



HAL
open science

Rôle des catalases bactériennes et de l'H₂O₂ dans l'établissement et le maintien de la symbiose entre *Sinorhizobium meliloti* et *Medicago*

Alexandre Jamet

► **To cite this version:**

Alexandre Jamet. Rôle des catalases bactériennes et de l'H₂O₂ dans l'établissement et le maintien de la symbiose entre *Sinorhizobium meliloti* et *Medicago*. Sciences du Vivant [q-bio]. Université de Nice Sophia Antipolis, 2004. Français. NNT: . tel-04725652

HAL Id: tel-04725652

<https://theses.hal.science/tel-04725652v1>

Submitted on 11 Oct 2024

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.



Distributed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License

UNIVERSITE DE NICE-SOPHIA ANTIPOLIS – UNSA
FACULTE DES SCIENCES

UMR Interactions Plantes-Micro-organismes et Santé Végétale (IPMSV)
INRA (1064) - UNSA - CNRS (6192)

THESE

présentée pour obtenir le titre de
Docteur en Sciences

par

Alexandre JAMET

Rôle des catalases bactériennes et de l'H₂O₂ dans l'établissement et le maintien de la symbiose entre *Sinorhizobium meliloti* et *Medicago*

Soutenue le 8 octobre 2004
Devant le jury composé de :

F. Cuzin	Professeur, Université de Nice-Sophia Antipolis	Président
M. Holsters	Professeur, Université de Gand, Belgique	Rapporteur
N. J. Brewin	Professeur, John Innes Centre, Norwich, GB	Rapporteur
J. Batut	Directeur de Recherche CNRS, Castanet-Tolosan	Examineur
D. Touati	Directeur de Recherche CNRS, Jussieu, Paris	Membre invité
D. Hérouart	Professeur, Université de Nice-Sophia Antipolis	Directeur de thèse

Dans la salle de séminaire du Centre Agrobiotech à 14h00

SOMMAIRE:

INTRODUCTION	4
1. SINORHIZOBIUM MELILOTI, UNE BACTÉRIE SYMBIOTIQUE	5
1.1. Caractéristiques phylogénétiques et génétiques de <i>Sinorhizobium meliloti</i>	5
1.1.1. α -protéobactéries et interactions avec des partenaires eucaryotes	5
1.1.2. <i>Sinorhizobium meliloti</i>	6
1.2. L'établissement de la symbiose	8
1.2.1. La reconnaissance des partenaires symbiotiques	8
1.2.2. Le processus d'infection	11
1.2.3. La fixation de l'azote et sa régulation	14
1.2.4. Sénescence et réinfection saprophytique	16
1.2.5. L'organisation de la nodosité	17
2. LES ESPÈCES RÉACTIVES DE L'OXYGÈNE ET LES SYSTÈMES DE PROTECTION BACTÉRIENS	19
2.1. Les espèces réactives de l'oxygène	19
2.1.1. Chimie des espèces réactives de l'oxygène	19
2.1.2. Formation des ERO chez les bactéries	20
2.2. Les dommages générés par un stress oxydatif	23
2.2.1. Les dommages générés par l' $O_2^{\bullet-}$	23
2.2.2. Les dommages générés par l' H_2O_2	25
2.3. Les systèmes bactériens de réparation et de protection	27
2.3.1. Les systèmes de réparation bactériens	27
2.3.1.1. Les systèmes de réparation de l'ADN	27
2.3.1.2. Les systèmes de réparation des protéines	27
2.3.2. Les systèmes de protection bactériens	28
2.3.2.1. Détoxification enzymatique de l' $O_2^{\bullet-}$	28
2.3.2.2. Détoxification enzymatique de l' H_2O_2	29
2.3.2.3. Les composés antioxydants	30
2.3.3. La régulation de la défense antioxydante chez les bactéries	32
3. LES ESPÈCES RÉACTIVES DE L'OXYGÈNE DANS LES INTERACTIONS PLANTES-BACTÉRIES	36
3.1. Implication des ERO dans les interactions plantes-pathogènes	36
3.1.1. Le « Cross-link » des parois végétales	36
3.1.2. L'induction de la mort cellulaire programmée et des gènes de défense	37
3.2. Les ERO dans les symbioses <i>Rhizobium</i>-légumineuses	38
3.2.1. Les ERO dans la mise en place de la symbiose	38
3.2.1.1. Les ERO dans l'initiation du cordon d'infection	39
3.2.1.2. La progression du cordon d'infection	40

3.2.2. Les ERO et la fixation d'azote	41
3.2.2.1. La respiration des bactéroïdes	41
3.2.2.2. La leghémoglobine	41
3.2.3. Les ERO dans la sénescence de la nodosité	42
3.3. La défense antioxydante de <i>Sinorhizobium meliloti</i>	43
3.3.1. Superoxyde dismutases	43
3.3.2. Catalases	44
4. BUT DU TRAVAIL	45
RÉSULTATS	47
1. CHAPITRE 1 : IMPLICATION DES CATALASES DE <i>S. MELILOTI</i> DANS LA SYMBIOSE.	49
Article	53
2. CHAPITRE 2 : RÔLE DU RÉGULATEUR OXYR CHEZ <i>SINORHIZOBIUM MELILOTI</i>.	64
Article	67
3. CHAPITRE 3 : RÔLE DE L'H₂O₂ LORS DE L'ÉTABLISSEMENT DE LA SYMBIOSE.	88
3.1. Introduction	88
3.2. Résultats	88
CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	102
MATÉRIELS ET MÉTHODES	115
1. MATÉRIEL BIOLOGIQUE ET CONDITIONS DE CULTURE	116
1.1. Matériel bactérien, plasmides et conditions de culture	116
1.2. Matériel végétal et conditions de culture	116
2. MÉTHODES DE GÉNÉTIQUE BACTÉRIENNE	117
2.1. Transfert d'ADN entre souches par conjugaison	117
2.2. Transformation bactérienne	118
2.2.1. Préparation de cellules compétentes	118
2.2.2. Transformation de cellules compétentes	119

2.3. Transduction généralisée	119
3. MÉTHODES DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE.....	119
3.1. Extraction et purification des acides nucléiques	119
3.1.1. Préparation d'ADN génomique de <i>S. meliloti</i>	119
3.1.2. Préparation d'ADN plasmidique d' <i>E. coli</i>	120
3.1.3. Préparation d'ARN de <i>S. meliloti</i>	120
3.2. Techniques de transferts et d'hybridations	120
3.2.1. Hybridation ADN-ADN	120
3.2.2. Hybridation ADN-ARN	121
3.3. Extension d'amorce et séquençage d'ADN	121
3.3.1. Extension d'amorce.....	121
3.3.2. Séquençage manuel d'ADN	122
4. MÉTHODES DE BIOCHIMIE	123
4.1. Mise en évidence et dosage d'activités enzymatiques	123
4.1.1. Activités catalasiques	123
4.1.1.1. Visualisation des activités catalasiques.....	123
4.1.1.2. Dosage de l'activité catalasique totale	124
4.1.2. Activités β -galactosidase et β -glucuronidase	124
4.1.3. Activité de réduction de l'acétylène.....	124
4.2. Dosage de l'H_2O_2	125
5. TECHNIQUES DE CYTOLOGIE	125
5.1. Localisation des activités β-galactosidase et β-glucuronidase.....	125
5.1.1. Préparation des tissus	125
5.1.2. Détection des activités.....	126
5.2. Localisation de l'H_2O_2 dans les nodosités	126
5.2.1. Préparation des nodosités	126
5.2.2. Détection de l' H_2O_2	127
ANNEXES.....	128
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	157

INTRODUCTION

INTRODUCTION

1. *SINORHIZOBIUM MELILOTI*, UNE BACTERIE SYMBIOTIQUE

1.1. Caractéristiques phylogénétiques et génétiques de *Sinorhizobium meliloti*

1.1.1. α -protéobactéries et interactions avec des partenaires eucaryotes

Sinorhizobium meliloti est une bactérie à Gram négatif, de la subdivision α des protéobactéries (Figure 1). Les interactions entre des α -protéobactéries et des partenaires eucaryotes sont variées et remontent à au moins 1,5 milliards d'années. En effet, la subdivision α des protéobactéries comporte plusieurs Ordres parmi lesquels les Rickettsiales et les Rhizobiales.

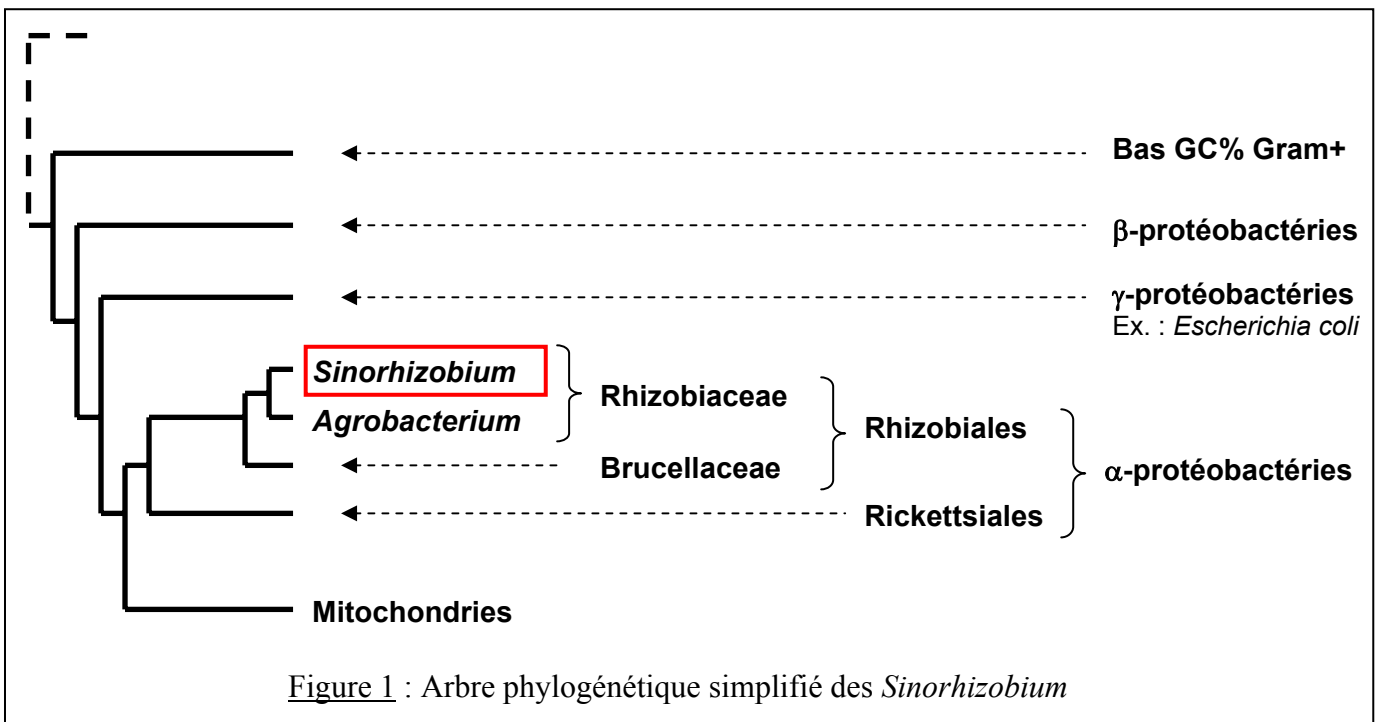


Figure 1 : Arbre phylogénétique simplifié des *Sinorhizobium*

Les Rickettsiales sont des parasites et des endosymbiontes intracellulaires obligatoires qui rentrent dans la cellule hôte par phagocytose. La comparaison de la séquence des génomes bactériens connus, à celle de génomes mitochondriaux (ou de gènes codés par le noyau mais dont les produits sont adressés à la mitochondrie) montre que les mitochondries et *Rickettsia prowazekii*, dérivent d'un ancêtre commun (Andersson *et al.*, 1998 ; Kurland et Andersson, 2000). L'endosymbiose initiale d'une proto-mitochondrie aurait permis à la cellule hôte, initialement anaérobie obligatoire, de survivre dans un milieu riche en oxygène.

Les rhizobiales, qu'on nomme aussi les rhizobacteria, établissent des relations étroites avec des partenaires eucaryotes, relations qui peuvent être pathogènes ou symbiotiques selon les Ordres ou les espèces. Ainsi, parmi les rhizobiales, les *Brucellaceae* comme *Brucella suis* (Paulsen *et al.*, 2002) sont des pathogènes de cellules animales alors que les *Rhizobiaceae* n'interagissent qu'avec des cellules végétales. Parmi les *Rhizobiaceae*, les *Agrobacterium* sont des pathogènes de plantes qui induisent la formation de galles et les *Sinorhizobium* établissent des relations symbiotiques avec les cellules de racines de *Fabaceae*.

Même si les endosymbioses ayant abouties à la mitochondrie et au plaste ont été les plus importantes au cours de l'évolution des eucaryotes, d'autres endosymbioses se poursuivent actuellement et continuent de permettre des adaptations environnementales supplémentaires. Ainsi, la symbiose de *Sinorhizobium meliloti* au niveau des racines de *Medicago* (comme la luzerne) confère à la plante l'autotrophie vis-à-vis de l'azote grâce à la fixation de l'azote atmosphérique par les bactéries. En échange, la plante fournit à la bactérie, les molécules carbonées issues de la photosynthèse et nécessaires à leur survie.

1.1.2. *Sinorhizobium meliloti*

Sinorhizobium meliloti est une bactérie du sol vivant dans la rhizosphère de plantes de la famille des *Fabaceae* avec lesquelles elle est capable d'établir une association symbiotique. Ces plantes sont de la famille de la luzerne (*Medicago sp.* et *Melilotus sp.*). Cette association se traduit par la formation de nodosités racinaires. Ces nouveaux organes de la plante hébergent les bactéries qui, en symbiose, sont capables de fixer l'azote atmosphérique en le convertissant en ammonium assimilable par la plante. En échange, la plante fournit aux bactéries une source de carbone sous formes d'acides dicarboxyliques. Notons également l'importance du transport des acides aminés entre la plante et la bactérie (Lodwig *et al.*, 2003).

S. meliloti est un microorganisme chimioorganotrophe capable d'utiliser une grande variété de sucre et d'acides carboxyliques comme sources d'énergie. Sa température optimale de croissance varie entre 25 et 30°C. Son pH optimal de croissance est compris entre 6 et 7. Alors que la bactérie est capable de croître à des pH alcalins (9,5), les pH acides (<5) inhibent sa croissance. Aérobie stricte, *S. meliloti* ne peut utiliser que l'oxygène comme accepteur final d'électrons lors de la respiration.

S. meliloti est un des microorganismes symbiotiques fixateurs d'azote modèle dont le génome a entièrement été séquencé. Son génome a une taille de 6,7 mégabases (Mb) (Galibert *et al.*, 2001). Il est constitué de trois réplicons comprenant un chromosome de 3,65 Mb (Capela *et al.*, 2001), et deux mégaplasmides, nommés pSymA (Barnett *et al.*, 2001) et pSymB (Finan *et al.*, 2001) dont la taille est de 1,36 et 1,68 Mb respectivement. Le génome complet contient 6204 cadres ouverts de lecture, représentant autant de gènes potentiels.

pSymA et pSymB ont probablement une origine exogène. L'origine de pSymA est sans doute plus récente que celle de pSymB. En effet, pSymA porte les gènes de transfert *traABDG* et une séquence *oriT* alors que pSymB ne porte que des paralogues de *traA* et de *oriT*. De plus, le G+C % de pSymA (60,4%) est plus faible que celui du chromosome (62,7%) et de pSymB (62,4%) ce qui va dans le sens de cette hypothèse. Notons que les gènes *traIRMBF* et *trbDJLKFH* présents sur les plasmides d'autres *Rhizobia* sont absents de pSymA et de pSymB.

Ces mégaplasmides contiennent des gènes fondamentaux pour la survie de la bactérie dans son environnement. Ainsi, pSymB porte de nombreux gènes impliqués dans l'établissement de la symbiose (Becker *et al.*, 2004) et une souche curée de ce mégaplasmide n'est pas viable. En revanche, une souche 2011 de *S. meliloti* curée de son mégaplasmide pSymA demeure viable malgré de nombreuses auxotrophies (Oresnik *et al.*, 2000). Une étude protéomique comparative de la souche sauvage 2011 et de la souche 2011 curée de son mégaplasmide pSymA montre que des gènes portés par ce réplicon ont un rôle dans la régulation de l'expression de certains gènes présents sur les autres réplicons, (Chen *et al.*, 2000). Ainsi, des interactions complexes se sont établies entre pSymA et les autres réplicons.

1.2. L'établissement de la symbiose

1.2.1. La reconnaissance des partenaires symbiotiques

La mise en place de la symbiose nécessite l'échange de signaux entre les deux partenaires symbiotiques. Les plantes rejettent d'importantes quantités de matière organique dans le sol ; 19% des photosynthétats produits par la plante sont libérés dans la rhizosphère (Helal et Sauerbeck, 1989). Parmi ces composés carbonés exsudés par la plante, les flavonoïdes (dérivés de 2-phenyl-1,4-benzopyrone) sont les plus importants dans le déclenchement de l'expression des gènes bactériens indispensables à la mise en place de la symbiose, à savoir les gènes *nod*, *nol*, et *noe* (Figure 2).

La régulation de l'expression des gènes *nod* varie d'une espèce à l'autre mais se fait toujours grâce au(x) régulateur(s) NodD. Ce régulateur transcriptionnel de type LysR peut se lier à des régions hautement conservées de 47 pb de l'ADN, les boîtes *nod*, que l'on retrouve dans les régions promotrices de nombreux gènes comme, par exemple, les gènes de synthèse des facteurs Nod ou les gènes *noeAB* responsables de la spécificité d'hôte (Rostas *et al.*, 1986). Bien que NodD puisse se lier aux boîtes *nod* sans inducteur, les flavonoïdes sont indispensables à l'expression des gènes *nod*. Ainsi, NodD est à la fois le senseur des flavonoïdes et l'activateur transcriptionnel des gènes *nod* (Schlaman *et al.*, 1992). Le nombre de copies du gène *nodD* est variable d'une espèce bactérienne à l'autre. Ainsi, alors que *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* n'a qu'un gène *nodD*, *S. meliloti* possède 4 gènes régulateurs, *nodD*₁/*D*₂/*D*₃ (Honma et Ausubel, 1987) et *syrM* (Barnett et Long, 1990).

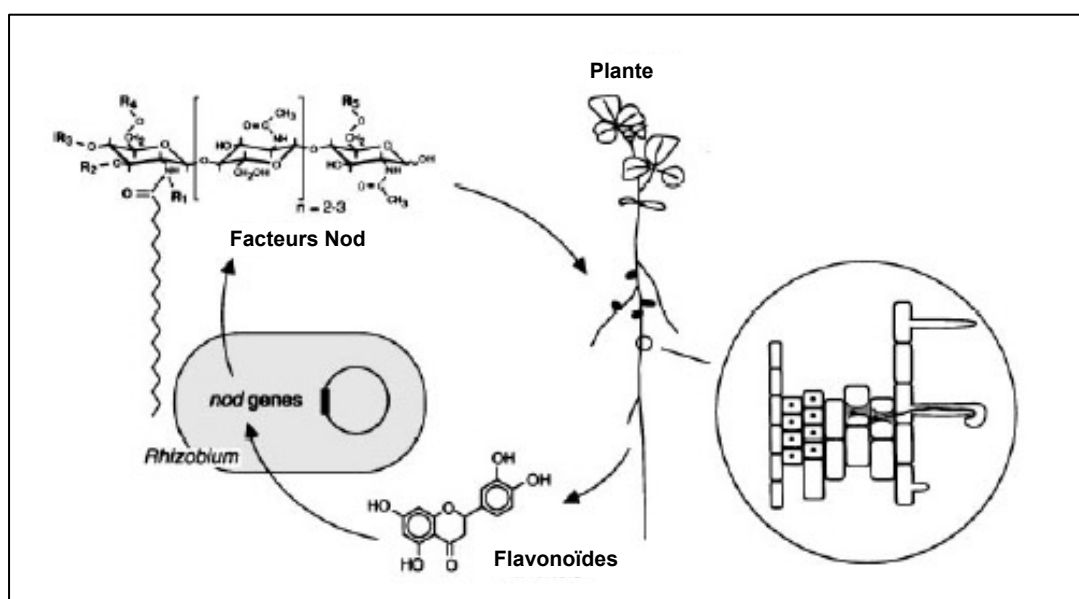


Figure 2 : Les premiers échanges intervenant dans le dialogue moléculaire plante-bactérie

L'expression des gènes *nod* est également régulée négativement. Nécessaire à une nodulation optimale de *Medicago sativa* par *S. meliloti* (Kondorosi *et al.*, 1989), cette répression est sous le contrôle du régulateur NoIR (Kondorosi *et al.*, 1991) qui est également un membre de la famille des régulateurs de type LysR. En liant des régions conservées de l'ADN, NoIR réprime non seulement la transcription des gènes *nodD* mais aussi celle des gènes *nodABC* impliqués dans la synthèse des facteurs Nod (Cren *et al.*, 1995). Notons que la souche Rm1021 dont le génome a été séquencé, est un mutant NoIR⁻. Cette mutation est due à une insertion ponctuelle dans la partie C-terminale de sa séquence empêchant sa liaison à l'ADN (Cren *et al.*, 1994).

En réponse aux inducteurs végétaux comme les flavonoïdes, les bactéries synthétisent et sécrètent des lipochitoooligosaccharides (LCOs) appelés facteurs Nod (Figures 2 et 3). On distingue deux grandes familles de gènes responsables de la synthèse des facteurs Nod. Les gènes *nodABC* responsables de la synthèse du squelette lipochitoooligosaccharidique, constitué par l'enchaînement d'unité N-acétyl-glucosamines acylées et les gènes responsables des décorations des facteurs Nod (pour revue : (Perret *et al.*, 2000)). Ces gènes confèrent aux facteurs Nod leur spécificité d'hôte.

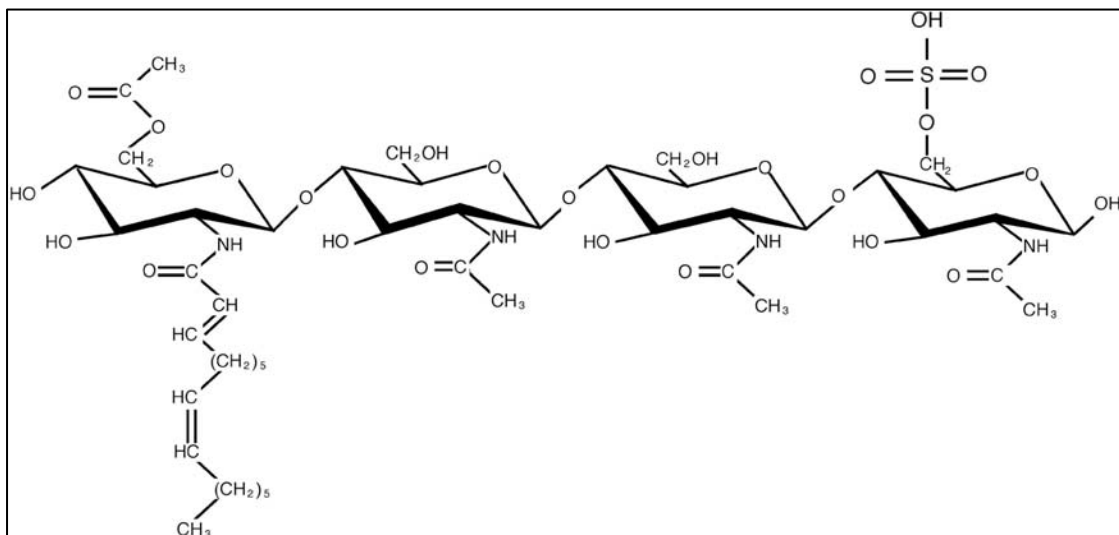


Figure 3 : Structure des facteurs de nodulation de *S. meliloti* (Lerouge *et al.*, 1990)

A des concentrations variant du pico- au micro-molaire, ces molécules sont capables d'induire de nombreuses réponses indispensables à l'organogenèse de la nodosité et à l'accueil des bactéries telles qu'un rapide influx de calcium, des changements morphologiques

au niveau des cellules épidermiques et des cellules corticales racinaires, ainsi que l'expression de gènes spécifiques de la nodosité, appelés nodulines (Geurts et Bisseling, 2002).

Les facteurs Nod sont perçus *via* NFR1 et NFR5, deux récepteurs transmembranaires de la famille des récepteurs sérine/thréonine kinase (Figure 4) dont les régions extracellulaires contiennent des domaines LysM probablement impliqués dans la reconnaissance de ces composés (Madsen *et al.*, 2003 ; Radutoiu *et al.*, 2003). Les facteurs Nod vont induire une voie de signalisation qui fait intervenir des oscillations calciques au niveau des poils absorbants. DMI1 code pour une protéine répandue chez les végétaux et indispensable à la génération de cette réponse calcique (Ané *et al.*, 2004). DMI3 code pour une calmoduline qui pourrait discriminer entre des signaux calciques d'origine bactérienne ou fongique et activer en conséquence la voie de signalisation conduisant à la nodulation ou la mycorhization (Figure 4) (Lévy *et al.*, 2004).

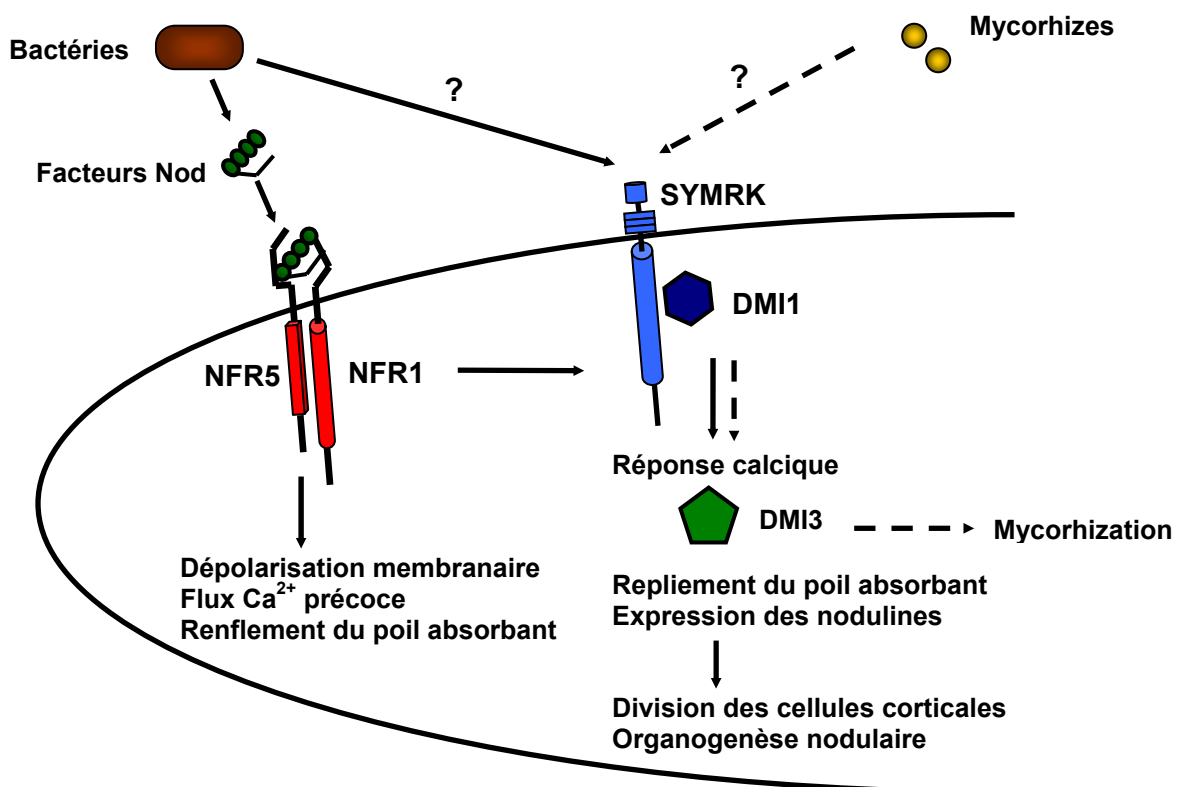


Figure 4 : Modèle de perception et de transduction du signal des facteurs Nod d'après (Cullimore et Dénarié, 2003).

1.2.2. Le processus d'infection

La pré-infection : En prélude à l'infection, les bactéries s'accumulent à la surface des racines (Dazzo *et al.*, 1984) sous la forme de biofilms qui sont constitués de nombreuses bactéries au sein d'une matrice cellulosique. Ils se forment sur une surface solide et peuvent résister à de nombreux stress. Ces bactéries interagissent entre elles par des systèmes de « quorum-sensing » (Gonzalez et Marketon, 2003) utilisant entre autres comme molécule signal l'homosérine lactone. Le « quorum-sensing » permet de coordonner le développement et le métabolisme bactérien lors de l'établissement de la symbiose et contrôle, par exemple chez *S. meliloti*, la production d'exopolysaccharides indispensables à l'interaction symbiotique (Marketon *et al.*, 2003). Les bactéries interagissent avec l'extrémité des poils absorbants grâce en particulier à des lectines. Cette interaction *via* les exopolysaccharides bactériens serait importante dans la reconnaissance de la bactérie et interviendrait, comme les décorations des facteurs Nod, dans la spécificité d'hôte (Hirsch, 1999 ; van Rhijn *et al.*, 1998).

L'initiation du cordon d'infection : Avec l'initiation d'un primordium nodulaire, la courbure des poils absorbants racinaires, appelée « crosse de berger », est l'événement le plus marquant dû aux seuls facteurs Nod. Cette courbure allant jusqu'à 360 degrés est le résultat d'une reprise de la croissance des poils absorbants qui se réorientent vers le point d'attachement des bactéries d'où sont émis les facteurs Nod (Esseling *et al.*, 2003). Elle aboutit à l'emprisonnement d'un petit nombre de ces bactéries dans un repli du poil absorbant. A cette étape, les bactéries enfermées dans une « poche d'infection » seraient relativement séparées du milieu extérieur (Geurts *et al.*, 2003) et des interactions de type quorum-sensing pourraient intervenir au sein de la microcolonie ainsi isolée. L'initiation proprement dite du cordon d'infection se fait par hydrolyse de la paroi végétale par les bactéries (van Spronsen *et al.*, 1996). La membrane plasmique végétale s'invagine, le cytosquelette se réarrange (Timmers *et al.*, 1999), et la paroi végétale se reforme autour de cette invagination à mesure que les bactéries progressent créant une structure tubulaire, le cordon d'infection, autour des bactéries.

