the *vap* gene family, increases the symbiotic efficiency of *Sinorhizobium meliloti*. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 14, 887–894.

Oono, R., and Denison, R.F. (2010). Comparing symbiotic efficiency between swollen versus nonswollen rhizobial bacteroids. *Plant Physiol.* 154, 1541–1548.

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

P Pan, H., and Wang, D. (2017). Nodule cysteine-rich peptides maintain a working balance during nitrogen-fixing symbiosis. *Nat. Plants* 3, 1–6.

Pandey, D.P., and Gerdes, K. (2005). Toxin-antitoxin loci are highly abundant in free-living but lost from host-associated prokaryotes. *Nucleic Acids Res.* 33, 966–976.

Park, D., Yoon, H., Lee, K., Park, S., Cheon, S., Lee, H.H., Lee, S.J., and Lee, B. (2020). Crystal structure of proteolyzed VapBC and DNA-bound VapBC from *Salmonella enterica* Typhimurium LT2 and VapC as a putative Ca²⁺-dependent ribonuclease. *FASEB J.* 34, 3051–3068.

Park, J.-H., Yamaguchi, Y., and Inouye, M. (2011). *Bacillus subtilis* MazF-bs (EndoA) is a UACAU-specific mRNA interferase. *FEBS Lett.* 585, 2526–2532.

Pathak, C., Im, H., Yang, Y.J., Yoon, H.J., Kim, H.M., Kwon, A.R., and Lee, B.J. (2013). Crystal structure of apo and copper bound HP0894 toxin from *Helicobacter pylori* 26695 and insight into mRNase activity. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1834, 2579–2590.

Pavelich, I.J., Maehigashi, T., Hoffer, E.D., Ruangprasert, A., Miles, S.J., and Dunham, C.M. (2019). Monomeric YoeB toxin retains RNase activity but adopts an obligate dimeric form for thermal stability. *Nucleic Acids Res.* 47, 10400–10413.

Pecrix, Y., Staton, S.E., 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.

Peltier, J., Hamiot, A., Garneau, J.R., Boudry, P., Maikova, A., Hajnsdorf, E., Fortier, L.C., Dupuy, B., and Soutourina, O. (2020). Type I toxin-antitoxin systems contribute to the maintenance of mobile genetic elements in *Clostridioides difficile*. *Commun. Biol.* 3.

Peng, J., Triplett, L.R., Schachterle, J.K., and Sundin, G.W. (2019). Chromosomally encoded hok-sok toxin-antitoxin system in the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*: Identification and functional characterization. *Appl. Environ. Microbiol.* *85*.

Pérez-Montaño, F., Jiménez-Guerrero, I., Del Cerro, P., Baena-Ropero, I., López-Baena, F.J., Ollero, F.J., Bellogín, R., Lloret, J., and Espuny, R. (2014). The symbiotic biofilm of *Sinorhizobium fredii* SMH12, necessary for successful colonization and symbiosis of *Glycine max* cv Osumi, is regulated by Quorum Sensing systems and inducing flavonoids via NodD1. *PLoS One* *9*, e105901.

Pérez Guerra, J.C., Coussens, G., De Keyser, A., De Rycke, R., De Bodt, S., Van De Velde, W., Goormachtig, S., and Holsters, M. (2010). Comparison of developmental and stress-induced nodule senescence in *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.* *152*, 1574–1584.

Perret, X., Staehelin, C., and Broughton, W.J. (2000). Molecular Basis of Symbiotic Promiscuity.

Pierre, O., Engler, G., Hopkins, J., Brau, F., Boncompagni, E., and Hérouart, D. (2013). Peribacteroid space acidification: a marker of mature bacteroid functioning in *Medicago truncatula* nodules. *Plant. Cell Environ.* *36*, 2059–2070.

Pierre, O., Hopkins, J., Combiér, M., Baldacci, F., Engler, G., Brouquisse, R., Hérouart, D., and Boncompagni, E. (2014). Involvement of papain and legumain proteinase in the senescence process of *Medicago truncatula* nodules. *New Phytol.* *202*, 849–863.

Pimentel, B., Madine, M.A., and de la Cueva-Méndez, G. (2005). Kid cleaves specific mRNAs at UUACU sites to rescue the copy number of plasmid R1. *EMBO J.* *24*, 3459–3469.

Pini, F., De Nisco, N.J., Ferri, L., Penterman, J., Fioravanti, A., Brilli, M., Mengoni, A., Bazzicalupo, M., Viollier, P.H., Walker, G.C., et al. (2015). Cell Cycle Control by the Master Regulator CtrA in *Sinorhizobium meliloti*. *PLoS Genet.* *11*, e1005232.

Piscotta, F.J., Jeffrey, P.D., and James Link, A. (2019). ParST is a widespread toxin–antitoxin module that targets nucleotide metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *116*, 826–834.

Pobigaylo, N., Wetter, D., Szymczak, S., Schiller, U., Kurtz, S., Meyer, F., Nattkemper, T.W., and Becker, A. (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.

Prysak, M.H., Mozdierz, C.J., Cook, A.M., Zhu, L., Zhang, Y., Inouye, M., and Woychik, N.A. (2009). Bacterial toxin YafQ is an endoribonuclease that associates with the ribosome and blocks translation elongation through sequence-specific and frame-dependent mRNA cleavage. *Mol. Microbiol.* *71*, 1071–1087.

Pueppke, S.G., and Broughton, W.J. (1999). *Rhizobium* sp. Strain NGR234 and *R. fredii* USDA257 Share Exceptionally Broad, Nested Host Ranges. *J. Bacteriol.* *181*, 293–318.

Puppo, A., Groten, K., Bastian, F., Carzaniga, R., Soussi, M., Lucas, M.M., De Felipe, M.R., Harrison, J., Vanacker, H., and Foyer, C.H. (2005). Legume nodule senescence: Roles for redox and hormone signalling in the orchestration of the natural aging process. *New Phytol.* *165*, 683–701.

Puskás, L.G., Nagy, Z.B., Kelemen, J.Z., Rüberg, S., Bodogai, M., Becker, A., and Dusha, I. (2004). Wide-range transcriptional modulating effect of ntrR under microaerobiosis in *Sinorhizobium meliloti*. *Mol. Genet. Genomics* *272*, 275–289.

Q

Qian, H., Yao, Q., Tai, C., Deng, Z., Gan, J., and Ou, H.-Y. (2018). Identification and characterization of acetyltransferase-type toxin-antitoxin locus in *Klebsiella pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* *108*, 336–349.

R

Qian, H., Yu, H., Li, P., Zhu, E., Yao, Q., Tai, C., Deng, Z., Gerdes, K., He, X., Gan, J., et al. (2019). Toxin-antitoxin operon *kacAT* of *Klebsiella pneumoniae* is regulated by conditional cooperativity via a W-shaped KacA-KacT complex. *Nucleic Acids Res.* *47*, 7690–7702.

Raina, M., and Ibba, M. (2014). tRNAs as regulators of biological processes. *Front. Genet.* *5*.

Rajwar, A., Sahgal, M., and Johri, B.N. (2013). Legume-rhizobia symbiosis and interactions in agroecosystems. In *Plant Microbe Symbiosis: Fundamentals and Advances*, (Springer India), pp. 233–265.

Ramage, H.R., Connolly, L.E., and Cox, J.S. (2009). Comprehensive functional analysis of *Mycobacterium tuberculosis* toxin-antitoxin systems: implications for pathogenesis, stress responses, and evolution. *PLoS Genet.* *5*, e1000767.

Ramisetty, B.C.M., Ghosh, D., Roy Chowdhury, M., and Santhosh, R.S. (2016). What Is the Link between Stringent Response, Endoribonuclease Encoding Type II Toxin–Antitoxin Systems and Persistence? *Front. Microbiol.* *7*.

Rascio, N., and La Rocca, N. (2013). Biological Nitrogen Fixation☆. In *Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences*, (Elsevier), p.

Redmond, J.W., Batley, M., Innes, R.W., Kuempel, P.L., Djordjevic, M.A., and Rolfe, B.G. (1986). Flavones Induce Expression of the Nodulation Genes in *Rhizobium*. In *Recognition in Microbe-Plant Symbiotic and Pathogenic Interactions*, (Springer Berlin Heidelberg), pp. 115–121.

Ren, B., Wang, X., Duan, J., and Ma, J. (2019). Rhizobial tRNA-derived small RNAs are signal molecules regulating plant nodulation. *Science* (80-.). *365*, 919–922.

Rocker, A., Peschke, M., Kittilä, T., Sakson, R., Brieke, C., and Meinhart, A. (2018). The *ng-ζ1* toxin of the gonococcal epsilon/zeta toxin/antitoxin system drains precursors for cell wall synthesis. *Nat. Commun.* *9*, 1–11.

Rodriguez, H., Mendoza, A., Antonia Cruz, M., Holguin, G., Glick, B.R., and Bashan, Y. (2006). Pleiotropic physiological effects in the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense* following chromosomal labeling in the *clpX* gene. *FEMS Microbiol. Ecol.* *57*, 217–225.

Ronneau, S., and Helaine, S. (2019). Clarifying the Link between Toxin–Antitoxin Modules and Bacterial Persistence. *J. Mol. Biol.* *431*, 3462–3471.

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

Roux, B., Rodde, N., Jardinaud, M.-F., Timmers, T., Sauviac, L., Cottret, L., Carrère, S., Sallet, E., Courcelle, E., Moreau, S., 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.* *77*, 817–837.

Roy, C.R., and Cherfils, J. (2015). Structure and function of Fic proteins. *Nat. Rev. Microbiol.* *13*, 631–640.

Roy, M., Kundu, A., Bhunia, A., Das Gupta, S., De, S., and Das, A.K. (2019). Structural characterization of VapB46 antitoxin from *Mycobacterium tuberculosis*: insights into VapB46–DNA binding. *FEBS J.* *286*, 1174–1190.

Ruangprasert, A., Maehigashi, T., Miles, S.J., Giridharan, N., Liu, J.X., and Dunham, C.M. (2014). Mechanisms of toxin inhibition and transcriptional repression by *Escherichia coli* DinJ-YafQ. *J. Biol. Chem.* *289*, 20559–20569.

Ruangprasert, A., Maehigashi, T., Miles, S.J., and Dunham, C.M. (2017). Importance of the *E. coli* DinJ antitoxin carboxy terminus for toxin suppression and regulated proteolysis. *Mol. Microbiol.* *104*, 65–77.

Rycroft, J.A., Gollan, B., Grabe, G.J., Hall, A., Cheverton, A.M., Larrouy-Maumus, G., Hare, S.A., and Helaine, S. (2018). Activity of acetyltransferase toxins involved in *Salmonella* persister formation during macrophage infection. *Nat. Commun.* *9*.

S

Sachs, J.L., Quides, K.W., and Wendlandt, C.E. (2018). Legumes versus rhizobia: a model for ongoing conflict in symbiosis. *New Phytol.* *219*, 1199–1206.

Sala, A., Bordes, P., and Genevaux, P. (2014). Multiple toxin-antitoxin systems in *Mycobacterium tuberculosis*. *Toxins (Basel)*. *6*, 1002–1020.

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.* *20*, 339–354.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Mol. Cloning a Lab. Manual.

Samson, J.E., Spinelli, S., Cambillau, C., and Moineau, S. (2013). Structure and activity of AbiQ, a lactococcal endoribonuclease belonging to the type III toxin-antitoxin system. *Mol. Microbiol.* *87*, 756–768.

Schifano, J.M., and Woychik, N.A. (2017). Cloaked dagger: tRNA slicing by an unlikely culprit. *RNA Biol.* *14*, 15–19.

Schifano, J.M., Edifor, R., Sharp, J.D., Ouyang, M., Konkimalla, A., Husson, R.N., and Woychik, N.A. (2013). Mycobacterial toxin MazF-mt6 inhibits translation through cleavage of 23S rRNA at the ribosomal A site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 8501–8506.

Schifano, J.M., Vvedenskaya, I.O., Knoblauch, J.G., Ouyang, M., Nickels, B.E., and Woychik, N.A. (2014). An RNA-seq method for defining endoribonuclease cleavage specificity identifies dual rRNA substrates for toxin MazF-mt3. *Nat. Commun.* *5*, 3538.

Schifano, J.M., Cruz, J.W., Vvedenskaya, I.O., Edifor, R., Ouyang, M., Husson, R.N., Nickels, B.E., and Woychik, N.A. (2016). tRNA is a new target for cleavage by a MazF toxin. *Nucleic Acids Res.* *44*, 1256–1270.

Schumacher, M.A., Piro, K.M., Xu, W., Hansen, S., Lewis, K., and Brennan, R.G. (2009). Molecular mechanisms of HipA-mediated multidrug tolerance and its neutralization by HipB. *Science (80-)*. *323*, 396–401.

Schumacher, M.A., Min, J.K., Link, T.M., Guan, Z., Xu, W., Ahn, Y.H., Soderblom, E.J., Kurie, J.M., Evdokimov, A., Moseley, M.A., et al. (2012). Role of Unusual P Loop Ejection and Autophosphorylation in HipA-Mediated Persistence and Multidrug Tolerance. *Cell Rep.* *2*, 518–525.

Schureck, M.A., Maehigashi, T., Miles, S.J., Marquez, J., Cho, S.E., Erdman, R., and Dunham, C.M. (2014). Structure of the proteus vulgaris HigB-(HigA)₂-HigB toxin-antitoxin complex. *J. Biol. Chem.* *289*, 1060–1070.

- Schureck, M.A., Dunkle, J.A., Maehigashi, T., Miles, S.J., and Dunham, C.M. (2015). Defining the mRNA recognition signature of a bacterial toxin protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *112*, 13862–13867.
- Schureck, M.A., Repack, A., Miles, S.J., Marquez, J., and Dunham, C.M. (2016). Mechanism of endonuclease cleavage by the HigB toxin. *Nucleic Acids Res.* *44*, 7944–7953.
- Schureck, M.A., Meisner, J., Hoffer, E.D., Wang, D., Onuoha, N., Ei Cho, S., Lollar, P., and Dunham, C.M. (2019). Structural basis of transcriptional regulation by the HigA antitoxin. *Mol. Microbiol.* *111*, 1449–1462.
- Schuster, C.F., and Bertram, R. (2016). Toxin-antitoxin systems of *Staphylococcus aureus*. *Toxins (Basel)*. *8*.
- Schuster, C.F., Park, J.-H., Prax, M., Herbig, A., Nieselt, K., Rosenstein, R., Inouye, M., and Bertram, R. (2013). Characterization of a mazEF toxin-antitoxin homologue from *Staphylococcus equorum*. *J. Bacteriol.* *195*, 115–125.
- Sharrock, A., Ruthe, A., Andrews, E.S.V., Arcus, V.A., and Hicks, J.L. (2018). VapC proteins from *Mycobacterium tuberculosis* share ribonuclease sequence specificity but differ in regulation and toxicity. *PLoS One* *13*.
- Shidore, T., and Triplett, L.R. (2017). Toxin-Antitoxin Systems: Implications for Plant Disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* *55*, 161–179.
- Short, F.L., Pei, X.Y., Blower, T.R., Ong, S.-L., Fineran, P.C., Luisi, B.F., and Salmond, G.P.C. (2013). Selectivity and self-assembly in the control of a bacterial toxin by an antitoxic noncoding RNA pseudoknot. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, E241-9.
- Short, F.L., Akusobi, C., Broadhurst, W.R., and Salmond, G.P.C. (2018). The bacterial Type III toxin-antitoxin system, ToxIN, is a dynamic protein-RNA complex with stability-dependent antiviral abortive infection activity. *Sci. Rep.* *8*.
- Simmons, L.A., Cohen, S.E., Foti, J.J., and Walker, G.C. (2008). The SOS Regulatory Network. *EcoSal Plus* *3*.
- Singleton, L.A., Gibson, J.L., Tanner, E.J., McKenzie, G.J., Lee, P.L., Gonzalez, C., and Rosenberg, S.M. (2009). An SOS-regulated type 2 toxin-antitoxin system. *J. Bacteriol.* *191*, 7456–7465.
- Skjærning, R.B., Senissar, M., Winther, K.S., Gerdes, K., and Brodersen, D.E. (2019). The RES domain toxins of RES-Xre toxin-antitoxin modules induce cell stasis by degrading NAD⁺. *Mol. Microbiol.* *111*, 221–236.
- Smith, A.B., and Maxwell, A. (2006). A strand-passage conformation of DNA gyrase is required to allow the bacterial toxin, CcdB, to access its binding site. *Nucleic Acids Res.* *34*, 4667–4676.
- Song, S., and Wood, T.K. (2018). Post-segregational Killing and Phage Inhibition Are Not Mediated by Cell Death Through Toxin/Antitoxin Systems. *Front. Microbiol.* *9*, 814.
- Song, S., and Wood, T.K. (2020). Toxin/Antitoxin System Paradigms: Toxins Bound to Antitoxins Are Not Likely Activated by Preferential Antitoxin Degradation. *Adv. Biosyst.* *4*, 1900290.
- Soufo, H.J.D., Reimold, C., Linne, U., Knust, T., Gescher, J., and Graumann, P.L. (2010). Bacterial translation elongation factor EF-Tu interacts and colocalizes with actin-like MreB protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 3163–3168.
- Soutourina, O. (2019). Type I Toxin-Antitoxin Systems in Clostridia. *Toxins (Basel)*. *11*.

Spaink, H.P. (2000). Root Nodulation and Infection Factors Produced by Rhizobial Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* *54*, 257–288.

Sprent, J.I., and James, E.K. (2008). Legume-rhizobial symbiosis: an anorexic model? *New Phytol.* *179*, 3–5.

Sprent, J.I., Ardley, J.K., and James, E.K. (2013). From North to South: A latitudinal look at legume nodulation processes. *South African J. Bot.* *89*, 31–41.

Stanger, F. V., Harms, A., Dehio, C., and Schirmer, T. (2016). Crystal Structure of the Escherichia coli Fic Toxin-Like Protein in Complex with Its Cognate Antitoxin. *PLoS One* *11*, e0163654.

Stark, J.L., Mercier, K.A., Mueller, G.A., Acton, T.B., Xiao, R., Montelione, G.T., and Powers, R. (2010). Solution structure and function of YndB, an AHSA1 protein from Bacillus subtilis. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* *78*, 3328–3340.

Steitz TA (2008). A structural understanding of the dynamic ribosome machine. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 242–253.

Strauch, M.A., Spiegelman, G.B., Perego, M., Johnson, W.C., Burbulys, D., and Hoch, J.A. (1989). The transition state transcription regulator abrB of Bacillus subtilis is a DNA binding protein. *EMBO J.* *8*, 1615–1621.

Summers, M.L., Botero, L.M., Busse, S.C., and McDermott, T.R. (2000). The ++Sinorhizobium meliloti Ion protease is involved in regulating exopolysaccharide synthesis and is required for nodulation of alfalfa. *J. Bacteriol.* *182*, 2551–2558.

Sun, C., Guo, Y., Tang, K., Wen, Z., Li, B., Zeng, Z., and Wang, X. (2017). MqsR/MqsA toxin/antitoxin system regulates persistence and biofilm formation in pseudomonas putida KT2440. *Front. Microbiol.* *8*, 840.

Suzaki, T., Yoro, E., and Kawaguchi, M. (2015). Leguminous Plants: Inventors of Root Nodules to Accommodate Symbiotic Bacteria. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* *316*, 111–158.

Syska, C., Brouquisse, R., Alloing, G., Pauly, N., Frenedo, P., Bosseno, M., Dupont, L., and Boscari, A. (2019). Molecular Weapons Contribute to Intracellular Rhizobia Accommodation Within Legume Host Cell. *Front. Plant Sci.* *10*, 1496.

T

Tadege, M., Wen, J., He, J., Tu, H., Kwak, Y., Eschstruth, A., Cayrel, A., Endre, G., Zhao, P.X., Chabaud, M., et al. (2008). Large-scale insertional mutagenesis using the Tnt1 retrotransposon in the model legume Medicago truncatula. *Plant J.* *54*, 335–347.

Talavera, A., Tamman, H., Ainelo, A., Konijnenberg, A., Hadži, S., Sobott, F., Garcia-Pino, A., Hörak, R., and Loris, R. (2019). A dual role in regulation and toxicity for the disordered N-terminus of the toxin GraT. *Nat. Commun.* *10*.

Thomet, M., Trautwetter, A., Ermel, G., and Blanco, C. (2019). Characterization of HicAB toxin-antitoxin module of Sinorhizobium meliloti. *BMC Microbiol.* *19*, 10.

Tian, X.-L., Li, M., Scinocca, Z., Rutherford, H., and Li, Y.-H. (2019). ClpP is required for proteolytic regulation of type II toxin–antitoxin systems and persister cell formation in Streptococcus mutans. *Access Microbiol.* *1*, e000054.

Timmers, A.C.J., Soupene, E., Auriac, M.C., De Billy, F., Vasse, J., Boistard, P., and Truchet, G. (2000). Saprophytic intracellular rhizobia in alfalfa nodules. *Mol. Plant-Microbe Interact.* *13*, 1204–1213.

Tripathi, A., Dewan, P.C., Siddique, S.A., and Varadarajan, R. (2014). MazF-induced Growth Inhibition and Persister Generation in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* *289*, 4191–4205.

Tsilibaris, V., Maenhaut-Michel, G., and Van Melderen, L. (2006). Biological roles of the Lon ATP-dependent protease. *Res. Microbiol.* *157*, 701–713.

Turnbull, K.J., and Gerdes, K. (2017). HicA toxin of *Escherichia coli* derepresses *hic AB* transcription to selectively produce HicB antitoxin. *Mol. Microbiol.* *104*, 781–792.

U

Udvardi, M., and Poole, P.S. (2013). Transport and Metabolism in Legume-Rhizobia Symbioses. *Annu. Rev. Plant Biol.* *64*, 781–805.

V

Unterholzner, S.J., Poppenberger, B., and Rozhon, W. (2013). Toxin-antitoxin systems: Biology, identification, and application. *Mob. Genet. Elements* *3*, e26219.

VanDrisse, C.M., Parks, A.R., and Escalante-Semerena, J.C. (2017). A toxin involved in *Salmonella* persistence regulates its activity by acetylating its cognate antitoxin, a modification reversed by CobB sirtuin deacetylase. *MBio* *8*.

Vasse, J., De Billy, F., Camut, S., and Truchet, G. (1990). Correlation between ultrastructural differentiation of bacterioids and nitrogen fixation in alfalfa nodules. *J. Bacteriol.* *172*, 4295–4306.

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

Verma, S., and Bhatnagar, R. (2014). MoxT toxin of *Bacillus anthracis* exhibits sequence specific ribonuclease activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *450*, 998–1004.

Vernié, T., Kim, J., Frances, L., Ding, Y., Sun, J., Guan, D., Niebel, A., Gifford, M.L., de Carvalho-Niebel, F., and Oldroyd, G.E.D. (2015). The NIN Transcription Factor Coordinates Diverse Nodulation Programs in Different Tissues of the *Medicago truncatula* Root. *Plant Cell* *27*, 3410–3424.

W

Walling, L.R., and Butler, J.S. (2016). Structural Determinants for Antitoxin Identity and Insulation of Cross Talk between Homologous Toxin-Antitoxin Systems. *J. Bacteriol.* *198*, 3287–3295.

Walling, L.R., and Butler, J.S. (2018). Homologous VapC Toxins Inhibit Translation and Cell Growth by Sequence-Specific Cleavage of tRNA^{fMet}. *J. Bacteriol.* *200*.

Wang, D., Griffiths, J., Starker, C., Fedorova, E., Limpens, E., Ivanov, S., Bisseling, T., and Long, S. (2010). A nodule-specific protein secretory pathway required for nitrogen-fixing symbiosis. *Science* (80-). *327*, 1126–1129.

Wang, X., Kim, Y., Hong, S.H., Ma, Q., Brown, B.L., Pu, M., Tarone, A.M., Benedik, M.J., Peti, W., Page, R., et al. (2011). Antitoxin MqsA helps mediate the bacterial general stress response. *Nat. Chem. Biol.* *7*, 359–366.

Wang, X., Lord, D.M., Cheng, H.-Y., Osbourne, D.O., Hong, S.H., Sanchez-Torres, V., Quiroga, C., Zheng, K., Herrmann, T., Peti, W., et al. (2012). A new type V toxin-antitoxin system where mRNA for toxin GhoT is cleaved by antitoxin GhoS. *Nat. Chem. Biol.* *8*, 855–861.

Wang, X., Lord, D.M., Hong, S.H., Peti, W., Benedik, M.J., Page, R., and Wood, T.K. (2013). Type II toxin/antitoxin MqsR/MqsA controls type V toxin/antitoxin GhoT/GhoS. *Environ. Microbiol.* *15*, 1734–1744.

Wen, J., and Fozo, E.M. (2014). sRNA antitoxins: more than one way to repress a toxin. *Toxins* (Basel).

6, 2310–2335.

Wen, Y., Behiels, E., and Devreese, B. (2014a). Toxin-Antitoxin systems: their role in persistence, biofilm formation, and pathogenicity. *Pathog. Dis.* *70*, 240–249.

Wen, Y., Behiels, E., Felix, J., Elegheert, J., Vergauwen, B., Devreese, B., and Savvides, S.N. (2014b). The bacterial antitoxin HipB establishes a ternary complex with operator DNA and phosphorylated toxin HipA to regulate bacterial persistence. *Nucleic Acids Res.* *42*, 10134–10147.

Wen, Z., Wang, P., Sun, C., Guo, Y., and Wang, X. (2017). Interaction of type IV toxin/antitoxin systems in cryptic prophages of *Escherichia coli* K-12. *Toxins (Basel)*. *9*.

Wilcox, B., Osterman, I., Serebryakova, M., Lukyanov, D., Komarova, E., Gollan, B., Morozova, N., Wolf, Y.I., Makarova, K.S., Helaine, S., et al. (2018). *Escherichia coli* Itat is a type II toxin that inhibits translation by acetylating isoleucyl-tRNA^{Leu}. *Nucleic Acids Res.* *46*, 7873–7885.

Will, S., Joshi, T., Hofacker, I.L., Stadler, P.F., and Backofen, R. (2012). LocARNA-P: Accurate boundary prediction and improved detection of structural RNAs. *RNA* *18*, 900–914.

Winther, K.S., and Gerdes, K. (2011). Enteric virulence associated protein VapC inhibits translation by cleavage of initiator tRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 7403–7407.

Winther, K.S., and Gerdes, K. (2012). Regulation of enteric vapBC transcription: induction by VapC toxin dimer-breaking. *Nucleic Acids Res.* *40*, 4347–4357.

Winther, K., Tree, J.J., Tollervey, D., and Gerdes, K. (2016). VapCs of *Mycobacterium tuberculosis* cleave RNAs essential for translation. *Nucleic Acids Res.* *44*, 9860–9871.

Winther, K.S., Brodersen, D.E., Brown, A.K., and Gerdes, K. (2013). VapC20 of *mycobacterium tuberculosis* cleaves the sarcin-ricin loop of 23S rRNA. *Nat. Commun.* *4*, 1–9.

Wu, L., Zhang, M., Song, Y., Deng, M., He, S., Su, L., Chen, Y., Wood, T.K., and Yan, X. (2019). Deciphering the Antitoxin-Regulated Bacterial Stress Response via Single-Cell Analysis. *ACS Chem. Biol.* *acschembio.9b00721*.

X

Xiao, T.T., Schilderink, S., Moling, S., Deinum, E.E., Kondorosi, E., Franssen, H., Kulikova, O., Niebel, A., and Bisseling, T. (2014). Fate map of *Medicago truncatula* root nodules. *Dev.* *141*, 3517–3528.

Xie, Y., Wei, Y., Shen, Y., Li, X., Zhou, H., Tai, C., Deng, Z., and Ou, H.-Y. (2018). TADB 2.0: an updated database of bacterial type II toxin-antitoxin loci. *Nucleic Acids Res.* *46*, D749–D753.

Xu, B.S., Liu, M., Zhou, K., Geng, Z., Gao, Z.Q., Dong, Y.H., She, Z., and Liu, Q.S. (2019). Conformational changes of antitoxin HigA from *Escherichia coli* str. K-12 upon binding of its cognate toxin HigB reveal a new regulation mechanism in toxin-antitoxin systems. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *514*, 37–43.

Y

Yamaguchi, Y., Nariya, H., Park, J.-H., and Inouye, M. (2012). Inhibition of specific gene expressions by protein-mediated mRNA interference. *Nat. Commun.* *3*, 607.

Yang, Q.E., and Walsh, T.R. (2017). Toxin-antitoxin systems and their role in disseminating and maintaining antimicrobial resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* *41*, 343–353.

Yang, L., Syska, C., Garcia, I., Frendo, P., and Boncompagni, E. (2020a). Involvement of proteases during nodule senescence in leguminous plants. In *The Model Legume Medicago Truncatula*, (Wiley), pp. 683–693.

Yang, L., El Msehli, S., Benyamina, S., Lambert, A., Hopkins, J., Cazareth, J., Pierre, O., Hérouart, D.,

Achi-Smiti, S., Boncompagni, E., et al. (2020b). 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.

Yang, M., Gao, C., Wang, Y., Zhang, H., and He, Z.-G. (2010). Characterization of the Interaction and Cross-Regulation of Three *Mycobacterium tuberculosis* RelBE Modules. *PLoS One* *5*, e10672.

Yang, S., Wang, Q., Fedorova, E., Liu, J., Qin, Q., Zheng, Q., Price, P.A., Pan, H., Wang, D., Griffiths, J.S., et al. (2017). Microsymbiont discrimination mediated by a host-secreted peptide in *Medicago truncatula*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *114*, 6848–6853.

Yashiro, Y., Yamashita, S., and Tomita, K. (2019). Crystal Structure of the Enterohemorrhagic *Escherichia coli* AtaT-AtaR Toxin-Antitoxin Complex. *Structure* *27*, 476–484.e3.

Yeo, C.C. (2018). GNAT toxins of bacterial toxin-antitoxin systems: acetylation of charged tRNAs to inhibit translation. *Mol. Microbiol.* *108*, 331–335.

Yoon, W.S., Seok, S.H., Won, H.S., Cho, T., Lee, S.J., and Seo, M.D. (2019). Structural changes of antitoxin HigA from *Shigella flexneri* by binding of its cognate toxin HigB. *Int. J. Biol. Macromol.* *130*, 99–108.

Young, N.D., Debellé, F., Oldroyd, G.E.D., Geurts, R., Cannon, S.B., Udvardi, M.K., Benedito, V.A., Mayer, K.F.X., Gouzy, J., Schoof, H., et al. (2011). The *Medicago* genome provides insight into the evolution of rhizobial symbioses. *Nature* *480*, 520–524.

Yuan, J., Sterckx, Y., Mitchenall, L.A., Maxwell, A., Loris, R., and Waldor, M.K. (2010). *Vibrio cholerae* ParE2 poisons DNA gyrase via a mechanism distinct from other gyrase inhibitors. *J. Biol. Chem.* *285*, 40397–40408.

Yuan, J., Yamaichi, Y., and Waldor, M.K. (2011). The three *Vibrio cholerae* chromosome II-encoded ParE toxins degrade chromosome I following loss of chromosome II. *J. Bacteriol.* *193*, 611–619.

Z

Zhang, Y., Zhang, J., Hoeflich, K.P., Ikura, M., Qing, G., Inouye, M., Higgins, P.N., Couturier, M., and Ganoza, M.C. (2003). MazF cleaves cellular mRNAs specifically at ACA to block protein synthesis in *Escherichia coli*. *Mol. Cell* *12*, 913–923.

Zhang, Y., Zhu, L., Zhang, J., and Inouye, M. (2005). Characterization of ChpBK, an mRNA interferase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* *280*, 26080–26088.

Zhang, Y., Yamaguchi, Y., and Inouye, M. (2009). Characterization of YafO, an *Escherichia coli* toxin. *J. Biol. Chem.* *284*, 25522–25531.

Zhao, Y., McAnulty, M.J., and Wood, T.K. (2016). Toxin YafQ reduces *Escherichia coli* growth at low temperatures. *PLoS One* *11*.

Zhu, L., Zhang, Y., Teh, J.-S., Zhang, J., Connell, N., Rubin, H., and Inouye, M. (2006). Characterization of mRNA interferases from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* *281*, 18638–18643.

Zhu, L., Phadtare, S., Nariya, H., Ouyang, M., Husson, R.N., and Inouye, M. (2008). The mRNA interferases, MazF-mt3 and MazF-mt7 from *Mycobacterium tuberculosis* target unique pentad sequences in single-stranded RNA. *Mol. Microbiol.* *69*, 559–569.

Zhu, L., Inoue, K., Yoshizumi, S., Kobayashi, H., Zhang, Y., Ouyang, M., Kato, F., Sugai, M., and Inouye, M. (2009). *Staphylococcus aureus* MazF specifically cleaves a pentad sequence, UACAU, which is unusually abundant in the mRNA for pathogenic adhesive factor SraP. *J. Bacteriol.* *191*, 3248–3255.

Zhu, L., Sharp, J.D., Kobayashi, H., Woychik, N.A., and Inouye, M. (2010). Noncognate Mycobacterium tuberculosis toxin-antitoxins can physically and functionally interact. *J. Biol. Chem.* 285, 39732–39738.

Zipfel, C., and Oldroyd, G.E.D. (2017). Plant signalling in symbiosis and immunity. *Nature* 543, 328–336.

Zorzini, V., Buts, L., Schrank, E., Sterckx, Y.G.J., Respondek, M., Engelberg-Kulka, H., Loris, R., Zangger, K., and van Nuland, N.A.J. (2015). Escherichia coli antitoxin MazE as transcription factor: insights into MazE-DNA binding. *Nucleic Acids Res.* 43, 1241–1256.

Zorzini, V., Mernik, A., Lah, J., Sterckx, Y.G.J., De Jonge, N., Garcia-Pino, A., De Greve, H., Verse, W., and Loris, R. (2016). Substrate recognition and activity regulation of the Escherichia coli mRNA endonuclease MazF. *J. Biol. Chem.* 291, 10950–10960.

Annexe 5- Revue “Molecular Weapons
Contribute to Intracellular Rhizobia
Accommodation Within Legume Host
Cell.”



Molecular Weapons Contribute to Intracellular Rhizobia Accommodation Within Legume Host Cell

Camille Syska¹, Renaud Brouquisse¹, Geneviève Alloing¹, Nicolas Pauly², Pierre Frendo¹, Marc Bosseno¹, Laurence Dupont¹ and Alexandre Boscari^{1*}

¹ Université Côte d'Azur, INRA, CNRS, ISA, Sophia Antipolis, France, ² Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes, INRA, CNRS, Université de Toulouse, Castanet-Tolosan, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Masa H. Sato,
Kyoto Prefectural University, Japan

Reviewed by:

Mika Nomura,
Kagawa University, Japan
Jesus Montiel,
Aarhus University, Denmark

*Correspondence:

Alexandre Boscari
alexandre.boscari@inra.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Plant Microbe Interactions,
a section of the journal
Frontiers in Plant Science

Received: 08 August 2019

Accepted: 28 October 2019

Published: 26 November 2019

Citation:

Syska C, Brouquisse R, Alloing G,
Pauly N, Frendo P, Bosseno M,
Dupont L and Boscari A (2019)
Molecular Weapons Contribute to
Intracellular Rhizobia Accommodation
Within Legume Host Cell.
Front. Plant Sci. 10:1496.
doi: 10.3389/fpls.2019.01496

The interaction between legumes and bacteria of rhizobia type results in a beneficial symbiotic relationship characterized by the formation of new root organs, called nodules. Within these nodules the bacteria, released in plant cells, differentiate into bacteroids and fix atmospheric nitrogen through the nitrogenase activity. This mutualistic interaction has evolved sophisticated signaling networks to allow rhizobia entry, colonization, bacteroid differentiation and persistence in nodules. Nodule cysteine rich (NCR) peptides, reactive oxygen species (ROS), reactive nitrogen species (RNS), and toxin-antitoxin (TA) modules produced by the host plants or bacterial microsymbionts have a major role in the control of the symbiotic interaction. These molecules described as weapons in pathogenic interactions have evolved to participate to the intracellular bacteroid accommodation by escaping control of plant innate immunity and adapt the functioning of the nitrogen-fixation to environmental signalling cues.