Structure et progression du cordon d'infection : La structure du cordon d'infection (Figure 5) est très proche de celle d'une paroi primaire de cellule végétale et constitue donc une continuité apoplastique. Comme une paroi végétale, le cordon d'infection est constitué

majoritairement de pectine et de cellulose, qui semble confinée aux zones pariétales des cordons. Au centre du cordon d'infection, les bactéries se trouvent dans une matrice extracellulaire glycoprotéique de composition proche de celle de l'espace intercellulaire des tissus racinaires (VandenBosch *et al.*, 1989).

La progression des cordons d'infection se fait par ajout de matériel à l'apex de celui-ci (Rae *et al.*, 1992) grâce aux systèmes d'exocytose de la cellule végétale. Les bactéries se divisent à mesure que le cordon progresse et le dialogue moléculaire entre la plante et les bactéries est permanent. L'utilisation de bactéries exprimant constitutivement une Gfp sous le contrôle d'un promoteur fort a permis de montrer que seules les bactéries situées à l'apex du cordon d'infection se divisent (Gage *et al.*, 1996). En utilisant deux populations de *S. meliloti* produisant des protéines fluorescentes dans des zones différentes du spectre (Gfp : vert ou DsRed : rouge), il a été montré que la zone permettant la progression du cordon ne s'étendrait que sur 60 μm (Gage, 2002) et que sa vitesse de progression serait de 10 $\mu\text{m}/\text{heure}$, ce qui correspondrait à un temps de génération de 4-5 heures à l'extrémité des cordons. Une étude récente indique que seules les bactéries situées dans les 10 premiers micromètres des cordons d'infection se trouveraient en phase exponentielle de croissance (Smit *et al.*, 2004). Les autres bactéries se trouveraient en phase stationnaire de croissance. Compte tenu des dimensions des bactéries et des cordons d'infection, 100 à 150 bactéries seraient suffisantes à la propagation d'un cordon d'infection (Brewin, 2004).

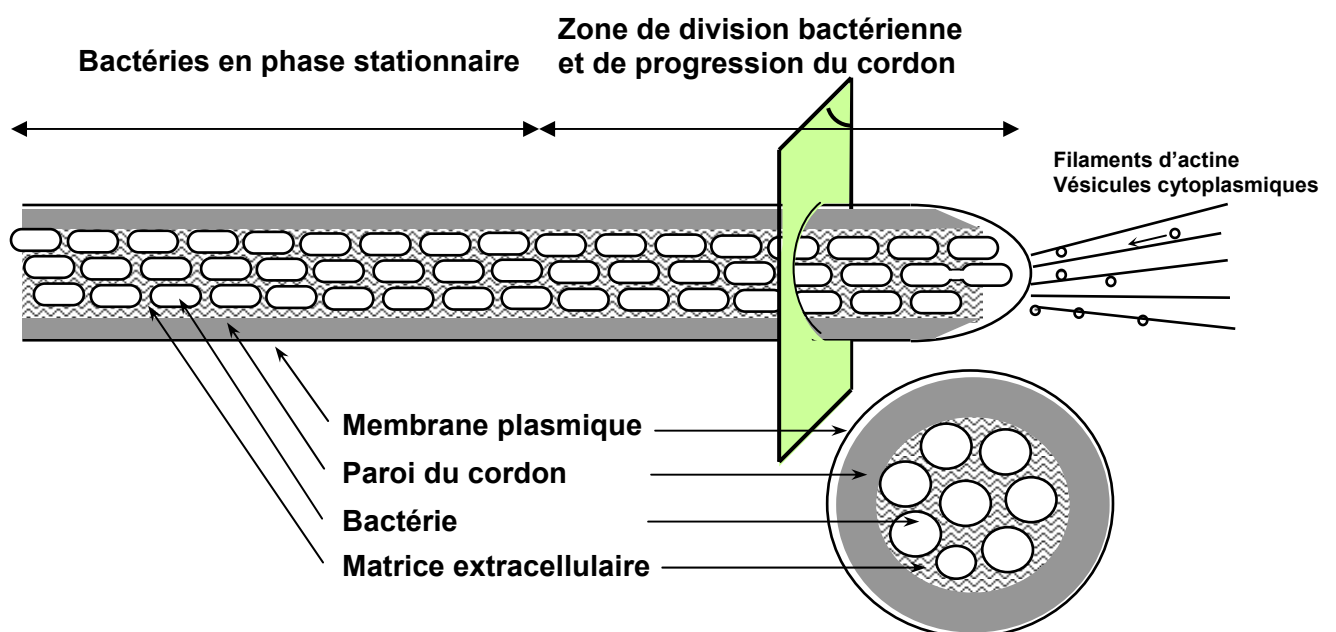


Figure 5 : Représentation schématique de coupes longitudinale et transversale d'un cordon d'infection (d'après Brewin, 2004).

Dans le cordon d'infection, les bactéries sont entourées par une capsule polysaccharidique (Rathbun *et al.*, 2002). Parmi ces polysaccharides, on trouve les lipopolysaccharides (LPS) liés à la membrane externe de la cellule, l'antigène K (KPS) associé à la surface de la bactérie et les exopolysaccharides (EPS) faiblement attachés à leur surface et sécrétés dans le milieu. Chez *S. meliloti*, les exopolysaccharides sont indispensables à l'initiation et la progression du cordon d'infection (Pellock *et al.*, 2000). Le succinoglycane (EPS I) est nécessaire à l'initiation et l'élongation des cordons d'infection (Cheng et Walker, 1998). Le galactoglucane (EPS II) et l'antigène K semblent moins importants que le succinoglycane dans la formation des cordons d'infection, mais des mutants de ces types de polysaccharides engendrent la formation de cordons à morphologie aberrante. Les lipopolysaccharides semblent avoir un rôle important dans l'élongation des cordons d'infection et dans la survie des bactéroïdes (Campbell *et al.*, 2002). Des LPS de *S. meliloti* sont capables d'inhiber la bouffée oxydante observée dans la réaction de défense d'une culture cellulaire de *Medicago sativa* (Albus *et al.*, 2001). Ainsi, les auteurs suggèrent que les LPS relargués par la bactérie puissent fonctionner comme un signal induisant l'interaction symbiotique et supprimant la réponse de défense chez la plante hôte (Campbell *et al.*, 2003). La bactérie serait ainsi reconnue par la plante comme non pathogène. Récemment, il a été montré que les exopolysaccharides de surface auraient également un rôle de barrière physique contre les ERO dans l'interaction *Azorhizobium caulinodans*-*Sesbania rostrata* (D'Haese *et al.*, 2004).

Invasion du primordium nodulaire et différenciation : Les bactéries sont relarguées lorsque les cordons d'infection atteignent le primordium nodulaire. Elles pénètrent les cellules par invagination de la membrane plasmique, et sont donc entourées d'une membrane d'origine végétale appelée membrane pér bactéroïdienne (PBM). Ce relargage implique que les bactéries soient au contact de la membrane plasmique végétale et ne peut donc se faire qu'à l'extrémité des cordons d'infection où la paroi n'est pas encore présente ou bien de façon latérale par rapport au cordon au niveau de zones d'amincissement de la paroi. A partir du moment où les bactéries sont libérées, on parle de « bactéroïdes » et l'ensemble bactéroïde-PBM est appelé « symbiosome ». Le symbiosome est considéré par certains auteurs comme un nouvel organite de la cellule végétale (Brewin, 2003).

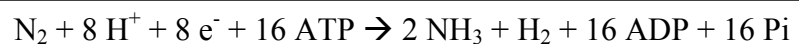
Les jeunes bactéroïdes non fixateurs vont alors se différencier en bactéroïdes fixateurs, véritables usines à fixer l'azote présentant des caractéristiques très différentes de celles des bactéries libres. Cette différenciation se fait en plusieurs étapes (Truchet *et al.*, 1980). Les

bactéroïdes de type 1 correspondent aux bactéries qui viennent d'être relarguées ; ils sont très proches des bactéries présentes dans les cordons d'infection, se multiplient et présentent une membrane pér bactéroïdienne qui subit de profondes modifications par fusion de vésicules Golgiennes. Puis, les bactéroïdes de type 1 stoppent leurs divisions et commencent à s'allonger, on parle alors de bactéroïdes de type 2. Les bactéroïdes de type 3 sont de forme très allongée avec un cytoplasme très hétérogène et sont uniquement présents dans l'interzone II-III de la nodosité (voir partie 1.2.5.). La différenciation se poursuit en bactéroïdes de type 4, caractérisés par une forte hétérogénéité cytoplasmique qui leur donne un aspect « code barre » en microscopie électronique, ce sont les bactéroïdes fixateurs d'azote. Ces bactéroïdes vont ensuite se différencier en bactéroïdes de type 5 qui cessent de fixer l'azote et présentent un cytoplasme très homogène. C'est l'étape ultime de différenciation avant la sénescence (voir partie 1.2.4.).

La différenciation bactérie-bactéroïde fait sans doute intervenir de nombreux signaux moléculaires. Des études protéomiques (Djordjevic *et al.*, 2003) et génomiques (Ampe *et al.*, 2003 ; Becker *et al.*, 2004) mettent en évidence un métabolisme et une expression de gènes profondément modifiés chez le bactéroïde par rapport à la bactérie libre. De nombreux stress environnementaux pourraient être impliqués dans la différenciation bactérie-bactéroïde.

1.2.3. La fixation de l'azote et sa régulation

Le bactéroïde de type 4 est capable de réduire l'azote atmosphérique en ammonium grâce à un complexe enzymatique très conservé (Ruvkun et Ausubel, 1980) présent chez tous les diazotrophes, la nitrogénase (Peters *et al.*, 1995). La nitrogénase catalyse la réaction suivante :



Ce complexe est formé de deux composants. Le composant I ou dinitrogénase contenant un cofacteur Fer-Molybdène (Fe-Mo). C'est un hétérotétramère de type $\alpha_2\beta_2$ qui porte le site catalytique de réduction de l'azote. Le composant II ou dinitrogénase réductase est un homodimère qui transfère les électrons au composant I en consommant 2 molécules d'ATP par électron transféré. Les gènes *nifHDK* codent respectivement le composant II et les sous unités α et β du composant I (Ruvkun *et al.*, 1982).

De nombreux autres gènes sont impliqués dans la fixation d'azote. Les gènes *nifE*, *nifN* et *nifB* sont nécessaires à la synthèse et à la maturation du cofacteur Fe-Mo. L'opéron *fixABCX* code un système de donneur d'électrons à la nitrogénase. L'opéron *fixNOQP* code des protéines constituant une chaîne respiratoire de substitution opérant dans des conditions de microoxie nécessaires au fonctionnement de la nitrogénase.

En effet, la nitrogénase est extrêmement sensible à l'oxygène, l'hétérotétramère étant irréversiblement dénaturé par ce gaz (Shaw et Brill, 1977). Paradoxalement, comme le montre la réaction globale de la fixation d'azote, la réduction d'une molécule de N₂ nécessite 16 molécules d'ATP et est donc extrêmement coûteuse en énergie. Le catabolisme des acides dicarboxyliques d'origine végétale par le bactéroïde permet la production de cet ATP. Celui-ci est obtenu par un processus de phosphorylation oxydative qui ne peut utiliser que l'oxygène comme accepteur terminal d'électrons, les *Rhizobia* étant des bactéries aérobies strictes. Pour résoudre ce problème, la nodosité possède des systèmes lui permettant d'assurer un important flux en oxygène aux bactéroïdes tout en maintenant une concentration en oxygène libre faible et compatible avec le fonctionnement de la nitrogénase. Ainsi, grâce à des barrières de diffusion (en particulier au niveau du cortex nodositaire) et à la leghémoglobine (Lb), une hémoprotéine d'origine végétale capable de complexer l'oxygène avec une très haute affinité (Appleby, 1984), la concentration en oxygène libre est de l'ordre de 10-30 nM dans la nodosité alors que celle de l'oxygène lié à la Lb est de l'ordre de 100 µM. La chaîne respiratoire (FixNOPQ) à haute affinité (K_m = 7nM) pour l'oxygène permet la respiration des bactéroïdes dans cet environnement à faible teneur en oxygène.

Les gènes *fixLJ* codent des protéines régulatrices appartenant à la famille des régulateurs à deux composants (David *et al.*, 1988). Ces régulateurs sont responsables du contrôle de l'expression de l'ensemble des gènes *fix* et *nif* via l'induction en microaérobie de l'expression des gènes des régulateurs NifA et FixK (Figure 6). FixL est capable de s'autophosphoryler à partir de l'ATP lorsque la pression partielle en oxygène diminue (Lois *et al.*, 1993). La forme phosphorylée de FixL transfère son phosphate à la protéine FixJ stimulant ainsi sa fixation aux promoteurs des gènes *nifA* et *fixK* (Hertig *et al.*, 1989).

FixK est un régulateur de la famille des régulateurs Fnr/Crp (Batut *et al.*, 1989) ; il régule positivement les opérons *fixNOPQ* et *fixGHIS* et négativement sa propre expression et celle de *nifA* via l'activation de la transcription du gène codant le régulateur FixT (Foussard *et al.*, 1997). FixT est un inhibiteur de l'autophosphorylation de FixL (Garnerone *et al.*, 1999). L'ensemble des gènes régulés par FixK possède une séquence consensus ou « boîte fnr » (5' TTGA-(N₆)-TCAA 3') située à 45 pb. du point d'initiation de la transcription de ces gènes.

Récemment, on dénombrait trois homologues de FixK dans le génome de *S. meliloti* (Barnett *et al.*, 2001).

NifA régule les gènes *nifN*, *nifHDKE*, *nifB* et *fixABCX* en association avec un facteur de transcription auxiliaire, le facteur sigma 54 appelé aussi RpoN (Buck et Cannon, 1992). Les promoteurs de ces gènes possèdent une séquence de liaison au facteur sigma en position -24/-12 qui présente la séquence consensus 5' CTGGCAC-(N₅)-TTGCA 3' (Kustu *et al.*, 1989) et une séquence de liaison à NifA 5' TGT-(N₁₀)-ACA 3'. Le régulateur NifA est inactivé par l'oxygène (Beynon *et al.*, 1988).

Enfin, on peut noter qu'une glutamine-amidotransférase, codée par le gène *asnO*, pourrait moduler l'activité de FixT (Bergès *et al.*, 2001).

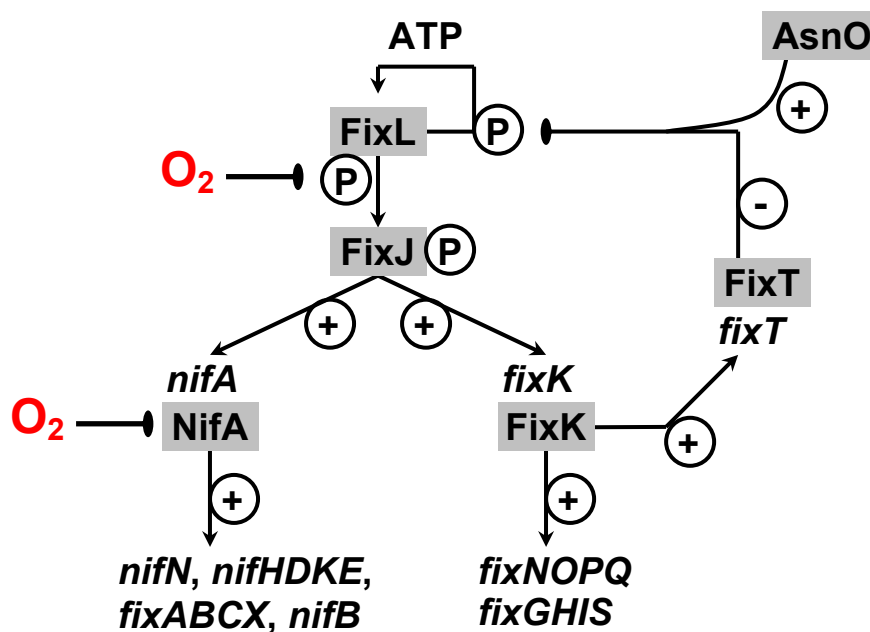


Figure 6 : Modèle de régulation des gènes de fixation d'azote chez *S. meliloti* (d'après Bergès *et al.*, 2001).

1.2.4. Sénescence et réinfection saprophytique

Pour des raisons indéterminées, les bactéroïdes cessent de fixer l'azote et dégèrent. Cette étape est appelée la sénescence. Des bactéries provenant de cordons d'infection persistants sont relarguées après la sénescence des bactéroïdes et seraient à l'origine de la pérennité de l'espèce (Paau *et al.*, 1980). En effet, les bactéroïdes de *S. meliloti* ne seraient pas capables de se redifférencier en bactéries. Les bactéries une fois relarguées se multiplieraient

en utilisant de façon saprophytique les produits de dégradation des bactéroïdes (Timmers *et al.*, 2000).

1.2.5. L'organisation de la nodosité

Le résultat de ces processus de reconnaissance et d'infection entre les bactéries fixatrices et la plante hôte aboutissent à l'apparition d'un nouvel organe racinaire spécialisé dans la fixation de l'azote : la nodosité. Cet organe, pour assurer sa croissance, possède un méristème. Lorsque le méristème ne persiste pas, on parle de nodosité à croissance déterminée, c'est le cas chez *Glycine max* (le soja). Dans le cas de la symbiose *S. meliloti-Medicago*, le méristème est persistant et assure une croissance continue de l'organe. De forme allongée, ces nodosités sont dites à croissance indéterminée. La persistance de l'activité méristématique dans la partie apicale de la nodosité et l'existence d'un programme de différenciation des bactéries en bactéroïdes fixateurs puis sénescents se traduisent par l'organisation de la nodosité en une succession de zones. La zone la plus jeune se trouvant dans la partie distale (éloignée de la racine) et la plus âgée dans la partie proximale (Figure 7) (Vasse *et al.*, 1990).

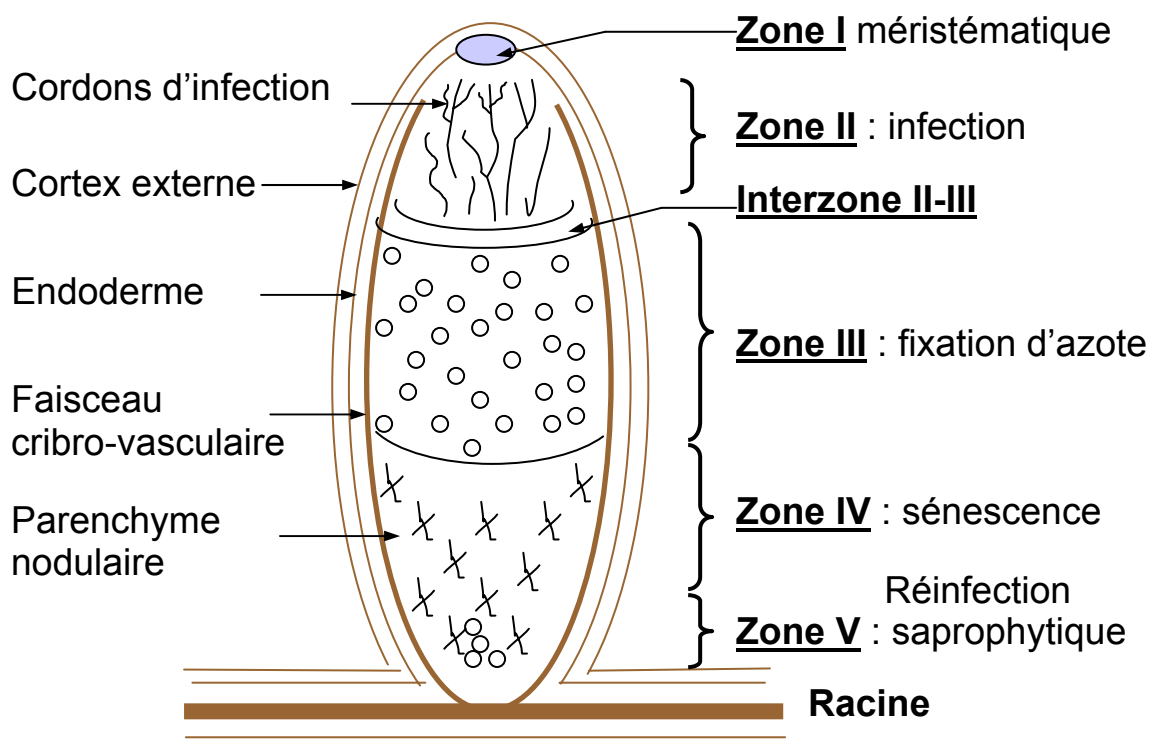


Figure 7 : Représentation schématique d'une coupe longitudinale de nodosité mature de type indéterminé

Ainsi, on distingue successivement :

- la zone I ou méristématique, dépourvue de bactéries. Le méristème assure la croissance de la nodosité pendant 7 à 8 semaines en conditions de laboratoire. Après ce temps, la perte de l'activité méristématique aboutit à l'arrêt de la croissance de la nodosité.

- la zone II ou d'infection. C'est dans la partie proximale de cette zone que les bactéries sont relarguées et que débute leur différenciation en bactéroïdes. On trouve des bactéroïdes de type 1 et de type 2 dans cette zone. Il faut noter que les cordons d'infection progressent vers le méristème apical.

- l'interzone II-III. Elle est très limitée (2 à 3 assises cellulaires) et bien définie (les cellules végétales contiennent de nombreux amyloplastes). Ces cellules contiennent également de nombreux bactéroïdes de type 3.

- la zone III ou de fixation. C'est là que les bactéroïdes de type 4 assurent la fixation de l'azote atmosphérique (voir partie 1.2.3.). La taille de cette zone est également assez constante (8 à 12 assises cellulaires).

- la zone IV ou de sénescence. Les bactéroïdes y dégèrent. En même temps, une partie des cellules végétales perdent leur paroi et sont lysées. Cette zone apparaît en 4^{ème} semaine après infection et finit par envahir tout l'organe.

- la zone V ou de réinfection saprophytique. Même si la zone II est la zone la plus riche en cordons d'infection, les autres zones (III, IV et V) contiennent aussi des cordons d'infection. Les bactéries encore présentes dans ces cordons sont relarguées en zone V, celles-ci ne se différencient pas mais se divisent activement pour envahir certaines des cellules sénescents de façon saprophytique (Timmers *et al.*, 2000).

2. LES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE ET LES SYSTEMES DE PROTECTION BACTERIENS

2.1. Les espèces réactives de l'oxygène

2.1.1. Chimie des espèces réactives de l'oxygène

Les espèces chimiques possédant un ou plusieurs électrons non appariés sont dites radicalaires. L'oxygène (O_2) avec deux électrons de spins parallèles sur deux orbitales séparées est donc un diradical (Figure 8). Cependant, pour qu'il puisse oxyder une autre espèce chimique, il faut qu'il reçoive une paire d'électrons de spins parallèles. Cette restriction de spin implique que ces électrons soient fournis un à un à l' O_2 , ce qui explique sa faible réactivité. L'oxygène est donc un diradical stable. Les métaux de transition (Fe^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , etc.), qui sont les éléments possédant une sous-couche électronique de rang 3 partiellement remplie, ont la capacité de contourner cette restriction de spin grâce à leur capacité de fournir des électrons un à un (Halliwell et Gutteridge, 1984) et donc de réduire l'oxygène.

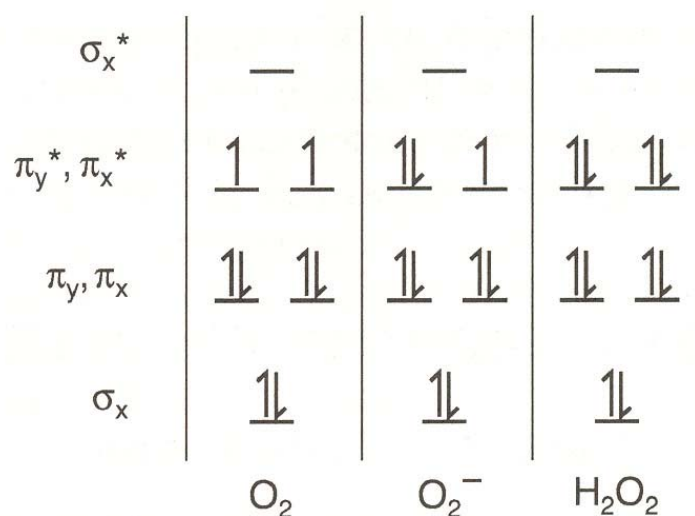


Figure 8 : Diagramme des orbitales moléculaires de l'oxygène (O_2), de l'anion superoxyde (O_2^-) et du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

La réduction incomplète de l'oxygène va être à l'origine de la formation d'une famille de molécules, les espèces réactives de l'oxygène (ERO). La plupart des ERO dérivent de la réduction incomplète de l' O_2 (Figure 9). Il existe une gradation dans la réactivité des ERO ; ainsi, la charge de l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) inhibe son efficacité comme oxydant de

molécules riches en électrons ; la réactivité du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est diminuée par la stabilité de sa liaison O–O ; en revanche le radical hydroxyle ($\text{HO}\cdot$) réagit dès qu'il est formé avec la plupart des molécules.

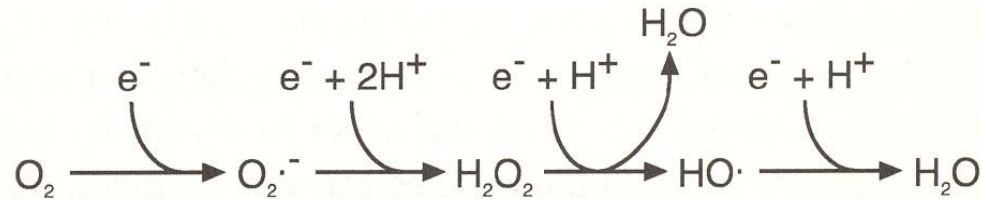


Figure 9 : Les étapes de réduction de l'oxygène (Imlay, 2003).

2.1.2. Formation des ERO chez les bactéries

Chez les êtres vivants, le stress oxydatif correspond à un déséquilibre entre formation et destruction des ERO. Le degré de stress oxydatif auquel est soumis un microorganisme dépend donc, entre autres, du taux de formation d' $\text{O}_2^{\cdot-}$ et d' H_2O_2 au sein de celui-ci. Ces ERO peuvent avoir une origine exogène, par exemple lors des interactions plante-microorganismes (voir partie 3) ou une origine endogène lorsqu'elles proviennent de la bactérie. En effet, les microorganismes fabriquent de façon routinière des ERO, lorsque des molécules impliquées dans les transferts d'électrons réduisent l'oxygène au lieu de leurs molécules cibles. Les chaînes de transfert d'électrons impliquées dans la respiration sont les principales sources de ces fuites électroniques (Figure 10).

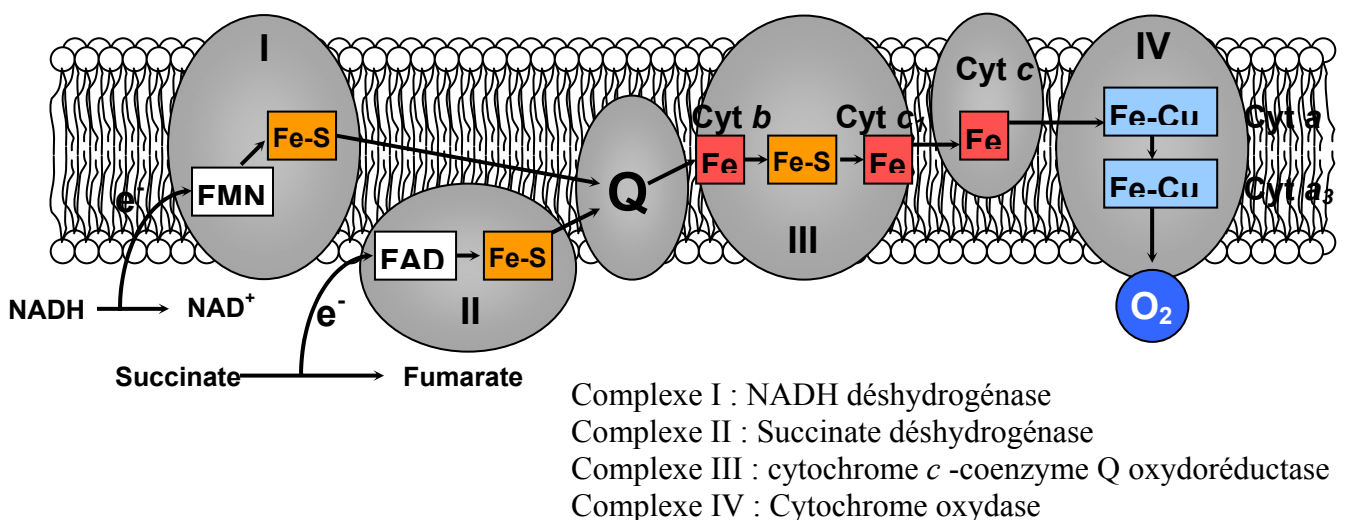


Figure 10 : Exemple de chaînes respiratoires bactériennes. Selon la disponibilité des substrats, différentes déshydrogénases (complexe I et II) peuvent être mises à contribution.

Ainsi, chez *E. coli* une concentration en $O_2^{\bullet-}$ de 0,1 nM est produite par des membranes isolées (Imlay et Fridovich, 1991) et la respiration est responsable de la quasi-totalité de l' H_2O_2 formé par la bactérie, c'est à dire 0,15 μM (Gonzalez-Flecha et Demple, 1995). En utilisant des mutants incapables de détoxifier l' H_2O_2 , il a été montré que *E. coli* produisait 15 μM d' H_2O_2 par seconde en conditions de croissance aérobies optimales (Seaver et Imlay, 2001).

L' $O_2^{\bullet-}$ et l' H_2O_2 sont principalement formés par autooxydation des constituants flaviniques des déshydrogénases des chaînes respiratoires (Messner et Imlay, 1999) et non comme initialement imaginé par échappement d'intermédiaires lors de la réduction de l' O_2 au niveau des cytochromes oxydases (Minghetti et Gennis, 1988). Lors du fonctionnement normal des déshydrogénases, ces enzymes utilisent des cofacteurs, les flavines, qui acceptent les électrons des substrats organiques (FMN et FAD sur la figure 10). Les flavines réduites transfèrent un à un les électrons au cluster fer-soufre ou aux quinones du complexe (Figure 10). Si un oxygène entre en collision avec une flavine réduite ($FADH_2$) avant que celle-ci n'est transférée ses électrons, un électron peut passer du $FADH_2$ à l'oxygène (Messner et Imlay, 2002). Le taux de production d' $O_2^{\bullet-}$ et d' H_2O_2 dépend donc de l'accessibilité des flavines et de la concentration en O_2 . Les bactéries limitent donc leur production d'ERO dans des environnements pauvres en O_2 , ce qui n'empêche pas pour autant le fonctionnement des cytochromes oxydases, celles-ci étant saturées dès des concentrations en O_2 faibles ($< 5\mu M$). Les différentes déshydrogénases ou flavoprotéines ont des flavines plus ou moins exposées à l'oxygène. Ainsi, la flavodoxine produit 0,055 $O_2^{\bullet-}/min$ contre 310 $O_2^{\bullet-}/min$ pour la fumarate réductase dont le composant flavique est particulièrement exposé. De plus, l'autooxydation des flavoprotéines conduit à des mélanges d' $O_2^{\bullet-}$ et d' H_2O_2 (Massey, 1994) (Figure 11). La première étape génère une flavosemiquinone ($FADH\bullet$) et $O_2^{\bullet-}$; dans une minorité des cas l' $O_2^{\bullet-}$ s'échappe et la flavosemiquinone génère une deuxième molécule d' $O_2^{\bullet-}$ avec une autre molécule d'oxygène. Dans la plupart des cas, une inversion de spin de la flavosemiquinone ou d' $O_2^{\bullet-}$ permet le recouvrement des orbitales atomiques des deux composés et aboutit à la formation d'une molécule d' H_2O_2 (Figure 11).

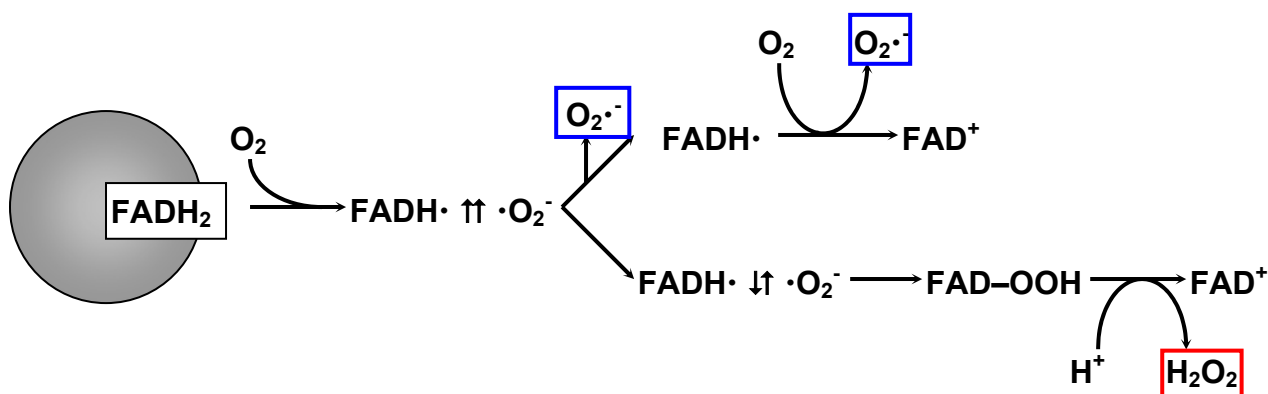
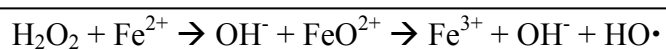


Figure 11 : Représentation schématique de l'autooxydation d'une flavoprotéine conduisant à un mélange d'O₂•⁻ et d'H₂O₂ (d'après Imlay, 2003).

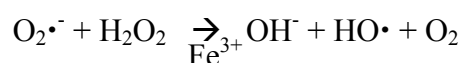
Le complexe *bc₁* est responsable chez certains microorganismes à Gram négatif de la formation d'O₂•⁻ périplasmique. Cependant, des microorganismes ne possédant pas de complexes *bc₁*, comme par exemple *E. coli*, produisent quand même de l'O₂•⁻ dans leur périplasme en croissance aérobie (Imlay, 2003).

Globalement, les proportions et les quantités d'O₂•⁻ et d'H₂O₂ produites chez les bactéries apparaissent très variables d'une espèce à l'autre. Ainsi, dans un même environnement, deux espèces bactériennes différentes subiront des niveaux de stress différents.

Les principaux dommages sont causés à la cellule par le radical hydroxyle (HO•). Il est formé, par la réaction de Fenton dans la cellule lorsque des métaux cèdent un électron à l'H₂O₂. Le fer ferreux (Fe²⁺) étant le principal responsable de cette réaction en conditions *in vivo*.



L'HO• peut également être formé selon la réaction de Haber-Weiss, dans ce cas le réducteur du fer III est l'O₂•⁻.



Cependant, cette dernière réaction n'est pas importante *in vivo* ($t_{1/2} \sim 20\text{h}$) ; en effet, bien que la constante de la réaction de réduction du Fe³⁺ en Fe²⁺ par O₂•⁻ soit forte ($\sim 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), la

concentration en $O_2^{\bullet-}$ libre dans la bactérie est très faible ($\sim 10^{-10}$ M) (Imlay et Fridovich, 1991).

2.2. Les dommages générés par un stress oxydatif

2.2.1. Les dommages générés par l' $O_2^{\bullet-}$

En 1969, l'activité d'une superoxyde dismutase, une enzyme capable de dismuter et donc d'éliminer l' $O_2^{\bullet-}$, est mise en évidence (McCord et Fridovich, 1969). En 1986, le premier mutant dépourvu d'activité superoxyde dismutase (SOD) chez *E. coli* est construit (Carlioz et Touati, 1986). Ce mutant, incapable de croître en présence d'oxygène, démontre que le radical $O_2^{\bullet-}$ se forme, lors de la respiration aérobie, en quantité suffisante pour affecter la croissance de la bactérie. En effet, l' $O_2^{\bullet-}$ peut générer des dommages aux clusters fer-soufre et aux glucides chez les bactéries.

Bien qu'incapable d'oxyder des acides aminés, l' $O_2^{\bullet-}$ cause des dommages à certaines protéines comme la dihydroxy-acide déshydrogénase (Kuo *et al.*, 1987). L'inactivation de cette protéine est due à la destruction de son cluster fer-soufre $[4Fe-4S]^{2+}$ par l' $O_2^{\bullet-}$ (Flint *et al.*, 1993). Cette destruction s'accompagne du relargage d'une molécule d' H_2O_2 et de l'atome de fer sous sa forme ferrique (Fe^{2+}) du site catalytique du cluster pouvant ainsi conduire à la réaction de Fenton (Figure 12). D'autres protéines comme l'aconitase B (Gardner et Fridovich, 1991) ou les fumarases A et B (Liochev et Fridovich, 1993) ont également des clusters sensibles à l' $O_2^{\bullet-}$, les constantes de vitesses de ces réactions sont extrêmement élevées (10^6 à 10^7 $M^{-1} s^{-1}$). En revanche, les clusters fer-soufre des enzymes des chaînes respiratoires ne semblent pas sensibles à l' $O_2^{\bullet-}$ (Imlay, 2003).

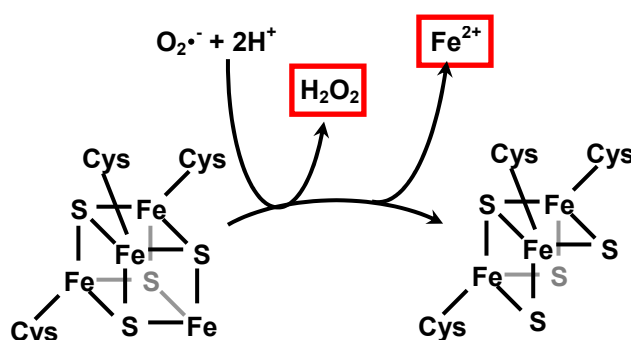
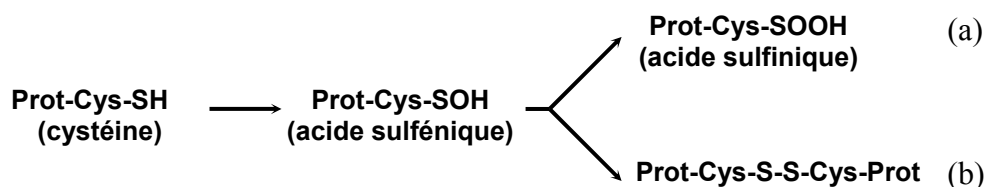


Figure 12 : Représentation schématique de l'inactivation d'un cluster fer-soufre par l' $O_2^{\bullet-}$ (d'après Imlay, 2003).

Certains glucides sont particulièrement sensibles à l' $O_2^{\bullet-}$ (Okado-Matsumoto et Fridovich, 2000). Les petits oses, comme les trioses, incapables de se cycliser et de se stabiliser, ont un carbone en α du groupement carbonyle facilement oxydable.

2.2.2. Les dommages générés par l' H_2O_2

L' H_2O_2 oxyde les résidus cystéine des protéines, créant des acides sulféniques qui peuvent soit être oxydés une nouvelle fois pour former des acides sulfiniques (a), soit former des ponts disulfure avec d'autres cystéines (b) :



La constante de vitesse de ce type de réactions n'est pas très élevée ($20 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) et, à cette vitesse, la demi-vie d'oxydation de la cystéine par $1 \mu\text{M}$ d' H_2O_2 est de 10h. Cependant, l'environnement dans lequel se trouve la cystéine fait énormément varier son oxydabilité ; le régulateur OxyR (voir 2.3.3.2.), par exemple, est capable de détecter des concentrations de l'ordre du nano-molaires en H_2O_2 grâce à la formation d'un pont disulfure entre deux cystéines (Aslund *et al.*, 1999). Les résidus méthionine sont aussi oxydables en méthionine sulfoxyde mais avec une constante de vitesse beaucoup plus faible ($0,01 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Enfin, l' H_2O_2 peut indirectement amener à la formation de formes carbonylées des protéines (Stadtman et Berlett, 1991).

La dangerosité de l' H_2O_2 réside principalement dans sa capacité à former le radical hydroxyle. Cette réaction a des paramètres cinétiques qui la rendent hautement probable : la constante de vitesse de la réaction de Fenton est de $2000\text{-}6000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ lorsque le fer(II) est complexé à un nucléotide (Rush *et al.*, 1990) et la concentration en H_2O_2 intracellulaire, bien que faible en conditions de croissance normale ($<0,2 \mu\text{M}$), peut augmenter en conditions de stress. Les principaux dommages générés par l' $\text{HO}\cdot$ sont les dommages aux membranes lipidiques et les dommages à l'ADN.

Chez les organismes supérieurs, les dommages membranaires, dus à la peroxydation des lipides, sont extrêmement importants lors d'un stress oxydatif. Cette réaction, qui démarre avec une molécule d' $\text{HO}\cdot$, peut théoriquement se propager à travers toute la membrane plasmique *via* les lipides polyinsaturés. Des études semblent indiquer que les lipides monoinsaturés présents chez la plupart des bactéries ne sont pas réactifs (Bielski *et al.*, 1983). Ainsi, les dommages membranaires n'auraient lieu chez les procaryotes qu'au niveau des membranes des thylacoïdes chez les bactéries photosynthétiques (Imlay, 2003).

Les dommages causés à l'ADN sont de loin les plus préjudiciables car ils peuvent causer des pertes définitives de l'information génétique. On distingue deux catégories de dommages, les lésions aux bases et les ruptures des liaisons phosphodiester.

Les dommages aux acides nucléiques sont extrêmement variés, on dénombre plus de 40 bases modifiées différentes dues à l'oxydation des quatre bases A, T, C et G (Cadet *et al.*, 2000). Le dommage le plus fréquent est la formation de 8-oxo-7,8-dihydroguanine (oxoG). L'oxoG est formé par hydroxylation d'une guanine en C8 (Kasai et Nishimura, 1983 ; Kasai et Nishimura, 1984). Lors de la réplication, le dATP est généralement incorporé face à l'oxoG à la place du dCTP (Shibutani *et al.*, 1991), ce qui aboutit à une transversion GC → TA.

Les ruptures de la molécule d'ADN peuvent se faire *via* les liaisons phosphodiester. En effet, ces liaisons se trouvent à l'extérieur de la molécule d'ADN et sont donc des sites privilégiés des attaques radicalaires. De plus, la charge globale de l'ADN attire les ions métalliques comme le Fe^{2+} en favorisant la réaction de Fenton (Imlay et Linn, 1988). L'attaque radicalaire peut également avoir lieu sur les carbones des pentose et les formes modifiées conduisent à l'apparition de ruptures simples ou doubles brins (Dedon *et al.*, 1992). Enfin, on peut citer des instabilités au niveau de grandes portions de la molécule d'ADN comme par exemple les microsatellites induites par les ERO (Yamamura *et al.*, 2003).

Lors d'un stress oxydatif, les processus décrits précédemment interviennent rarement seuls et de nombreux dommages peuvent agir en synergie (Figure 13).

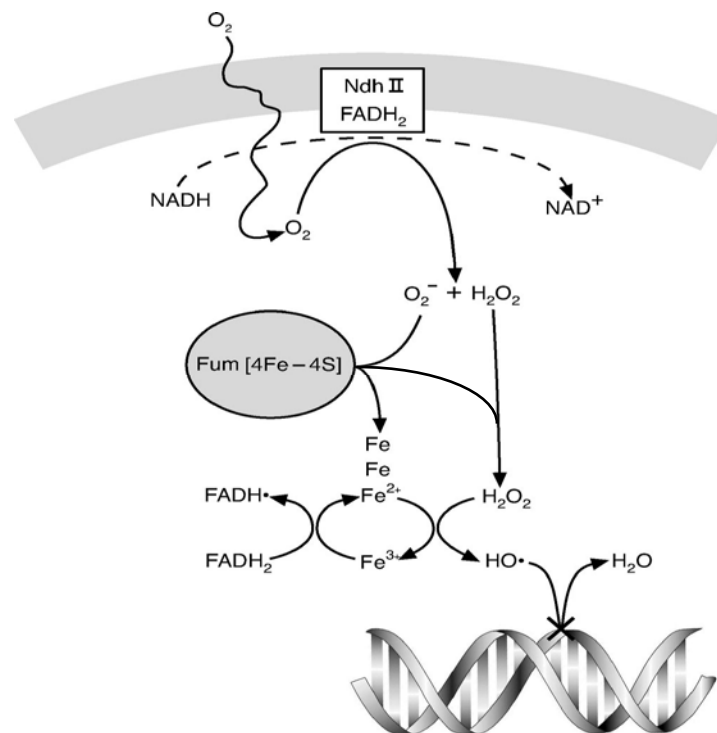


Figure 13 : Un exemple de dommage dû à l'oxygène (Imlay, 2003)

2.3. Les systèmes bactériens de réparation et de protection

Afin de faire face aux dommages engendrés par un stress oxydatif, les bactéries ont à leur disposition de nombreux mécanismes leur permettant de réparer les lésions engendrées par les ERO ou de les éliminer avant qu'elles ne puissent avoir des effets délétères.

2.3.1. Les systèmes de réparation bactériens

2.3.1.1. Les systèmes de réparation de l'ADN

Les bactéries possèdent de nombreux systèmes de réparations permettant de faire face aux dommages causés à l'ADN. L'excision des nucléotides altérés par un stress oxydatif peut se faire grâce au complexe UvrABC bien que sa fonction première soit de remédier aux altérations de l'ADN dues aux UV (Sancar et Sancar, 1988). La réparation des mésappariements de l'ADN (Schofield et Hsieh, 2003) est principalement assurée par les enzymes MutS, MutL et MutH. Le dommage majeur causé à l'ADN lors d'un stress oxydatif que représente la formation d'oxoG, est réparé grâce à l'enzyme MutY. Celle-ci va permettre la rupture de la liaison entre l'adénine apparié à l'oxoG et le desoxyribose auquel elle est liée pour initier la réparation (Michaels *et al.*, 1992).

2.3.1.2. Les systèmes de réparation des protéines

Récemment les gènes codant les enzymes impliquées dans la réparation des clusters fer-soufre ($[3\text{Fe-4S}]^{1+} \rightarrow [4\text{Fe-4S}]^{2+}$) ont été identifiés (Djaman *et al.*, 2004). Les auteurs ont également montré que ces systèmes de réparation sont distincts des systèmes responsables de la synthèse *de novo* de ces clusters (Djaman *et al.*, 2004).

Les acides aminés des protéines oxydées peuvent être également réparés. Les méthionine sulfoxyde réductases sont des enzymes capables de catalyser la réduction des méthionine sulfoxydes en méthionines. Deux gènes codant des enzymes ayant une activité méthionine sulfoxyde réductase, *msrA* (Rahman *et al.*, 1992) et *msrB* (Grimaud *et al.*, 2001), ont été identifiés chez *E. coli*. Il faut noter, qu'à l'heure actuelle, aucun équivalent à la sulfiredoxine eucaryote, une enzyme capable de catalyser la réduction des acides sulfonique (Biteau *et al.*, 2003 ; Brot *et al.*, 1981), n'est connu chez les procaryotes.

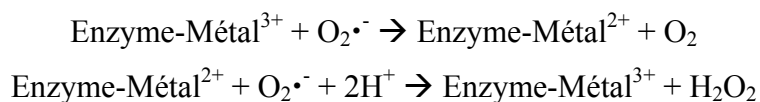
2.3.2. Les systèmes de protection bactériens

2.3.2.1. Détoxification enzymatique de l'O₂•⁻

Les superoxyde dismutases (SODs) catalysent la réaction de dismutation de l'anion superoxyde selon la réaction :



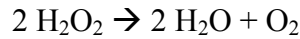
Cette dismutation se fait spontanément avec une constante de vitesse de $10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; elle n'a donc pratiquement pas lieu dans la cellule compte tenue de la concentration en O₂•⁻ ($\sim 10^{-10} \text{ M}$) (Imlay et Fridovich, 1991). Les SODs permettent une augmentation considérable de cette vitesse ($\sim 2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Ce sont des métallo-protéines où des métaux de transition (Cu³⁺, Zn³⁺, Mn³⁺ ou Fe³⁺ en fonction du type de SOD) capables de réagir avec un électron, jouent un rôle d'oxydant puis de réducteur dans un mécanisme en deux étapes :



Il existe trois types de SODs : les SODs à fer (FeSODs), les SODs à manganèse (MnSODs) et les SODs à cuivre/zinc (Cu/ZnSODs). Dans ce dernier cas, seul le cuivre est associé au substrat. On trouve ces trois types de SODs chez les procaryotes et chez certains eucaryotes ; il semblerait que des transferts horizontaux entre eucaryotes et procaryotes des gènes codant les SODs aient eu lieu au cours de l'évolution. Comme les eucaryotes, la plupart des procaryotes possèdent plusieurs SODs. L'O₂•⁻ ne traversant pas les membranes lipidiques en raison de sa charge, il doit être détoxiqué là où il est formé. Ainsi, *E. coli* possède trois SODs : deux cytoplasmiques, dont une MnSOD et une FeSOD, codés respectivement par *sodA* (Touati, 1983) et *sodB* (Carlioz *et al.*, 1988) et une périplasmique Cu/ZnSOD codée par *sodC* (Imlay et Imlay, 1996). *sodB* est exprimé constitutivement, *sodA* est activée en conditions de stress oxydatif, *sodC* est induite en phase stationnaire et par un stress oxydatif (Gort *et al.*, 1999).

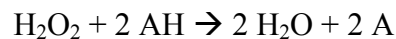
2.3.2.2. Détoxification enzymatique de l'H₂O₂Les catalases

Les catalases (ou hydroperoxydases) sont capables de réduire l'H₂O₂ en espèces inoffensives, l'eau (H₂O) et l'oxygène selon la réaction :



Chez les bactéries, on distingue trois catégories de catalases (Chelikani *et al.*, 2004) :

- Les catalases monofonctionnelles ou « vraies catalases » (HPII chez *E. coli*) sont les plus représentées chez les bactéries ; on en dénombre plus de 225 chez les procaryotes à l'heure actuelle. Elles contiennent un hème au niveau de leur site actif et sont subdivisées en deux classes, les catalases à petites sous-unités (<60 kDa) et les catalases à grandes sous-unités (>75 kDa).
- Les catalases bifonctionnelles (HPI chez *E. coli*) sont à la fois des catalases et des peroxydases. On en dénombre actuellement plus de 50. D'un point de vue structural et au niveau de leurs séquences, elles sont proches des peroxydases végétales. Les peroxydases éliminent l'H₂O₂ en oxydant un co-substrat (AH/A) selon la réaction :



De façon générale, les peroxydases ont un rendement inférieur à celui des catalases dans la détoxification de l'H₂O₂. En effet, les peroxydases ne peuvent pas réduire plus d'H₂O₂ que leur métabolisme ne leur fournit de cosubstrat réducteur. Cependant l'affinité des catalases-peroxydases pour l'H₂O₂ est généralement meilleure que celle des catalases vraies.

- Les catalases à manganèse (Mn-catalase, catalases non-hème, ou pseudo-catalases). On en recense actuellement plus de 25. Ce sont des homo-hexamères formés de petites sous unités d'environ 30 kDa. Chez *Salmonella*, une Mn-catalase a récemment été mise en évidence, elle serait sous le contrôle du régulateur global de la phase stationnaire, RpoS, également régulateur de la HPII chez *E. coli* (Robbe-Saule *et al.*, 2001).

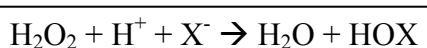
Les alkyl-hydroperoxydases

Récemment, il a été montré chez *E. coli*, qu'un mutant dépourvu d'activité catalase était capable de détoxifier des concentrations faibles d'H₂O₂ (Seaver et Imlay, 2001). L'alkyl-hydroperoxydase, Ahp, est à l'origine de cette détoxification. Bien qu'ayant d'abord été décrite comme une peroxydase NAD(P)H dépendante capable de réduire des hydroperoxydes

organiques (ROOH) comme le cumène ou le *t*-butyl-hydroperoxyde (Jacobson *et al.*, 1989), Ahp est également capable de réduire l'H₂O₂ (Niimura *et al.*, 1995). Il est possible que, chez *E. coli*, la réduction des hydroperoxydes lipidiques ne soit que secondaire, car les bactéries ne possèdent pas de lipides polyinsaturés, nécessaires à leur peroxydation. Ainsi, il a été suggéré que Ahp soit physiologiquement impliquée dans la réduction de l'H₂O₂ (Seaver et Imlay, 2001). Chez *E. coli*, l'activité de Ahp est rapidement saturée (concentration du milieu extracellulaire supérieure à 20 μM d'H₂O₂). Cependant, même si sa V_{max} est faible, son affinité (K_m) est meilleure que celle des HPII. Ainsi, Ahp serait donc en première ligne pour l'élimination de l'H₂O₂ d'origine endogène chez *E. coli*.

Les haloperoxydases

Les haloperoxydases sont des enzymes capables de catalyser l'oxydation d'un halogène (X⁻) en réduisant une molécule d'H₂O₂ selon la réaction :



Les haloperoxydases portent le nom de l'halogène le plus électronégatif qu'elles sont capables d'oxyder. Ainsi, une chloroperoxydase (Cpo) pourra oxyder le chlorure (Cl⁻), le bromure (Br⁻) et l'iodure (I⁻). On trouve trois catégories d'haloperoxydases chez les bactéries : les haloperoxydases à groupement prosthétique hème, les haloperoxydases à vanadium et les haloperoxydases sans groupement prosthétique. Néanmoins, même si ces enzymes catalysent la réduction de l'H₂O₂, leur rôle en tant que destructeur ou « scavenger » d'H₂O₂ n'est pas décrit.

On peut ajouter que de nombreuses haloperoxydases ont une activité phosphatase, indépendamment de la catégorie à laquelle elles appartiennent (Preobrazhenskaya *et al.*, 2003 ; Wieger *et al.*, 1997).

2.3.2.3. Les composés antioxydants

Ces composés de faible poids moléculaire vont réagir avec les ERO avant que celles-ci ne réagissent avec des molécules importantes pour la cellule.

L'ubiquinone ou coenzyme Q (figure 10) est un composé essentiel au fonctionnement des chaînes respiratoires aérobies. Chez *E. coli*, l'ubiquinone est composée de 8 unités isoprénoïdes très lipophiles. Un mutant *ubiCA* affecté dans la synthèse de l'ubiquinone produit 2 à 3 fois plus de radicaux O₂^{•-} et voit sa concentration intracellulaire en H₂O₂ doubler

(Soballe et Poole, 2000). Ce résultat peut sembler contradictoire avec le fait que les principaux sites de production d'ERO sont les chaînes respiratoires. Soballe et Poole proposent que, comme dans les mitochondries, les semiquinones (QH•) puissent servir de composé antioxydant.

Le glutathion ou γ -L-glutamyl-L-cystéinyl-glycine (GSH) est un tripeptide de formule γ Glu-Cys-Gly. Le GSH est le composé soufré de faible poids moléculaire le plus abondant chez de nombreux organismes. Dès 1983, il a été proposé comme étant impliqué dans la protection contre le stress oxydatif (Meister et Anderson, 1983). Sa synthèse (Figure 14) est assurée par deux enzymes, la γ -L-glutamyl-L-cystéine synthétase (γ -GCS) et la glutathione synthétase (GSHS). Chez les procaryotes, la γ -GCS, codée par *gshA* (ou *gsh-I*), assure la synthèse du γ -L-glutamyl-L-cystéine (γ -GC) par une liaison en γ entre le glutamate et la cystéine. La GSHS, codée par le gène *gshB* (ou *gsh-II*), permet la synthèse de glutathion réduit par adjonction d'une glycine au γ -GC.

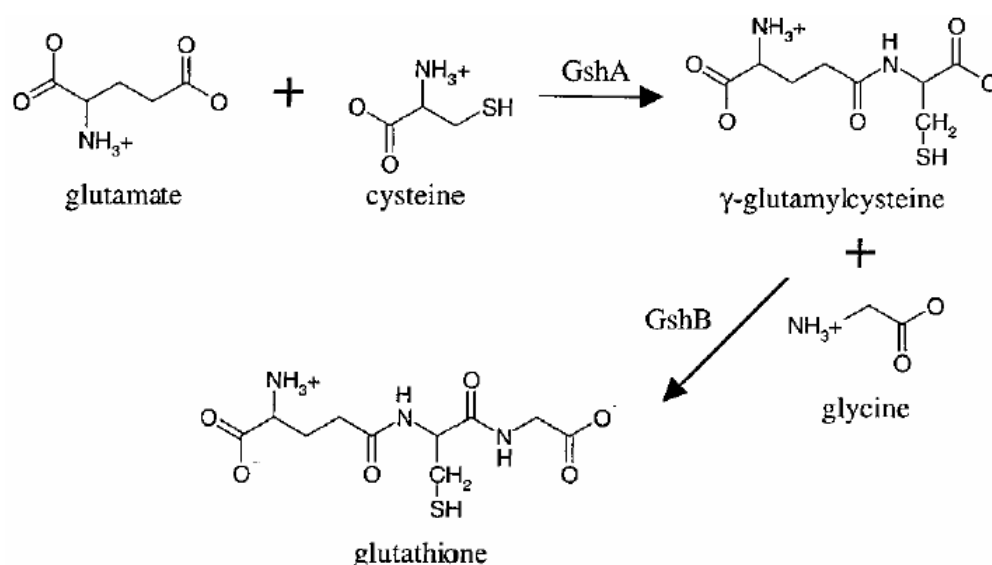


Figure 14 : Voie de biosynthèse du GSH (Gralnick *et al.*, 2000)

Lorsqu'il est oxydé, le GSH va se dimériser grâce à un pont disulfure entre deux cystéines pour former le GSSG. Le glutathion est présent chez tous les eucaryotes et chez la plupart des bactéries à l'exception de bactéries à Gram négatif (Fahey *et al.*, 1978). Chez la levure comme chez tous les eucaryotes, le GSH est un réducteur indispensable à l'organisme (Penninckx, 2000). En revanche le GSH n'est pas nécessaire à la survie d'*E. coli* (Greenberg

et Demple, 1986). Chez les bactéries, le GSH semble important pour la liaison, la transformation et la détoxification d'une grande variété de composés toxiques et compléterait la défense antioxydante bactérienne (Ferguson et Booth, 1998 ; Riccillo *et al.*, 2000 ; Vergauwen *et al.*, 2003). Enfin, le GSH serait impliqué dans la régulation des catalases (Oktyabrsky *et al.*, 2001). Cette régulation se ferait *via* le régulateur OxyR (voir chapitre 2.3.3.1) (Aslund *et al.*, 1999).

2.3.3. La régulation de la défense antioxydante chez les bactéries

La défense antioxydante bactérienne est régulée par un grand nombre de régulateurs transcriptionnels qui agissent comme des senseurs de l'état redox cellulaire. Ces régulateurs vont être oxydés par telle(s) ou telle(s) molécule(s) oxydante(s) au niveau de leur(s) site(s) actif(s) qui sont généralement des cystéines ou des clusters très exposés au stress oxydatif. Ainsi, les régulateurs vont subir une altération réversible, qui en modifiant leur structure, va modifier leur liaison avec la polymérase et/ou avec l'ADN et permettre l'activation ou la répression de certains gènes.

Actuellement on connaît au moins 8 régulateurs de ce type que l'on peut placer dans deux grandes familles selon leurs sites actifs. Les régulateurs utilisant des métaux de transitions : SoxR, FNR, FixL, NifL, PerR et les régulateurs utilisant des cystéines : OxyR, OhrR, CtrJ (Paget et Buttner, 2003). Seul le régulateur OxyR sera décrit précisément.