Keywords: legumes, symbiosis, bacteroid, reactive oxygen species, nitric oxide, nitrogen-fixation, nodule-specific cysteine rich peptides, toxin-antitoxin

INTRODUCTION

The nitrogen-fixing symbiosis (NFS) results from the relationship between plants of the legume family and soil bacteria referred to as rhizobia. After a recognition step, bacteria infect legume roots, induce the formation of specialized root organs, the nodules, and colonize nodule cells by endocytosis to form structures called symbiosomes (Ferguson et al., 2010). Inside symbiosomes, bacteria differentiate into bacteroids that can convert atmospheric dinitrogen (N₂) into ammonia (NH₄⁺), via the nitrogenase activity. NH₄⁺ is then transferred to the whole plant through either amino acids or ureide compounds (Oldroyd and Downie, 2008; Masson-Boivin et al., 2009). NFS provides substantial agronomic and environmental benefits such as the substitution to nitrogen (N) fertilizer inputs to increase the plant yields (Vitousek et al., 2013).

The setting of NFS depends on a signal exchange. An initial plant defense response is observed during the first hours of the interaction with the rhizobium, and then is actively suppressed after the recognition. How rhizobia are recognized as symbionts rather than pathogens by the host plant is well described (Jones et al., 2007; Soto et al., 2009), and the strategies of the plants to adjust their own defense systems to enable rhizobia entry, colonization, and differentiation are detailed in several reviews (Oldroyd et al., 2011; Oldroyd, 2013). Recent reports support the hypothesis

that the regulation of immune response does not end at the recognition stage, but rather continue to allow rhizobial long-term accommodation inside the plant cells (Cao et al., 2017; Zipfel and Oldroyd, 2017; Berrabah et al., 2018; Yu et al., 2019). Multiple compounds such as nodule-specific cysteine rich (NCR) peptides, reactive oxygen species (ROS), reactive nitrogen species (RNS) and toxin–antitoxin (TA) modules have been shown to control the setup and the functioning of the interaction between the two partners. The purpose of the present review is to provide an overview of the role of these compounds, described as weapons in pathogenic interactions, in the intracellular bacteroid accommodation (rhizobial colonization, differentiation, and control of plant innate immunity for persistence) and the adjustment of the nitrogen-fixation activity to environmental signalling cues.

Reactive Oxygen Species (ROS) in Bacterial Colonization of the Plant Cell and Bacteroid Persistence in the Nodule

ROS are involved in adaptation to environmental perturbations (Apel and Hirt, 2004; Waszczak et al., 2018). They are also essential for promoting normal cellular processes in bacteria and plants (Mittler, 2017). The level of ROS in cells depends on the tight regulation of a complex array of ROS generating systems and detoxification mechanisms, and antioxidant metabolites like glutathione and ascorbate. The balance between ROS production and detoxification regulates the cellular redox homeostasis in plants as well as in bacteria (Apel and Hirt, 2004).

In plants, the respiratory burst oxidase homologs (RBOH) proteins (also called NADPH oxidase) emerged as the major sources of apoplastic ROS (Figure 1) and key players in the redox signaling during pathogen infection and other processes (Kadota et al., 2015; Liu and He, 2016; Montiel et al., 2016). Some members of this multigenic family are differentially expressed in *Medicago truncatula* nodule tissues and play different roles from the establishment of the symbiotic interaction to the functioning of mature nodule (Marino et al., 2011; Montiel et al., 2018). The reduction in the N_2 -fixation capacity in transgenic roots knocked-down for *MtRbohA* was the first evidence of a RBOH involvement in nodule functioning (Marino et al., 2011)(Table 1). Authors suggested that MtRBOHA activity contributes to the communication between the plant and the microsymbiont. Hydrogen peroxide production was visualized in *M. truncatula* infection zone and regulates genes involved in the nodulation process (Andrio et al., 2013). Similar results were obtained in *Phaseolus vulgaris* using knocked-down *PvRbohA* gene (Arthikala et al., 2017). Moreover, the roots overexpression of *PvRbohB* increases the number of bacteroids in the symbiosomes and improves biological N_2 -fixation in *P. vulgaris* (Arthikala et al., 2014). In contrast, mutations of *NAD1* gene (Nodules with Activated Defence) in *M. truncatula* activate a strong defence response after rhizobia are released from infection threads into plant cells, leading to necrotic cell death of symbiotic cells (Wang et al., 2016). The knock-out of either *MtRbohB*, *MtRbohC*, or *MtRbohD* in the *nad1* mutant reverts this cell death phenotype indicating that nodule innate immunity is notably mediated by

RBOH activity (Yu et al., 2018; Yu et al., 2019). These data provide evidences that MtRBOH-mediated ROS production has positive and negative functions in the reception of the microsymbionts in the nodule cells.

To cope with the plant ROS production, the microsymbiont contains a number of antioxidants and ROS-scavenging enzymes to preserve the bacteroids against ROS damages (Puppo et al., 2005; Becana et al., 2010). Analysis of bacterial mutants deficient in glutathione synthetase (*gshB*), thioredoxin (*trxL*), glutaredoxins (*grx1*, or *grx2*), superoxide dismutase (*sodA*), and catalases (double mutants *katA/katC* or *katB/katC*) showed that the alteration in antioxidant pools as well as the mutation of ROS detoxification enzymes impact the formation of nodules, decrease the N_2 -fixing capacity and induce a premature nodule senescence (Table 1)(Santos et al., 2000; Jamet et al., 2003; Harrison et al., 2005; Castro-Sowinski et al., 2007; Benyamina et al., 2013). Besides, nodules induced by a *Sinorhizobium meliloti* deletion mutant of *LsrB*, which encodes a LysR transcription factor acting as a ROS regulator, showed premature senescence with impaired bacteroid differentiation (Luo et al., 2005; Tang et al., 2013). *LsrB* was found to induce the expression of the *lrp3-lpsCDE* operon involved in lipopolysaccharide biosynthesis required for infection or bacteroid survival in host cells (Figure 1)(Tang et al., 2014) and that of γ -glutamylcysteine synthetase, involved in glutathione synthesis (Tang et al., 2017).

Nodule-Specific Cysteine Rich (NCR) Peptides and Terminal Bacteroid Differentiation

NCR peptides have been specifically found in the Inverted Repeat-Lacking Clade (IRLC) legumes such as *Medicago* spp., and in Dalbergoid legumes such as *Aeschynomene* spp., where bacteria are terminally differentiated to polyploid non-dividing bacteroids (Mergaert et al., 2003; Mergaert et al., 2006; Alunni and Gourion, 2016). They encode highly divergent peptides, which resemble defensin-type antimicrobial peptides involved in plant and animal innate immunity (Mergaert et al., 2003). Indeed, some NCR peptides have a strong *in vitro* antimicrobial activity when applied to free-living bacteria (Van de Velde et al., 2010; Maróti and Kondorosi, 2014; Farkas et al., 2017).

Almost all NCR genes are exclusively expressed in the infected cells of nodules and their products are targeted to the symbiosome through the endoplasmic reticulum secretory system (Figure 1) (Wang et al., 2010; Guefrachi et al., 2014). Challenge of cultured bacteria with synthetic NCR peptides and ectopic expression of NCR peptides in legumes devoid of NCR genes cause features of bacteroid differentiation, demonstrating that these NCR peptides are sufficient to induce the irreversible differentiation (Van de Velde et al., 2010). The number of NCR genes is remarkably variable (from 7 in *Glycyrrhiza uralensis* to over 700 members in *M. truncatula*), and a positive correlation was found between the size of the NCR peptide family in the plant genome and the degree of bacteroid elongation (Montiel et al., 2017). Despite the large size of NCR peptide family in *M. truncatula* suggesting an extensive redundancy, NCR169, NCR211, and NFS1 are essential and the corresponding plant mutants are unable to

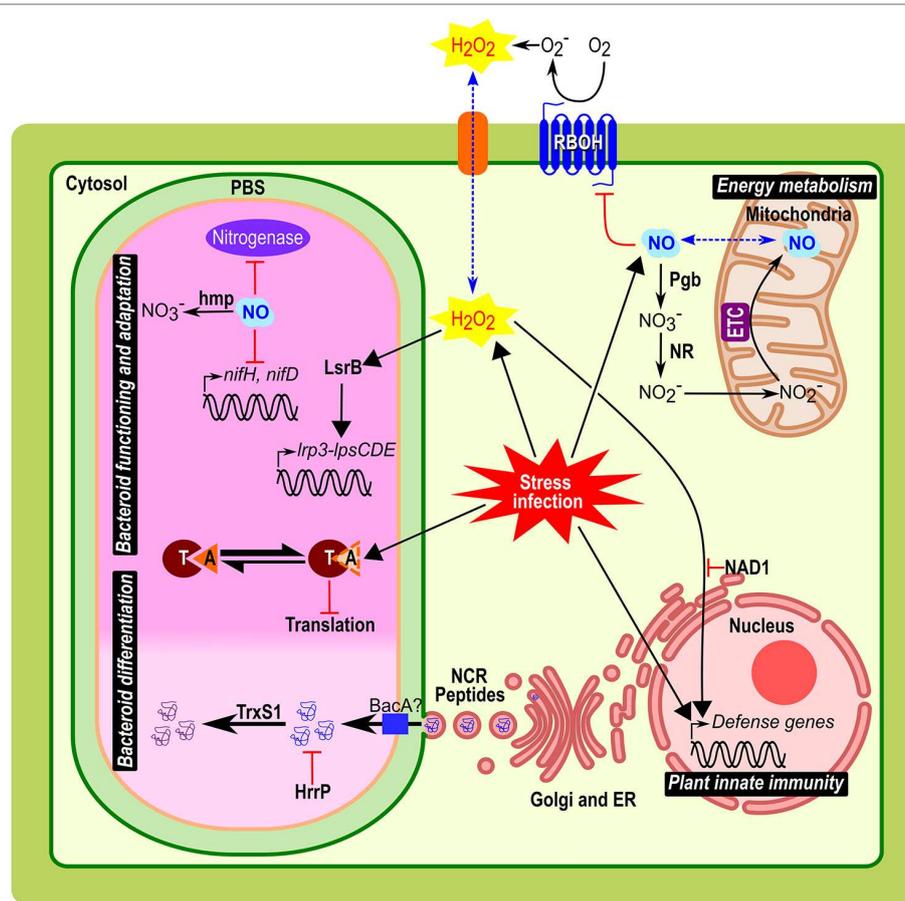


FIGURE 1 | Implication and connection of ROS, NO, NCR peptides, and TA modules in symbiosomes from *Medicago* root nodules. Biological role of these compounds during bacteroid differentiation, nodule functioning and adaptation, plant innate immunity, and energy metabolism are represented. Plant host cells infected by bacteria/bacteroid, implied various stress responses such as oxidative/nitrosative stress, acidic pH, microoxia, and exposure to NCRs. In the symbiosome, the clear part corresponds to the infection zone and the dark pink to the fixation zone with bacteria differentiated in bacteroid. Black arrows indicate metabolism reaction or downstream signal transduction pathways; red arrows indicate regulation mechanism (activation with arrowhead or repression with bar-headed lines). Blue dotted arrow indicates a diffusion through the membrane. Abbreviations: PBS, peribacteroid space; NR, nitrate reductase; Pgb, Phytoglobin; RBOH, respiratory burst oxidase homologs; O_2^- , superoxide radical; H_2O_2 , hydrogen peroxide; ETC, electron transfer chain; NO, nitric oxide; ER; endoplasmic reticulum; NCR peptides, nodule-specific cysteine-rich peptides; Hmp, flavo-hemoglobin; NAD1, Nodules with Activated Defence 1; TrxS1, Thioredoxine S1; Hrrp, Host-range restriction peptidase; LsrB, LysR transcription factor; T, toxin; A, antitoxin.

establish a functional NFS (Table 1) (Horváth et al., 2015; Kim et al., 2015; Yang et al., 2017). Both NFS1 and NCR211 exemplify NCR peptides that control the survival of fully differentiated bacteroids instead of triggering the terminal differentiation of bacteroids. NFS1 controls the discrimination mechanisms against incompatible microsymbionts (Yang et al., 2017), provoking bacterial cell death and early nodule senescence in an allele-specific and rhizobial strain-specific manner, while NCR211 is required for bacteroid persistence inside symbiotic cells (Kim et al., 2015).

To survive exposure to toxic NCR peptides *S. meliloti* requires the integrity of the BacA ABC-transporter. A *bacA* mutant strain is unable to differentiate and rapidly dies after its release from infection threads (Figure 1) (Haag et al., 2011). Similarly, the BacA-like peptide transporter BclA of *Bradyrhizobium japonicum* is essential for bacteroid differentiation and survival

in *Aeschynomene* nodule, which suggests that the NCR peptides uptake may be a common mechanism used by different rhizobia to counteract the toxic effect of peptides (Guefrachi et al., 2015). In the symbiosis between *Sinorhizobium fredii* and *G. uralensis* alternatively, bacteroid differentiation occurs via a *bacA*-independent pathway and is rather associated with LPS modification of the bacteroid outer membrane (Crespo-Rivas et al., 2016). Additionally, a *S. meliloti* natural strain can escape the control of NCR peptides and proliferate in nodules using the plasmid encoded host-range restriction peptidase Hrrp, which is able to digest NCR peptides *in vitro* (Figure 1 and Table 1) (Price et al., 2015). The expression of *hrrp* increases the fitness of rhizobial strains while inhibiting N_2 -fixation in some plant ecotypes (Price et al., 2015).

Another layer of regulation may come from posttranslational modifications of NCR peptides (Marx et al., 2016). In particular,

TABLE 1 | Non-exhaustive summary of genes involved in ROS, NCR, NO, and TA modules pathways within legume nodule cells.

	Mutant/transgenic line	Origin	Proteic activity	Symbiotic function	Reference
ROS	<i>nad1</i>	<i>M. truncatula</i>	Nodule activated defense protein -uncharacterized	Nodule innate immunity, Bacteroid differentiation/survival, N ₂ -fixation	Wang et al. (2016)
	RbohA: RNAi	<i>P. vulgaris</i>	Respiratory burst oxidase homolog - ROS production	N ₂ -fixation	Marino et al. (2011)
	RbohA: RNAi			Bacterial infection, Nodule formation, Bacteroid survival, N ₂ -fixation	Arthikala et al. (2017)
	RbohB: RNAi			Bacterial infection, Nodule formation, N ₂ -fixation	Montiel et al. (2012)
	RbohB: OE			Bacterial infection, Nodule formation, Bacteroid differentiation, N ₂ -fixation	Arthikala et al. (2014)
	<i>gshB</i>	<i>S. melliloti</i>	ROS detoxification enzymes	Nodule formation, N ₂ -fixation	Harrison et al. (2005)
	<i>trxL</i>			N ₂ -fixation	Castro-Sowinski et al. (2007)
	<i>grx1</i>			N ₂ -fixation	Benyamina et al. (2013)
	<i>grx2</i>			Nodule formation, N ₂ -fixation	
	<i>sodA</i>			N ₂ -fixation, Bacteroid differentiation	Santos et al. (2000)
<i>katA/katC; katB/katC</i>	Nodule formation, Infection, N ₂ -fixation, Bacteroid differentiation			Jamet et al. (2003)	
<i>IsrB</i>	LysR transcription factor			Infection, Bacteroid differentiation/survival, N ₂ -fixation	Luo et al. (2005); Tang et al. (2013); Tang et al., (2014); Tang et al., (2017)
NCR	<i>dnf7-2</i> deletion mutant	<i>M. truncatula</i>	Antimicrobial peptide NCR169	Bacteroid survival/persistence	Horváth et al. (2015)
	<i>dnf4</i> deletion mutant	<i>M. truncatula</i>	Antimicrobial peptide NCR211- Symbiont Specificity	Bacteroid survival/persistence	Kim et al. (2015)
	<i>NFS1-/- (NCRα-β)</i>	<i>M. truncatula</i>	Antimicrobial peptide - Symbiont Specificity	Bacteroid survival, Senescence	Yang et al. (2017)
	Trx s1: RNAi	<i>M. truncatula</i>	Thioredoxin-NCR reduction	Bacteroid differentiation	Ribeiro et al. (2017)
	Trx s1: OE				
	<i>bacA</i>	<i>S. melliloti</i>	ABC transporter- Symbiont protection against NCRs	Bacteroid differentiation	Haag et al. (2011)
	<i>bclA</i>	<i>B. japonicum</i>		Bacteroid differentiation/survival	Guefrachi et al. (2015)
<i>hrrP</i>	<i>S. melliloti</i>	M16A family metallopeptidase- Escape NCR control	Bacteroid fitness	Price et al. (2015)	
NO	Hb1: RNAi	<i>L. japonicus</i>	Leghemoglobin- degradation of nitric oxide	N ₂ -fixation	Ott et al. (2005)
	Hb1: OE	<i>A. firma</i>	Phytoglobin- degradation of nitric oxide	N ₂ -fixation	Shimoda et al. (2009)
	Hb1: OE				
	<i>hmp</i>	<i>S. melliloti</i>	Flavohemoprotein- NO degradation	Bacteroid survival, N ₂ -fixation, Senescence	Cam et al. (2012); Meilhoc et al. (2013); Blanquet et al. (2015)
<i>hmp++ norB nnrS1</i>				Blanquet et al. (2015)	
TA modules	<i>vapC-4 (ntrF)</i>	<i>S. melliloti</i>	VapB (antidote), VapC (site-specific RNase)	Nodule formation	Dusha et al. (1989)
	<i>vapB-5</i>			N ₂ -fixation, Senescence	Oláh et al. (2001)
	<i>vapC-5</i>			Nodule formation, Bacteroid differentiation	Lipuma et al. (2014)
	<i>bat/bto = vapBC</i>	<i>B. japonicum</i>		N ₂ -fixation, Bacteroid survival, Senescence	Miclea et al. (2010)
			Nodule formation, N ₂ -fixation		

Genes studied have a rhizobial (orange) or a plant (light green) origin. The nitrogen-fixing phenotype of the mutant or transgenic line is depicted in green if defective or in pink if improved in the column symbiotic function.

a nodule-specific thioredoxin, TrxS1, capable to reduce NCR peptides and targeted to symbiosomes, has been shown to be required for bacteroid differentiation, suggesting that NCR redox state is important *in planta* (Figure 1 and Table 1) (Ribeiro et al., 2017). In this context, the redox control of the bacteroid differentiation probably occurs through the NCR peptide activity suggesting a crosstalk between the different regulators described in this review.