Le régulateur OxyR est le premier senseur d' H_2O_2 à avoir été décrit (Christman *et al.*, 1985). OxyR appartient à la famille des régulateurs transcriptionnels de type LysR (Christman *et al.*, 1989 ; Schell, 1993). Il a d'abord été identifié comme le régulateur central impliqué dans la réponse à un stress H_2O_2 chez *Salmonella enterica* (anciennement appelée *Salmonella typhimurium*). En réponse à l' H_2O_2 , OxyR active un régulon de plus de 20 gènes (Aslund *et al.*, 1999 ; Mukhopaday et Schellhorn, 1997) dont les plus connus et les mieux caractérisés sont l'hydroperoxydase HPI (codée par *katG*), l'alkyl hydroperoxyde réductase (codée par *ahpCF*), la glutathion réductase (codée par *gorA*), la glutarédoxine (codée par *grxA*) et le petit ARN régulateur (transcrit non traduit *oxyS*). Des études de transcriptomique et de bioinformatique chez *E. coli* (Zheng *et al.*, 2001 ; Zheng *et al.*, 2001) ont permis de mettre en évidence de nombreux autres gènes régulés par OxyR parmi lesquels *dsbG* (codant une chaperonne périplasmique facilitant le repliement des protéines contenant des ponts

disulfures), *fhuF* (codant une ferrique réductase) et *yfdI* (qui possède des homologies de séquences avec des ligases).

OxyR est un tétramère ou plus exactement un dimère de dimère (Kullik *et al.*, 1995). Il se lie de façon adjacente et en amont de la séquence -35 de liaison de la polymérase et agit comme un régulateur positif en favorisant la liaison de la polymérase à l'ADN. Cette liaison se fait via la séquence consensus inversée répétée ATAG-(N)₇-CGAT-(N)₇-ATAG-(N)₇-CGAT chez *E. coli* (Toledano *et al.*, 1994 ; Zheng *et al.*, 2001) Le régulateur interagit avec la partie C-terminale de la sous unité α de l'ARN polymérase (Tao *et al.*, 1995).

De nombreux travaux, concernant le mode d'activation d'OxyR, ont été publiés. Storz et ses collaborateurs ont d'abord montré que l'oxydation d'OxyR se faisait directement et grâce à au moins une des six cystéines du régulateur (Storz *et al.*, 1990). Afin de déterminer les résidus impliqués dans cette régulation, toutes les cystéines d'OxyR ont été mutées une à une (Kullik *et al.*, 1995). Seule la cystéine Cys199 semble jouer un rôle dans ce processus régulateur et un mutant dont les cinq autres cystéines ont été mutées en sérines n'est pas affecté dans sa résistance au stress oxydatif. Le groupe de Jonathan S. Stamler a ensuite montré que ce régulateur est aussi capable de répondre à des agents nitrosylés (-SNO) (Hausladen *et al.*, 1996). Ainsi, les premières observations vont dans le même sens avec la Cys199 hydroxylée (Cys199-SOH) ou nitrosylée (Cys199-SNO) en fonction du type de stress (H₂O₂ ou NO•). En utilisant une protéine OxyR dont toutes les cystéines, exceptés Cys199 et Cys208, ont été mutées en alanines (mutant « 4C→A »), le groupe de Storz a montré que la formation d'un pont disulfure entre Cys199 et Cys208 assurerait l'activation d'OxyR (Zheng *et al.*, 1998), suggérant que ce pont disulfure se formerait *via* un intermédiaire sulfénique en Cys199 ayant une activité partielle détectée précédemment. La réduction d'OxyR serait assurée par le glutathion (Aslund *et al.*, 1999). Malgré un éloignement relativement important de 17Å entre ces deux cystéines, distance révélée par des données de cristallographie (Choi *et al.*, 2001), les auteurs suggèrent que l'intermédiaire sulfénique formé par oxydation de Cys199 puisse induire un rapprochement des deux cystéines Cys199 et Cys208, permettant la formation du pont disulfure. Récemment de nouvelles données cristallographiques (Muraoka *et al.*, 2003 ; Zaim et Kierzek, 2003) ont apporté des informations sur la multimérisation d'OxyR et des régulateurs de type LysR.

Cependant, cette description du mode de régulation d'OxyR a été remise en question par le groupe de Stamler (Kim *et al.*, 2002), suggérant que le pont disulfure entre les cystéines Cys199 et Cys208 ne joue aucun rôle dans la régulation d'OxyR. Ainsi, ces auteurs présentent des résultats selon lesquelles l'activité d'OxyR ne serait due qu'à des modifications de la

Cys199 en réponse à différents stress : hydroxylation (Cys199-SOH) lors d'un stress oxydatif, nitrosylation (Cys199-SNO) par le NO• ou glutathionylation (Cys199-SSG) en présence de glutathion oxydé (GSSG). Ces différentes formes d'OxyR sont actives et diffèrent par leurs structures, leurs propriétés coopératives et leur affinité pour leurs sites de fixation à l'ADN. Le groupe de Stamler suggère donc un modèle d'activation d'OxyR beaucoup plus complexe que celui proposé par le groupe de Gisela Storz. L'état d'activation d'OxyR pourrait varier en fonction de son état d'oxydation selon le gène régulé et non sur un modèle « allumé/éteint » (Kim *et al.*, 2002).

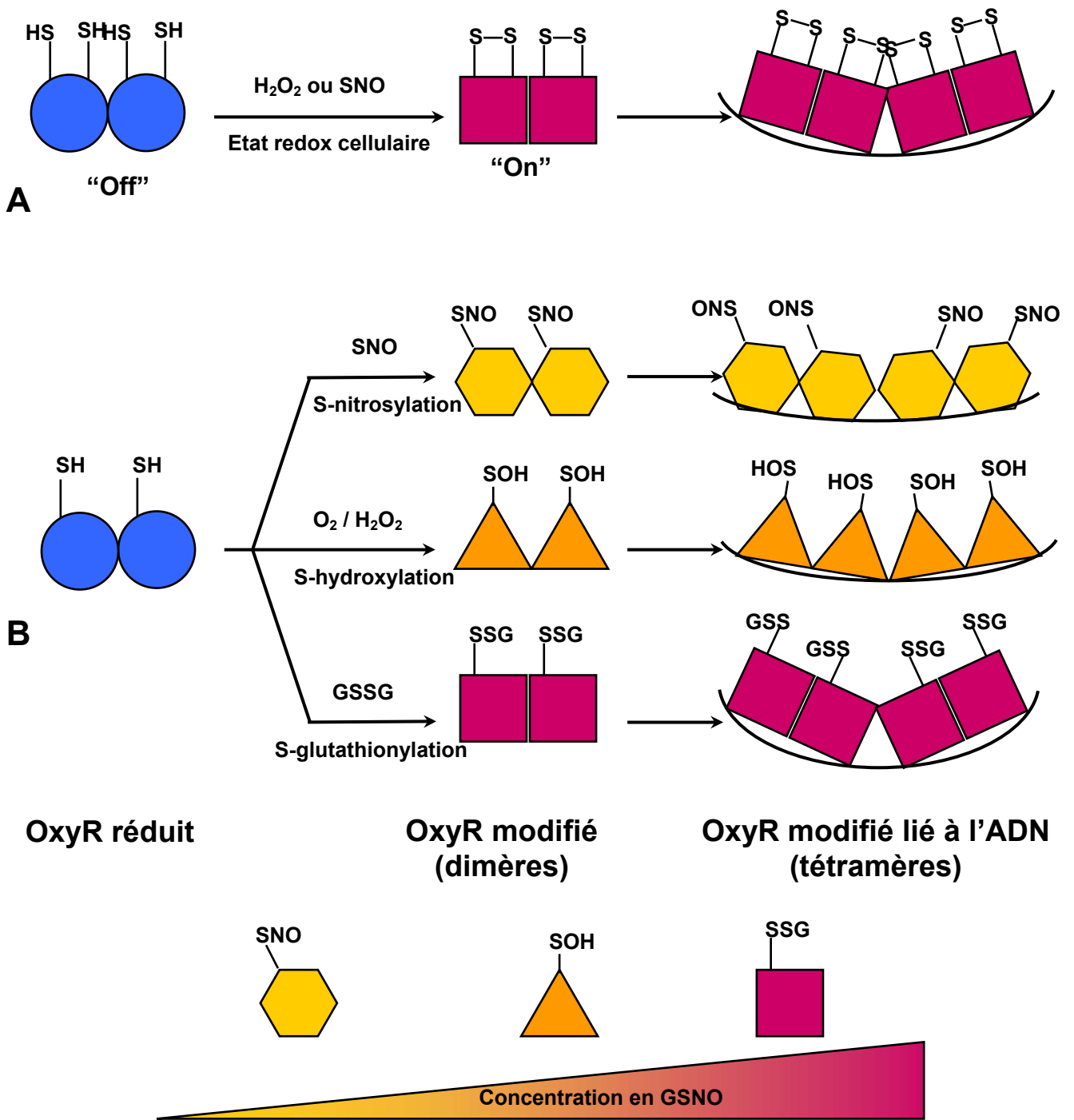


Figure 15 : Modèles de régulation de l'activation du régulateur OxyR. Le modèle A d'après Zheng *et al.* (1998) et le modèle B d'après Kim *et al.* (2002)

3. LES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE DANS LES INTERACTIONS PLANTES-BACTERIES

3.1. Implication des ERO dans les interactions plantes-pathogènes

Pour empêcher son invasion par un pathogène, la plante produit des ERO après reconnaissance de celui-ci. Dans les interactions plantes-pathogènes, ces ERO vont renforcer les parois végétales et induire une réponse hypersensible (HR) localisée, qui déclenche l'expression de gènes de défense, de la mort cellulaire programmée et de la réponse systémique acquise (Lamb et Dixon, 1997 ; Ryals *et al.*, 1996).

La bouffée oxydante est définie comme une libération brutale d'ERO en réponse à un *stimulus* externe (Jackson et Taylor, 1996). Ces ERO, principalement l' H_2O_2 et l' $O_2^{\bullet-}$, sont produites dans l'apoplaste par des NADPH oxydases liées à la membrane plasmique, des peroxydases liées à la paroi (Kawano, 2003) et des amine oxydases localisées dans l'apoplaste lui-même (Allan et Fluhr, 1997). Récemment, deux NADPH oxydases végétales ayant un rôle majeur dans la bouffée oxydante, ont été identifiées par homologies avec les oxydases impliquées dans la phagocytose (Torres *et al.*, 2002). Des concentrations supérieures à $15\mu M$ en H_2O_2 peuvent ainsi être produites (Apel et Hirt, 2004), directement par les peroxydases ou indirectement par les oxydases après dismutation de l' $O_2^{\bullet-}$ produit.

3.1.1. Le « Cross-link » des parois végétales

L' H_2O_2 libéré lors de la bouffée oxydante a un rôle central dans le « cross-link » des parois végétales (Bradley *et al.*, 1992 ; Tenhaken *et al.*, 1995). Ces « cross-link » oxydatifs, en créant une barrière physique au niveau de l'apoplaste, bloquent la propagation des pathogènes.

Les extensines sont des protéines de la paroi caractérisées par des motifs répétés d'hydroxyprolines (HRGPs pour « Hydroxyproline-rich glyco-proteins ») et contenant souvent un grand nombre de tyrosines (Tyr). Les motifs répétés d'hydroxyprolines sont souvent décorés d'oligosaccharides d'arabinose qui donnent aux HRGPs leur rigidité (Williamson, 1994). La synthèse et la sécrétion d'HRGPs est induite par une blessure, une infection ou des éliciteurs fongiques (Lawton et Lamb, 1987) et une sous-classe d'HRGPs riche en tyrosines est induite de façon spécifique lors de l'infection par un pathogène (Kawalleck *et al.*, 1995). Lors de l'attaque par un pathogène, les extensines sont rapidement

liées par des ponts ioniques aux acides polysaccharidiques puis par des liaisons covalentes à la paroi et entre-elles, ce qui entraîne leur insolubilisation et le durcissement de la paroi.

Les tyrosines sont les acides aminés impliqués dans l'insolubilisation des extensines. Plusieurs types de réactions peuvent avoir lieu entre les tyrosines (Figure 16). Ces réactions ont été détectées *in vivo* (Brady et Fry, 1997 ; Fry, 1982) et donnent lieu à des liaisons covalentes inter-HRGPs (dityrosine et di-isodityrosine) ou intra-HRGPs (isodityrosine).

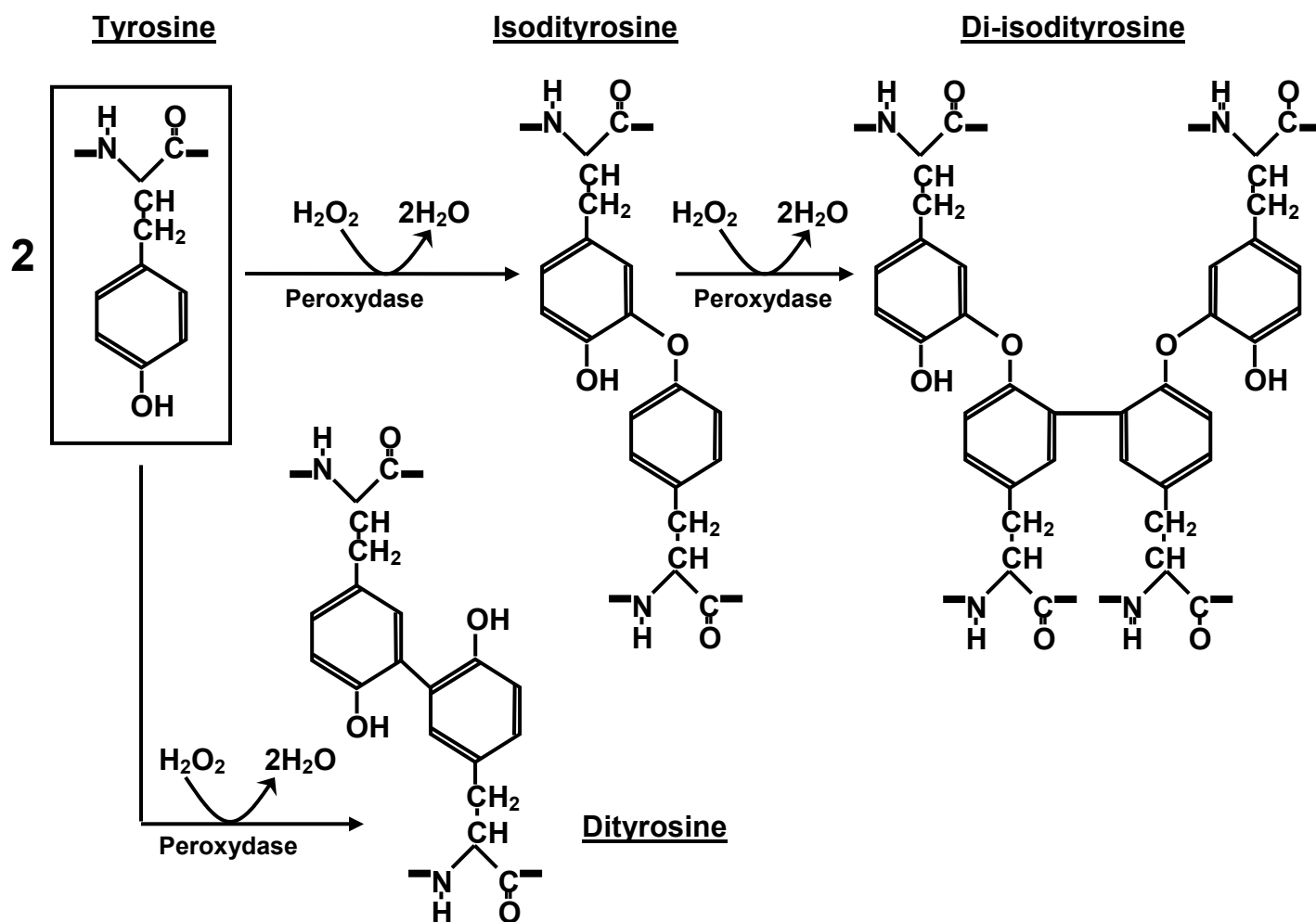


Figure 16 : Structures chimiques et mécanismes de formation des ponts entre tyrosines.

3.1.2. L'induction de la mort cellulaire programmée et des gènes de défense

Contrairement à $l'O_2^{\cdot-}$, $l'H_2O_2$ peut diffuser à travers les membranes et agir ainsi comme molécule signal. Ce signal induit la mort cellulaire programmée (PCD) des cellules au site d'infection et active de nombreux gènes de défense dans les autres parties de la plante (Dangl et Jones, 2001). Au cours de l'interaction plante-pathogène, l'activité des enzymes capables de détoxifier les ERO est diminuée par l'acide salicylique (SA) et le monoxyde d'azote

(NO•), un composé radicalaire (Klessig *et al.*, 2000 ; Wendehenne *et al.*, 2004). Notons que le NO• peut également potentialiser l'induction de la mort cellulaire programmée par les autres ERO (Delledonne *et al.*, 1998). Cette diminution des défenses de la plante est indispensable à l'induction de la PCD (Mittler *et al.*, 1999).

De façon concomitante à la HR, une résistance secondaire connue sous le nom de réponse systémique acquise (SAR) est induite dans les tissus non infectés de la plante (Sticher *et al.*, 1997). La SAR induit une résistance à long terme contre une grande variété de pathogène chez la plante. L'établissement de la SAR est associé à un niveau élevé d'acide salicylique (SA) dans toute la plante et l'application exogène de SA aboutit à l'activation de la SAR. Les modifications de l'état redox cellulaire induisant la SAR sont perçues grâce au régulateur NPR1 (Mou *et al.*, 2003 ; Pieterse et Van Loon, 2004).

3.2. Les ERO dans les symbioses *Rhizobium*-légumineuses

La mise en place des symbioses *Rhizobium*-légumineuses et leur fonctionnement sont des processus où les ERO ont une place très importante. Ainsi, que ce soit lors des premières étapes de la mise en place de la symbiose où les ERO sont détectées, lors de la fixation de l'azote où les conditions favorisent largement leur formation ou lors de la sénescence de la nodosité, les ERO pourraient avoir un rôle majeur dans la vie et la mort de la nodosité.

3.2.1. Les ERO dans la mise en place de la symbiose

Bien que les ERO aient un effet délétère à forte concentration pour chacun des deux partenaires symbiotiques, il a été suggéré qu'en faible quantité et à des moments bien précis de la mise en place de la symbiose, elles aient un rôle positif. C'est ainsi le cas dans la symbiose entre *Azorhizobium caulinodans* et *Sesbania rostrata*, une légumineuse d'origine tropicale, où la bactérie ne pénètre pas par les poils absorbants mais au niveau de poches d'infections situées à la bases des racines secondaires. Dans ce cas, la mort cellulaire programmée de quelques cellules végétales, induite par les facteurs Nods via l'H₂O₂, va permettre l'entrée des bactéries (D'Haese *et al.*, 2003).

La symbiose est un processus régulé par la plante, et lors de la symbiose *S. meliloti* - *Medicago*, seule une très faible proportion des cordons d'infection initiés conduit au développement d'une nodosité (Vasse *et al.*, 1993). Il a été suggéré que la symbiose était une réaction d'incompatibilité contrôlée (Rolfe et Gresshoff, 1988). Ainsi, la plante se défendrait localement par une réponse de type hypersensible conduisant à une libération d'ERO.

3.2.1.1. Les ERO dans l'initiation du cordon d'infection

Après inoculation de *Medicago* par *S. meliloti*, l'activité peroxydase augmente transitoirement au site de déformation du poil absorbant (Salzwedel et Dazzo, 1993). Cette activité pourrait avoir un rôle dans le « cross-linking » oxydatif des polymères de paroi cellulaire au site de pénétration des bactéries, résultant en un durcissement de la structure de cette paroi. L' H_2O_2 pourrait être le substrat de ces peroxydases lors de ce processus, illustrant ainsi un rôle potentiel de certaines ERO à faible concentration lors de l'initiation de la symbiose.

Ces auteurs proposent que, pour une infection efficace, les *rhizobia* doivent d'abord supprimer l'activité peroxydase des poils absorbant, ce qui leur permettrait de pénétrer la paroi de l'hôte. Ces auteurs suggèrent qu'une diminution rapide et transitoire de l'activité peroxydase puisse être due aux exopolysaccharides (EPS), qui, par liaison aux poils absorbants, augmenteraient la fréquence des infections et pourraient aider les bactéries à empêcher la SAR au cours de l'infection. Après la pénétration, une activité peroxydase localisée serait nécessaire à la réparation de la paroi du poil absorbant au site de pénétration de la bactérie et d'initiation du cordon d'infection. Ces auteurs supposent que la plante devrait résister à la pénétration de bactéries non-hôtes et de pathogènes en augmentant rapidement et localement les niveaux de peroxydase pour durcir la paroi des cellules.

Préalablement à l'infection bactérienne de *Medicago truncatula*, les facteurs Nod déclenchent l'expression transitoire et localisée d'une « noduline précoce » nommée *rip1* (pour *Rhizobium* *I*nduced *P*eroxidase) qui coderait une peroxydase (Cook *et al.*, 1995). On peut noter que l'éthylène a le même effet que les facteurs Nod sur l'induction de ce gène (Oldroyd *et al.*, 2001). En tant que peroxydase, RIP1 pourrait avoir un rôle dans le métabolisme de l' H_2O_2 et/ou dans la mise en place des « cross-link » de polymères des parois végétales. Les transcrits correspondants à *rip1* sont localisés au niveau des cellules épidermiques infectées par la suite, l'expression ayant lieu au moment de la pré-infection (Cook *et al.*, 1995) ; ceci suggère également un rôle dans la réparation de la paroi cellulaire au site d'infection. Récemment, Ramu et ses collaborateurs (Ramu *et al.*, 2002) ont montré que les transcrits correspondant à *rip1* et les ERO partagent un type similaire de localisation chez *M. truncatula* et que l'application de facteurs Nod engendre une rapide co-induction *rip1*-ERO. L'utilisation d'une souche mutante de *S. meliloti* ne produisant pas de facteurs Nod ou d'un mutant de *M. truncatula* affecté dans la transduction du signal facteur Nod (*dmi1-1*) ne

permet de détecter ni des ERO ni l'expression de *rip1*. De plus, l' H_2O_2 induit de façon spécifique l'expression de *rip1*, ce qui laisse supposer que la perception des facteurs Nod par la plante induit la production d' H_2O_2 , qui a son tour induirait l'expression de *rip1* (Ramu *et al.*, 2002).

3.2.1.2. La progression du cordon d'infection

Chez le pois, Wisniewski et ses collaborateurs (Wisniewski *et al.*, 2000) ont mis en évidence que l'insolubilisation de glycoprotéines de la matrice créent une barrière inhibant l'entrée des bactéries. Ces auteurs proposent que l'activité diamine oxydase (DAO) puisse produire localement de l' H_2O_2 , qui, utilisé par des peroxydases, pourrait induire l'insolubilisation de glycoprotéines et moduler ainsi la plasticité de la paroi cellulaire. Les glycoprotéines de la matrice sont solubles à l'extrémité des cordons d'infection, et durcies ailleurs (Wisniewski *et al.*, 2000). La progression des bactéries dans les cordons, vers la zone d'infection, se ferait donc en particulier grâce à l'établissement d'un gradient d'activité peroxydase.

Récemment, le même groupe a mis en évidence une famille de protéines contenant des motifs riches en hydroxyproline et possédant plus de 70% d'identité avec des extensines végétales (Rathbun *et al.*, 2002). Cette nouvelle famille d'extensines est spécifique des Légumineuses et les auteurs pensent qu'elles pourraient servir à réguler la transition fluide-solide de la matrice du cordon d'infection. L' H_2O_2 pourrait être à l'origine des « cross-link » de ces extensines *via* les tyrosines (Figure 16) et permettre, en fonction de sa concentration et de sa localisation, la progression ou l'avortement des cordons d'infection.

De plus, la mono-ubiquitylation de l'actine, une modification post-traductionnelle, est induite dans les nodosités de *Phaseolus vulgaris* (Dantan-Gonzalez *et al.*, 2001). Ce type de modification est présent lors des interactions plantes-pathogènes et fournirait une stabilité aux micro-filaments contre les dégradations protéolytiques. Cette réponse peut être induite au niveau de cultures cellulaires par application d' H_2O_2 (Dantan-Gonzalez *et al.*, 2001), suggérant que l' H_2O_2 ait un rôle dans la modification de la structure des parois cellulaires. Notons la découverte récente d'une noduline, Nod22, capable de conférer à *E. coli* par expression hétérologue une protection vis-à-vis de l' H_2O_2 d'origine exogène (Mohammad *et al.*, 2004). Les auteurs suggèrent que cette noduline puisse être impliquée dans la protection du cytosquelette au cours de l'interaction symbiotique.

Enfin, de l' H_2O_2 s'accumule dans les cellules corticales de *M. truncatula* dans les zones occupées par des mycorhizes (Salzer *et al.*, 1999). Cet H_2O_2 est concentré à l'extrémité des hyphes en train de pénétrer la cellule hôte, comme c'est aussi le cas au niveau du site de pénétration des bactéries lors de l'initiation du cordon d'infection (Salzwedel et Dazzo, 1993). Cela suggère l'existence d'une bouffée oxydante impliquée dans le contrôle de la colonisation de la plante hôte (Salzer *et al.*, 1999). En accord avec cette supposition, une bouffée oxydante d' O_2^- dans la zone recourbée du poil absorbant a été mise en évidence immédiatement après l'inoculation de *M. truncatula* (Santos *et al.*, 2001). De l' H_2O_2 a aussi été trouvé dans les parois de cellules infectées et dans des cordons d'infection de nodosités de 5 semaines, suggérant que cette bouffée soit prolongée dans le temps et puisse avoir un rôle dans la régulation du processus infectieux (Santos *et al.*, 2001). Enfin, cette bouffée oxydante pourrait être prolongée par l'acide salicylique (SA), qui, en se liant aux peroxydases telles que RIP1, pourrait les inactiver (van Spronsen *et al.*, 2003).

3.2.2. Les ERO et la fixation d'azote

Les ERO produites au sein de la nodosité peuvent provenir des deux partenaires. Celles produites par le partenaire bactérien sont, en grande partie, indirectement dues à la fixation de l'azote. Ces ERO, si elles sont produites en trop grande quantité, peuvent avoir des effets extrêmement délétères.

3.2.2.1. La respiration des bactéroïdes

La fixation de l'azote est un processus extrêmement coûteux en énergie. Cette énergie provient de la respiration des bactéroïdes (1.2.3.) qui ne peuvent utiliser que l'oxygène comme accepteur terminal d'électrons. Comme il a été vu précédemment (2.1.2.), les fuites électroniques qui ont lieu au niveau des chaînes respiratoires sont susceptibles d'engendrer une forte production d'ERO, extrêmement nocifs pour les deux partenaires symbiotiques et pour la nitrogénase. De plus, lorsque la nitrogénase est au contact de l'oxygène, elle est inactivée irréversiblement et engendre la production d'ERO.

3.2.2.2. La leghémoglobine

Dans la zone de fixation, la réduction de la pression partielle en oxygène est assurée par la leghémoglobine (Lb). Là encore, cette hémoprotéine n'est pas épargnée par les effets délétères de l'oxygène. En effet, elle contient un groupement prosthétique qui lui permet,

comme c'est le cas dans l'hémoglobine, de transporter l'oxygène. Ce transport se fait grâce au fer ferreux Fe^{2+} de l'hème. Ainsi, la leghémoglobine oscille normalement entre deux états : Lb(II) lorsqu'elle est réduite et Lb(II)-O₂ lorsqu'elle est liée à l'oxygène. La forme réduite oxygénée, Lb(II)-O₂, peut s'autooxyder et donner une forme ferrique Lb(III) et le radical O₂^{•-} (Puppo *et al.*, 1981). Sous sa forme Lb(III), la leghémoglobine n'est plus capable de transporter l'oxygène et l'O₂^{•-} produit peut réagir avec la forme Lb(II) pour donner à nouveau de la forme Lb(III). L'O₂^{•-} peut également se dismuter pour donner de l'H₂O₂, qui, en réagissant avec la forme Lb(II), donne la forme ferryl Lb(IV) de la leghémoglobine, inactive là encore. L'H₂O₂ peut également réagir avec la forme Lb(III) et former un radical cationique associé à l'hème (Davies et Puppo, 1992). La Lb radicalaire va se stabiliser en se dimérisant ou en oxydant les lipides membranaires de la membrane péribactéroïdienne (Moreau *et al.*, 1996), qui, provenant de la plante (lipides polyinsaturés), est sensible à la peroxydation. Si le rapport H₂O₂ / Lb est très élevé (3:1), l'hème peut se rompre et libérer du fer dans le milieu (Puppo et Halliwell, 1988). Ce fer va pouvoir réagir avec les ERO présents et engendrer de l'HO[•].

3.2.3. Les ERO dans la sénescence de la nodosité

Comparativement aux autres organes de la plante, les nodosités sont affectées par une sénescence précoce. La Zone IV (ou de sénescence) apparaît chez *Medicago* quatre semaines après infection et finie par envahir tout l'organe. Les ERO semblent avoir un rôle très important dans la sénescence et de grandes quantités d'H₂O₂ ont pu être mises en évidence dans la zone IV, dans les parois des cellules infectées et dans les membranes péribactéroïdiennes (Sigaud, 1998).

Cette sénescence pourrait avoir une importance à double titre :

- Pour la plante : Dans la nature, la sénescence a lieu au moment du remplissage des gousses qui assurent la pérennité du partenaire végétal par dissémination des graines. La sénescence, en mettant fin à la fixation d'azote, permettrait l'arrêt de la consommation d'énergie liée au fonctionnement de la nitrogénase et une re-mobilisation complète des réserves nodositaires vers les parties aériennes de la plante. Notons que Nod22, conférant une résistance hétérologue à l'H₂O₂ chez *E. coli* (Mohammad *et al.*, 2004), est réprimé au moment de la sénescence de la nodosité (Alesandrini *et al.*, 2003).
- Pour la bactérie : La re-différenciation des bactéroïdes en bactéries n'a jamais pu être mise en évidence chez *S. meliloti*. Si celle-ci n'est pas possible, quel serait l'intérêt d'un point de

vue évolutif pour la bactérie de se transformer en bactéroïde ? Comment cet événement aurait-il pu être sélectionné au cours de l'évolution ? La découverte récente d'une nouvelle zone dans les nodosités de *Medicago* (zone V) apporte des éléments de réponse à cette question. Cette zone est une zone de réinfection saprophytique où des bactéries sont relargués tardivement des cordons d'infections au niveau des cellules sénescents (Timmers *et al.*, 2000). Ces bactéries semblent alors se diviser activement sur les restes des bactéroïdes et envahir certaines cellules sénescents. La mort des bactéroïdes pourrait donc avoir un rôle au niveau de la pérennité de l'espèce bactérienne. Après sénescence de la nodosité, de nombreuses bactéries seraient ainsi libérées dans le sol.

3.3. La défense antioxydante de *Sinorhizobium meliloti*

Dans les symbioses bactéries-légumineuses, bien que les facteurs Nod inhibent dans les premières heures la production d'ERO par la plante hôte (Sham et Long, 2003), les ERO sont aussi induites chez la plante hôte après inoculation par *Rhizobium* (Bueno *et al.*, 2001 ; Santos *et al.*, 2001). Cela implique une défense anti-oxydante efficace de la part des deux partenaires symbiotiques (Matamoros *et al.*, 2003) et en particulier de la part du partenaire bactérien qui fera l'objet de notre étude.

3.3.1. Superoxyde dismutases

Des études biochimiques ont permis de mettre en évidence des activités SODs similaires chez la bactérie libre et le bactéroïde (Dimitrijevic *et al.*, 1984 ; Puppo et Rigaud, 1986). *S. meliloti* possède deux gènes codant des SODs :

- Le gène *sodA*, situé sur le chromosome bactérien, code la principale SOD de *S. meliloti*. Cette SOD présente une propriété assez originale puisqu'elle est capable d'accepter le fer ou le manganèse comme cofacteur en fonction de la disponibilité de ces ions dans le milieu (Santos *et al.*, 1999). Un mutant *sodA*⁻ est très affecté dans ses capacités à former des nodosités fonctionnelles (Santos *et al.*, 2000), les bactéries sont retardées au moment de l'infection, et affectées dans leur différenciation en bactéroïdes fixateurs.

- L'analyse de la séquence du génome de *S. meliloti* a permis de mettre en évidence un autre gène codant une Cu/ZnSOD nommé *sodC*. Comme chez *E. coli*, le gène *sodC* de *S. meliloti* possède un peptide d'adressage périplasmique. Ce gène est induit lors des premières étapes de l'infection ce qui suggère que SodC pourrait détoxiquer l'O₂^{•-} provenant de la plante alors que SodA, la SOD cytoplasmique, détoxiquerait l'O₂^{•-} synthétisé par la bactérie

(Ampe *et al.*, 2003). Il est à noter que l'activité SOD correspondant à SodC apparaît en phase stationnaire de croissance et que cette activité est induite en condition de stress salin (Barra, 2003).

3.3.2. Catalases

S. meliloti possède trois catalases KatA, KatB et KatC détectables sur gel d'activité catalase. KatA et KatC sont codées respectivement par les gènes *katA* et *katC* qui ont été clonés et caractérisés avant le début de cette thèse (Hérouart *et al.*, 1996 ; Sigaud *et al.*, 1999). KatA et KatC sont toutes les deux des catalases de type HPII alors que KatB est une catalase peroxydase de type HPI. Il est intéressant de noter qu'au niveau de leur régulation, KatA semble être l'équivalent fonctionnel de *katG*, la HPI d'*E. coli*, et KatC celui de *katE*, la HPII d'*E. coli*. En effet, l'activité catalasique correspondant à KatA est inductible par l' H_2O_2 (Hérouart *et al.*, 1996) et le gène *katC* est induit en phase stationnaire et par de nombreux stress environnementaux (Sigaud *et al.*, 1999). Des simples mutants *katA*⁻ ou *katC*⁻ ne sont pas affectés dans leurs capacités symbiotiques, tant au niveau de l'infection que de la fixation d'azote. En revanche, le double mutant *katA*⁻ *katC*⁻ présente des capacités de nodulation réduite de 25% et fixe trois fois moins bien l'azote atmosphérique que la souche sauvage (Sigaud *et al.*, 1999).

4. BUT DU TRAVAIL

De nombreux éléments suggèrent que les ERO puissent être des acteurs permanents dans la symbiose *Sinorhizobium-Medicago*. A la fois nécessaires au contrôle des premières étapes de l'infection ou lors de la sénescence, et délétères pour la fixation de l'azote et les partenaires symbiotiques lorsqu'elles sont présentes à des concentrations élevées, les ERO semblent intervenir à toutes les étapes de la symbiose. Un contrôle de la balance redox doit donc être assuré tout au long de la vie de la nodosité. Cela implique une régulation extrêmement fine de la défense anti-oxydante chez les deux partenaires symbiotiques.

Ce travail a pour but une meilleure compréhension du rôle et de la régulation de la défense antioxydante de *Sinorhizobium meliloti* et, en particulier, de celui de ses catalases lors de l'établissement et du maintien d'une symbiose fonctionnelle avec *Medicago*. Il permet d'apporter des éléments de réponse aux questions suivantes :

- Les catalases bactériennes sont-elles indispensables à l'établissement et au fonctionnement de la symbiose ?
- Comment les catalases de *S. meliloti* sont-elles régulées ?
- Quel est le rôle de l'H₂O₂ détecté dans les cordons d'infection ?

Ce travail s'organise autour de trois chapitres :

- Le premier chapitre porte sur la caractérisation de l'expression des trois catalases de *S. meliloti* (en conditions libre et symbiotique) et leur implication dans la symbiose. Cette caractérisation a été faite en utilisant le gène rapporteur *lacZ* codant la β -galactosidase et en construisant des fusions *kat-lacZ* afin de localiser précisément les zones de la nodosité où les catalases sont exprimées. Cette expression a été comparée à l'expression des catalases chez la bactérie en condition de croissance libre. La construction d'un double mutant *katB⁻ katC⁻* a également été réalisée. Ce travail a fait l'objet d'un article dans « Molecular Plant-Microbe Interactions ».

I Jamet, A. , S. Sigaud, G. Van de Sype, A. Puppo and D. Hérouart (2003). Expression of the bacterial catalase genes during <i>Sinorhizobium meliloti-Medicago sativa</i> symbiosis and their crucial role during the infection process. <i>Mol. Plant-Microbe Interact.</i> 16: 217-225
--

• Le deuxième chapitre porte sur l'étude de la régulation du gène *katA* et la caractérisation de son régulateur OxyR. Ce travail a été accepté sous réserve de corrections mineures dans « Journal of Bacteriology ».

II **Jamet, A.**, E. Kiss, J. Batut, A. Puppo and D. Hérouart (2004). *katA* catalase gene is regulated by OxyR both in free-living and in symbiotic *Sinorhizobium meliloti*. (accepté sous réserve de modifications)

• Le troisième chapitre porte sur l'étude du rôle de l'H₂O₂ lors de l'établissement de la symbiose. Pour cela, une bactérie surexprimant le gène codant la catalase KatB, a été construite et son phénotype symbiotique caractérisé.

Un article de revue sera présenté dans la discussion générale de cette thèse, cet article a été publié dans « Plant Physiology and Biochemistry ».

III Hérouart, D., E. Baudouin, P. Frendo, J. Harrison, R. Santos, **A. Jamet**, G. Van de Sype, D. Touati and A. Puppo (2002). Reactive oxygen species, nitric oxide and glutathione: a key role in the establishment of the legume-*Rhizobium* symbiosis? Plant Physiol. Biochem. 40: 619-624.

Enfin, un travail présentant la caractérisation de mutants bactériens affectés dans leur synthèse du glutathion sera présenté en annexe. Ce travail a permis, entre autres, de mettre en évidence une surexpression de l'activité catalase chez ces mutants. Ce travail a été accepté sous réserve de corrections mineures dans « Journal of Bacteriology ».

IV Harrison, J., **A. Jamet**, C. I. Muglia, G. Van de Sype, M. O. Aguilar, A. Puppo and P. Frendo (2004). Glutathione plays a fundamental role in growth and symbiotic capacity of *Sinorhizobium meliloti* (accepté sous réserve de modifications)

Ces articles sont référencés dans cette thèse par un numéro en chiffres romains.

RESULTATS

PREMIER CHAPITRE

IMPLICATION DES CATALASES DE *S. MELILOTI* DANS LA SYMBIOSE



1. CHAPITRE 1 :

Implication des catalases de *S. meliloti* dans la symbiose.

Afin de définir les conditions dans lesquelles *S. meliloti* utilise ses trois catalases (KatA, KatB et KatC) et leurs rôles respectifs lors de l'établissement de la symbiose et du fonctionnement d'une nodosité fixatrice d'azote, il est apparu nécessaire de caractériser l'expression des catalases bactériennes en conditions libre et symbiotique.

Cette caractérisation a été faite en utilisant le gène de la β -galactosidase (*lacZ*) comme gène rapporteur. Des fusions *katA-lacZ* et *katB-lacZ* ont été construites (**article I**), la fusion *katC-lacZ* ayant été construite précédemment (Sigaud *et al.*, 1999). Ces trois constructions ont été transférées et recombinaées dans la souche GMI211 qui ne possède pas d'activité β -galactosidase endogène (*LacZ*⁻). Les trois souches obtenues GKAZ01 (GMI211 *katA-lacZ*), GKBZ01 (GMI211 *katB-lacZ*), et GKCZ01 (GMI211 *katC-lacZ*) ont ainsi permis de caractériser l'expression des gènes *kat*.

Le profil catalasique de *S. meliloti* (souches Rm5000 et GMI211) a été établi précédemment (Sigaud *et al.*, 1999) ; alors que l'activité correspondant à KatB est présente de façon constitutive, les activités KatA et KatC sont présentes respectivement en phase exponentielle et en phase stationnaire de croissance. Il existe une parfaite corrélation entre l'expression des fusions *kat-lacZ* et le profil des activités catalasiques tout au long de la croissance (**article I**), les catalases sont donc régulées principalement à un niveau transcriptionnel.

L'inductibilité des différentes fusions a été testée (**article I** et Tableau 1) en conditions de stress (chaleur, NaCl, éthanol, paraquat et H₂O₂). Comme dans la souche RKCZ01 (Sigaud *et al.*, 1999), la fusion *katC-lacZ* est inductible dans la souche GMI211 en phase exponentielle de croissance par tous les stress testés, excepté l'H₂O₂. En phase stationnaire de croissance, la fusion, probablement à son maximum d'induction, n'est pas inductible. Aucune induction n'a été détectée avec la fusion *katB-lacZ*. Parmi les traitements testés, seul l'H₂O₂ induit la fusion *katA-lacZ*, mais celle-ci n'est pas observable en phase stationnaire de croissance.

Tableau 1 : Effet de différents stress sur la régulation de l'expression des catalases. Les différentes souches ont été soumises pendant une heure aux stress indiqués.

		Activité β -galactosidase ^(a)					
		Phase exponentielle ^(b)			Phase stationnaire ^(c)		
Traitements \ Souches		GKAZ01	GKBZ01	GKCZ01	GKAZ01	GKBZ01	GKCZ01
Pas de traitement		70 ± 4	450 ± 12	110 ± 12	63 ± 5	494 ± 6	566 ± 170
Chaleur (37°C)		56 ± 4	430 ± 25	387 ± 17	65 ± 9	503 ± 21	661 ± 51
NaCl (4%)		62 ± 8	425 ± 32	344 ± 41	69 ± 6	527 ± 12	661 ± 98
Ethanol (4%)		73 ± 3	432 ± 22	287 ± 21	52 ± 12	468 ± 20	492 ± 77
Paraquat (1mM)		71 ± 9	476 ± 37	345 ± 38	71 ± 8	519 ± 12	646 ± 107
H ₂ O ₂ (1mM)		430 ± 23	409 ± 44	152 ± 13	52 ± 7	500 ± 20	599 ± 96

^a Les valeurs ont été obtenues en utilisant des triplicata et sont données en unités Miller ± erreur standard.

^b DO₆₀₀ = 0.4, les bactéries ont été inoculées à DO₆₀₀ = 0.05 et ont poussé une nuit.

^c DO₆₀₀ > 3, les bactéries ont poussé 72 heures.

L'inductibilité de la fusion *katA-lacZ* par l'H₂O₂ a été caractérisée au cours de la croissance. Des fractions de la culture ont été prélevées et traitées ou non par de l'H₂O₂. Le traitement se présente sous la forme de 5 pulses de 200 μ M H₂O₂ chacun toutes les 12 minutes (Figure 17). L'activité β -galactosidase a ensuite été mesurée selon la méthode de Miller. L'inductibilité est modérée (x 2) en début de phase exponentielle. Elle atteint un maximum (x 5) en milieu de phase exponentielle (t=16h, DO₆₀₀=0,4) et diminue jusqu'à devenir nulle en phase stationnaire de la croissance.

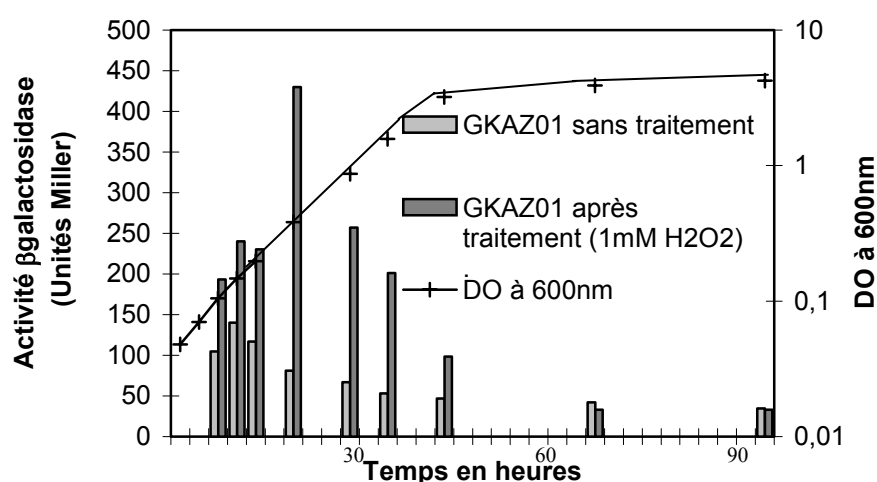


Figure 17 : Induction de la fusion *katA-lacZ* par l'H₂O₂ au cours de la croissance bactérienne de la souche GKAZ01.

La régulation de l'expression des catalases *in planta* au cours de la symbiose a été étudiée grâce aux différentes fusions transcriptionnelles promoteur *kat-lacZ*. Il a été mis en évidence une expression spatio-temporelle différentielle des trois catalases au cours du développement de la nodosité (Figure 18 et Figure 3 de l'article). Alors que le gène *katB* est exprimé de façon constitutive, *katA* ne s'exprime que chez les bactéroïdes et *katC* chez les bactéries non différenciées (zone II d'infection et zone V de réinfection saprophytique).

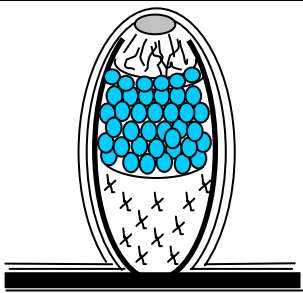
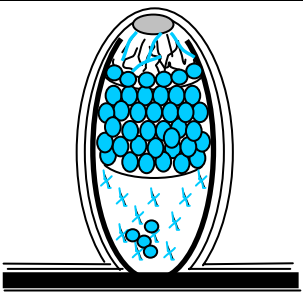
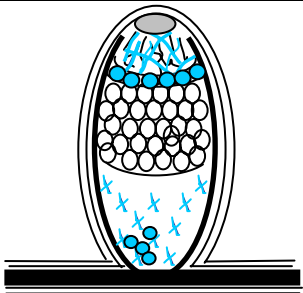
<i>katA</i>	<i>katB</i>	<i>katC</i>
Zone III Bactéroïdes	Expression constitutive Bactéries et bactéroïdes	Zone II, IV et V Bactéries indifférenciées
		

Figure 18 : Représentation schématique de la localisation de l'expression des gènes codant les catalases au sein de la nodosité. Cellule infectée où la fusion s'exprime ● ou ne s'exprime pas ○. Cordon d'infection où la fusion s'exprime ↙ ou ne s'exprime pas ↘.

Dans les cordons d'infection, seuls les gènes *katB* et *katC* sont exprimés. Il peut sembler étonnant que *KatA*, seule catalase dont le gène est inductible par l' H_2O_2 , ne soit pas induite dans les cordons où a lieu une bouffée oxydante prolongée produite par la plante (Santos *et al.*, 2001). Cela amène à l'idée selon laquelle la production d'ERO, observée dans les cordons d'infection et dans les jeunes nodosités, ne mettrait pas la bactérie en situation de stress oxydatif, mais aurait un rôle dans le développement des nodosités.

Dans la zone III de fixation, les gènes *katA* et *katB* sont fortement exprimés. Dans cette zone, l'intense activité respiratoire du microsymbiote, pour subvenir aux dépenses énergétiques occasionnées par la réduction du N_2 , est de nature à provoquer une production importante d'ERO. De plus, la léghémoglobine peut s'autooxyder et conduire à la formation d' H_2O_2 pouvant diffuser vers le bactéroïde.

Enfin, dans la zone IV, où la dégénérescence des cellules végétales infectées et des bactéroïdes est importante, les gènes *katB* et *katC* s'expriment seulement dans les quelques cordons d'infection persistant entre les cellules végétales (Paau *et al.*, 1980), ce qui confirme

la présence de bactéries vivantes et indifférenciées dans cette zone IV de la nodosité. La présence de cellules végétales colorées en zone de sénescence très tardive (Zone V) des nodosités infectées par la souche GKCZ01, confirmerait l'hypothèse selon laquelle quelques cellules végétales subirait une seconde invasion bactérienne, non symbiotique mais saprophyte sans différenciation des bactéries (Timmers *et al.*, 2000).

La construction d'un double mutant *katB*⁻*katC*⁻ a été réalisée (**article I**). Alors que des simples mutants *katA*⁻, *katB*⁻ ou *katC*⁻ ne sont pas affectés dans leurs capacités symbiotiques, un double mutant *katB*⁻*katC*⁻ est extrêmement affecté lors des premières étapes de l'infection (**article I**). L'expression des différentes catalases *in planta* est cohérente avec les phénotypes observés chez les doubles mutants *katB*⁻*katC*⁻ et *katA*⁻*katC*⁻. En effet, la souche MK5004 (*katB*⁻*katC*⁻), qui ne possède plus que le gène *katA*, est très affectée dans ses capacités symbiotiques et n'est pas relarguée correctement. Le mutant MK5003, qui ne possède plus que le gène *katB* est affecté dans ses capacités symbiotiques de façon plus modérée. Il faut également remarquer que, comme pour le double mutant *katA*⁻*katC*⁻, la double mutation *katB*⁻*katC*⁻ affecte peu la croissance de la bactérie libre *in vitro*. Cela conforte la conclusion de Peter Loewen dans sa revue (Loewen *et al.*, 2000) qui considère que : « les catalases ne sont pas essentielles pour la croissance et la survie des bactéries dans les conditions de laboratoires mais qu'elles jouent des rôles importants dans de nombreuses situations environnementales ».

Cette étude met clairement en évidence le rôle fondamental des catalases lors de l'établissement de la symbiose.

Article

Expression of the bacterial catalase genes during *Sinorhizobium meliloti*-*Medicago sativa* symbiosis and their crucial role during the infection process

**ALEXANDRE JAMET, SAMUEL SIGAUD, GHISLAINE VAN DE SYPE, ALAIN PUPPO, AND
DIDIER HEROUART**

3/9

DEUXIEME CHAPITRE

ROLE DU REGULATEUR OXYR CHEZ *SINORHIZOBIUM MELILOTI*

2. CHAPITRE 2 :

Rôle du régulateur OxyR chez *Sinorhizobium meliloti*.

Le séquençage du génome de la souche Rm1021 de *S. meliloti* (Galibert *et al.*, 2001) a révélé la présence d'une phase ouverte de lecture (SMc00818) en amont et en sens opposé de *katA*, présentant de fortes homologues (40% d'identité) avec le régulateur OxyR d'*E. coli*. Ce régulateur est un activateur fort du gène *katG* en présence d'H₂O₂. Chez *S. meliloti*, *katA* étant la seule catalase induite par l'H₂O₂ exogène (Hérouart *et al.*, 1996), ce gène annoté *oxyR* est donc un candidat tout désigné pour coder le régulateur de *katA*.

Cette hypothèse est renforcée par l'étude comparative de la région intergénique *oxyR-katA* de *S. meliloti*, au niveau de la boîte de fixation OxyR, avec la séquence promotrice d'*oxyR* d'autres bactéries comme *Brucella abortus* (Kim et Mayfield, 2000), *Mesorhizobium loti* (Kaneko *et al.*, 2000), *Xanthomonas campestris* (Loprasert *et al.*, 2000) et d'*E. coli* (Figure 19).

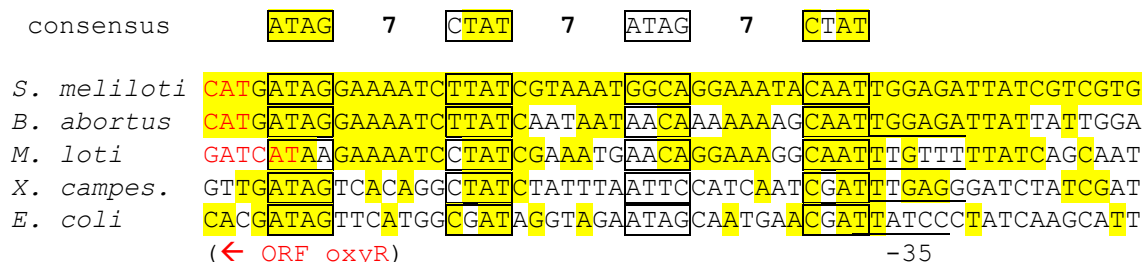


Figure 19 : Alignement de séquences des zones promotrices hypothétiques d'*oxyR* de *S. meliloti*, *Brucella abortus*, *Mesorhizobium loti*, *Xanthomonas campestris* et *E. coli*.

La construction et l'analyse d'un mutant *oxyR*, nommé Rm*oxyR*, a permis de montrer que le gène *katA* est régulé par OxyR aussi bien en condition de croissance libre qu'en condition symbiotique (**article II**). Cette régulation se ferait de manière duale avec répression de *katA* par OxyR en absence d'H₂O₂ et induction de *katA* en présence d'H₂O₂ (**article II**).

De plus, une induction d'un facteur 7 de l'expression d'*oxyR* a été mise en évidence chez les bactéroïdes comparativement aux bactéries libres (**article II**). L'analyse de la séquence promotrice d'*oxyR* permet de mettre en évidence des séquences présentant de fortes

homologies avec les boîtes de fixation de NifA et du facteur alternatif de transcription $\sigma 54$ codé par *rpoN* (Figure 20). Ces deux boîtes sont placées dans l'ordre : boîte NifA – boîte $\sigma 54$ – début de transcription d'*oxyR*. De plus, le début de transcription supposé d'*oxyR* présente de fortes homologies de séquence avec le début de transcription du gène *nifH*, également régulé par NifA/ $\sigma 54$.

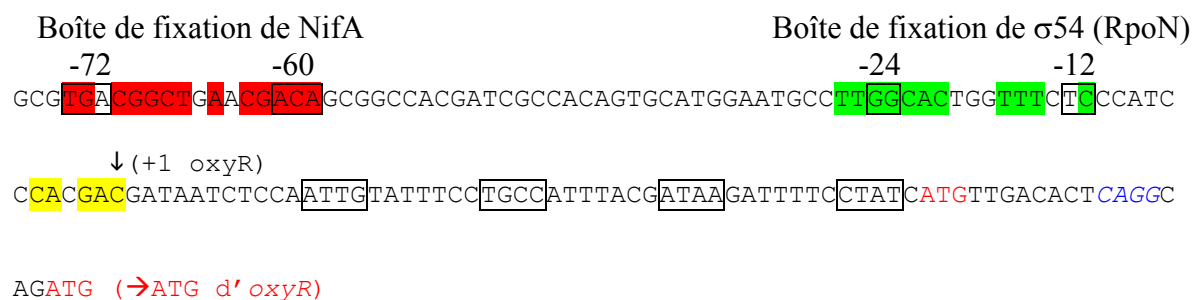


Figure 20 : Séquence promotrice d'*oxyR*. Motif TGT-(N₁₀)-ACA (boîte NifA) : les homologies avec le promoteur de *nifH* sont surlignées en rouge. Motif GG-(N₁₀)-GC (boîte $\sigma 54$) : les homologies avec les promoteurs de *fixA*, de Sma0824 ou de *nifH* sont surlignées en vert. Les homologies avec le début de transcription du gène *nifH* sont surlignées en jaune.

L'induction d'*oxyR* observée chez les bactéroïdes pourrait donc se faire *via* le régulateur NifA et le facteur alternatif de transcription $\sigma 54$ qui forment un couple majeur dans la régulation de la fixation d'azote. Afin de tester cette hypothèse, une construction portant la fusion *oxyR-lacZ* a été réalisée en utilisant le plasmide pBBRMCS-5 (Gm^r) replicable chez *S. meliloti* (Figure 21). Un fragment de 300 bp, provenant du vecteur pGEM-11, contenant le promoteur du gène *oxyR* a été inséré dans le plasmide pBBRMCS-5. Les transformants résistants à la gentamicine ont été sélectionnés et la construction vérifiée par digestion *SalI-PstI*. Le vecteur ainsi obtenu a été nommé pBBRoxyR. La cassette *lacZ/Nm^r* (4,8 kb), extraite du plasmide pKOK5 grâce à une digestion par l'enzyme de restriction *SalI*, a été insérée au niveau des sites *SalI* du vecteur pBBRoxyR. Les transformants ont été sélectionnés sur milieu contenant de la gentamicine et de la kanamycine. La présence et le sens d'insertion de la cassette *lacZ/Nm^r* ont été vérifiés par digestion *EcoRI* et le vecteur obtenu nommé pBBRoxyR-*lacZ*.

Le plasmide pBBRoxyR-*lacZ* a été transféré par conjugaison triparentale dans les souches Rm1021, *nifA⁻* et *nifH⁻*. La souche *nifH⁻* ne devrait pas *a priori* être affectée dans la

régulation d'*oxyR* et a donc servi de souche contrôle car elle est non fixatrice et forme des nodosités semblables à celles formées par la souche *nifA*⁻.

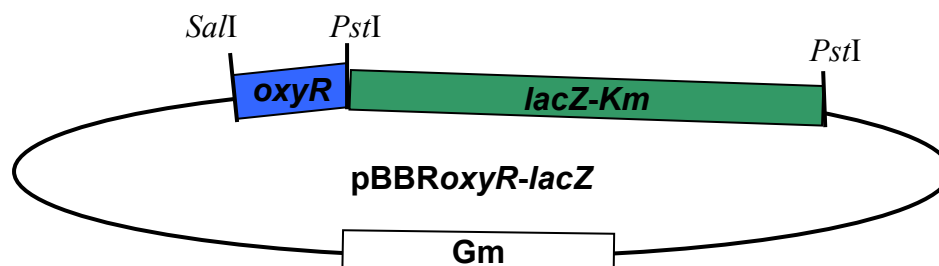


Figure 21 : Schéma du vecteur pBBRoxyR-lacZ

Les différentes souches bactériennes obtenues ont été utilisées pour infecter 3 lots de 72 plantes. Cinq semaines après l'infection, les nodosités ont été récupérées et l'activité β -galactosidase des bactéroïdes mesurée. Cette activité est identique pour les souches Rm1021 (1095 ± 106 U Miller/ μ g de protéine) et *nifA*⁻ (964 ± 87 U Miller/ μ g de protéine) ce qui indiquerait que NifA n'est pas un régulateur d'*oxyR* dans les conditions testées.

Article

***katA* catalase gene is regulated by OxyR both in free-living and in
symbiotic *Sinorhizobium meliloti***

**ALEXANDRE JAMET, ERNŐ KISS, JACQUES BATUT, ALAIN PUPPO, AND
DIDIER HEROUART**

1 ***katA* catalase gene is regulated by OxyR both in free-living and in**
2 **symbiotic *Sinorhizobium meliloti*.**

3
4
5
6
7
8

Alexandre Jamet,¹ Ernő Kiss,² Jacques Batut,² Alain Puppo,¹ and Didier Hérouart^{1*}

9 ¹Laboratoire Interactions Plantes-Microorganismes et Santé Végétale, UMR Institut National
10 de la Recherche Agronomique (1064) - Université de Nice Sophia-Antipolis - Centre National
11 de la Recherche Scientifique (6192), 400 Route des Chappes, BP 167, F-06903 Sophia
12 Antipolis Cedex, France, and ²Laboratoire des Interactions Plantes Micro-organismes, UMR
13 Centre National de la Recherche Scientifique (2594) - Institut National de la Recherche
14 Agronomique (441), Chemin de Borde Rouge, BP 27, F-31326 Castanet Tolosan Cedex,
15 France

16
17

18 Running title: Regulation of *katA* catalase gene in *S. meliloti*

19
20

21 Section: Plant Microbiology

22
23

24 * Correspondence and requests for materials should be addressed to Didier Hérouart.

25 E-mail herouart@unice.fr; Tel. (+33)4 92 38 66 36. Fax. (+33)4 92 38 66 40.

1 **SUMMARY**

2

3 The characterization of an insertion *oxyR* mutant provides evidences that *katA*, encoding the
4 unique H₂O₂ inducible HPII catalase, is regulated by OxyR not only in free-living but also in
5 symbiotic *S. meliloti*. Moreover, *oxyR* is expressed independently of exogenous H₂O₂ and
6 self-down regulates its expression in *S. meliloti*.

7

1 *Sinorhizobium meliloti* is a ubiquitous soil α -proteobacterium able to establish a symbiosis
2 with alfalfa (*Medicago sativa*) and related legumes, characterised by the formation of root
3 nodules. The exchange of sophisticated recognition signals between the plant and the bacteria
4 leads to the entering of bacteria into the root hairs and to the development of primordia cells
5 in the cortex where the bacteria are released (21, 37). Inside the nodule, the bacteria
6 differentiate into their symbiotic form, the bacteroids, able to reduce nitrogen to ammonia,
7 which is assimilated by the plant. The key enzyme of nitrogen fixation, the nitrogenase, is
8 submitted to a fragile equilibrium. To avoid its rapid and irreversible inactivation by oxygen,
9 a diffusion barrier in the cortex of nodules limits permeability to oxygen (40) and the plant
10 oxygen carrier, leghaemoglobin, delivers the necessary oxygen to the bacteroids (9).
11 Nevertheless, a high respiration rate is required to support the nitrogen fixation process and
12 this leads to the generation of large amounts of reactive oxygen species (ROS) such as
13 superoxide radicals (O_2^-) and hydrogen peroxide (H_2O_2), which can also inactivate the
14 nitrogenase (31). ROS have also been detected in nodules (34); H_2O_2 accumulation all around
15 bacteria was observed in some infection threads but never inside bacteria or bacteroids
16 indicating that they contain an efficient H_2O_2 -scavenging system.