Considered together, these data indicate that the symbiosis efficiency of terminally differentiated bacteria is the outcome of a tight balance between the effects of NCR peptides and the ability of rhizobia to resist them. The rupture of this balance can lead to the activation of the plant innate immunity (Yu et al., 2019).

Nitric Oxide (NO) in Functional Nodules: Microoxia, Energetic Metabolism

NO production was observed in functional nodules of *Lotus japonicus* and *M. truncatula*, mainly in the N₂-fixation zone (Baudouin et al., 2006; Shimoda et al., 2009), and in the nodule senescence zone (Cam et al., 2012; Fukudome et al., 2018). Although the origin and the biological significance of NO production in nodules has been thoroughly analyzed over the last few years (Boscari et al., 2013; Hichri et al., 2015; Berger et al., 2019), there are still many questions to be clarified concerning the relative importance of the signaling/metabolic functions of NO versus its toxic action on host plant and symbiont.

Functional nodules are characterized by a microoxic environment to protect the bacterial nitrogenase from irreversible denaturation by oxygen (O₂) which requires the setup of an O₂ barrier in the outer cell layers of the nodule and the synthesis of leghemoglobin (Lb) (Appleby, 1992). In plant roots submitted to hypoxia, a “Phytoglobin-NO respiration” has been shown to use nitrite as a final electron acceptor instead of O₂ to be reduced to NO by the mitochondrial electron transfer chain (ETC), which allows cell energy status retention (Figure 1) (Igamberdiev and Hill, 2009; Gupta and Igamberdiev, 2011). Accumulated data support the existence of such a Phytoglobin-NO respiration in *M. truncatula* and *Medicago sativa* nodules, in which both nitrate reductase (NR) and ETC are involved in NO production and in the maintenance of the nodule energy state (Horchani et al., 2011; Berger et al., 2018).

Despite its role in acclimation to microoxic environment, NO is also a potent inhibitor of nitrogenase activity (Trinchant and Rigaud, 1982; Sasakura et al., 2006; Kato et al., 2010). In nodules of soybean plants subjected to flooding, the increase in NO production is associated with the repression of bacterial *nifH* and *nifD* (Figure 1), and this inhibition is partially reversed by the application of the NO scavenger cPTIO, which illustrates the inhibitory role of NO on the expression of nitrogenase genes (Sánchez et al., 2010). Furthermore, using both pharmacological approach, with NO-donors and scavengers, and molecular approach with transgenic plants with modified NO levels, several studies report that NO inhibits *in vivo* N₂-fixing activity in soybean, *L. japonicus*, and *M. truncatula* nodules (Table 1) (Shimoda et al., 2009; Kato et al., 2010; Cam et al., 2012).

The biological activity of NO is mediated through redox-dependent protein modifications such as metal-nitrosylation, S-nitrosation and Tyr-nitration (Stamler et al., 2001; Besson-Bard et al., 2008). In *M. truncatula* mature nodules, 80 proteins have been reported to be S-nitrosated, most of them involved in primary metabolism, energy regeneration and nitrogen assimilation (Puppo et al., 2013). In this context, *M. truncatula* glutathione peroxidase 1 and glutamine synthetase 1a were shown to be regulated by NO through S-nitrosation and Tyr-nitration modifications (Melo et al., 2011; Castella et al., 2017).

Beside the nodule metabolism regulation, a participation of NO to the life-time of the symbiotic interaction was also observed (Cam et al., 2012). Increased NO level in nodule obtained either by using *S. meliloti* mutant strains deficient in the degradation of NO (*hmp*, *norB*, *nnrS1*) (Table 1), or by treating nodules with NO donors (Cam et al., 2012; Meilhoc et al., 2013; Blanquet et al., 2015) leads to premature nodule senescence. Conversely, by using *S. meliloti* mutant strains that over-expressed *hmp*, a decrease in NO level was observed correlated to a delay of nodule senescence (Table 1) (Cam et al., 2012). Therefore, NO concentration should be tightly controlled, in time and space, in both partners to avoid its toxic effects and to fulfil its signaling and metabolic functions during nodule functioning and under environmental stresses (Berger et al., 2019).

Toxin-Antitoxin (TA) Systems in Bacteroid Adaptation in Infected Plant Cells

TA systems are key players of intracellular survival of invading bacteria during eukaryote interactions (Lobato-Márquez et al., 2016). TA genes encode a stable toxin and its cognate antitoxin. Depending on the antitoxin nature (RNA or protein) and its mode of action, TA modules are classified into six different types (I–VI). The type II, where both toxin and antitoxin are small proteins forming a stable complex, is the most abundant type in pathogens, particularly exposed to diverse micro-environments during host interaction (Ramage et al., 2009; Georgiades and Raoult, 2011). Due to the self-poisoning effect of the toxin, TA modules could be considered as intracellular molecular timebombs. TA expression is tightly regulated to allow either growth arrest and bacterial adaptation or cell death (Hayes and Kędzierska, 2014). Under various stress conditions, the antitoxin is degraded by bacterial proteases leading to the deregulation of the TA operon and delivery of the toxin which targets specific cellular functions (DNA replication, translation) (Gerdes et al., 2005). In phytopathogenic bacteria, TA have been recently demonstrated as involved in virulence and biofilm formation during plant infection (Shidore and Triplett, 2017; Martins et al., 2018).

Among the 29 chromosomal type II TA systems of *S. meliloti*, eleven belong to the VapBC family; VapB being the antitoxin and VapC the toxin, acting as a site-specific RNase (Table 1). The importance of two *vapBC* operons, *vapBC-4* (*ntrPR*) and *vapBC-5*, has been shown in *S. meliloti* during symbiotic interaction with *Medicago* sp. (Dusha et al., 1989; Lipuma et al., 2014). NtrPR was identified on the capacity of the toxin *ntrR* mutant (for nitrogen regulator) to form more nodules on alfalfa roots in the presence

of exogenous ammonium (Dusha et al., 1989). This suggests that NtrR toxin is involved in the nodulation efficiency depending on the level of nitrogen supply. This module plays also a role in mature nodules in a nitrogen-tolerant manner, as *ntrR*-induced nodules have an enhanced N₂-fixation capacity and an increased plant yield (Oláh et al., 2001). Regarding VapBC-5 module, the *vapC-5* toxin mutant improves the symbiotic interaction with alfalfa (increase in N₂-fixation capacity and plant yield) associated to a delay in nodule senescence (Lipuma et al., 2014).

These *vapC* mutants have no free-living phenotypes. Therefore, TA modules might play a role in the bacterial adaptation to infection stresses (metabolic shifting, acidic pH, microoxia, ROS, antimicrobial peptides, stresses known to activate pathogen TA modules (Lobato-Márquez et al., 2016)) (Figure 1). Thus, in a wild-type context, NtrPR and VapBC-5 modules likely limit the symbiotic interaction upon specific plant signals and/or contribute to the nodule senescence onset. The high number of TA systems in *S. meliloti* genome could be due to functional redundancy or to different roles independent of the NFS. Indeed, Milunovic et al. (2014) showed that the deletion of four TA operons from the pSyma and pSymb plasmids induces a cell toxicity phenotype in free living, with no symbiotic effect during alfalfa interaction (Milunovic et al., 2014). In contrast, in *B. japonicum* USDA110, the complete deletion of the *bat/bto* TA resulted in a limited production of soybean nodules associated to a reduced plant yield (Miclea et al., 2010). Such a phenotype suggests that this system might play a positive role on the symbiotic interaction with soybean, although this could also be linked to the pleiotropic effects observed for this deletion mutant in free-living conditions.

Concluding Remarks

The evidences presented in this review show the importance of ROS, NO, NCR peptides, and TA modules in the intracellular bacteroid accommodation and the N₂-fixation activity regulation. These molecules, considered in certain situations as cellular weapons, are necessary not only in the nodule functioning, but also in the rupture of the symbiosis under unfavourable conditions such as deficient bacterial symbionts, adverse environmental conditions or cellular aging.

REFERENCES

- Alunni, B., and Gourion, B. (2016). Terminal bacteroid differentiation in the legume–rhizobium symbiosis: nodule-specific cysteine-rich peptides and beyond. *New Phytol.* 211, 411–417. doi: 10.1111/nph.14025
- Andrio, E., Marino, D., Marmeys, A., de Segonzac, M. D., Damiani, I., and Genre, A. (2013). Hydrogen peroxide-regulated genes in the *Medicago truncatula*–*Sinorhizobium meliloti* symbiosis. *New Phytol.* 198, 179–189. doi: 10.1111/nph.12120
- Apel, K., and Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, 373–399. doi: 10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701
- Appleby, C. A. (1992). The origin and functions of haemoglobin in plants. *Sci. Prog.* 76, 365–398. doi: 10.2307/43421309
- Arthikala, M.-K., Montiel, J., Sánchez-López, R., Nava, N., Cárdenas, L., and Quinto, C. (2017). Respiratory burst oxidase homolog gene a is crucial for

The importance of these regulatory elements is now clearly demonstrated, but their mode of action still remains to be fully deciphered. Identification of the molecular pathways involved in the regulation of the bacterial intracellular life during NFS will be helpful to dissect the crosstalk between these different regulatory elements. Evidences exist of the connection between ROS, NO, and NCR in plant cells to balance the plant immune response, to regulate the rhizobial differentiation and control the switch from bacteroid persistence to cell death. Among these recent findings it can be noted the involvement of three RBOH in the activation of immunity in *Medicago* nodules and the regulation of bacteroid differentiation *via* TrxS1-dependent redox regulation of some NCRs *in planta* (Ribeiro et al., 2017) (Figure 1). Furthermore, it was previously shown that NO could inhibit NADPH oxidase activity by post-translational modification (Figure 1) (Yun et al., 2011).

Similarly, the connection between TA, NO, ROS, and NCR produced by both partners represents a field of future interest to identify the signals involved in TA activation. The delayed senescence of nodules induced by the *vapC-5* toxin mutants conducted to higher the expression of NCR001 gene compared to control *Rhizobium* strain (Lipuma et al., 2014). Finally, a better understanding of these regulatory processes may give promising strategies to improve the NFS and reduce the use of fertilizers.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

CS and AB conceived the idea of the review. All the authors were involved in the manuscript writing.

FUNDING

This work was supported by the “Institut National de la Recherche Agronomique,” the “Centre National de la Recherche Scientifique,” the University of Nice-Sophia-Antipolis, and the French Government (National Research Agency, ANR) through the LABEX SIGNALIFE program (reference # ANR-11-LABX-0028-01) and the STAYPINK project (ANR-15-CE20-0005).

- rhizobium infection and nodule maturation and function in common bean. *Front. Plant Sci.* 8, 2003. doi: 10.3389/fpls.2017.02003
- Arthikala, M.-K., Sánchez-López, R., Nava, N., Santana, O., Cárdenas, L., and Quinto, C. (2014). RbohB, a *Phaseolus vulgaris* NADPH oxidase gene, enhances symbiosome number, bacteroid size, and nitrogen fixation in nodules and impairs mycorrhizal colonization. *New Phytol.* 202, 886–900. doi: 10.1111/nph.12714
- Bao, H., Zhang, Z., and Cao, Y. (2019). Immune Signal. *Pathw. Dur. Termin. bacteroid Differ. nodules. Trends Plant Sci.* 24, 299–302. doi: 10.1016/j.tplants.2019.01.010
- 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. doi: 10.1094/MPMI-19-0970
- Becana, M., Matamoros, M. A., Udvardi, M., and Dalton, D. A. (2010). Recent insights into antioxidant defenses of legume root nodules. *New Phytol.* 188, 960–976. doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03512.x

- Benyamina, S. M., Baldacci-Cresp, F., Couturier, J., Chibani, K., Hopkins, J., and Bekki, A. (2013). Two Sinorhizobium meliloti glutaredoxins regulate iron metabolism and symbiotic bacteroid differentiation. *Environ. Microbiol.* 15, 795–810. doi: 10.1111/j.1462-2920.2012.02835.x
- Berger, A., Boscari, A., Frendo, P., and Brouquisse, R. (2019). Nitric oxide signaling, metabolism and toxicity in nitrogen-fixing symbiosis. *J. Exp. Bot.* 70, 4505–4520. doi: 10.1093/jxb/erz159
- Berger, A., Brouquisse, R., Pathak, P. K., Hichri, I., Bhatia, S., and Boscari, A. (2018). Pathways of nitric oxide metabolism and operation of phytooglobins in legume nodules: missing links and future directions. *Plant Cell Environ.* 41, 2057–2068. doi: 10.1111/pce.13151
- Berrabah, F., Ratet, P., and Gourion, B. (2018). Legume nodules: massive infection in the absence of defense induction. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 32, 35–44. doi: 10.1094/MPMI-07-18-0205-FI
- Besson-Bard, A., Pugin, A., and Wendehenne, D. (2008). New insights into nitric oxide signaling in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59, 21–39. doi: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092830
- 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. doi: 10.1094/MPMI-05-15-0118-R
- 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, 1–6. doi: 10.3389/fpls.2013.00384
- 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
- Cao, Y., Halane, M. K., Gassmann, W., and Stacey, G. (2017). The role of plant innate immunity in the legume-rhizobium symbiosis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 68, 535–561. doi: doi.org/10.1146/annurev-arplant-042916-041030
- Castella, C., Mirtziou, I., Seassau, A., Boscari, A., Montrichard, F., and Papadopoulou, K. (2017). Post-translational modifications of Medicago truncatula glutathione peroxidase 1 induced by nitric oxide. *Nitric. Oxide-Biol. Chem.* 68, 125–136. doi: 10.1016/j.niox.2017.02.004
- Castro-Sowinski, S., Matan, O., Bonafede, P., and Okon, Y. (2007). A thioredoxin of Sinorhizobium meliloti CE52G is required for melanin production and symbiotic nitrogen fixation. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20, 986–993. doi: 10.1094/MPMI-20-8-0986
- Crespo-Rivas, J. C., Guefrachi, I., Mok, K. C., Villaécija-Aguilar, J. A., Acosta-Jurado, S., and Pierre, O. (2016). Sinorhizobium fredii HH103 bacteroids are not terminally differentiated and show altered O-antigen in nodules of the inverted repeat-lacking clade legume glycyrrhiza uralensis. *Environ. Microbiol.* 18, 2392–2404. doi: 10.1111/1462-2920.13101
- Dusha, I., Bakos, A., Kondorosi, A., de Bruijn, F. J., and Schell, J. (1989). The Rhizobium meliloti early nodulation genes (nodABC) are nitrogen-regulated: isolation of a mutant strain with efficient nodulation capacity on alfalfa in the presence of ammonium. *Mol. Gen. Genet.* 219, 89–96. doi: doi.org/10.1007/BF00261162
- Farkas, A., Maróti, G., Kereszt, A., and Kondorosi, É. (2017). Comparative analysis of the bacterial membrane disruption effect of two natural plant antimicrobial peptides. *Front. Microbiol.* 8, 51. doi: doi.org/10.3389/fmicb.2017.00051
- Ferguson, B. J., Indrasumunar, A., Hayashi, S., Lin, M.-H., Lin, Y.-H., and Reid, D. E. (2010). Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *J. Integr. Plant Biol.* 52, 61–76. doi: 10.1111/j.1744-7909.2010.00899.x
- Fukudome, M., Watanabe, E., Osuki, K.-I., Imaizumi, R., Aoki, T., Becana, M., et al. (2018). Stably-transformed lotus japonicus plants overexpressing phytoglobin LjGlb1-1 show decreased nitric oxide levels in roots and nodules as well as delayed nodule senescence stably-transformed lotus japonicus plants overexpressing phytoglobin LjGlb1-1 show D. 60, 1–21.
- Georgiades, K., and Raouf, D. (2011). Genomes of the most dangerous epidemic bacteria have a virulence repertoire characterized by fewer genes but more toxin-antitoxin modules. *PLoS One* 6, e17962–e17962. doi: 10.1371/journal.pone.0017962
- Gerdes, K., Christensen, S. K., and Løbner-Olesen, A. (2005). Prokaryotic toxin-antitoxin stress response loci. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 371–382. doi: 10.1038/nrmicro1147
- Guefrachi, I., Nagymihaly, M., Pislariu, C. I., Van de Velde, W., Ratet, P., and Mars, M. (2014). Extreme specificity of NCR gene expression in Medicago truncatula. *BMC Genomics* 15, 712. doi: 10.1186/1471-2164-15-712
- Guefrachi, I., Pierre, O., Timchenko, T., Alunni, B., Barrière, Q., and Czernic, P. (2015). Bradyrhizobium BclA is a peptide transporter required for bacterial differentiation in symbiosis with Aeschynomene legumes. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 28, 1155–1166. doi: 10.1094/MPMI-04-15-0094-R
- Gupta, K. J., and Igamberdiev, A. U. (2011). The anoxic plant mitochondrion as a nitrite: NO reductase. *Mitochondrion* 11, 537–543. doi: 10.1016/j.mito.2011.03.005
- Haag, A. F., Balaban, M., Sani, M., Kerscher, B., Pierre, O., and Farkas, A. (2011). Protection of Sinorhizobium against host cysteine-rich antimicrobial peptides is critical for symbiosis. *PLoS Biol.* 9, e1001169. doi: 10.1371/journal.pbio.1001169
- Harrison, J., Jamet, A., Muglia, C. I., Van de Sype, G., Aguilar, O. M., and Puppo, A. (2005). Glutathione plays a fundamental role in growth and symbiotic capacity of Sinorhizobium meliloti. *J. Bacteriol.* 187, 168–174. doi: 10.1128/JB.187.1.168-174.2005
- Hayes, F., and Kędzierska, B. (2014). Regulating toxin-antitoxin expression: controlled detonation of intracellular molecular timebombs. *Toxins (Basel)* 6, 337–358. doi: 10.3390/toxins6010337
- Hichri, I., Boscari, A., Castella, C., Rovere, M., Puppo, A., and Brouquisse, R. (2015). Nitric oxide: a multifaceted regulator of the nitrogen-fixing symbiosis. *J. Exp. Bot.* 66, 2877–2887. doi: 10.1093/jxb/erv051
- Horchani, F., Prévot, M., Boscari, A., Evangelisti, E., Meilhoc, E., and Bruand, C. (2011). Both plant and bacterial nitrate reductases contribute to nitric oxide production in Medicago truncatula nitrogen-fixing nodules. *Plant Physiol.* 155, 1023–1036. doi: 10.1104/pp.110.166140
- Horváth, B., Domonkos, Á., Kereszt, A., Szűcs, A., Ábrahám, E., and Ayaydin, F. (2015). Loss of the nodule-specific cysteine rich peptide, NCR169, abolishes symbiotic nitrogen fixation in the Medicago truncatula dnf7 mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 15232–15237. doi: 10.1073/pnas.1500777112
- Igamberdiev, A. U., and Hill, R. D. (2009). Plant mitochondrial function during anaerobiosis. *Ann. Bot.* 103, 259–268. doi: 10.1093/aob/mcn100
- Jamet, A., Sigaud, S., Van de Sype, G., Puppo, A., and 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.* 16, 217–225. doi: 10.1094/MPMI.2003.16.3.217
- Jones, K. M., Kobayashi, H., Davies, B. W., Taga, M. E., and Walker, G. C. (2007). How rhizobial symbionts invade plants: the Sinorhizobium-Medicago model. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 619–633. doi: 10.1038/nrmicro1705
- Kadota, Y., Shirasu, K., and Zipfel, C. (2015). Regulation of the NADPH oxidase rbohD during plant immunity. *Plant Cell Physiol.* 56, 1472–1480. doi: 10.1093/pcp/pcv063
- 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. doi: 10.1016/j.jplph.2009.08.006
- Kim, M., Chen, Y., Xi, J., Waters, C., Chen, R., and Wang, D. (2015). An antimicrobial peptide essential for bacterial survival in the nitrogen-fixing symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 15238–15243. doi: 10.1073/pnas.1500123112
- Lipuma, J., Cinege, G., Bodogai, M., Oláh, B., Kiers, A., and Endre, G. (2014). A vapBC-type toxin-antitoxin module of Sinorhizobium meliloti influences symbiotic efficiency and nodule senescence of Medicago sativa. *Environ. Microbiol.* 16, 3714–3729. doi: 10.1111/1462-2920.12608
- Liu, Y., and He, C. (2016). Regulation of plant reactive oxygen species (ROS) in stress responses: learning from AtRBOHD. *Plant Cell Rep.* 35, 995–1007. doi: 10.1007/s00299-016-1950-x
- Lobato-Márquez, D., Díaz-Orejas, R., and García-del Portillo, F. (2016). Toxin-antitoxins and bacterial virulence. *FEMS Microbiol. Rev.* 40, 592–609. doi: 10.1093/femsre/fuw022
- Luo, L., Yao, S.-Y., Becker, A., Rüberg, S., Yu, G.-Q., and Zhu, J.-B. (2005). Two new Sinorhizobium meliloti LysR-type transcriptional regulators required for nodulation. *J. Bacteriol.* 187, 4562–4572. doi: 10.1128/JB.187.13.4562-4572.2005
- Marino, D., Andrio, E., Danchin, E. G. J., Oger, E., Gucciardo, S., and Lambert, A. (2011). A Medicago truncatula NADPH oxidase is involved in symbiotic nodule functioning. *New Phytol.* 189, 580–592. doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03509.x