17 To cope with H_2O_2 , *S. meliloti* possesses three catalases encoded by three different genes:
18 two monofunctional catalases (HP II), KatA (12) and KatC (36), and one bifunctional catalase-
19 hydroperoxidase (HPI), KatB (12). The catalase genes are differentially expressed during
20 free-living growth, oxidative stress and nodule establishment (13). *katA* expression has been
21 detected during the exponential phase of free-living bacteria only and *katA* is the unique
22 catalase gene inducible by exogenous H_2O_2 . In *Escherichia coli*, inductibility by H_2O_2 and
23 expression in exponential phase have been observed for *katG* catalase gene encoding the
24 catalase-hydroperoxidase HPI (38). The H_2O_2 induction of *katG* requires the positive activator
25 OxyR (26), which directly senses oxidative stress (18, 41).

26 **Analysis of the *oxyR-katA* genetic region.** The complete genome sequence of *S. meliloti*
27 (10) revealed a putative *oxyR* gene (SMc00818) in front of *katA*. The *oxyR* homologous gene
28 in *S. meliloti* is located 193 bp upstream of and in the opposite strand to *katA*. The regulation
29 of an HP II-like catalase by OxyR has been described in *B. abortus* only (17). The alignment
30 of *oxyR-katA* intergenic region from *S. meliloti* and *B. abortus* (Fig. 1A) revealed highly
31 conserved regions especially in the DNA-binding site described in *B. abortus* (16). The *S.*
32 *meliloti* sequence (ATAG-N₇-TTAT-N₇-GGCA-N₇-CAAT) is identical to the *B. abortus*
33 sequence, except that GGCA is replaced by AACA. Moreover, the OxyR predicted amino
34 acid sequences (317 amino acid) from *S. meliloti* and *B. abortus* showed 53% identity and

1 their alignment indicated that the OxyR ATG initiation codon of *S. meliloti* could be located
2 18 bp upstream of the annotated translational start codon. Six amino acids (MLTLRQ) could
3 be added to the N-terminal region, four of them being identical in both bacteria (MxTxRQ).
4 Thus, the newly annotated *oxyR* gene could be located 175 bp upstream of *katA* and would
5 encode a 317 amino acid protein in *S. meliloti*. The two critical cysteine C₂₀₀ and C₂₀₉ which
6 could be implicated in the activation of OxyR, are conserved in the OxyR of *S. meliloti*.

7 **Construction of an *oxyR*-insertion mutant and its role in the adaptation to H₂O₂.** To
8 determine the role of *oxyR* in H₂O₂ response in *S. meliloti*, an *oxyR* mutant, named R*moxyR*,
9 was constructed in the parental strain Rm1021 using insertional inactivation with a *uidA*
10 transcriptional fusion. Genomic DNA from Rm1021 was amplified by PCR using the
11 oligonucleotides sm818a (5' CTC GCG GAT GTC GGC AGA TTG G) and sm818b (5' AAA
12 ACA GCG CCC GGG TAA CGA T) (Fig. 1A). The PCR fragment (271 bp) was cloned into
13 pCR-TOPO vector (Invitrogen), followed by a double digestion with *Bam*HI and *Xba*I in
14 order to clone this fragment upstream of the *uidA* gene present into pVO155 suicide vector
15 (29). The mutation was introduced by single-reciprocal recombination into the chromosome
16 of *S. meliloti* Rm1021 by triparental conjugation as described (11). The disruption of the *oxyR*
17 gene was confirmed by Southern blots using vector and gene specific probes respectively
18 (data not shown).

19 Growth inhibition of R*moxyR* strain by H₂O₂ was tested with the halo assay method,
20 which gives a long-term test of resistance to H₂O₂ exposure. Aliquot (200 μL) of 0.4-0.5
21 OD₆₀₀ *S. meliloti* cultures were plated onto LB-MC agar plates. Paper discs (6mm diameter)
22 were impregnated with 5 μL of H₂O₂ (1M) and placed in the center of the *S. meliloti* plates.
23 After 2-3 days incubation at 30°C, diameters of the complete growth inhibition zone averaged
24 26 mm and 49 mm for the wild-type Rm1021 strain and the R*moxyR* mutant, respectively.
25 The R*moxyR* strain complemented with the pBBR-*oxyR* plasmid carrying the complete *oxyR*
26 gene showed a growth inhibition zone of 25 mm. To construct the pBBR-*oxyR* plasmid, a
27 PCR-fragment carrying the *oxyR* gene, the complete intergenic *oxyR*-*katA* region and the
28 beginning of the *katA* gene was amplified using the oligonucleotides sm819
29 (5'GCGCTCGCGGTTCTGGTG) and sm817 (5'CTTGCGCCCGATTCCTGTC),
30 subcloned into pCR-TOPO vector and cloned in the vector pBBRMCS-3 using the sites *Spe*I
31 and *Apa*I. In this assay, R*moxyR* strain appears to be more sensitive to H₂O₂ than its parental
32 strain, indicating that *oxyR* plays important role in the protection of *S. meliloti* against the
33 activated species.

1 To further investigate the role of OxyR in the adaptation of *S. meliloti* to H₂O₂, Rm1021
2 and RmoxylR strains in exponential phase (OD₆₀₀ = 0.4-0.5) were pretreated for 1h or not with
3 a sub-lethal dose of H₂O₂ (1 mM), which are known to activate OxyR in *E. coli* (41). Cultures
4 were then treated with a lethal dose of H₂O₂ (20mM) for various times, and survival was
5 assessed by plating dilutions onto LB-MC. With a pretreatment, Rm1021 strain was more
6 resistant to H₂O₂ than RmoxylR indicating that *oxyR* is required for adaptation to H₂O₂. In
7 contrast, the pretreatment had not effect on the survival of RmoxylR to H₂O₂. Unexpectedly,
8 without H₂O₂ pretreatment, RmoxylR mutant was more resistant to H₂O₂ than the parental
9 strain. A similar pattern has been observed for an *oxyR* mutant of *B. abortus*, which was more
10 resistant to H₂O₂ than a wild-type strain when bacteria were not pretreated with H₂O₂ (16).

11 **OxyR regulates *kata* expression in free-living conditions.** KatA is the major catalase
12 component of an adaptive response to H₂O₂ (12). To confirm that the results described above
13 were due to KatA deregulation, RmoxylR mutant and its parental strain were analysed for total
14 catalase activity spectrophotometrically (Fig. 2A) by following the decomposition of H₂O₂ at
15 240 nm (15) and on native polyacrylamide gel using negative DAB staining (Fig. 2B) as
16 previously described (5, 12) with or without H₂O₂ pretreatment. It appeared clearly that the
17 increases of total catalase activity in the different conditions (Fig. 2A) were due solely to
18 KatA and not to KatB and KatC (Fig. 2B). Upon exposure to H₂O₂, no increase of KatA level
19 was observed in the RmoxylR mutant strain confirming the hypothesis that OxyR acts as an
20 activator of KatA upon H₂O₂ exposure. Moreover, the basal KatA level in RmoxylR was
21 higher than in the parental strain Rm1021 without H₂O₂ treatment, which is consistent with
22 the higher resistance observed in RmoxylR strain. No difference was observed in catalase
23 activity patterns and in total catalase activity of Rm1021 and RmoxylR with or without H₂O₂
24 pretreatment in late stationary phase (data not shown). To verify that KatA deregulations were
25 due to modifications of *kata* transcription, the accumulation of *kata* transcripts was quantified
26 by northern blotting in Rm1021 and RmoxylR strains (Fig. 2C). RNAs were isolated and
27 separated by electrophoresis as previously described (1, 3), blotted on a nylon membrane and
28 probed with ³²P-labeled *kata* probe corresponding to a 450 bp *EcoRI-PstI* fragment from
29 pBSKA1-1 (12). With or without H₂O₂ treatment, a single 1.6 kb hybridisation band was
30 detected in each strain (Fig. 2C). Variations of *kata* RNA levels, measured with a phosphorus
31 imager, and total catalase activities (Fig. 2A) were perfectly correlated indicating that the
32 observed deregulation is essentially at the transcriptional level. To determine the *kata*
33 transcription start site in oxidative or non-oxidative conditions, primer extension experiments
34 were performed using RNAs from Rm1021 and RmoxylR strains treated or not with H₂O₂

1 (Fig. 2D) as described on The Long Lab Home Page
2 (<http://cmgm.stanford.edu/biology/long/protocols.htm#primer>), using primer pextkatA 5'
3 GGTGGTGGTGCATCGTCGGACGATCTGTCAT specific to *katA* labeled with [γ - 32 P]dATP.
4 DNA sequencing was performed using CycleReader DNA sequencing Kit (MBI Fermentas)
5 using [α - 33 P]dCTP. The transcription start site is located at G (Fig. 2D), corresponding to
6 position 103 bp upstream of the *katA* translational start codon, ATG, which is consistent with
7 the hypothetical -35 (TGGAGA) and -10 (GAGAA) boxes, and the OxyR binding site (Fig.
8 1A). The different intensities of the signal for primer extension analysis were also in
9 agreement with the northern analysis and no change of +1 position was observed under the
10 different conditions tested.

11 An *oxyR* gene has been identified in 31 bacterial genomes (6, 27). The position of *oxyR* is
12 very variable in the different bacterial genomes, but it is often next to a gene involved in
13 oxidative stress protection and regulated by OxyR: for example, *ahpC* in *Mycobacterium*
14 *tuberculosis* (7) and *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (25), *dps* in *Bacteroides fragilis*
15 (32), *oxyS* in *E. coli* (4), *recG* in *Pseudomonas aeruginosa* (28), *kat* in *Brucella abortus* (17).
16 Common organization between *oxyR* and catalase genes is observed in most *Rhizobiales*
17 studied so far such as *S. meliloti*, *Agrobacterium tumefaciens*, *B. abortus*, *Mesorhizobium loti*,
18 *Rhizobium etli*, and *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*. Nevertheless, OxyR potentially
19 regulates a *kat* gene encoding a monofunctional catalase (HP1) in *S. meliloti* and *B. abortus*
20 only, whereas in other *Rhizobiales*, *oxyR* is localized in front of a catalase gene encoding a
21 bifunctional catalase-hydroperoxidase (HPI).

22 ***oxyR* expression in free-living conditions.** To analyse the expression of *oxyR* gene and
23 its regulation by H₂O₂, we followed the level of β -glucuronidase activity in the R*moxyR*
24 strain, which carried an *oxyR::uidA* fusion, using p-nitrophenyl β -D-glucuronide as the
25 substrate, according to methods previously described (14). With or without H₂O₂ treatment
26 similar gus activities were observed in R*moxyR* (5.9 and 6 units per μ g of proteins
27 respectively). In R*moxyR* complemented by pBBR-*oxyR* plasmid, H₂O₂ treatment did not
28 modify the gus activity either (3.5 and 3.3 units per μ g of proteins respectively). This non-
29 induction of *oxyR* expression after H₂O₂ exposure indicates that *oxyR* is constitutively
30 expressed, independently of exogenous H₂O₂. Nevertheless, a reduction of β -glucuronidase
31 activity was observed in R*moxyR* complemented by pBBR-*oxyR* plasmid compared to
32 R*moxyR* mutant, indicating that *oxyR* self-down regulates its expression like in all bacteria
33 species studied so far (27).

1 **OxyR regulates *katA* expression *in planta*.** The effects of *oxyR* disruption on nodulation
2 and fixation capacities of the bacteria were analyzed by infection of *Medicago sativa* and
3 *Medicago truncatula* plantlets with the Rm*oxyR* mutant and the Rm1021 strain as control. No
4 significant reduction of nodulation and nitrogen fixation capacity were observed in Rm*oxyR*
5 mutant compared to Rm1021 (data not shown).

6 To analyse the role of OxyR regulator on *katA* regulation *in planta*, plants were infected
7 with bacterial strains carrying *katA-lacZ* plasmid-fusions. Using the two *SacI* sites present in
8 the *oxyR* gene and in the polylinker of the vector of pBBR-*oxyR* plasmid, the *oxyR* gene was
9 disrupted by deletion resulting in the pBBR-*doxyR* plasmid. A 3.7 kb *PstI-PstI* fragment from
10 pKOK5 vector containing the promoterless *lacZ*-Km^r cartridge was inserted in the *PstI* site of
11 pBBR-*oxyR* and pBBR-*doxyR* plasmids. The recombinant plasmids harbouring the correct
12 *katA-lacZ* orientation fusions were selected and noted respectively as pRKAZ and pdRKAZ
13 (Fig. 1B); they were introduced in the parental Rm1021 strain (named 1021-pRKAZ and
14 1021-pdRKAZ) and in the Rm*oxyR* mutant (named *oxyR*-pRKAZ and *oxyR*-pdRKAZ),
15 respectively. To validate the H₂O₂ inductibility of these *katA-lacZ* fusions in the different
16 genetic backgrounds, the β-galactosidase activity was measured for the different strains
17 treated (+) or not (-) with 1 mM H₂O₂ for 1 hour (Table 2) using o-nitrophenyl β-D-
18 galactoside as previously described (24). The results clearly indicated that 1021-pRKAZ,
19 1021-pdRKAZ and *oxyR*-pRKAZ strains showed a similar H₂O₂ induction pattern. In
20 contrast, the *oxyR* mutant harbouring the *oxyR* truncated-*katA-lacZ* fusion (*oxyR*-pdRKAZ)
21 was deregulated which is consistent with our results presented in Fig. 2. Moreover, the
22 providing of a full-length *oxyR* in trans in the Rm*oxyR* mutant (*oxyR*-pRKAZ) restore a wild-
23 type basic *katA* level when H₂O₂ is not present. In order to keep a ratio, one *oxyR* gene for one
24 *katA*-promotor, results obtained with strains 1021-pRKAZ and *oxyR*-pdRKAZ were only
25 taken into account for *in planta* experiments. Despite the absence of antibiotic selection
26 pressure during symbiotic process, a good stability of recombinant plasmids pRKAZ and
27 pdRKAZ was measured in bacteria by testing antibiotic resistance of reisolated bacteria from
28 5-weeks-old root nodules (93% and 95% of resistance respectively). Analysis of total β-
29 galactosidase activity in 5-week-old nodule extracts showed that the expression of the *katA*-
30 *lacZ* fusion was higher in 1021-pRKAZ (1,095 ± 106 Miller units per μg of protein) than in
31 *oxyR*-pdRKAZ (469 ± 12 Miller units per μg of proteins), indicating that OxyR acts also as an
32 activator for *katA* in symbiotic bacteria. The histochemical detection of β-galactosidase
33 activity was performed as previously described (2) using X-gal as a substrate (Fig. 3A to 3D).

1 Nodules sections (150 μm) were obtained with a vibratome 1000 Plus (Labonord, France),
2 mounted on slides for observation and photography with an Olympus microscope. Four days
3 after infection, analysis of root hairs revealed no staining inside most infection threads with
4 1021-pRKAZ (Fig. 3A), whereas a blue staining in all the infection threads was observed with
5 the *oxyR*-pdRKAZ (Fig. 3C). Analysis of 5-week-old nodules (Fig. 3B and D) showed that
6 the expression of *katA-lacZ* fusion is strongly detected in nitrogen fixing bacteroids (zone III)
7 for both 1021-pRKAZ and *oxyR*-pdRKAZ strains (Fig. 3B and D). In contrast, a significant
8 detection of β -galactosidase was observed in infection zone II with the *oxyR*-pdRKAZ strain
9 only (Fig. 3D). These results are consistent with those observed in free-living conditions: *katA*
10 is constitutively expressed in the *Rmoxr* mutant. In fixing bacteroids a high respiration
11 activity produces reactive oxygen species including H_2O_2 , which is dismutated into O_2 and
12 H_2O mainly by KatA. Thus, these results suggest that fixing bacteroids could be submitted to
13 H_2O_2 stress.

14 ***oxyR* expression in planta.** To analyse the expression of *oxyR* gene during the
15 development of the root nodule, *Medicago sativa* plantlets were infected with *Rmoxr* mutant
16 strain harbouring the *oxyR::uidA* fusion. The histochemical detection of β -glucuronidase
17 activity was performed using X-gluc as substrate as previously described (14). Four days after
18 infection, analysis of root hairs revealed no staining (Fig. 3E), suggesting that the *oxyR*
19 expression level was under the threshold detection level at this step of infection. In contrast,
20 analysis of 5 week-old nodules showed that *oxyR::uidA* is detectable solely in nitrogen fixing
21 bacteroids (zone III) (Fig. 3F) and β -glucuronidase activity from purified *Rmoxr* bacteroids
22 was exacerbated (36 units per μg of proteins) compared to the activity observed in free-living
23 bacteria (5 units per μg of proteins). This result indicates an over-expression of the *oxyR* gene
24 transcription in bacteroids. Despite the absence of β -glucuronidase activity detection inside
25 infection threads, analysis of *katA* expression with the 1021-pRKAZ and *oxyR*-pdRKAZ
26 strains showed that OxyR could also repress *katA* expression in most infection threads and in
27 zone II of mature nodules. An expression level of the *oxyR-uidA* fusion under the detection
28 threshold could explain these contradictory results. On the other hand, contrarily to our
29 previous observations with the GKAZ01 strain (13), the expression of the reporter gene in the
30 1021-pRKAZ has also been detected in some infection threads, which could be correlated
31 with H_2O_2 accumulation pattern observed during symbiotic process (34). Recent results
32 suggest that H_2O_2 could be required for the progression of infection threads (30). It may be

1 proposed that these necessary H₂O₂ pulses occurring in infection threads could activate OxyR
2 and periodically derepress *kata* expression.

3 Despite the fact that the production of a truncated OxyR in the *oxyR* mutant could disturb
4 the regulation of *kata* gene, our results suggest that OxyR could potentially repress the *kata*
5 gene expression in the absence of exogenous H₂O₂ in *S. meliloti*. Indeed, the possibility that
6 OxyR could act as a repressor of a catalase gene has been recently demonstrated in *Neisseria*
7 *gonorrhoeae* (39). Moreover, OxyR regulates dually *ahpC* expression in *Xanthomonas*
8 *campestris* pv. phaseoli (22). In this bacterial plant pathogen, *ahpC* expression is activated by
9 oxidized OxyR and repressed by reduced OxyR. Binding of the reduced form of OxyR blocks
10 the -35 region, preventing binding of RNA polymerase and leading to repression of the gene.
11 Recent results in *E. coli* indicate that alkyl hydroperoxide reductase (Ahp) is also involved in
12 the primary scavenges of H₂O₂ when the concentration is very low (35). It must be pointed
13 out that a sophisticated and unusual regulation of genes involved in H₂O₂-scavenging system
14 by OxyR is observed in bacteria interacting with hosts (*S. meliloti*, *B. abortus*, and *X.*
15 *campestris* pv. phaseoli). It may be suggested that this process optimizes, in all cases, the
16 host-bacterial interactions.

17

18 The authors are grateful to Dr. Pierre Frendo and Dr. Danièle Touati for helpful
19 discussions. This work was supported by the Improving Human Potential European Program
20 (contract HPRN-CT-2000-00094). E. Kiss has been supported by an INRA post-doctoral
21 fellowship as well as by the Marie Curie Fellowship of the European Community program
22 “Improving the Human Research Potential & the Socio-Economic Knowledge Base” (contract
23 HPMF-CT-2001-01487).

24

1 TABLE 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

2

Strains and plasmids	Relevant characteristic(s) ^a	Source or reference
Bacteria		
<i>Sinorhizobium meliloti</i>		
RCR2011	SU47, wild-type, Nod ⁺ Fix ⁺	(33)
Rm1021	Derivative of RCR2011, Sm ^r	(23)
Rm oxyR	Same as Rm1021 but with $\text{oxyR}::\text{uidA}$ fusion (oxyR^+), Sm ^r , Nm ^r	This study
1021-pRKAZ	Same as Rm1021 but with plasmid pRKAZ	This study
1021-pdRKAZ	Same as Rm1021 but with plasmid pdRKAZ	This study
oxyR -pRKAZ	Same as oxyR but with plasmid pRKAZ	This study
oxyR -pdRKAZ	Same as oxyR but with plasmid pdRKAZ	This study
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	F ⁻ $\text{supE44 } \Delta\text{lacU169}(\Phi\text{80dlacZDM15}) \text{hsdR17}(r_K^+ m_K^+) \text{recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1}$	Bethesda Research Laboratories
MT607	$\text{pro-82 thi-1 hsdR17 supE44 recA56}$	(8)
MT616	MT607 (pRK600)	(8)
Plasmids		
pRK600	ColE1 replicon with RK2 transfer region, Cm ^r	(8)
pBluescriptKS(+)	Derivative of pUC19 with fl(+) oriR , Ap ^r	Stratagene
pCR-TOPO	Derivative of pUC19 with fl(+) ori , Ap ^r , Km ^r	Invitrogen
pGEM-T	T vector with fl oriR , Ap ^r	Promega corporation
pVO155	Derivate of pUC119	(29)
pKOK5	Derivative of pSUP202, source of lacZ-Km^r , Ap ^r , Km ^r	(19)
pBBR1-MCS-3	Derivative of pBBR1-MCS, Tc ^r	(20)
pCR-TOPO- oxyR01	pCR-TOPO vector with 271 bp. PCR amplified fragment of the oxyR gene	This study
pCR-TOPO- oxyR02	pCR-TOPO vector with 1780 bp. PCR amplified fragment with the oxyR gene and partial kata gene	This study
pGEM oxyR	pGEM-T, with 920 bp. PCR amplified fragment	This study
pVO- oxyR	pVO155, with BamHI-XbaI fragment of pCR-TOPO- oxyR01	This study
pBBR- oxyR	pBBR1MCS-3, with SpeI-ApaI fragment of pCR-TOPO- oxyR02	This study
pBBR- doxyR	pBBR- oxyR , SacI-SacI fragment deleted	This study
pRKAZ	pBBR- oxyR , with fusion pkatA-lacZ	This study
pdRKAZ	pBBR- doxyR , with fusion pkatA-lacZ	This study
pBSKA1-1	pBluescript, 1.4 kb EcoRI-ApaI fragment with partial kata	(12)

3 ^a Abbreviations: Tc, tetracycline; Sm, streptomycin; Ap, ampicillin; Km, kanamycine; Cm, chloramphenicol; Sp, spectinomycin

4

1 TABLE 2. Induction of *katA-lacZ* fusion by H₂O₂ in 1021-pRKAZ, 1021-pKAZ, *oxyR*-
2 pRKAZ and *oxyR*-pdRKAZ) strains. β -galactosidase activities were measured after a one-
3 hour treatment (+) or not (-) with 1 mM H₂O₂ and expressed in Miller units.

4

	Rm1021		Rm<i>oxyR</i>	
	pRKAZ	pdRKAZ	pRKAZ	pdRKAZ
-	444 ± 97	509 ± 130	390 ± 157	1338 ± 156
+	2222 ± 265	1960 ± 320	1825 ± 405	1292 ± 198

5

1 **LEGENDS TO FIGURES**

2

3 FIG. 1. A- Alignment of the *oxyR-katA* intergenic sequences of *S. meliloti* (*S.m*) and *B.*
4 *abortus* (*B.a*). OxyR DNA-binding site from *B. abortus* is shaded in grey. Initial codon from
5 *katA* and *oxyR* are indicated in bold caps. KatA ribosome binding sites are indicated in bold
6 italic (*RBS*). The positions of the *katA* promoter from *S. meliloti* are underlined and bolded
7 (+1, -10, and -35 regions). B- Genetic map of the *oxyR-katA* region, pRKAZ, and pdRKAZ
8 plasmids used in this study, and positions of the primers used for their construction are
9 indicated. Large arrows indicate the location and direction of transcription of the identified
10 gene. Small arrows indicate the direction and the position of primers.

11

12 FIG. 2. Effects of H₂O₂ on catalase activity and *katA* gene expression for the parental Rm1021
13 and the mutant Rm*oxyR* strains. Bacteria were treated (+) or not (-) with 1 mM H₂O₂ for 1
14 hour. Cell extracts were prepared and analysed for catalase activities spectrophotometrically
15 (A) and on native polyacrylamide gel (B) using 30 µg of protein per lane, determined with the
16 Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad Laboratories GmbH). The positions of KatA and KatB are
17 indicated according to Sigaud *et al.* (1999). Catalase activities were obtained using triplicate
18 samples from two independent experiments and are given in units per milligram of protein.
19 Data are presented as the mean ± standard deviation. The expression of the *katA* gene was
20 followed using northern blot (C) and primer extension analyses (D).

21

22 FIG. 3. Histochemical detection of *katA* (A, B, C, and D) and *oxyR* (E and F) expression
23 during *Sinorhizobium meliloti*-*Medicago sativa* nodule development. *katA* expression was
24 followed in 1021-pRKAZ (A and B) and *oxyR*-pdRKAZ (C and D) strains. β-galactosidase
25 (A, B, C, and D) and β-glucuronidase (E and F) activities were detected using X-gal and X-
26 gluc, respectively. *katA-lacZ* and *oxyR-uidA* fusions were detected in roots hairs four days
27 after infection (A, C, and E), and in 5-week-old nodule (B, D, and F). Arrows indicate
28 infection threads. Spatial development zones (I, II, or III) are indicated on nodules cross
29 sections. Scales bars = 50 µm (A, C, and E) or 200 µm (B, D, and F).

1 REFERENCES

- 2
- 3 1. **Ampe, F., E. Kiss, F. Sabourdy, and J. Batut.** 2003. Transcriptome analysis of
4 *Sinorhizobium meliloti* during symbiosis. *Genome Biology.* **4**:R15.
- 5 2. **Boivin, C., S. Camut, C. A. Malpica, G. Truchet, and C. Rosenberg.** 1990.
6 *Rhizobium meliloti* genes encoding catabolism of trigonelline are induced under
7 symbiotic conditions. *Plant Cell.* **2**:1157-1170.
- 8 3. **Cabanes, D., P. Boistard, and J. Batut.** 2000. Symbiotic induction of pyruvate
9 dehydrogenase genes from *Sinorhizobium meliloti*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*
10 **13**:483-493.
- 11 4. **Christman, M. F., G. Storz, and B. N. Ames.** 1989. OxyR, a positive regulator of
12 hydrogen peroxide-inducible genes in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*,
13 is homologous to a family of bacterial regulatory proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*
14 **86**:3484-3488.
- 15 5. **Clare, D. A., M. N. Duong, D. Darr, F. Archibald, and I. Fridovich.** 1984. Effects
16 of molecular oxygen on detection of superoxide radical with nitroblue tetrazolium and
17 on activity stains for catalase. *Anal. Biochem.* **140**:532-537.
- 18 6. **Del Carmen Vargas, M., S. Encarnacion, A. Davalos, A. Reyes-Perez, Y. Mora,**
19 **A. Garcia-De Los Santos, S. Brom, and J. Mora.** 2003. Only one catalase, *katG*, is
20 detectable in *Rhizobium etli*, and is encoded along with the regulator OxyR on a
21 plasmid replicon. *Microbiology.* **149**:1165-1176.
- 22 7. **Deretic, V., J. Song, and E. Pagan-Ramos.** 1997. Loss of *oxyR* in *Mycobacterium*
23 *tuberculosis*. *Trends Microbiol.* **5**:367-372.
- 24 8. **Finan, T. M., B. Kunkel, G. F. De Vos, and E. R. Signer.** 1986. Second symbiotic
25 megaplasmid in *Rhizobium meliloti* carrying exopolysaccharide and thiamine
26 synthesis gene. *J. Bacteriol.* **167**:66-72.
- 27 9. **Fischer, H.-M.** 1996. Environmental regulation of rhizobial symbiotic nitrogen
28 fixation genes. *Trends Microbiol.* **4**:317-320.
- 29 10. **Galibert, F., T. M. Finan, S. R. Long, A. Pühler, P. Abola, F. Ampe, F. Barloy-**
30 **Hubler, M. J. Barnett, A. Becker, P. Boitard, G. Bothe, M. Boutry, L. Bowser, J.**
31 **Buhrmester, E. Cadieu, D. Capela, P. Chain, A. Cowie, R. W. Davis, S. Dréano,**
32 **N. A. Federspiel, R. F. Fisher, S. Gloux, T. Godrie, A. Goffeau, B. Golding, J.**
33 **Gouzy, M. Gurjal, I. Hernandez-Lucas, A. Hong, L. Huizar, R. W. Hyman, T.**
34 **Jones, D. Kahn, M. L. Kahn, S. Kalman, D. H. Keating, E. Kiss, C. Komp, V.**

- 1 **Lelaure, D. Masuy, C. Palm, M. C. Peck, T. M. Pohl, D. Portetelle, B. Purnelle, U.**
2 **Ramsperger, R. Surzycki, P. Thébault, M. Vandenbol, F.-J. Vorhölter, S.**
3 **Weidner, D. H. Wells, K. Wong, K.-C. Yeh, and J. Batut.** 2001. The composite
4 genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science*. **293**:668-672.
- 5 11. **Glazebrook, J., and G. C. Walker.** 1991. Genetic techniques in *Rhizobium meliloti*.
6 *Methods Enzymol.* **204**:398-418.
- 7 12. **Hérouart, D., S. Sigaud, S. Moreau, P. Frendo, D. Touati, and A. Puppo.** 1996.
8 Cloning and characterization of the *katA* gene of *Rhizobium meliloti* encoding a
9 hydrogen peroxide-inducible catalase. *J. Bacteriol.* **178**:6802-6809.
- 10 13. **Jamet, A., S. Sigaud, G. Van de Sype, A. Puppo, and D. Hérouart.** 2003.
11 Expression of the bacterial catalase genes during *Sinorhizobium meliloti-Medicago*
12 *sativa* symbiosis and their crucial role during infection process. *Mol. Plant-Microbe*
13 *Interact.* **16**:217-225.
- 14 14. **Jefferson, R. A., S. M. Burgess, and D. Hirsh.** 1986. β -glucuronidase from
15 *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**:8447-8451.
- 16 15. **Jones, D. P.** 1982. Intracellular catalase function: analysis of the catalytic activity by
17 product formation in isolated liver cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **214**:806-814.
- 18 16. **Kim, J.-A., and J. E. Mayfield.** 2000. Identification of *Brucella abortus* OxyR and
19 its role in control of catalase expression. *J. Bacteriol.* **182**:5631-5633.
- 20 17. **Kim, J.-A., Z. Sha, and J. E. Mayfield.** 2000. Regulation of *Brucella abortus*
21 catalase. *Infect. Immun.* **68**:3861-3866.
- 22 18. **Kim, S. O., K. Merchant, R. Nudelman, W. F. Beyer Jr., T. Keng, J. DeAngelo, A.**
23 **Hausladen, and J. S. Stamler.** 2002. OxyR: a molecular code for redox-related
24 signaling. *Cell.* **109**:383-396.
- 25 19. **Kokotek, W., and W. Lotz.** 1989. Construction of a lacZ-kanamycin-resistance
26 cassette, useful for site-directed mutagenesis and as a promoter probe. *Gene.* **84**:467-
27 471.
- 28 20. **Kovach, M. E., R. W. Phillips, P. H. Elzer, R. M. Roop II, and K. M. Peterson.**
29 1994. pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector. *Biotechniques.* **16**:800-802.
- 30 21. **Long, S. R.** 2001. Genes and signals in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Plant*
31 *Physiol.* **125**:69-72.
- 32 22. **Loprasert, S., M. Fuangthong, W. Whangsuk, S. Atichartpongkul, and S.**
33 **Mongkolsuk.** 2000. Molecular and physiological analysis of an OxyR-regulated *ahpC*
34 promoter in *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. *Mol. Microbiol.* **37**:1504-1514.