- Maróti, G., and Kondorosi, E. (2014). Nitrogen-fixing Rhizobium-legume symbiosis: are polyploidy and host peptide-governed symbiont differentiation general principles of endosymbiosis? *Front. Microbiol.* 5, 326. doi: 10.3389/fmicb.2014.00326
- Martins, P. M. M., Merfa, M. V., Takita, M. A., and De Souza, A. A. (2018). Persistence in Phytopathogenic bacteria: do we know enough? *Front. Microbiol.* 9, 1099. doi: doi.org/10.3389/fmicb.2018.01099
- Marx, H., Minogue, C. E., Jayaraman, D., Richards, A. L., Kwicien, N. W., and Siahpirani, A. F. (2016). A proteomic atlas of the legume *Medicago truncatula* and its nitrogen-fixing endosymbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Nat. Biotechnol.* 34, 1198. doi: doi.org/10.1038/nbt.3681
- Masson-Boivin, C., Giraud, E., Perret, X., and Batut, J. (2009). Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? *Trends Microbiol.* 17, 458–466. doi: 10.1016/j.tim.2009.07.004
- Meilhoc, E., Blanquet, P., Cam, Y., and Bruand, C. (2013). Control of NO level in rhizobium-legume root nodules: not only a plant globin story. *Plant Signal. Behav.* 8, e25923. doi: 10.4161/psb.25923
- 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
- Mergaert, P., Nikovics, K., Kelemen, Z., Maunoury, N., Kondorosi, A., and Kondorosi, E. (2003). A novel family in *Medicago truncatula* consisting of more than 300 nodule-specific genes coding for small, secreted polypeptides with conserved cysteine motifs. *Plant Physiol.* 132, 161–173. doi: 10.1104/pp.102.018192
- Mergaert, P., Uchiyumi, T., Alunni, B., Evanno, G., Cheron, A., and Catrice, O. (2006). Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the Rhizobium–legume symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 5230–5235. doi: 10.1073/pnas.0600912103
- Miclea, P. S., Péter, M., Végh, G., Cinege, G., Kiss, E., and Váró, G. (2010). Atypical transcriptional regulation and role of a new toxin-antitoxin-like module and its effect on the lipid composition of *bradyrhizobium japonicum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 23, 638–650. doi: 10.1094/MPMI-23-5-0638
- Milunovic, B., George, C., Morton, R. A., and Finan, T. M., (2014). Cell growth inhibition upon deletion of four toxin-antitoxin loci from the megaplasmids of *sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 196, 811–824. doi: 10.1128/JB.01104-13
- Mittler, R. (2017). ROS Are Good. *Trends Plant Sci.* 22, 11–19. doi: 10.1016/j.tplants.2016.08.002
- Montiel, J., Arthikala, M. K., Cárdenas, L., and Quinto, C. (2016). Legume NADPH oxidases have crucial roles at different stages of nodulation. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 1–12. doi: 10.3390/ijms17050680
- Montiel, J., Downie, J. A., Farkas, A., Bihari, P., Herczeg, R., and Bálint, B. (2017). Morphotype of bacteroids in different legumes correlates with the number and type of symbiotic NCR peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114, 5041LP–505046. doi: 10.1073/pnas.1704217114
- Montiel, J., Fonseca-García, C., and Quinto, C. (2018). Phylogeny and Expression of NADPH Oxidases during Symbiotic Nodule Formation. *Agric.* 8, 179. doi: 10.3390/agriculture8110179
- Montiel, J., Nava, N., Cárdenas, L., Sánchez-López, R., Arthikala, M.-K., Santana, O., et al. (2012). A *Phaseolus vulgaris* NADPH Oxidase Gene is Required for Root Infection by Rhizobia. *Plant Cell Physiol.* 53, 1751–1767. doi: 10.1093/pcp/pcs120
- Oláh, B., Kiss, E., Györgypál, Z., Borzi, J., Cinege, G., and Csanádi, G. (2001). Mutation in the *ntrR* gene, a member of the *vap* gene family, increases the symbiotic efficiency of *Sinorhizobium meliloti*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14, 887–894. doi: 10.1094/MPMI.2001.14.7.887
- Oldroyd, G. E. D. (2013). Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 252. doi: 10.1038/nrmicro2990
- Oldroyd, G. E. D., and Downie, A. (2008). Bias and precision of cholesterol analysis by physician's office analyzers. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59, 519–546. doi: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092839
- 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. doi: 10.1146/annurev-genet-110410-132549
- Ott, T., Van Dongen, J. T., Günther, C., Krusell, L., Desbrosses, G., and Vigeolas, H. (2005). Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. *Curr. Biol.* 15, 531–535. doi: 10.1016/j.cub.2005.01.042
- Price, P. A., Tanner, H. R., Dillon, B. A., Shabab, M., Walker, G. C., and Griffiths, J. S. (2015). Rhizobial peptidase HrrP cleaves host-encoded signaling peptides and mediates symbiotic compatibility. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 15244 LP–15249. doi: 10.1073/pnas.1417797112
- Puppo, A., Groten, K., Bastian, F., Carzaniga, R., Soussi, M., and Lucas, M. M. (2005). Legume nodule senescence: Roles for redox and hormone signalling in the orchestration of the natural aging process. *New Phytol.* 165, 683–701. doi: 10.1111/j.1469-8137.2004.01285.x
- Puppo, A., Pauly, N., Boscardi, 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. doi: 10.1155/jn.00838.2004
- Ramage, H. R., Connolly, L. E., and Cox, J. S. (2009). Comprehensive functional analysis of Mycobacterium tuberculosis toxin-antitoxin systems: implications for pathogenesis, stress responses, and evolution. *PLoS Genet.* 5, e1000767. doi: 10.1371/journal.pgen.1000767
- Ribeiro, C. W., Baldacci-Cresp, F., Pierre, O., Larousse, M., Benyamina, S., and Lambert, A. (2017). Regulation of differentiation of nitrogen-fixing bacteria by microsymbiont targeting of plant Thioredoxin s1. *Curr. Biol.* 27, 250–256. doi: 10.1016/j.cub.2016.11.013
- Sánchez, C., Gates, A. J., Meakin, G. E., Uchiyumi, T., Girard, L., and Richardson, D. J. (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
- Santos, R., Hérouart, D., Puppo, A., and Touati, D. (2000). Critical protective role of bacterial superoxide dismutase in Rhizobium–legume symbiosis. *Mol. Microbiol.* 38, 750–759. doi: 10.1046/j.1365-2958.2000.02178.x
- Sasakura, F., Uchiyumi, T., Shimoda, Y., Suzuki, A., Takenouchi, K., and Higashi, S. (2006). A class 1 hemoglobin gene from *Alnus firma* functions in symbiotic and nonsymbiotic tissues to detoxify nitric oxide. *Mol. Plant Microbe Interact.* 19, 441–450. doi: 10.1094/MPMI-19-0441
- Shidore, T., and Triplett, L. R. (2017). Toxin-Antitoxin systems: implications for plant disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* 55, 7.1–7.19. doi: doi.org/10.1146/annurev-phyto-080516-035559
- Shimoda, Y., Shimoda-Sasakura, F., Kucho, K., Kanamori, N., Nagata, M., and Suzuki, A. (2009). Overexpression of class 1 plant hemoglobin genes enhances symbiotic nitrogen fixation activity between *Mesorhizobium loti* and *Lotus japonicus*. *Plant J.* 57, 254–263. doi: 10.1111/j.1365-3113X.2008.03689.x
- Soto, M. J., Domínguez-Ferreras, A., Pérez-Mendoza, D., Sanjuán, J., and Olivares, J. (2009). Mutualism versus pathogenesis: the give-and-take in plant-bacteria interactions. *Cell. Microbiol.* 11, 381–388. doi: 10.1111/j.1462-5822.2009.01282.x
- Stamler, J. S., Lamas, S., and Fang, F. C. (2001). Nitrosylation: the prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell* 106, 675–683. doi: 10.1016/S0092-8674(01)00495-0
- Tang, G., Lu, D., Wang, D., and Luo, L. (2013). *Sinorhizobium meliloti* *lSrB* is involved in alfalfa root nodule development and nitrogen-fixing bacteroid differentiation. *Chin. Sci. Bull.* 58, 4077–4083. doi: 10.1007/s11434-013-5960-6
- Tang, G., Wang, Y., and Luo, L. (2014). Transcriptional regulator *LsrB* of *Sinorhizobium meliloti* positively regulates the expression of genes involved in lipopolysaccharide biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 5265–5273. doi: 10.1128/AEM.01393-14
- Tang, G., Xing, S., Wang, S., Yu, L., Li, X., and Staehelin, C. Tang, G., Xing, S., Wang, S., Yu, L., Li, X., and Staehelin, C., (2017). Regulation of cysteine residues in *LsrB* proteins from *Sinorhizobium meliloti* under free-living and symbiotic oxidative stress. *Environ. Microbiol.* 19, 5130–5145. doi: 10.1111/1462-2920.13992
- Trinchant, J. C., and Rigaud, J. (1982). Nitrite and nitric oxide as inhibitors of nitrogenase from soybean bacteroids. *Appl. Environ. Microbiol.* 44, 1385–1388. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16346155> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC242200>.
- Van de Velde, W., Zehirov, G., Szatmari, A., Debreczeny, M., Ishihara, H., and Kevei, Z. (2010). Plant peptides govern terminal differentiation of bacteria in symbiosis. *Science* (80-), 1122–1126. doi: 10.1126/science.1184057
- Vitousek, P. M., Menge, D. N. L., Reed, S. C., and Cleveland, C. C. (2013). Biological nitrogen fixation: rates, patterns and ecological controls in terrestrial ecosystems. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 368, 20130119. doi: 10.1098/rstb.2013.0119

- Wang, C., Yu, H., Luo, L., Duan, L., Cai, L., and He, X., et al. (2016). Nodules with activated defense 1 is required for maintenance of rhizobial endosymbiosis in *Medicago truncatula*. *New Phytol.* 212, 176–191. doi: 10.1111/nph.14017
- Wang, D., Griffiths, J., Starker, C., Fedorova, E., Limpens, E., and Ivanov, S. (2010). A nodule-specific protein secretory pathway required for nitrogen-fixing symbiosis. *Science* (80-), 1126–1129. doi: 10.1126/science.1184096
- Waszczak, C., Carmody, M., and Kangasjärvi, J. (2018). Reactive Oxygen Species in Plant Signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* 69, 209–236. doi: 10.1146/annurev-arplant-042817-040322
- Yang, S., Wang, Q., Fedorova, E., Liu, J., Qin, Q., and Zheng, Q. (2017). Microsymbiont discrimination mediated by a host-secreted peptide in *Medicago truncatula*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114, 6848–6853. doi: 10.1073/pnas.1700460114
- Yu, H., Bao, H., Zhang, Z., and Cao, Y. (2019). Immune signaling pathway during terminal bacteroid differentiation in nodules. *Trends Plant Sci.* 24, 299–302. doi: 10.1016/j.tplants.2019.01.010
- Yu, H., Xiao, A., Dong, R., Fan, Y., Zhang, X., and Liu, C. (2018). Rapid report suppression of innate immunity mediated by the CDPK-Rboh complex is required for rhizobial colonization in *Medicago truncatula* nodules. *New Phytol.* 220, 425–434. doi: 10.1111/nph.15410
- Yun, B.-W., Feechan, A., Yin, M., Saidi, N. B. B., Le Bihan, T., and Yu, M. (2011). S-nitrosylation of NADPH oxidase regulates cell death in plant immunity. *Nature* 478, 264. doi: 10.1038/nature10427
- Zipfel, C., and Oldroyd, G. E. D. (2017). Plant signalling in symbiosis and immunity. *Nature* 543, 328–336. doi: 10.1038/nature22009

Conflict of Interest: 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 Syska, Brouquisse, Alloing, Pauly, Frendo, Bosseno, Dupont and Boscari. 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.

Annexe 6- Revue “Involvement of proteases during nodule senescence in leguminous plant”

CHAPTER 9.4.1

Involvement of proteases during nodule senescence in leguminous plants

Li Yang, Camille Syska, Isabelle Garcia, Pierre Frendo, and Eric Boncompagni

Université Côte d'Azur, INRA, CNRS, UMR 1355-7254 ISA, Sophia Antipolis 06900, France

9.4.1.1 Introduction

In plants, as in all other living organisms, proteins are submitted to permanent turnover. The content of a given protein depends on its rate of both synthesis and degradation. The degradation of damaged, misfolded, and potentially harmful proteins is associated with the activity of proteolytic enzymes. Beside this regulatory role in the protein turnover, proteolysis plays numerous roles in the regulation of cellular metabolism, as well as in plant development and defense (Thomas 2013).

Proteases can be divided into several classes depending on the hydrolysis site of the target protein and on the chemical nature of the catalytic site of the protease. Exopeptidases which act on the termini of (poly)peptide chains can be classified as aminopeptidases when acting on the N-terminus of the protein and as carboxypeptidases when acting on the C-terminus of the protein. Endopeptidases, also called proteinases, act on the interior of polypeptides. Various amino acids are present in the catalytic site of proteases. In serine, threonine, and cysteine proteases (CPs), the hydroxyl or sulfhydryl group of the active-site amino acid performs a nucleophilic attack on the peptide bond to hydrolyze it. Acidic proteases (aspartic and glutamic proteases) and metalloproteases, which rely on divalent cations for activity such as zinc, cobalt, and manganese, activate a water molecule to act as a nucleophile to attack the peptide carbonyl group. The plant genomes contain around 2% of proteases. According to the MEROPS database (<http://merops.sanger.ac.uk>; Rawlings et al. 2016), the peptidases family contains 847 known and putative members in *Arabidopsis thaliana* and 799 members in *Medicago truncatula* of a total of around 40 000 genes per genome. The protease families diverge so far that relationships cannot always be surely demonstrated by comparison of their primary structures. Similarity of the three-dimensional structures allows to classify proteases in clans and families even when primary sequence is not comparable.