- 1 23. **Meade, H. M., S. R. Long, G. B. Kuvkun, S. E. Brown, and F. M. Ausubel.** 1982.
2 Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutant of
3 *Rhizobium meliloti* induced by transposon Tn5 mutagenesis. *J. Bacteriol.* **149**:114-
4 122.
- 5 24. **Miller, J. H.** 1972. *Experiment in molecular genetics*, p. 352-355, Cold Spring Harbor
6 Laboratory Press ed, New York.
- 7 25. **Mongkolsuk, S., S. Loprasert, W. Whangsuk, M. Fuangthong, and S.**
8 **Atichartpongkun.** 1997. Characterisation of transcription organization and analysis
9 of unique expression patterns of an alkyl hydroperoxide reductase C gene (*ahpC*) and
10 the peroxide regulator operon *ahpC-oxyR-orfX* from *Xanthomonas campestris* pv.
11 phaseoli. *J. Bacteriol.* **179**:3950-3955.
- 12 26. **Morgan, R. W., M. F. Christman, F. S. Jacobson, G. Storz, and B. N. Ames.** 1986.
13 Hydrogen peroxide-inducible proteins in *Salmonella typhimurium* overlap with heat
14 shock and other stress proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**:8059-8063.
- 15 27. **Nakjarung, K., S. Mongkolsuk, and P. Vattanaviboon.** 2003. The *oxyR* from
16 *Agrobacterium tumefaciens*: evaluation of its role in the regulation of catalase and
17 peroxide responses. *Biochem. Biophys Res. Commun.* **304**:41-47.
- 18 28. **Ochsner, U. A., M. L. Vasil, E. Alsabbagh, K. Parvatiyar, and D. J. Hassett.** 2000.
19 Role of the *Pseudomonas aeruginosa oxyR-recG* operon in oxidative stress defense
20 and DNA repair: OxyR-dependent regulation of *katB-ankB*, *ahpB*, and *ahpC-ahpF*. *J.*
21 *Bacteriol.* **182**:4533-4544.
- 22 29. **Oke, V., and S. R. Long.** 1999. Bacterial genes induced within the nodule during the
23 *Rhizobium*-legume symbiosis. *Mol. Microbiol.* **32**:837-849.
- 24 30. **Rathbun, E. A., M. J. Naldrett, and N. J. Brewin.** 2002. Identification of a family of
25 extensin-like glycoproteins in the lumen of *Rhizobium*-induced infection threads in
26 Pea root nodules. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **15**:350-359.
- 27 31. **Robson, R. L., and J. R. Postgate.** 1980. Oxygen and hydrogen in biological
28 nitrogen fixation. *Annu. Rev. Microbiol.* **34**:183-207.
- 29 32. **Rocha, E. R., G. Owen Jr., and C. J. Smith.** 2000. The redox-sensitive
30 transcriptional activator OxyR regulates the peroxide response regulon in the obligate
31 anaerobe *Bacteroides fragilis*. *J. Bacteriol.* **182**:5059-5069.
- 32 33. **Rosenberg, C., P. Boistard, J. Dénarié, and F. Casse-Delbart.** 1981. Genes
33 controlling early and late functions in symbiosis are located on a megaplasmid in
34 *Rhizobium meliloti*. *Mol. Gen. Genet.* **184**:326-333.

- 1 34. **Santos, R., D. Hérouart, S. Sigaud, D. Touati, and A. Puppo.** 2001. Oxidative burst
2 in Alfalfa-*Sinorhizobium meliloti* symbiotic interaction. *Mol. Plant-Microbe Interact.*
3 **14:**86-89.
- 4 35. **Seaver, L. C., and J. A. Imlay.** 2001. Alkyl hydroperoxide reductase is the primary
5 scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*
6 **183:**7173-7181.
- 7 36. **Sigaud, S., V. Becquet, P. Frendo, A. Puppo, and D. Hérouart.** 1999. Differential
8 regulation of two divergent *Sinorhizobium meliloti* genes for HPII-like catalases
9 during free-living growth and protective role of both catalases during symbiosis. *J.*
10 *Bacteriol.* **181:**2634-2639.
- 11 37. **Stougaard, J.** 2000. Regulators and regulation of legume root nodule development.
12 *Plant Physiol.* **124:**531-540.
- 13 38. **Triggs-Raine, B. L., and P. C. Loewen.** 1987. Physical characterisation of *katG*,
14 encoding catalase HPI of *Escherichia coli*. *Gene.* **52:**121-128.
- 15 39. **Tseng, H.-J., A. G. McEwan, M. A. Apicella, and M. P. Jennings.** 2003. OxyR acts
16 as a repressor of catalase expression in *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect. Immun.*
17 **71:**550-556.
- 18 40. **Witty, J. F., L. Skot, and N. P. Revsbech.** 1987. Direct evidence for changes in the
19 resistance of legume root nodules to O₂ diffusion. *J. Exp. Bot.* **38:**1129-1140.
- 20 41. **Zheng, M., F. Aslund, and G. Storz.** 1998. Activation of the OxyR transcription
21 factor by reversible disulfide bond formation. *Science.* **279:**1718-1721.

Figure 1

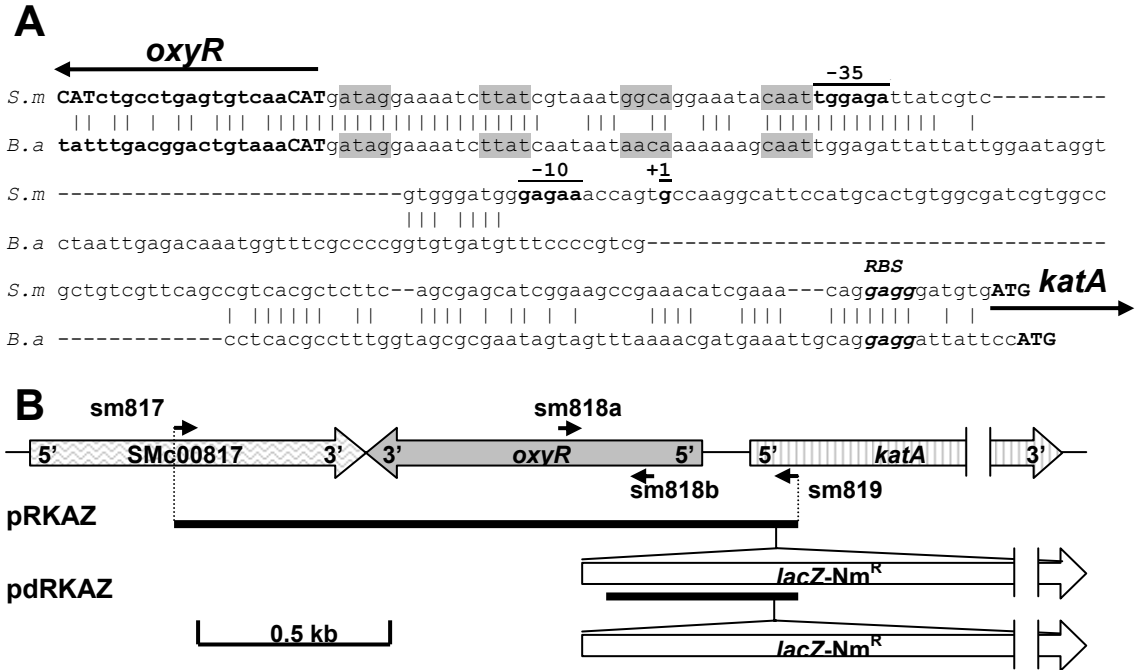


Figure 2.

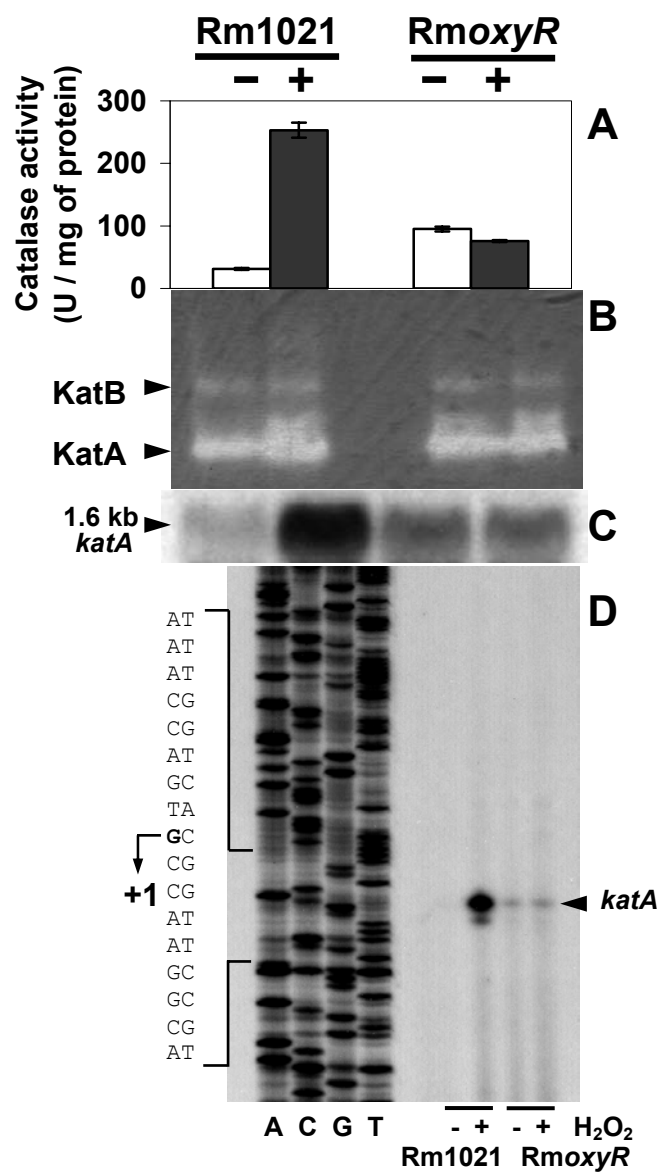
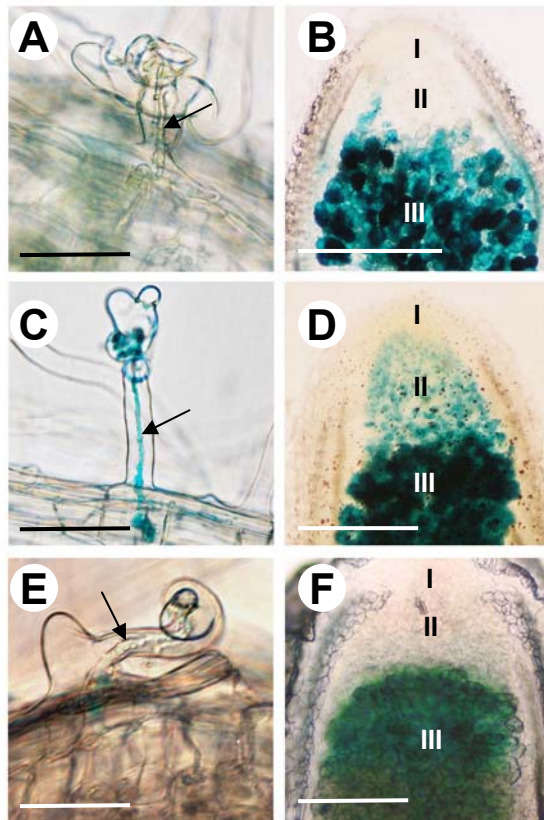


Figure 3



TROISIEME CHAPITRE

ROLE DE L'H₂O₂ LORS DE L'ETABLISSEMENT DE LA SYMBIOSE

3. CHAPITRE 3 :

Rôle de l'H₂O₂ lors de l'établissement de la symbiose.

3.1. Introduction

Les deux chapitres précédents ont permis d'établir que, lors des premières étapes de l'infection, une défense catalasique bactérienne suffisante est nécessaire. En effet, un double mutant *katB⁻katC⁻* est très affecté dans ses capacités symbiotiques. Cependant, lors des premières étapes de l'interaction symbiotique, et malgré la présence d'H₂O₂ détecté dans les cordons d'infection, le niveau des défenses catalasiques utilisées par la bactérie n'est pas à son niveau maximum comparé aux capacités catalasiques dont dispose la bactérie. En effet, les analyses réalisées avec les fusions *katA-lacZ* ont permis de mettre en évidence une répression du gène *katA* dans les cordons d'infections (**article II**). Les bactéries se trouveraient donc globalement en position de « non-agression oxydative » pendant leur cheminement dans les cordons d'infection.

Cela amène à l'idée selon laquelle la production d'ERO, observée dans les cordons d'infection et dans les jeunes nodosités (Santos *et al.*, 2001), ne mettrait pas la bactérie en situation de stress oxydatif mais aurait un rôle dans le développement des nodosités (**article III**). Afin de vérifier cette hypothèse, une souche sur-exprimant un des gènes de catalase a été construite et ses capacités symbiotiques évaluées, l'objectif étant de dégrader l'H₂O₂ détecté au niveau de la matrice des cordons d'infection (Santos *et al.*, 2001).

3.2. Résultats

Construction d'une bactérie possédant une activité catalase exacerbée

L'étude des constantes d'affinité et des vitesses des catalases de *S. meliloti* a permis de montrer que KatB a une affinité 100 fois plus grande que KatA et KatC (Ardissonne *et al.*, 2004), le choix de la surexpression s'est donc porté sur le gène *katB*. Un fragment de 2kb contenant ce gène a été amplifié par PCR en utilisant les amorces AJKATB1 (5'-CCATCGATCGCCCAATCGAGGAAGAGG-3') contenant le site de restriction *ClaI* et AJKATB2 (5'-ACATGGGCTCGAGCCACGT-3') contenant le site de restriction *XhoI*. Le produit d'amplification a été cloné dans le vecteur pGEM-T suivie d'une double digestion *ClaI* et *XhoI* afin de cloner le gène *katB* dans le vecteur de surexpression pTB93F (Gage *et*

al., 1996) sous le contrôle du promoteur fort de *Salmonella typhimurium*, pTrp. Cette construction plasmidique, stable chez *S. meliloti* en présence de spectinomycine, a été nommée pTBkatB⁺⁺.

Afin de vérifier la surproduction de l'activité catalase correspondant à KatB, le plasmide pTBkatB⁺⁺ a été transféré dans la souche mutante GKBZ01 dépourvue d'activité KatB (**article I**). Six transformants résistants à la spectinomycine ont été purifiés et leur profil catalasique analysé sur gel d'activité. Les six transformants présentaient un profil identique de surexpression de l'activité correspondant à KatB. Le profil catalasique d'un de ces mutants, nommé GKBZ01-pTBkatB⁺⁺, est présenté en figure 22.

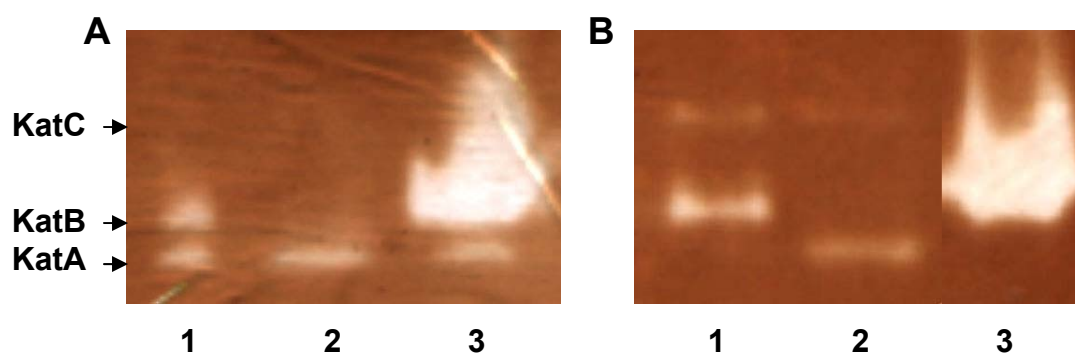


Figure 22 : Profil d'activité catalasique du mutant GKBZ01-pTBkatB⁺⁺ (**3**) comparé aux souches GMI211 (**1**) et GKBZ01 (**2**) en phase exponentielle (**A**) et stationnaire (**B**) de la croissance.

Des mesures d'activité catalase par spectrophotométrie montrent qu'en phase exponentielle de croissance, les activités catalasiques totales des souches GMI211, GKBZ01 et GKBZ01-pTBkatB⁺⁺ sont respectivement de 36±6.7, 17±7.2 et 380±102 U/μg de protéine. Ainsi, la souche mutante autorépliquant le plasmide pTBkatB⁺⁺ présente une activité catalase environ 10 fois plus grande qu'une souche sauvage.

L'effet de cette surexpression de KatB sur l'interaction entre la bactérie et la plante a été évalué par une étude comparative des capacités symbiotiques des souches GMI211 (WT), GKBZ01 (*katB*⁻) et GKBZ01-pTBkatB⁺⁺ en inoculant 3 lots de 72 plantules (Figure 23).

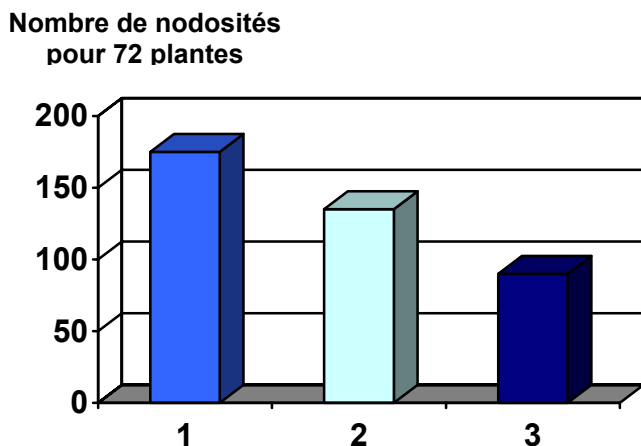


Figure 23 : Capacités symbiotiques des souches GMI211 (1), GKBZ01 (2) et GKBZ01-pTBkatB⁺⁺ (3).

Jusqu'à 2 semaines après infection, le mutant GKBZ01 surexprimant le gène *katB* présente un retard de nodulation. Ce retard est rattrapé à partir de 3 semaines post-infection et les différences observées ne sont plus significatives. Un réisolement bactérien à partir de nodosités âgées de trois semaines a permis de mettre en évidence que moins de 10% des bactéries réisolées étaient résistantes à la spectinomycine. En absence de sélection, plus de 90% des bactéries ont donc perdu le plasmide de surexpression pTBkatB⁺⁺.

Afin d'obtenir une souche bactérienne surexprimant le gène *katB* sans pression de sélection, il s'est donc avéré nécessaire d'intégrer la construction dans le génome bactérien. Les différentes étapes de la construction sont précisées en figure 24. Un fragment, contenant la partie 5' du gène *katB* sous le contrôle du promoteur pTrp, a été extrait du plasmide pTBkatB⁺⁺ grâce à une digestion par les enzymes *Bam*HI et *Bgl*II, et cloné dans le vecteur pSUP202 au site *Bam*HI. Les transformants résistants au chloramphénicol et à l'ampicilline mais sensibles à la tétracycline ont été sélectionnés ; le vecteur ainsi obtenu a été nommé pSUPkatB⁺⁺. La cassette *lacZ*/Nm^r (4,8 kb), extraite du plasmide pKOK5 grâce à une digestion par l'enzyme de restriction *Sal*I, a été insérée au niveau des sites *Sal*I du vecteur pSUPkatB⁺⁺. Les transformants ont été sélectionnés sur milieu contenant du chloramphénicol de l'ampicilline et de la kanamycine. La présence et le sens d'insertion de la cassette *lacZ*/Nm^r ont été vérifiés par digestion *Eco*RI et le vecteur obtenu a été nommé pSUPkatB⁺⁺*lacZ*. Une conjugaison triparentale a été effectuée avec comme souche donneuse la souche DH5α contenant le plasmide pSUPkatB⁺⁺*lacZ* et comme souche receveuse la souche Rm1021. Une recombinaison au niveau de la partie codante du gène *katB* permet d'obtenir une souche *pkatB-lacZ* pTrp-*katB*. Les transconjugants ont été sélectionnés sur milieu LBMC contenant de la streptomycine et de la néomycine, puis repiqués deux fois sur

le même milieu. Un des mutants sélectionnés a été nommé *RmkatB⁺⁺* et son phénotype a été caractérisé.

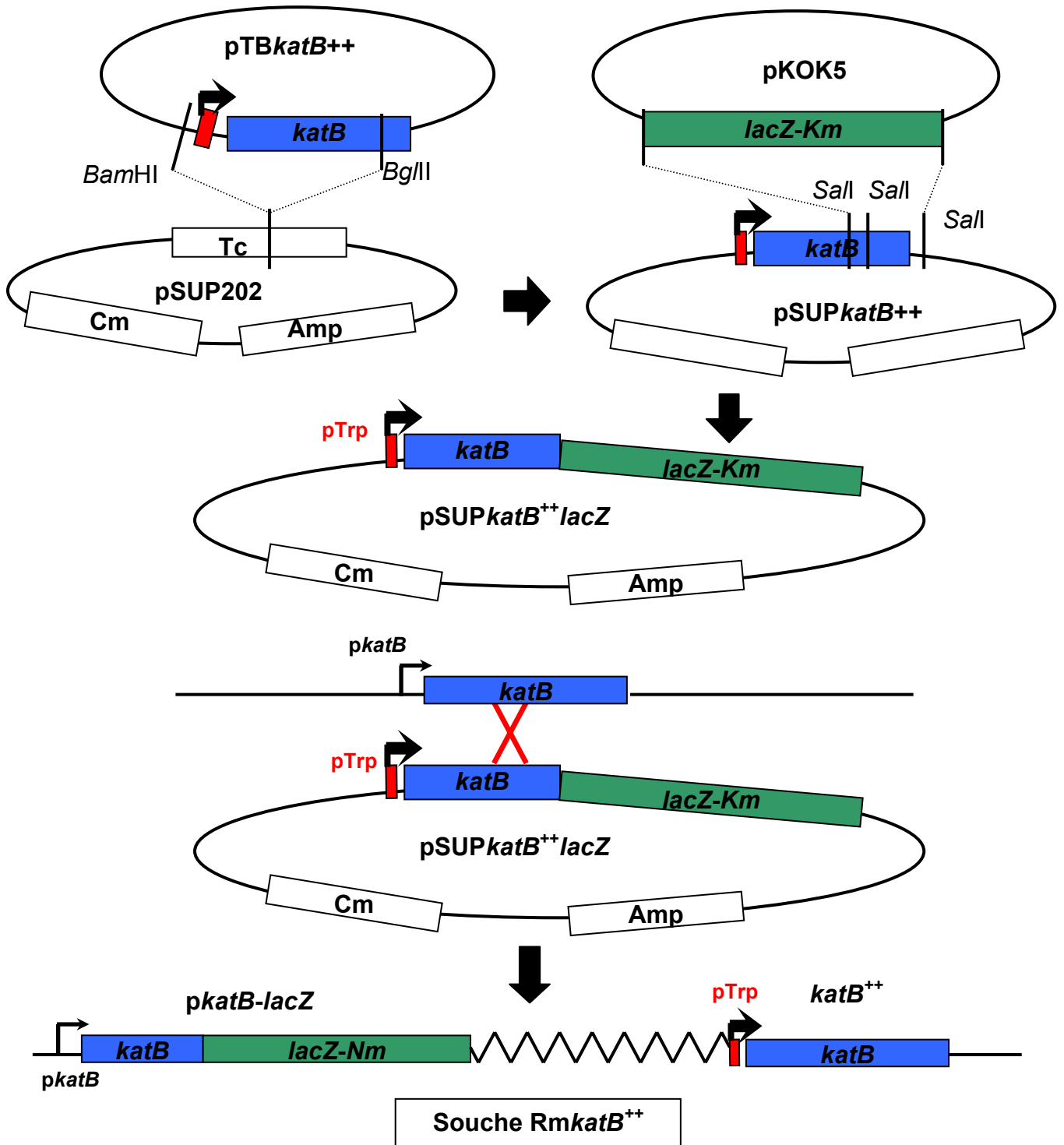


Figure 24 : Stratégie de construction de la souche recombinante *RmkatB⁺⁺* exprimant le gène *katB* sous le contrôle du promoteur fort *pTrp*.

Analyse des capacités catalasiques du mutant *RmkatB*⁺⁺

Le profil catalasique et l'activité catalase totale du mutant *RmkatB*⁺⁺ ont été déterminés et comparés à ceux de la souche sauvage Rm1021 en phase exponentielle et en phase stationnaire de croissance. En phase exponentielle, l'activité catalase totale du mutant *RmkatB*⁺⁺ ($90,1 \pm 14$ U/ μ g de protéine) est 3 fois plus importante que celle de la souche Rm1021 ($32 \pm 7,1$ U/ μ g de protéine). En revanche, en phase stationnaire, celle-ci est 10 fois plus importante : *RmkatB*⁺⁺ (203 ± 43 U/ μ g de protéine) et Rm1021 ($21 \pm 3,5$ U/ μ g de protéine). Comme le montrent les profils catalasiques des souches Rm1021 et *RmkatB*⁺⁺, cette augmentation de l'activité catalase totale est majoritairement due à l'augmentation de l'activité correspondant à KatB (Figure 25).

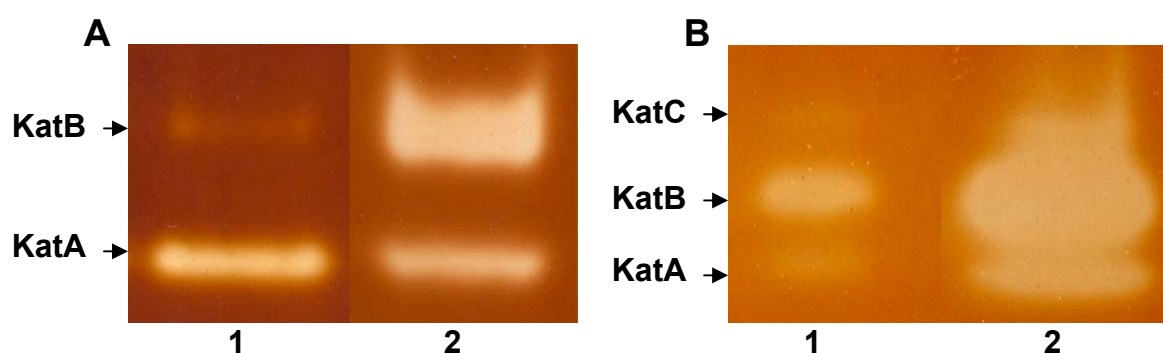


Figure 25 : Profils catalasiques des souches Rm1021 (1) et *RmkatB*⁺⁺ (2) en phase exponentielle (A) et stationnaire (B) de croissance.

Afin de déterminer si l'augmentation de l'activité catalase augmente la résistance du mutant à l' H_2O_2 d'origine exogène et donc augmente potentiellement sa capacité à dégrader l' H_2O_2 provenant du milieu extracellulaire, la survie du mutant *RmkatB*⁺⁺ en présence d' H_2O_2 a été déterminée et comparée à celle de la souche Rm1021. Les deux souches ont été traitées pendant 30 minutes avec différentes concentrations d' H_2O_2 . Après ce temps d'incubation, de la catalase de foie de bœuf a été ajoutée dans le milieu pour supprimer l' H_2O_2 encore présent dans le milieu de culture et les bactéries vivantes ont été dénombrées par l'étalement de dilutions sérielles. Alors qu'une concentration de 10mM d' H_2O_2 provoque la mort de 99% des bactéries sauvages, cette concentration n'affecte pas la survie des bactéries surexprimant l'activité KatB (Figure 26).

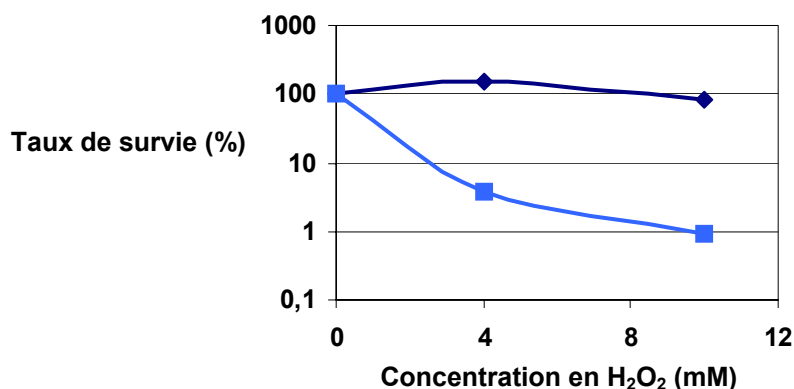


Figure 26 : Résistance des bactéries Rm1021 et RmkatB⁺⁺ à l'H₂O₂. Des fractions de cultures ont été traitées pendant 30 minutes à l'H₂O₂ et les bactéries vivantes ont été dénombrées par des étalements de dilutions sérielles.

La souche RmkatB⁺⁺, plus résistante à l'H₂O₂ d'origine exogène, pouvait donc constituer un « outil » capable de dégrader l'H₂O₂ extracellulaire en agissant comme un puits pour celui-ci, grâce au déséquilibre créé entre concentration intérieure et concentration extérieure. Afin d'évaluer cette hypothèse, les concentrations intracellulaire en H₂O₂ du mutant RmkatB⁺⁺ et de la souche Rm1021 ont été évaluées à l'aide du kit Amplex Red (Molecular Probes, Montluçon, France) en utilisant le protocole décrit précédemment pour *Agrobacterium tumefaciens* (Xu *et al.*, 2001). Une concentration intracellulaire de 124 nM d'H₂O₂ a été trouvée pour la souche Rm1021 alors qu'elle n'est que de 52 nM pour la souche RmkatB⁺⁺.