The proteases play crucial roles in plant physiology. The selective breakdown of regulatory proteins via the ubiquitin/proteasome pathway controls many aspects of the plant development. As examples, the ubiquitin-proteasome pathway regulates auxin, gibberellin, and jasmonate pathways (Wager and Browse 2012; Salehin et al. 2015) and light perception via the degradation of regulatory proteins (Huang et al. 2014). This pathway also controls key aspects of the plant innate immunity and general defense (Marino et al. 2012). Proteases are also responsible for the post-translational modifications of proteins at highly specific sites. This cleavage of proteins is involved in the maturation of enzymes after the subcellular targeting to vacuoles, extracellular space, and organelles such as plastids and mitochondria (Kmiec et al. 2014). Proteolysis is also necessary for protein assembly and to control the activity of proteins and peptides, such as systemin (Pearce 2011).

The vacuole is a major compartment involved in protein degradation. This organelle which can represent 90% of the plant cell volume, harbors in addition to other lytic enzymes, the majority of proteolytic activities (Matile and Martinoia 1982). Numerous proteases have been identified in the vacuole (Carter et al. 2004). The vacuolar proteolysis is involved in many cellular processes such as microautophagy and macroautophagy, regulating multiple aspects of plant physiology from mobilization of the storage proteins during seed germination, to initiation of cell death and senescence. The degradation of storage proteins during plant germination allows the remobilization of nitrogen for the formation of new proteins during plantlet development (Tan-Wilson and Wilson 2012).

Protease activity also plays a crucial role in the plant's adaptation to abiotic stresses. In such cases, proteolysis plays a housekeeping role by removing abnormal, inactivated, or denatured proteins, the accumulation of which could be toxic for the cell. In general, the plant adaptation to abiotic stresses goes together with an increased expression of proteases

(Velasco-Arroyo et al. 2016; Mishra and Richa Grover 2016). The stress-induced alteration of photosynthesis also induces a strong modification in cellular metabolism (Gururani et al. 2015). In these stress conditions, the proteases are involved in the redistribution of amino acids for the synthesis of new enzymes and the basis of carbon backbones for energy production through respiration (Roberts et al. 2012). Proteases are also involved in plant–pathogen interactions. Apoplastic proteases have been shown to be involved in the plant defense against microbial pathogens such as *Pseudomonas syringae* (Xia et al. 2004). Cysteine proteases have also been shown to be required for plant resistance against the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea* (Shindo et al. 2012) and *Ralstonia solanacearum* (Zhang et al. 2014a). Cathepsins are also involved in the basal immunity of plants against *P. syringae* (Ramirez et al. 2013). Similarly, a subtilase protease has been shown to be implicated in defense against bacteria and oomycetes (Ramirez et al. 2013).

Plant proteases participate to the programmed cell death (PCD) associated with developmental processes and plant defense against abiotic stresses and pathogen invasion (Sueldo and van der Hoorn 2017). In animal systems, the central core execution switch for apoptotic PCD is the activation of caspases (cysteine-containing aspartate-specific proteases). In plants, the existence of caspase-like activity during PCD has been shown to regulate PCD execution (Sueldo and van der Hoorn 2017). Proteasome activity also participates in PCD (Han et al. 2012). Proteases are involved in PCD occurring in embryo suspensors (Suarez et al. 2004; Zhao et al. 2013), the degeneration of the tapetum during anther development (Zhang et al. 2014b), the inner integument shrinking during seed coat formation (Nakaune et al. 2005), and the development of tracheary elements which constitute the xylem (Avci et al. 2008). Proteases are also involved in PCD occurring during the hypersensitive response induced during plant defense against pathogen microorganisms and viruses (McLellan et al. 2009; Coll et al. 2010; Chichkova et al. 2010). Likewise, proteases are involved in PCD occurring during abiotic stresses like oxidative and osmotic stresses (Chichkova et al. 2010).

Proteolysis is also associated with plant senescence, which is considered as another type of PCD. Senescence is a complex and controlled process, essential for (re)mobilization of nutrients from old and stressed tissues to growing or sink organs (Shi et al. 2017; Have et al. 2017). It is connected to the degradation of the cellular structures and macromolecules to allow the formation and the relocation of transportable molecules. Leaf senescence has been particularly well studied (Lim et al. 2007; Otegui et al. 2005). It is a developmental process linked to the organ's aging, but it could also be modulated by biotic and abiotic stresses (Jajic et al. 2015; Reinbothe et al. 2009). Proteases are involved in senescence with a major role in nutrient recycling, especially amino acids and nitrogen. Proteases are upregulated during the senescence process and nearly all protease families have been associated with some aspects of plant senescence (Diaz-Mendoza et al. 2016). They are located in

multiple cell compartments such as chloroplasts, mitochondria, vacuoles, and senescence associated vesicles (Diaz-Mendoza et al. 2016). In addition to their roles in nutrient mobilization, proteases have been shown to regulate the senescence process. Metacaspases, which are cysteine proteases, are positive regulators of cell death in the context of pathogen-triggered PCD and a negative regulator of the plant senescence (Coll et al. 2014; Minina et al. 2013).

Within leguminous plant nodules, cysteine proteinases are engaged in response to microbial invasion, protein turnover for tissue remodeling, metabolic homeostasis and nutrient reutilization, adaptation to environmental stresses, and leaf and nodule senescence.

Biological nitrogen fixation (BNF) is the biological process by which atmospheric nitrogen (N_2) is converted to ammonia by an enzyme called nitrogenase. It is the major source of nitrogen in the biosphere and as such has an important ecological and agronomical role, accounting for 65% of the nitrogen used in agriculture worldwide. The most important source of fixed nitrogen is the symbiotic association between rhizobia and legumes. The nodule is a *de novo* formed plant organ in which biological nitrogen fixation is achieved by the bacteria (see Chapter 6.1). The bacteria are surrounded by a plant cell membrane, the peribacteroid membrane (PBM), the whole forming an organelle-like structure called the symbiosome where bacteria differentiate into nitrogen-fixing bacteroids. Symbiosomes completely fill the cytoplasm of infected cells. As the bacteria differentiate, infected cells undergo enlargement coupled to repeated endoreduplication cycles – genomic DNA replication without mitosis and cytokinesis – and become large polyploid cells housing thousands of bacteroids (Jones et al. 2007; Kondorosi et al. 2000; see Section 9.3). The nodule functioning has many particularities, related to the plant–microbe crosstalk and to a metabolism which needs a high energy level under micro-oxic conditions. Whereas leaf senescence has been extensively studied, root nodule senescence has been less characterized. Nodule senescence also has specific features (Puppo et al. 2005). In this context, this review focuses on the roles of proteases in root nodule senescence.

9.4.1.2 Involvement of plant proteases in the nodule senescence process

Developmental and induced nodule senescence are complex processes causing a strong decrease of N_2 fixation and degradation of leghemoglobin (Lb) showing a typical green color of senescing nodule tissue (Puppo et al. 2005; Lehtovaara and Perttala 1978). Plants keep in homeostasis by the continuity of cell degradation and synthesis. However, when the rate of deterioration exceeds that of novel production, plants proceed to whole senescence. In roots, nodule senescence is accompanied with a series of physiological, biochemical, and structural alterations. Nodule senescence has also been regarded as a

delayed plant pathogenic response to Rhizobium (Mellor 1989). Nodules also individually follow a programmed death for turnover. Stress-induced nodule senescence is a consequence of accumulation of oxidized proteins, loss of thiols content, and general ultrastructural deterioration (Matamoros et al. 1999). Such proteolysis provides substrates to produce new amino acids, hence, contributing to protein turnover. Amino acids required by plants are mainly reused from old amino acids with continuous *de novo* synthesis.

Microscopic analysis of developmental nodule senescence showed that symbiotic organelle degradation occurs before the plant cell collapses in *M. truncatula* (Figure 9.4.1.1) (Van de Velde et al. 2006). The nodule degradation process involves a noticeable increase of protease activities leading to a complete degradation of the plant host cell and symbiotic bacteria (Figure 9.4.1.1).

In senescing nodule tissue of soybean, alfalfa, French bean, and pea nodules, numerous proteases activities have been detected (Kardailsky and Brewin 1996; Malik et al. 1981; Pfeiffer et al. 1983; Pladys and Vance 1993; Pladys and Rigaud 1985). In determinate nodule, such as soybean, senescence has been shown to be associated with the induction of cysteine protease genes (Alesandrini et al. 2003). Similarly, protease genes have been found to be strongly expressed during developmental senescence in zone IV at the proximal part of the nodule in indeterminate nodule such as *M. truncatula* or Chinese milk vetch (Fedorova et al. 2002; Naito et al. 2000).

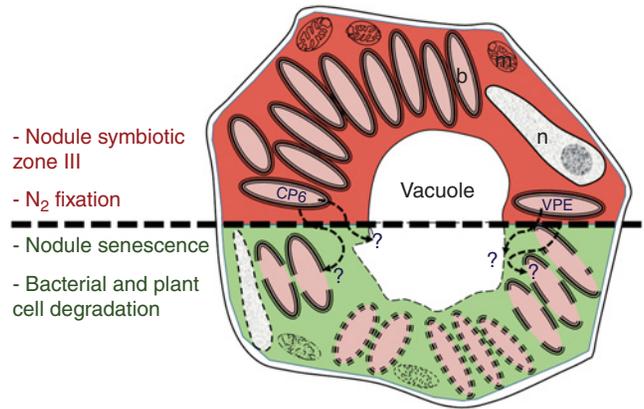


Figure 9.4.1.1 Representation of the developmental senescence in *M. truncatula* nodule infected cells. In red, schematic of infected cells involved in N-fixation, and in green, representation of typical nodule senescence cells. Dark dotted-lines show potential cell targets of both MtCP6 and MtVPE after release from symbiosomes during nodule senescence. Legends: b, bacteroid; m, mitochondria; n, nuclei.

A transcriptomic analysis of senescent nodules in *M. truncatula* using cDNA-AFLP (amplified fragment length polymorphism) confirmed the accumulation of transcripts corresponding to multiple proteases (Table 9.4.1.1) (Van de Velde et al. 2006). At least eight of the identified proteases are cysteine proteases (CPs) that share high homology with the

Table 9.4.1.1 Relative expression of various proteases involved in developmental and induced root nodule senescence in *M. truncatula*

GENBANK ACCESSION NUMBER	CONSENSUS BLAST HIT	Gene	EXPRESSION ANALYSIS							
			cDNA-AFLP			RT-qPCR				Scale %
			N	ASN2	PSN2	N	NS3	1ddt	3ddt	
DQ455113	cysteine proteinase TC100437	<i>MtCP6</i>	22	44	89	1	100	16	28	
DQ455114	cysteine proteinase		38	59	74	nd	nd	nd	nd	
DQ455173	cysteine proteinase TC100443		31	40	98	1	47	33	53	
DQ455264	cysteine proteinase TC100440		28	38	99	nd	nd	nd	nd	
DQ455343	cysteine proteinase BE999342		23	49	93	nd	nd	nd	nd	
DQ455093	cysteine protease TC98625		29	39	99	nd	nd	nd	nd	100
DQ455112	cysteine proteinase 15A precursor TC93993		27	28	98	nd	nd	nd	nd	90
DQ455138	cysteine proteinase TC102742		33	31	100	nd	nd	nd	nd	80
DQ455162	vacuolar processing enzyme TC106338	<i>MtVPE</i>	32	32	99	1	9	1	2	70
DQ455100	calpain-like protein		23	24	90	nd	nd	nd	nd	60
DQ455239	subtilisin-like proteinase		29	35	100	nd	nd	nd	nd	50
DQ455253	putative serine carboxypeptidase TC102585		25	30	94	nd	nd	nd	nd	30
DQ455255	aspartic proteinase delta TC95517		34	45	96	1	1	1	4	20
DQ455260	aspartic proteinase		34	41	91	nd	nd	nd	nd	10
DQ455294	thiolprotease TC106627		19	38	96	nd	nd	nd	nd	5
DQ455468	protease-like protein TC108065		33	29	93	nd	nd	nd	nd	0

cDNA-AFLP transcriptome analysis: N, nitrogen-fixing, indeterminate nodules without senescence zone; ASN2 and PSN2, apical and proximal part of nodules with large green senescence zone, respectively (Van de Velde et al. 2006). RT-qPCR expression patterns of dark induced nodule senescence: N, nodules without signs of senescence; SN3, fully senescent nodules; 1 and 3 ddt (dark-induced nodule senescence compared to young fixing nodules) (Perez Guerra et al. 2010). Lower expression is considered as 1% and higher expression is considered as 100%. nd, stands for no data.

senescence-associated gene 12 (*AtSAG12*), one of the prominent markers of leaf senescence in *A. thaliana* (Lohman et al. 1994). *AtSAG12* is a typical papain, a CP member of the peptidases (family C1A and clan CA classification from MEROPS database) typically found as lysosomal or secreted (Otegui et al. 2005; Richau et al. 2012). The overexpression of such CPs suggests an important role of proteases in the regulation of developmental nodule senescence. *MtCP6* has been mainly studied as a representative CP from this group of papain in nodule senescence (Van de Velde et al. 2006; Perez Guerra et al. 2010; Pierre et al. 2014). In *M. truncatula*, another cysteine protease, key marker of nodule senescence was found to be a Vacuolar Processing Enzyme (*MtVPE*), a protease belonging to legumain families (Table 9.4.1.1) (Sueldo and van der Hoorn 2017). *MtVPE*, a cysteine protease (member of family C13 from clan CD classification from MEROPS database), is evolutionarily related to caspases and, found to be located in the vacuole (Pierre et al. 2014; Hatsugai et al. 2015). Both *MtCP6* and *MtVPE* have been found to be strongly upregulated in response to both developmental and environmentally induced nodule senescence such as dark treatment (ddt) (Perez Guerra et al. 2010) (Table 9.4.1.1). Interestingly, only at the onset of nodule senescence, vacuolar SNAREs (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor adaptor protein receptors) proteins (*SYP22* and *VTI11*) that are typical markers of lytic vacuolar membrane identity are found to be present on the peribacteroid membrane (Limpens et al. 2009). The modification of membrane identity may allow the targeting of vacuolar proteases to the symbiosomes. In this scenario, the low pH present in the peribacteroid space would induce the autoactivation of both CPs and VPEs (Pierre et al. 2013).

In *M. truncatula*, five cysteine proteases have been identified as specifically expressed in nodules and share a high degree of homology with the *MtCP6* family (Pierre et al. 2014). A spatio-temporal analysis of *MtCP6* and *MtVPE* expression pattern in developmental nodule senescence revealed a strong expression associated to the transition region between the N_2 -fixing (III in red) and senescence (IV in green) zones (Figure 9.4.1.1) (Pierre et al. 2014). During senescence induced by three days of ammonitrate treatment, *MtCP6* and *MtVPE* expression was detected in the entire nodule and correlated to the extension of the green senescence zone of the nodule (Figure 9.4.1.1).

Subcellular localization of both *MtCP6* and *MtVPE* in *M. truncatula* senescent nodules has been associated to vacuoles in non-infected cells and to symbiosomes of infected cells, suggesting a role of these cysteine proteases in symbiosome degradation after the induction of proteases upon developmental or stress-induced senescence (Figure 9.4.1.1) (Pierre et al. 2014). Silencing of *MtCP6* or *MtVPE* genes delayed nodule senescence and extended the zone III ratio relative to zone IV with a concomitant increase of 2.5- to 1.5-fold in nitrogen fixation for both constructions, respectively (Pierre et al. 2014). Conversely, their ectopic expression in the nitrogen-fixing zone promoted

an extension of nodule senescence and a reduction of nodule length for both constructions (Pierre et al. 2014), showing the involvement of these two proteases in the nodule senescence process.

Similarly, cysteine protease genes are induced during nodule senescence in other leguminous plants. In soybean, 18 CPs and 6 VPEs were identified as transcriptionally upregulated during developmental nodule senescence (van Wyk et al. 2014). In *Trifolium repens*, five CP genes *TrCP1*, *TrCP5*, *TrCP8*, *TrCP10*, and *TrCP12* have been identified as having an increased expression mainly in the nodule senescence zone (Asp et al. 2004) (Table 9.4.1.2). In *Astragalus sinicus* the transcripts are mostly accumulated in senescence zone (IV), as well as in interzone (II-III) under developmental senescence. Interestingly, the expression of a nodule-specific CP, *Asnodf32*, appears at 14 days post inoculation (dpi) and increases fivefold at 30 dpi (Naito et al. 2000) (Table 9.4.1.2). The important role of *Asnodf32* in nodule senescence has been validated by the delayed root nodule senescence correlated to a significant extension of the nitrogen fixation active period obtained by RNAi silencing of the *Asnodf32* gene (Li et al. 2008). Furthermore, as in *M. truncatula*, *Asnodf32* RNAi leads to the elongation of nodules suggesting a modification of the nodule development (Li et al. 2008).

Interestingly, using laser microdissection, the analysis of nodule senescence in the mutant line E135F (*sym13*) of *Pisum sativum* L. showed the increase of mRNA abundance of two cysteine proteases (*PsCyp1* and *PsCyp15a*) (Table 9.4.1.2) and a thiol protease (*PsTPP*) (Serova et al. 2017).

Recently, a large collection of *M. truncatula* mutants has been constructed using ethyl methanesulfonate (EMS) and fast neutron mutagenized or *Tnt1*-insertion, leading to numerous Nod^+ Fix^- mutants with phenotypes showing signs of early senescence (Domonkos et al. 2013; Pislariu et al. 2012). This collection of mutants will represent a huge interest for deciphering the molecular pathways involving proteases in nodule senescence.

9.4.1.3 Role of cystatin in the nodule senescence process

To date, regulation of the cysteine proteases in legumes is poorly documented. However, recent studies show their interactions *in vivo* with cystatins, which are cysteine protease inhibitors limiting proteolytic processes in a reversible manner (for review, Benchabane et al. 2010; Martinez et al. 2012; van Wyk et al. 2014; Diaz-Mendoza et al. 2016; Yuan et al. 2016). Cystatins mainly inhibit protease enzymes belonging to peptidase families C1 (papain family) and C13 (legumain family).

In *Medicago sativa*, expression of the cystatin *MsCys1* is developmentally regulated in stems and leaves but not induced by various stress signals. Recombinant *MsCys1* shows a strong inhibitory effect on alfalfa leaf CPs activities (Rivard et al. 2007). However to date, no study concerning the biological

Table 9.4.1.2 Characterization of cysteine proteinases (CP, Cyp, VPE) related to nodule senescence in legume plants

Genes	Plant	Nodule type	Expression	Expression location	Possible Function	References
<i>MtCP1-5</i>	<i>Medicago truncatula</i>	Indeterminate	Nodule-specific	Periphery of the conical senescence zone IV	PCD and induced senescence; protein synthesis and processing, protein degradation	Van de Velde et al. 2006; Perez Guerra et al. 2010
<i>MtCP6</i>	<i>Medicago truncatula</i>	Indeterminate	Nodule-specific	Zone III -IV	PCD and induced senescence; protein synthesis and processing, protein degradation	Van de Velde et al. 2006; Perez Guerra et al. 2010; Pierre et al. 2014
<i>MtVPE</i>	<i>Medicago truncatula</i>	Indeterminate	Nodule-nonspecific	Meristematic and infection zones; weak in zone III -IV	PCD and induced senescence; protein synthesis and processing, protein degradation	Van de Velde et al. 2006; Pierre et al. 2014
<i>PsCyp1</i>	<i>Pisum sativum</i>	Indeterminate	Nodule-nonspecific	Zone III, weak in zone IV, root parenchymal cells	PCD, early senescence stage	Kardailsky and Brewin 1996; Serova et al. 2017
<i>PsCyp15a</i> <i>MsCyp15a</i> <i>MtCyp15a</i>	<i>Pisum sativum</i> ; <i>Medicago sativa</i> ; <i>Medicago truncatula</i>	Indeterminate	Nodule-nonspecific	Meristem and cortex, vascular bundles, infecting ramification, zone II-IV	PCD and induced senescence; adaptation to changes in cell turgor, protein turnover; nodule organogenesis and maturation	Jones and Mullet 1995; Kardailsky and Brewin 1996; Vincent et al. 2000; Vincent and Brewin 2000; Sheokand et al. 2005; Serova et al. 2017
<i>NODf32</i>	<i>Astragalus sinicus</i>	Indeterminate	Nodule-specific	Zone IV to II-III	PCD, protein turnover, remodeling of tissues, putative vacuolar-targeting	Naito et al. 2000; Li et al. 2008
<i>TrCPs</i>	<i>Trifolium repens</i>	Indeterminate	Nodule-specific	Zone IV	PCD, putative vacuolar-targeting signal	Asp et al. 2004
<i>GmCP</i>	<i>Glycine max</i>	Determinate	Nodule-nonspecific	Periphery of the central zone, central infected cells	PCD, protein degradation	Alesandrini et al. 2003
<i>GmCYS1</i>	<i>Glycine max</i>	Determinate	Nodule-specific	Not determined	PCD, nodule development	Oh et al. 2004

role of such cystatins has been carried out in the nodule under senescence.

In soybean senescent nodules, four cystatin genes are particularly co-induced with *GmCYPs* during the onset of senescence (van Wyk et al. 2014). Interestingly, two cystatin genes present a downregulation anticorrelated with the induction of *GmCYPs* expression throughout the transition to nodule senescence (van Wyk et al. 2014). Such coordinated expression of transcripts encoding cystatins and *GmCYPs* interacting partners suggest their involvement in the tight control of proteolysis regulation associated with nodule senescence. However, no functional analysis aiming to alter their expression has been carried out to determine their relevance in nodule senescence. Interestingly, ectopic overexpression of rice cystatin oryzacystatin-I in soybean leads to a strong decrease in cathepsin L-like cysteine protease activities (Quain et al. 2015). A clear phenotype has been shown with a higher nodulation efficiency of mutant plants in

comparison to the wild-type (Quain et al. 2015). Furthermore, overexpression in *Lotus japonicus* of *GmCYS16* gene shows that some cystatin played a positive role in the nodulation process with a significant increase in root nodule numbers (Yuan et al. 2016).

9.4.1.4 Proteases from the endosymbiotic bacteria involved in nodule senescence

Similarly to the plant partner, the bacterial partner participates in the establishment and in the functioning of the nitrogen-fixing symbiosis. Bacteria may also be tightly involved in the senescence process which leads to the breakdown of the symbiotic partnership.

Bacteria have the capacity to adjust to a wide variety of growth environments. *S. meliloti* is an interesting model of this

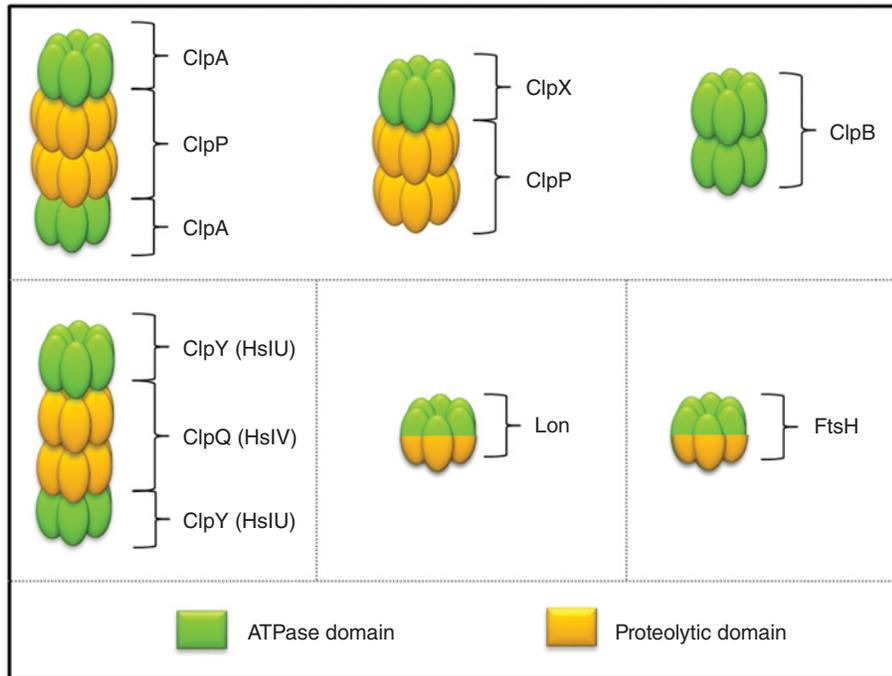


Figure 9.4.1.2 Structure of energy-dependent proteases belonging to the AAA+ family. In Clp proteases, proteolytic and ATPase activities are separated on independent polypeptides. ClpP proteolytic subunit is formed of two rings of heptameric ClpP, which associates with hexameric ClpA or ClpX ATPase subunit. In the same way, ClpQ (HslV) proteolytic subunit forms a complex with the ClpY (HslU) ATPase subunit. ClpB doesn't associate with a proteolytic subunit and acts only as a chaperone. Lon and FtsH proteases are hexamers of identical polypeptides which carry both ATPase and proteolytic activity.

adaptability as it has to adapt both to a free-living saprophytic lifestyle and an endosymbiotic environment within the plant cells. This adaptation is provided by many regulatory mechanisms including transcriptional and translational regulation, but also protein degradation. Indeed, in addition to housekeeping functions necessary to remove misfolded or damaged proteins, bacterial proteolysis plays an important role in the regulation of various biological processes including stress response, cell differentiation, sporulation, or pathogenesis (for review, Gottesman 2003; Konovalova et al. 2014). This regulated proteolysis is mainly realized by energy-dependent proteases belonging to the AAA+ (ATPases associated with different cellular activities) family. Protein degradation starts with the binding of the substrate to the ATPase domain. Then, ATP hydrolysis allows the unfolding of the protein and its transfer to the proteolytic domain. This protease family is divided into four classes (Figure 9.4.1.2): for two of them, proteolytic (ClpP and ClpQ [also called HslV]) and ATPase (ClpA or X and ClpY [HslU]) domains are separated on independent subunits whereas for Lon and FtsH, the two domains are in the same polypeptide.

In the nitrogen-fixing symbiosis, rhizobia undergo important metabolic modifications and adaptations during the transition between the free-living state and the symbiotic association. This transition may include major cellular differentiation with arrest in cell division and genomic endoreduplication and adaptation

to an acidic and microoxic environment (Jones et al. 2007; Pierre et al. 2013; see Chapter 9.2.2). To date, physiological and molecular mechanisms involved in these processes are still only partially determined. Analysis of symbiotic phenotypes of bacteria deficient in Lon protease has shown the involvement of this protease family in the regulation of nitrogen-fixing symbiosis (Summers et al. 2000; Nakajima et al. 2012). Indeed, *lon* mutants of *S. meliloti* and *Azorhizobium caulinodans* in interaction with alfalfa and *Sesbania rostrata*, respectively, have been shown to induce nodules with little or no nitrogen fixation capacity (Summers et al. 2000; Nakajima et al. 2012). Moreover, nodule formation by *S. meliloti lon* mutants is delayed and abnormal (pseudo-nodules). In both cases, *lon* mutants also produce and release more extracellular polysaccharides (EPS). Lon is known to be involved in polysaccharides synthesis in bacteria (Gottesman et al. 1985). As EPS were previously associated with early infection steps of the symbiosis such as bacterial attachment to root hairs and invasion (Frayse et al. 2003; Laus et al. 2005), the authors suggest that at least part of the symbiotic defects obtained with *lon* mutants may result from abnormal EPS production.

Beside the regulation of EPS production, in many bacteria, Lon proteases are also known to control activation of some toxin-antitoxin (TA) systems by degradation of the unstable antitoxin (Christensen et al. 2001, 2003; Brzozowska and Zielenkiewicz 2013). This leaves the toxin, usually acting as an

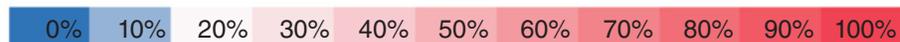
endoribonuclease, free to target specific RNAs thus contributing to a particular biological response. In this context, modification of the symbiotic properties of *S. meliloti* strains mutated in TA systems has been reported in the interaction with the plant host *M. sativa* (Oláh et al. 2001; Lipuma et al. 2014). Consequently, some symbiotic phenotypes of the *S. meliloti lon* mutants may also be the consequence of a defect in TA system activation. Another class of energy-dependent proteases, ClpX/AP, seems also involved in nitrogen-fixing symbiosis. In many bacteria, ClpP proteolysis has been associated with regulation of major cellular processes including cell division and differentiation, virulence and stress response (Porankiewicz et al. 1999). A critical role of ClpXP proteolysis has been also demonstrated in nitrogen fixation in the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense* (Rodriguez et al. 2006). Indeed, an *Azospirillum clpX* mutant presents enhanced nitrogen fixation associated to higher production of exopolysaccharides. In contrast, *clpX* disruption is lethal in *S. meliloti* (Kobayashi et al. 2009). However, mutation of *cpdR1*, encoding a transcriptional regulator of ClpX, induces small white pseudo-nodules with no

nitrogen-fixing capacity (Kobayashi et al. 2009). As host plant cells contain numerous bacteria, the authors propose that the bacteroid differentiation step is impaired in the *cpdR1* mutant.

Moreover, implication of ClpP proteolysis during nitrogen-fixing symbiosis is supported by *S. meliloti* transcriptomics data. Indeed, the transcript accumulation of some bacterial proteases in the different zones of the nodule can be determined from the plant and bacterial gene expression analysis performed in symbiotic root nodules using laser capture microdissection coupled to RNA-seq (Table 9.4.1.3) (<https://iant.toulouse.inra.fr/symbimics/>; Roux et al. 2014). This study reveals in particular a significant accumulation of *clpP3* proteolytic subunit transcripts in the nodule nitrogen-fixing zone. However, this induction is not correlated with ClpA or ClpX ATPase subunit, which are preferentially expressed in the proximal infection zone. Nevertheless, the transcript accumulation of ATPase subunits seems sufficient to allow the complex formation. Nonetheless, we cannot exclude that ClpP3 could be involved alone in the degradation of short peptides, which can occur with isolated ClpP protease. Moreover, the expression analysis showed

Table 9.4.1.3 RNA-seq gene expression of some bacterial proteases coupled to laser microdissection of *M. truncatula* nodule from the apical meristem to the nitrogen fixation zone

Protease family	Gene	FI	FIID	FIIP	IZ	FIII
AAA+						
Lon	<i>SMc01905</i>	802.4	834	2053.9	1331.5	1466.2
ClpP1	<i>SMc01903</i>	287.1	275.2	397.5	348.8	230
ClpP2	<i>SMc02720</i>	223.7	234.5	391.8	497.1	498.3
ClpP3	<i>SMc03841</i>	75.4	22.7	17.9	160.4	1621.9
ClpX	<i>SMc01904</i>	1853.8	2601.5	3479.9	2363.6	1016.3
ClpA	<i>SMc02109</i>	656.1	459.8	1399.4	1019.3	953
ClpB	<i>SMc02433</i>	591.2	439.3	2289.8	1585.2	3835
ClpS1	<i>SMc02110</i>	270.2	195.2	418.6	458.3	207.2
ClpS2	<i>SMc02694</i>	68.1	131.6	279.7	180.1	194.4
HsIU	<i>SMc02577</i>	82.9	77.5	944.5	380.5	100.2
HsIV	<i>SMc02575</i>	37.4	89.3	707.3	331.7	78.8
FtsH	<i>SMc04459</i>	1512.4	1309.4	3023.6	2099.1	1048.6
HflK	<i>SMc01441</i>	226.1	231	557.8	447.6	286.6
HflC	<i>SMc01440</i>	382.8	480.5	931.6	812.8	558.3
Carboxy terminal protease						
CtpA	<i>SMc03783</i>	1118.8	901.3	718.9	579.4	2155.7



The RNA-sequencing was determined in the different zones of *S. meliloti* 2011 induced nodules (2 wpi) (Roux et al. 2014). Values correspond to the number of reads and colors to their relative abundance (scale in percentage under the table). The transcript relative abundance was estimated using the percentage of normalized counts in each fraction relative to the total number of normalized counts. FI, meristematic zone; FII, infection zone with a distal (FIID) and a proximal fraction (FIIP) zone; IZ, interzone II-III; FIII, fixation zone.

that *clpB*, a member of the Clp ATPase family, which acts as a chaperone with the DnaJ, DnaK, and GrpE cellular machinery to disaggregate proteins, is also induced in the fixing zone. Therefore, all these data suggest an important role of this protease family in the functioning of the nitrogen-fixing interaction in addition to its probable implication in its establishment. Interestingly, the transcriptomic data analysis also reveals the induction in the nitrogen-fixing zone of a periplasmic carboxy-terminal processing serine protease gene, *ctpA*, known to be critical for viability of *Rhizobium leguminosarum* when grown on semi-solid medium (Gilbert et al. 2007). The role of the expression of *ctpA* during symbiosis remains to be determined.

Finally, the expression of a *S. meliloti* metalloprotease (HrrP) involved in the cleavage of host-encoded nodule-specific cysteine-rich (NCR) peptides may lead to premature bacteroids degeneration (Price et al. 2015). This result suggests a role of this protease in modifying the host-encoded NCR pool. This contributes to the plant-microbe crosstalk in the late development stage and demonstrates the role of bacterial proteolysis to maintain the symbiotic interaction.

The understanding of the implication of bacterium in the nodule senescence is in its infancy. Further analyses have to be performed to acquire a global vision of this critical process.

9.4.1.5 Conclusion

Many analyses have shown that a large panel of proteases are involved in nodule senescence under developmental or stress-induced senescence. One of the main reasons for the activation of the protease pathways in nodule senescence is linked to nutrient remobilization and programmed degradation of symbiotic partnership, in order to eliminate the useless organ during developmental senescence or to maintain the survival of the plant during stress-induced senescence. Nevertheless, the strong and fast induction of proteases may interfere with an efficient yield production of legumes in agricultural conditions. In a world confronted with global warming and limited access to water, a large investment in plant research attempting to moderate or delay strong responses to abiotic stresses can be seen as an interesting goal in order to produce more resilient plants. In this context, the analysis of the regulation of protease activation during the transition from symbiosis to senescence may allow us to better understand the key mechanisms involved in the senescence initiation. Moreover, such protease genes may also be essential tools for the plant assisted marker selections in order to delay the general plant senescence during adverse climate changes.

Acknowledgments

L.Y. is supported by a doctoral fellowship from the China scholarship council (CSC). C.S. is the recipient of a doctoral grant from the “Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement

supérieur et de la Recherche.” This work was supported by the French Government (National Research Agency, ANR) through the “STAYPINK” project (reference # ANR-15-CE20-0005) and “Investments for the Future” LABEX SIGNALIFE (program reference # ANR-11-LABX-0028-01).

References

- Alessandrini, F., Frenedo, P., Puppo, A., and Herouart, D. (2003). Isolation of a molecular marker of soybean nodule senescence. *Plant Physiology and Biochemistry* 41: 727–732.
- Asp, T., Bowra, S., Borg, S., and Holm, P.B. (2004). Cloning and characterisation of three groups of cysteine protease genes expressed in the senescing zone of white clover (*Trifolium repens*) nodules. *Plant Science* 167: 825–837.
- Avci, U., Petzold, H.E., Ismail, I.O. et al. (2008). Cysteine proteases XCP1 and XCP2 aid micro-autolysis within the intact central vacuole during xylogenesis in *Arabidopsis* roots. *The Plant Journal* 56: 303–315.
- Benchabane, M., Schluter, U., Vorster, J. et al. (2010). Plant cystatins. *Biochimie* 92: 1657–1666.
- Brzozowska, I. and Zielenkiewicz, U. (2013). Regulation of toxin-antitoxin systems by proteolysis. *Plasmid* 70: 33–41.
- Carter, C., Pan, S., Zouhar, J. et al. (2004). The vegetative vacuole proteome of *Arabidopsis thaliana* reveals predicted and unexpected proteins. *Plant Cell* 16: 3285–3303.
- Chichkova, N.V., Shaw, J., Galiullina, R.A. et al. (2010). Phytaspase, a relocatable cell death promoting plant protease with caspase specificity. *The EMBO Journal* 29: 1149–1161.
- Christensen, S.K., Mikkelsen, M., Pedersen, K., and Gerdes, K. (2001). RelE, a global inhibitor of translation, is activated during nutritional stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 14328–14333.
- Christensen, S.K., Pedersen, K., Hansen, F.G., and Gerdes, K. (2003). Toxin-antitoxin loci as stress-response-elements: ChpAK/MazF and ChpBK cleave translated RNAs and are counteracted by tmRNA. *Journal of Molecular Biology* 332: 809–819.
- Coll, N.S., Vercammen, D., Smidler, A. et al. (2010). *Arabidopsis* type I metacaspases control cell death. *Science* 330: 1393–1397.
- Coll, N.S., Smidler, A., Puigvert, M. et al. (2014). The plant metacaspase AtMC1 in pathogen-triggered programmed cell death and aging: functional linkage with autophagy. *Cell Death and Differentiation* 21: 1399–1408.
- Diaz-Mendoza, M., Velasco-Arroyo, B., Santamaria, M.E. et al. (2016). Plant senescence and proteolysis: two processes with one destiny. *Genetics and Molecular Biology* 39: 329–338.
- Domonkos, A., Horvath, B., Marsh, J.F. et al. (2013). The identification of novel loci required for appropriate nodule development in *Medicago truncatula*. *BMC Plant Biology* 13: 157.
- Fedorova, M., van de Mortel, J., Matsumoto, P.A. et al. (2002). Genome-wide identification of nodule-specific transcripts in the model legume *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* 130: 519–537.
- Frayse, N., Couderc, F., and Poinot, V. (2003). Surface polysaccharide involvement in establishing the rhizobium-legume symbiosis. *The FEBS Journal* 270: 1365–1380.
- Gilbert, K.B., Vanderlinde, E.M., and Yost, C.K. (2007). Mutagenesis of the carboxy terminal protease *CtpA* decreases desiccation tolerance

- in *Rhizobium leguminosarum*. FEMS Microbiology Letters 272: 65–74.
- Gottesman, S. (2003). Proteolysis in bacterial regulatory circuits. Annual Review of Cell and Developmental Biology 19: 565–587.
- Gottesman, S., Trisler, P., and Torres-Cabassa, A. (1985). Regulation of capsular polysaccharide synthesis in *Escherichia coli* K-12: characterization of three regulatory genes. Journal of Bacteriology 162: 1111–1119.
- Gururani, M.A., Venkatesh, J., and Tran, L.S. (2015). Regulation of photosynthesis during abiotic stress-induced photoinhibition. Molecular Plant 8: 1304–1320.
- Han, J.J., Lin, W., Oda, Y. et al. (2012). The proteasome is responsible for caspase-3-like activity during xylem development. The Plant Journal 72: 129–141.
- Hatsugai, N., Yamada, K., Goto-Yamada, S., and Hara-Nishimura, I. (2015). Vacuolar processing enzyme in plant programmed cell death. Frontiers in Plant Science 6: 234.
- Have, M., Marmagne, A., Chardon, F., and Masclaux-Daubresse, C. (2017). Nitrogen remobilization during leaf senescence: lessons from *Arabidopsis* to crops. Journal of Experimental Botany 68: 2513–2529.
- Huang, X., Ouyang, X., and Deng, X.W. (2014). Beyond repression of photomorphogenesis: role switching of COP/DET/FUS in light signaling. Current Opinion in Plant Biology 21: 96–103.
- Jajic, I., Sarna, T., and Strzalka, K. (2015). Senescence, stress, and reactive oxygen species. Plants (Basel) 4: 393–411.
- Jones, J.T. and Mullet, J.E. (1995). A salt-and dehydration-inducible pea gene, *Cyp15a*, encodes a cell-wall protein with sequence similarity to cysteine proteases. Plant Molecular Biology 28: 1055–1065.
- Jones, K.M., Kobayashi, H., Davies, B.W. et al. (2007). How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model. Nature Reviews Microbiology 5: 619–633.
- Kardailsky, I.V. and Brewin, N.J. (1996). Expression of cysteine protease genes in pea nodule development and senescence. Molecular Plant-Microbe Interactions 9: 689–695.
- Kmiec, B., Teixeira, P.F., and Glaser, E. (2014). Shredding the signal: targeting peptide degradation in mitochondria and chloroplasts. Trends in Plant Science 19: 771–778.
- Kobayashi, H., De Nisco, N.J., Chien, P. et al. (2009). *Sinorhizobium meliloti* *CpdR1* is critical for co-ordinating cell cycle progression and the symbiotic chronic infection. Molecular Microbiology 73: 586–600.
- Kondorosi, E., Roudier, F., and Gendreau, E. (2000). Plant cell-size control: growing by ploidy? Current Opinion in Plant Biology 3: 488–492.
- Konvalova, A., Søgaard-Andersen, L., and Kroos, L. (2014). Regulated proteolysis in bacterial development. FEMS Microbiology Reviews 38: 493–522.
- Laus, M., Van Brussel, A., and Kijne, J. (2005). Role of cellulose fibrils and exopolysaccharides of *Rhizobium leguminosarum* in attachment to and infection of *Vicia sativa* root hairs. Molecular Plant-Microbe Interactions 18: 533–538.
- Lehtovaara, P. and Perttala, U. (1978). Bile-pigment formation from different leghaemoglobins. Methine-bridge specificity of coupled oxidation. Biochemical Journal 176: 359–364.
- Li, Y., Zhou, L., Chen, D. et al. (2008). A nodule-specific plant cysteine proteinase, *AsNODF32*, is involved in nodule senescence and nitrogen fixation activity of the green manure legume *Astragalus sinicus*. The New Phytologist 180: 185–192.
- Lim, P.O., Kim, H.J., and Nam, H.G. (2007). Leaf senescence. Annual Review of Plant Biology 58: 115–136.
- Limpens, E., Ivanov, S., van Esse, W. et al. (2009). *Medicago* N₂-fixing symbiosomes acquire the endocytic identity marker Rab7 but delay the acquisition of vacuolar identity. The Plant Cell 21: 2811–2828.
- Lipuma, J., Cinege, G., Bodogai, M. et al. (2014). A vapBC-type toxin-antitoxin module of *Sinorhizobium meliloti* influences symbiotic efficiency and nodule senescence of *Medicago sativa*. Environmental Microbiology 16: 3714–3729.
- Lohman, K.N., Gan, S., John, M.C., and Amasino, R.M. (1994). Molecular analysis of natural leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. Physiologia Plantarum 92: 322–328.
- Malik, N.S., Pfeiffer, N., Williams, D., and Wagner, F.W. (1981). Peptidohydrolases of soybean root nodules identification, separation, and partial characterization of enzymes from bacteroid-free extracts. Journal of Plant Physiology 68: 386–392.
- Marino, D., Peeters, N., and Rivas, S. (2012). Ubiquitination during plant immune signaling. Journal of Plant Physiology 160: 15–27.
- Martinez, M., Cambra, I., Gonzalez-Melendi, P. et al. (2012). C1A cysteine-proteases and their inhibitors in plants. Physiologia Plantarum 145: 85–94.
- Matamoros, M.A., Baird, L.M., Escuredo, P.R. et al. (1999). Stress-induced legume root nodule senescence. Physiological, biochemical, and structural alterations. Journal of Plant Physiology 121: 97–112.
- Matile, P. and Martinoia, E. (1982). Catabolism of carotenoids: involvement of peroxidase? Plant Cell Reports 1: 244–246.
- McLellan, H., Gilroy, E.M., Yun, B.W. et al. (2009). Functional redundancy in the *Arabidopsis* Cathepsin B gene family contributes to basal defence, the hypersensitive response and senescence. The New Phytologist 183: 408–418.
- Mellor, R.B. (1989). Bacteroids in the rhizobium-legume symbiosis inhabit a plant internal lytic compartment: implications for other microbial endosymbioses. Journal of Experimental Botany 40: 831–839.
- Minina, E.A., Filonova, L.H., Fukada, K. et al. (2013). Autophagy and metacaspase determine the mode of cell death in plants. The Journal of Cell Biology 203: 917–927.
- Mishra, R.C. and Richa Grover, A. (2016). Constitutive over-expression of rice ClpD1 protein enhances tolerance to salt and desiccation stresses in transgenic *Arabidopsis* plants. Plant Science 250: 69–78.
- Naito, Y., Fujie, M., Usami, S. et al. (2000). The involvement of a cysteine proteinase in the nodule development in Chinese milk vetch infected with *Mesorhizobium huakuii* subsp. *rengei*. Plant Physiology 124: 1087–1096.
- Nakajima, A., Aono, T., Tsukada, S. et al. (2012). Lon protease of *Azorhizobium caulinodans* ORS571 is required for suppression of reb gene expression. Applied and Environmental Microbiology 78: 6251–6261.
- Nakaune, S., Yamada, K., Kondo, M. et al. (2005). A vacuolar processing enzyme, deltaVPE, is involved in seed coat formation at the early stage of seed development. Plant Cell 17: 876–887.
- Oh, C.J., Lee, H., Kim, H.B., and An, C.S. (2004). Isolation and characterization of a root nodule-specific cysteine proteinase cDNA from soybean. Journal of Plant Biology 47: 216–220.
- Oláh, B., Kiss, E., Györgypál, Z. et al. (2001). Mutation in the *ntrR* gene, a member of the *vap* gene family, increases the symbiotic efficiency

- of *Sinorhizobium meliloti*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14: 887–894.
- Otegui, M.S., Noh, Y.S., Martínez, D.E. et al. (2005). Senescence-associated vacuoles with intense proteolytic activity develop in leaves of *Arabidopsis* and soybean. *The Plant Journal* 41: 831–844.
- Pearce, G. (2011). Systemin, hydroxyproline-rich systemin and the induction of protease inhibitors. *Current Protein and Peptide Science* 12: 399–408.
- Perez Guerra, J.C., Coussens, G., De Keyser, A. et al. (2010). Comparison of developmental and stress-induced nodule senescence in *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* 152: 1574–1584.
- Pfeiffer, N.E., Malik, N., and Wagner, F.W. (1983). Reversible dark-induced senescence of soybean root nodules. *Journal of Plant Physiology* 71: 393–399.
- Pierre, O., Engler, G., Hopkins, J. et al. (2013). Peribacteroid space acidification: a marker of mature bacteroid functioning in *Medicago truncatula* nodules. *Plant, Cell & Environment* 36: 2059–2070.
- Pierre, O., Hopkins, J., Combiér, M. et al. (2014). Involvement of papain and legumain proteinase in the senescence process of *Medicago truncatula* nodules. *The New Phytologist* 202: 849–863.
- Pislariu, C.L., Murray, J.D., Wen, J. et al. (2012). A *Medicago truncatula* tobacco retrotransposon insertion mutant collection with defects in nodule development and symbiotic nitrogen fixation. *Journal of Plant Physiology* 159: 1686–1699.
- Pladys, D. and Rigaud, J. (1985). Senescence in French-bean nodules: occurrence of different proteolytic activities. *Physiologia Plantarum* 63: 43–48.
- Pladys, D. and Vance, C.P. (1993). Proteolysis during development and senescence of effective and plant gene-controlled ineffective alfalfa nodules. *Journal of Plant Physiology* 103: 379–384.
- Porankiewicz, J., Wang, J., and Clarke, A.K. (1999). New insights into the ATP-dependent Clp protease: *Escherichia coli* and beyond. *Molecular Microbiology* 32: 449–458.
- Price, P.A., Tanner, H.R., Dillon, B.A. et al. (2015). Rhizobial peptidase HrrP cleaves host-encoded signaling peptides and mediates symbiotic compatibility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112: 15244–15249.
- Puppo, A., Groten, K., Bastian, F. et al. (2005). Legume nodule senescence: roles for redox and hormone signalling in the orchestration of the natural aging process. *The New Phytologist* 165: 683–701.
- Quain, M.D., Makgopa, M.E., Cooper, J.W. et al. (2015). Ectopic phyto-cystatin expression increases nodule numbers and influences the responses of soybean (*Glycine max*) to nitrogen deficiency. *Phytochemistry* 112: 179–187.
- Ramirez, V., Lopez, A., Mauch-Mani, B. et al. (2013). An extracellular subtilase switch for immune priming in *Arabidopsis*. *PLoS Pathogens* 9: e1003445.
- Rawlings, N.D., Barrett, A.J., and Bateman, A. (2016). MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Research* 40: D343–D350.
- Reinbothe, C., Springer, A., Samol, I., and Reinbothe, S. (2009). Plant oxylipins: role of jasmonic acid during programmed cell death, defence and leaf senescence. *The FEBS Journal* 276: 4666–4681.
- Richau, K.H., Kaschani, F., Verdoes, M. et al. (2012). Subclassification and biochemical analysis of plant papain-like cysteine proteases displays subfamily-specific characteristics. *Journal of Plant Physiology* 158: 1583–1599.
- Rivard, D., Girard, C., Anguenot, R. et al. (2007). *MsCYS1*, a developmentally-regulated cystatin from alfalfa. *Plant Physiology and Biochemistry* 45: 508–514.
- Roberts, I.N., Caputo, C., Criado, M.V., and Funk, C. (2012). Senescence-associated proteases in plants. *Physiologia Plantarum* 145: 130–139.
- Rodriguez, H., Mendoza, A., Cruz, M.A. et al. (2006). Pleiotropic physiological effects in the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense* following chromosomal labeling in the *clpX* gene. *FEMS Microbiology Ecology* 57: 217–225.
- Roux, B., Rodde, N., Jardinaud, M.F. et al. (2014). An integrated analysis of plant and bacterial gene expression in symbiotic root nodules using laser-capture microdissection coupled to RNA sequencing. *The Plant Journal* 77: 817–837.
- Salehin, M., Bagchi, R., and Estelle, M. (2015). SCFTIR1/AFB-based auxin perception: mechanism and role in plant growth and development. *Plant Cell* 27: 9–19.
- Serova, T.A., Tikhonovich, I.A., and Tsyganov, V.E. (2017). Analysis of nodule senescence in pea (*Pisum sativum* L.) using laser microdissection, real-time PCR, and ACC immunolocalization. *Journal of Plant Physiology* 212: 29–44.
- Sheokand, S., Dahiya, P., Vincent, J., and Brewin, N. (2005). Modified expression of cysteine protease affects seed germination, vegetative growth and nodule development in transgenic lines of *Medicago truncatula*. *Plant Science* 169: 966–975.
- Shi, H., Liu, W., Wei, Y., and Ye, T. (2017). Integration of auxin/indole-3-acetic acid 17 and RGA-LIKE3 confers salt stress resistance through stabilization by nitric oxide in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 68: 1239–1249.
- Shindo, T., Misa-Villamil, J.C., Horgler, A.C. et al. (2012). A role in immunity for *Arabidopsis* cysteine protease RD21, the ortholog of the tomato immune protease C14. *PLoS One* 7: e29317.
- Suarez, M.F., Filonova, L.H., Smertenko, A. et al. (2004). Metacaspase-dependent programmed cell death is essential for plant embryogenesis. *Current Biology* 14: R339–R340.
- Sueldo, D.J. and van der Hoorn, R.A.L. (2017). Plant life needs cell death, but does plant cell death need Cys proteases? *The FEBS Journal* 284: 1577–1585.
- Summers, M.L., Botero, L.M., Busse, S.C., and McDermott, T.R. (2000). The *Sinorhizobium meliloti* Lon protease is involved in regulating exopolysaccharide synthesis and is required for nodulation of alfalfa. *Journal of Bacteriology* 182: 2551–2558.
- Tan-Wilson, A.L. and Wilson, K.A. (2012). Mobilization of seed protein reserves. *Physiologia Plantarum* 145: 140–153.
- Thomas, H. (2013). Senescence, ageing and death of the whole plant. *The New Phytologist* 197: 696–711.
- Van de Velde, W., Guerra, J.C., De Keyser, A. et al. (2006). Aging in legume symbiosis. A molecular view on nodule senescence in *Medicago truncatula*. *Journal of Plant Physiology* 141: 711–720.
- Velasco-Arroyo, B., Diaz-Mendoza, M., Gandullo, J. et al. (2016). HvPap-1 C1A protease actively participates in barley proteolysis mediated by abiotic stresses. *Journal of Experimental Botany* 67: 4297–4310.
- Vincent, J.L. and Brewin, N.J. (2000). Immunolocalization of a cysteine protease in vacuoles, vesicles, and symbiosomes of pea nodule cells. *Plant Physiology* 123: 521–530.

- Vincent, J.L., Knox, M.R., Ellis, T.N. et al. (2000). Nodule-expressed *Cyp15a* cysteine protease genes map to syntenic genome regions in *Pisum* and *Medicago* spp. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13: 715–723.
- Wager, A. and Browse, J. (2012). Social network: JAZ protein interactions expand our knowledge of jasmonate signaling. *Frontiers in Plant Science* 3: 41.
- van Wyk, S.G., Du Plessis, M., Cullis, C.A. et al. (2014). Cysteine protease and cystatin expression and activity during soybean nodule development and senescence. *BMC Plant Biology* 14: 294.
- Xia, Y., Suzuki, H., Borevitz, J. et al. (2004). An extracellular aspartic protease functions in *Arabidopsis* disease resistance signaling. *The EMBO Journal* 23: 980–988.
- Yuan, S., Li, R., Wang, L. et al. (2016). Search for nodulation and nodule development-related cystatin genes in the genome of soybean (*Glycine max*). *Frontiers in Plant Science* 7.
- Zhang, B., Tremousaygue, D., Denance, N. et al. (2014a). PIRIN2 stabilizes cysteine protease XCP2 and increases susceptibility to the vascular pathogen *Ralstonia solanacearum* in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 79: 1009–1019.
- Zhang, D., Liu, D., Lv, X. et al. (2014b). The cysteine protease CEP1, a key executor involved in tapetal programmed cell death, regulates pollen development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 26: 2939–2961.
- Zhao, P., Zhou, X.M., Zhang, L.Y. et al. (2013). A bipartite molecular module controls cell death activation in the basal cell lineage of plant embryos. *PLoS Biology* 11: e1001655.