Capacités symbiotiques du mutant RmkatB⁺⁺

Les capacités symbiotiques du mutant RmkatB⁺⁺ ont été évaluées et comparées à celles de la souche Rm1021 (WT) en inoculant 3 lots de 72 plantules (Figure 27). Comme avec la surexpression d'origine plasmidique (Figure 23), un retard de nodulation est observé jusqu'à 2 semaines après infection. Ce retard est rattrapé à partir de 3 semaines et les différences observées ne sont plus significatives. Notons également que les capacités fixatrices d'azote du mutant RmkatB⁺⁺ ne sont pas affectées, le mutant RmkatB⁺⁺ présente donc un phénotype de nodulation « Nod^d » ou retardé.

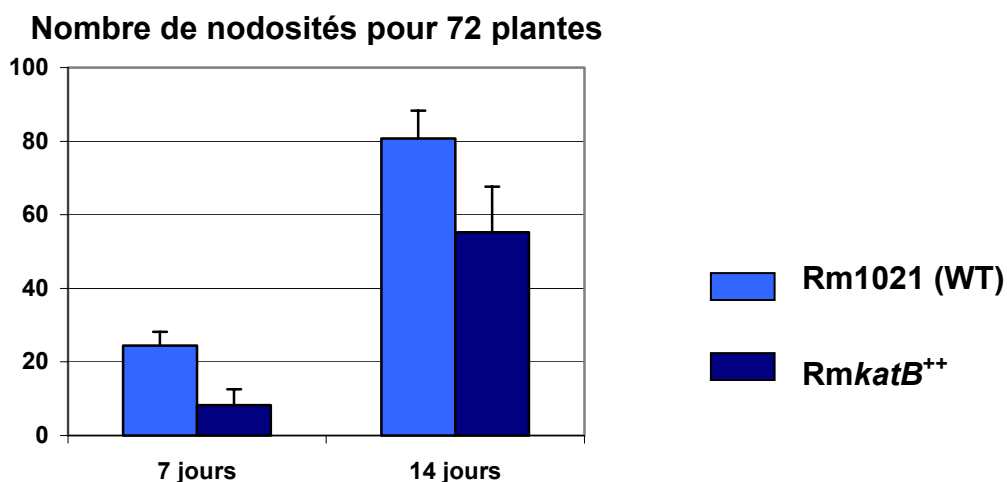


Figure 27 : Capacités symbiotiques des souches Rm1021 et RmkatB⁺⁺, 7 jours et 14 jours post-infection.

Afin de déterminer plus précisément à quel étape de l'infection le mutant RmkatB⁺⁺ est retardé, le plasmide pXLGD4 (Leong *et al.*, 1985), exprimant le gène *lacZ* sous le contrôle du promoteur constitutif du gène *hemA*, a été transféré dans les souches Rm1021 et RmkatB⁺⁺. Les souches Rm1021-pXLGD4 et RmkatB⁺⁺-pXLGD4 ainsi obtenues ont permis de suivre précisément l'état d'avancement de l'interaction symbiotique et donc l'étape à laquelle le mutant est retardé. Des plantules de *M. sativa* ont donc été inoculées avec les souches Rm1021-pXLGD4 ou RmkatB⁺⁺-pXLGD4. Après 3 et 5 jours d'infection, les racines de 40 plantes sont prélevées et les événements d'interaction suivants ont été dénombrés : les poils absorbants déformés colonisés (**CCRH** pour « colonized curled root hair »), les cordons d'infection initiés (**IIT** pour « initiated infection thread »), les cordons d'infection allongés (**EIT** pour « extended infection threads ») et les jeunes nodosités infectées (**IYN** pour « infected young nodules »). Les différents événements observés sont schématisés sur la figure 28 B.

Le nombre total d'événements d'infection n'est pas significativement différent d'une souche à l'autre. Cependant, en séparant les différents types d'événements (Figure 28 A), il apparaît que le nombre d'**EIT** est significativement plus important pour la souche Rm1021-pXLGD4 que pour la souche RmkatB⁺⁺-pXLGD4. De plus, même si la différence entre les nombres d'**IIT** n'est pas significative d'une souche à l'autre, le ratio **IIT/CCRH** est significativement plus important pour la souche Rm1021-pXLGD4 que pour la souche RmkatB⁺⁺-pXLGD4. **C'est donc au niveau de la progression de ses cordons d'infection que le mutant RmkatB⁺⁺ est retardé.**

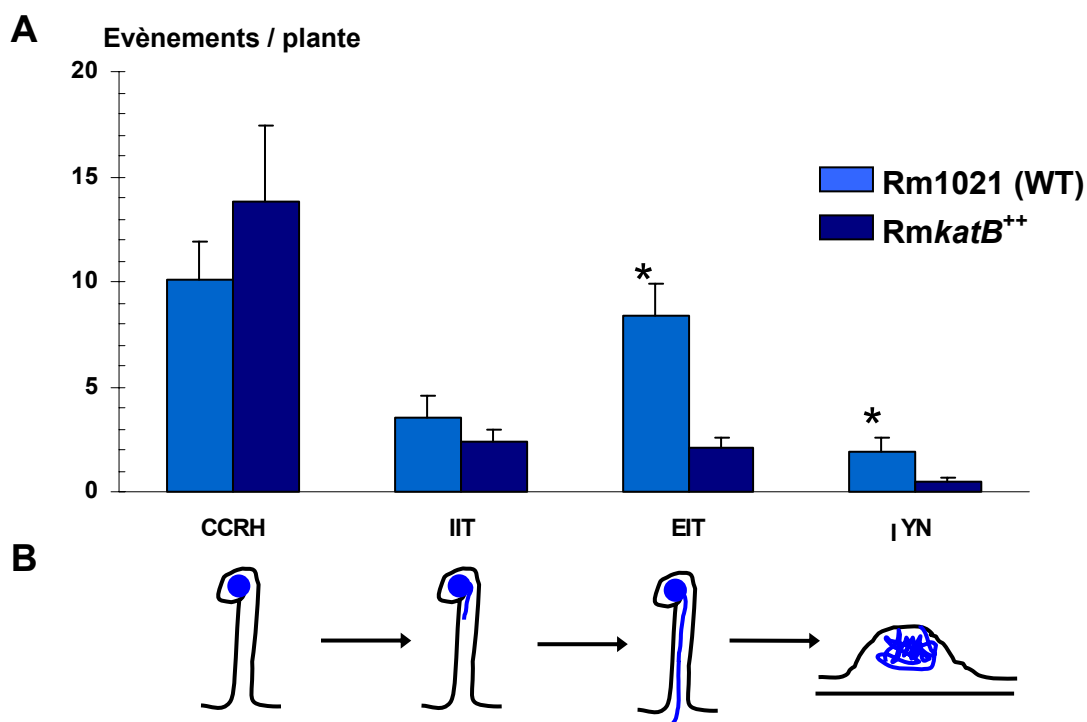


Figure 28 : nombre d'événements dénombrés 5 jours après infection par les souches Rm1021 et RmkatB⁺⁺. Les étoiles indiquent des différences significativement différentes entre les souches Rm1021 et RmkatB⁺⁺.

Ce phénotype a été décrit précédemment chez des mutants bactériens dont la production d'exopolysaccharides est perturbée. En effet, les exopolysaccharides sont essentiels aux premières étapes de l'infection (Cheng et Walker, 1998 ; D'Haese et al., 2004 ; Fraysse et al., 2003 ; Pellock et al., 2000). De plus, des mutants de gènes apparemment non liés à la production d'exopolysaccharides, peuvent malgré tout être affectés dans cette production. C'est le cas, par exemple, du mutant *relA* qui surproduit le succinoglycane (Wells et Long, 2002) et qui est affecté dans la progression de ses cordons d'infection. Il s'est donc avéré indispensable de vérifier si le phénotype du mutant RmkatB⁺⁺ n'était pas corrélé à une production perturbée d'exopolysaccharides.

Le calcofluor, extrêmement fluorescent sous lumière UV, a la capacité de se lier au succinoglycane et de mettre ainsi sa présence en évidence (Doherty et al., 1988). Le « Sudan Black B » (SBB), un colorant noir, se lie au poly- β -hydroxybutyrate (PHB) dans le cas de mutants exopolysaccharidiques (Liu et al., 1998). Chez une bactérie de type sauvage, les exopolysaccharides sont capables d'exclure le colorant SBB, empêchant ainsi la coloration des bactéries. Les deux tests ont donné des résultats identiques chez les souches Rm1021 et

RmkatB⁺⁺ (Figure 29). Le retard dans la progression des cordons d'infection ne serait donc pas dû à une perturbation de la production exopolysaccharidique.

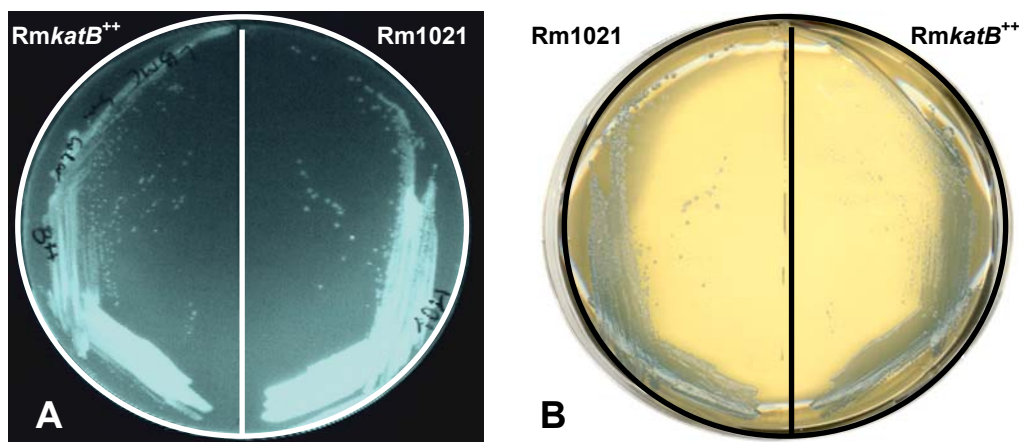


Figure 29 : Tests de production exopolysaccharidique au calcofluor (A) et au SBB (B) des souches Rm1021 et *RmkatB*⁺⁺.

Analyse microscopique des cordons d'infection formés par le mutant *RmkatB*⁺⁺

Les cordons d'infection formés par le mutant *RmkatB*⁺⁺ ont été analysés en microscopie optique et comparés à ceux formés par la souche Rm1021 (Figure 30). De forme irrégulière, les cordons d'infection formés par le mutant *RmkatB*⁺⁺ présentent un diamètre moyen plus grand ($7,34 \pm 2,25 \mu\text{m}$) que celui des cordons d'infection formés par la souche Rm1021 ($3 \pm 1,07 \mu\text{m}$).

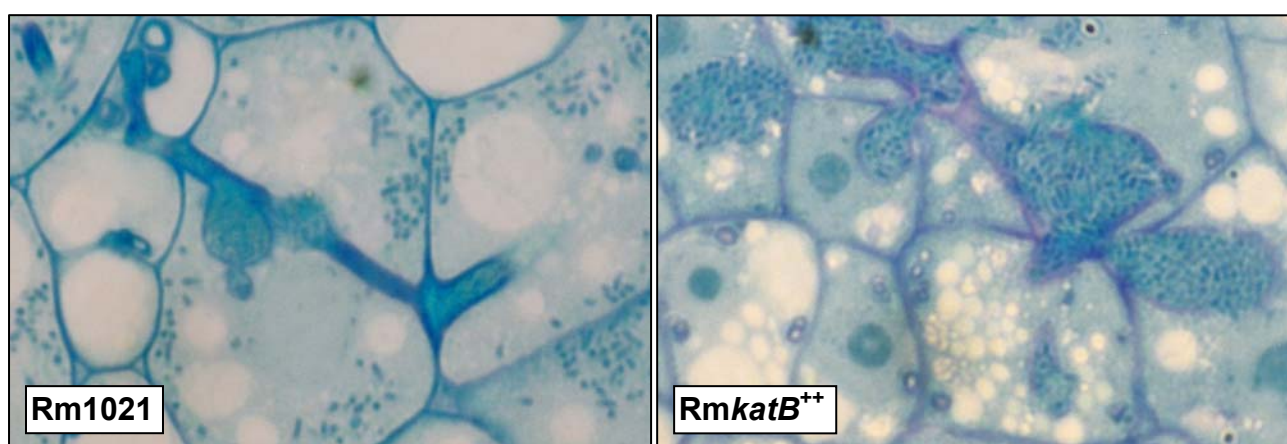


Figure 30 : Analyse structurale de cordons d'infections formés par les souches Rm1021 et *RmkatB*⁺⁺ chez des jeunes nodosités de 5 jours.

La présence d' H_2O_2 dans les jeunes nodosités formées par les souches Rm1021 et Rm*katB*⁺⁺ a été recherchée par une analyse ultrastructurale des cordons d'infection en microscopie électronique grâce à une technique de cytochimie (Figure 31 et 32). Le chlorure de cérium (CeCl_3), a la propriété de former, avec l' H_2O_2 , un précipité de perhydroxyde de cérium ($\text{Ce}(\text{OH})_2$) dense aux électrons (Bestwick *et al.*, 1997). La spécificité de ce marquage est contrôlée par un traitement à la catalase avant l'ajout de CeCl_3 . L' H_2O_2 étant dégradé, le précipité ne se forme pas sur ces échantillons. De l' H_2O_2 a été détecté précédemment dans certains cordons d'infections chez des nodosités de cinq semaines (Santos *et al.*, 2001).

Afin de confirmer la présence de précipités contenant du perhydroxyde de cérium, généré par réaction de l' H_2O_2 et du CeCl_3 , de nombreuses régions des sections observées en microscopie électronique ont été analysées par spectrométrie aux rayons X. Deux de ces régions sont présentées en Figure 33. Le faisceau d'électrons généré par le microscope est concentré sur une zone de la section observée, celui-ci interagit avec les électrons des orbitales les plus externes des atomes rencontrés et lorsque les électrons de ces atomes réintègrent leur couche électronique d'origine, ils émettent des photons dont l'énergie est caractéristique des couches concernées et donc de l'atome.

La majeure partie des cordons d'infection formés par la souche Rm1021 contient de l' H_2O_2 (Figure 31). Le précipité de $\text{Ce}(\text{OH})_2$ détecté apparaît principalement à l'interface matrice-paroi des cordons d'infection observés (Figure 31). Aucun précipité n'est détecté à l'extrémité des cordons d'infection lorsque ceux-ci relarguent des bactéries (Figure 31 B et C). De l' H_2O_2 a également été détecté dans les parois de certaines cellules végétales à proximité des cordons d'infection (Figure 31 D).

La plupart des cordons d'infections formés par la souche Rm*katB*⁺⁺ ne contiennent pas d' H_2O_2 (Figure 32). Cependant comme dans les cordons d'infection formés par la souche sauvage, de l' H_2O_2 a été détecté dans les parois des cellules végétales adjacentes aux cordons d'infection observés (Figure 32).

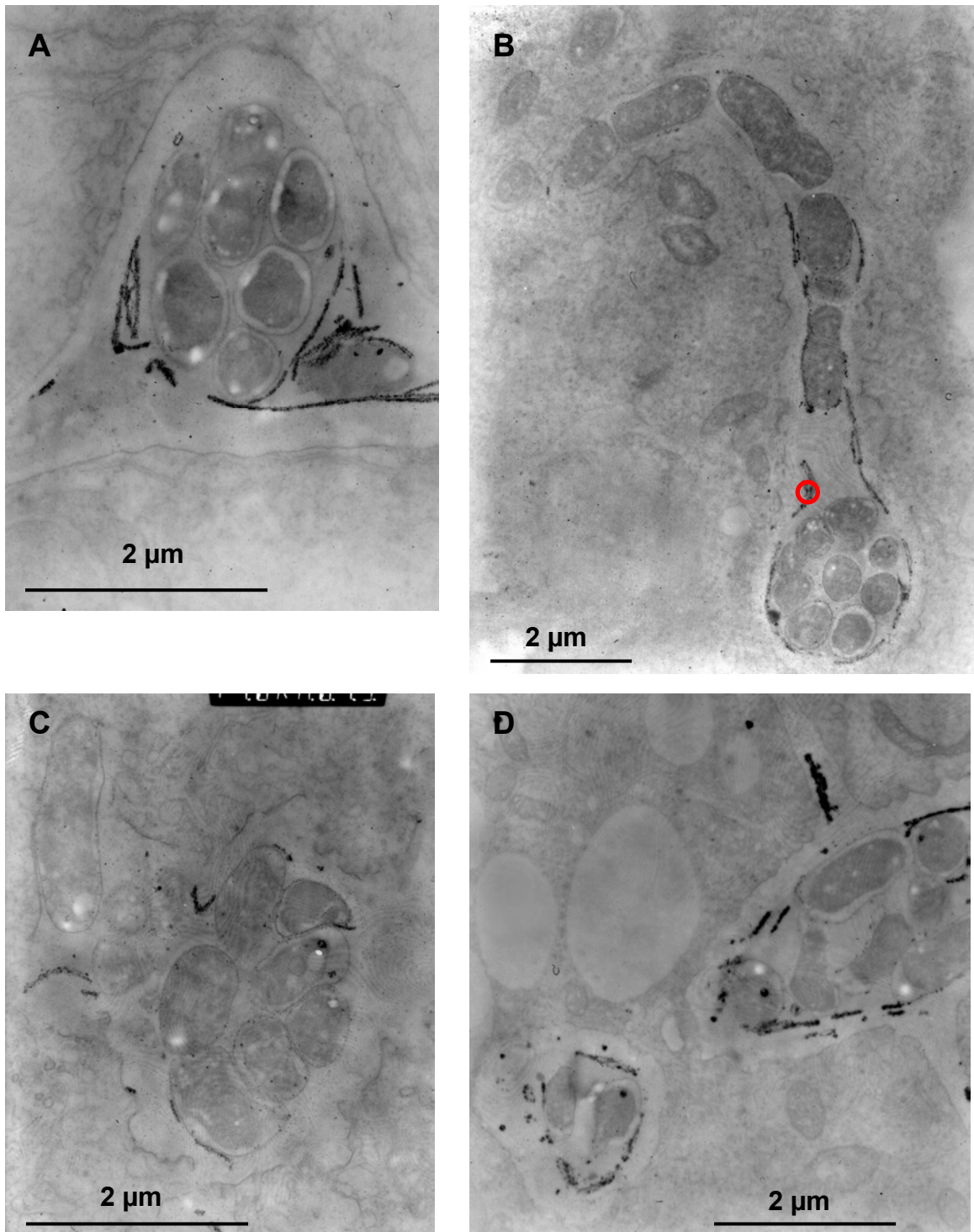


Figure 31 : Analyse ultrastructurale de cordons d'infections formés par la souche Rm1021 chez des jeunes nodosités de 5 jours.

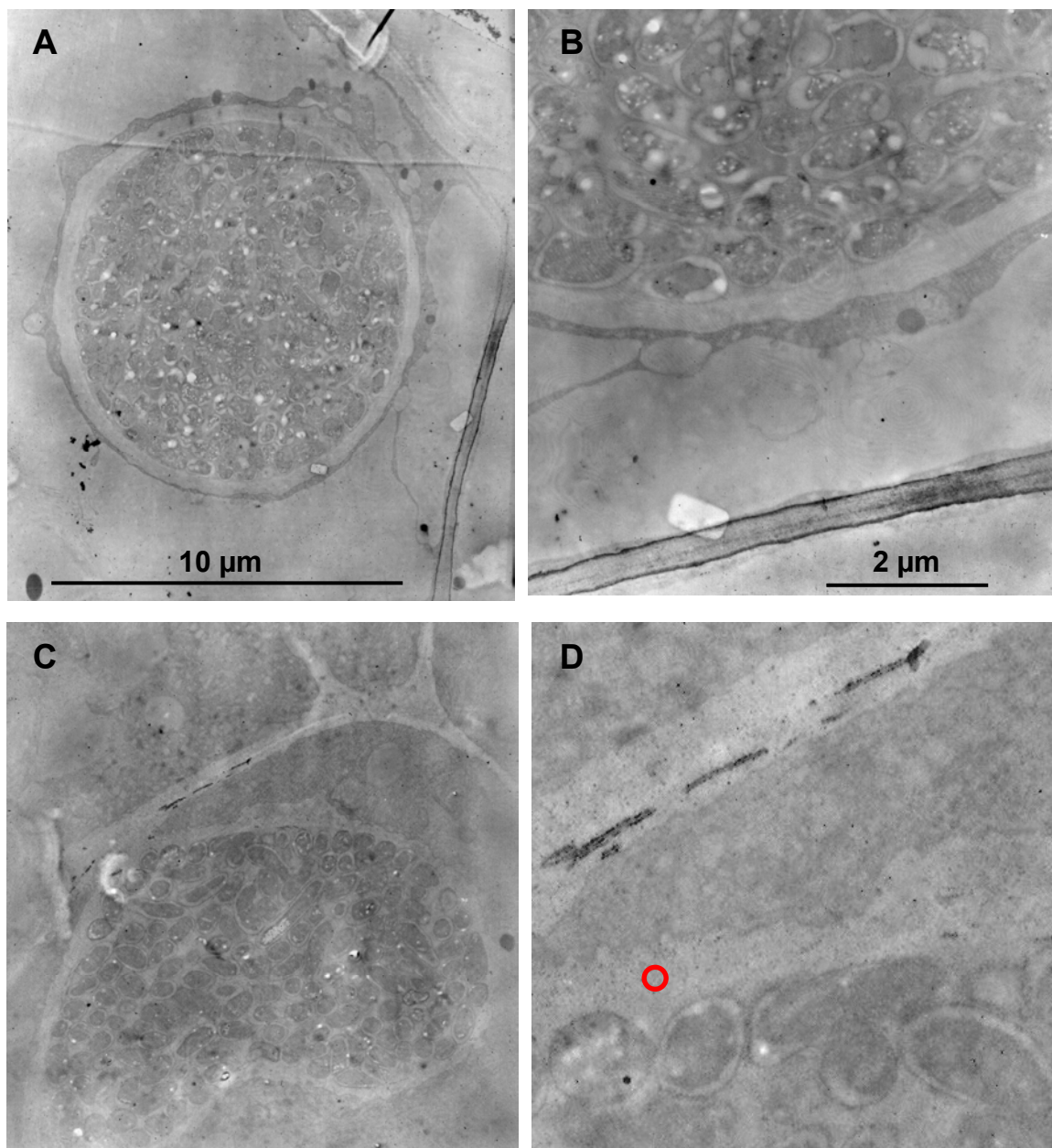


Figure 32 : Analyse ultrastructurale de cordons d'infections formés par la souche *RmkatB⁺⁺* chez des jeunes nodosités de 5 jours. B correspond à un agrandissement de A, D correspond à un agrandissement de C.

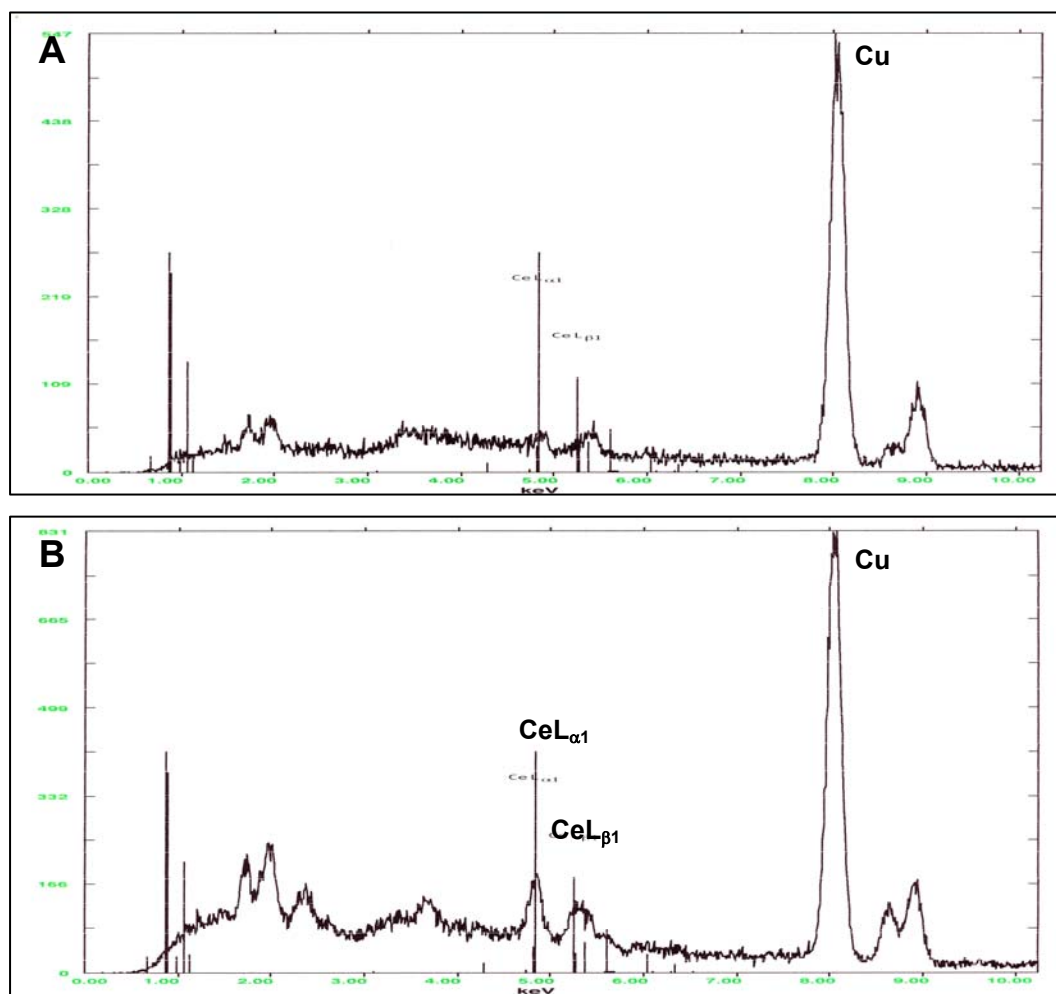


Figure 33 : Microanalyse par sonde électronique (spectrométrie aux rayons X). Analyse au niveau du cercle de la figure 31 B (A). Analyse au niveau du cercle de la figure 32 D (B). Les traits verticaux indiquent le spectre du cérium. Les traits $CeL_{\alpha 1}$ et $CeL_{\beta 1}$ correspondent aux bandes majeures du cérium. Le pic majeur observé (Cu) provient du cuivre des grilles utilisées en microscopie électronique.

La technique de marquage au cérium a donc permis de mettre en évidence une détoxification de l' H_2O_2 des cordons d'infection par le mutant $RmkatB^{++}$. Cette détoxification est corrélée positivement à un phénotype marqué au niveau de la taille et de la forme des cordons d'infection. L' H_2O_2 serait donc indispensable à un développement optimal du cordon d'infection.

Ces résultats sont parfaitement en accord avec l'hypothèse selon laquelle la régulation de la concentration des espèces réactives de l'oxygène jouerait un rôle important dans la

symbiose *Rhizobium*-légumineuse (**article III**). Wisniewski et ses collaborateurs ont proposé que l'activité diamine oxydase (DAO) puisse produire de l' H_2O_2 , qui, utilisé par des peroxydases, pourrait induire l'insolubilisation de glycoprotéines et moduler ainsi la plasticité de la paroi cellulaire (Wisniewski *et al.*, 2000). D'autres sources d' H_2O_2 pourraient également être impliquées c'est le cas de l'oxalate oxydase apoplastique (Brewin *et al.*, 2000) ou de certaines NADPH oxydases membranaires (Lamb et Dixon, 1997). L'absence d' H_2O_2 aux extrémités des cordons d'infection formés par la souche Rm1021 (Figure 31 B etC) permettrait d'éviter un durcissement de la paroi des cordons d'infection et un blocage de la progression des bactéries. Dans le cas du mutant *RmkatB*⁺⁺, l'absence de cross-link autoriserait une division anarchique des bactéries dans tout le volume du cordon d'infection.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

La production d'H₂O₂ est une réponse générale des plantes aux stress biotiques et abiotiques (Apel et Hirt, 2004). Dans le cas de la symbiose luzerne-*S. meliloti*, de l'H₂O₂ a été détecté dans les cordons d'infection mais jamais dans les bactéries ou les bactéroïdes (Santos *et al.*, 2001), ce qui suggère la présence d'une défense catalasique efficace. En effet, pour lutter contre une accumulation excessive d'H₂O₂, *S. meliloti* possède trois catalases codées par trois gènes différents, *katA*, *katB* et *katC*. Une expression différentielle de ces catalases a été observée au cours de la croissance, en conditions de stress oxydatif et lors du développement des nodosités (**article I**).

Ainsi, *katA*, le seul gène catalase induit en phase exponentielle et par l'H₂O₂, est fortement exprimé chez le bactéroïde (**article I**). Chez les bactéries libres, l'induction de *katA* se fait *via* le régulateur transcriptionnel OxyR, qui probablement, est activé directement par l'H₂O₂ comme c'est le cas chez *E. coli*. La caractérisation d'un mutant *oxyR* a permis de montrer que ce régulateur est également impliqué dans l'induction de *katA* observée chez le bactéroïde (**article II**). L'expression d'*oxyR* est également induite chez le microsymbiote (**article II**), ce qui pourrait permettre une augmentation de la sensibilité du bactéroïde à l'H₂O₂. Récemment, des expériences d'analyse transcriptomique et protéomique montrent que l'expression du génome change profondément chez le bactéroïde par rapport à la bactérie libre (Becker *et al.*, 2004 ; Djordjevic *et al.*, 2003). Elles confirment que *katA* et *oxyR* sont des gènes fortement transcrits et traduits lors de la fixation d'azote. Nos travaux ont montré que, malgré la présence de sites potentiels de fixation du régulateur NifA et du facteur alternatif de transcription RpoN en amont d'*oxyR*, ce gène ne semble pas être régulé par NifA. On peut supposer que *katA* est induit en réponse à de fortes quantités d'H₂O₂ produites au sein du bactéroïde. La fixation d'azote *per se* pourrait être à l'origine de cette production exacerbée d'ERO compte tenu du fait que c'est un processus hautement consommateur d'énergie et donc d'oxygène. Cependant, l'origine de cette induction pourrait être tout autre. En effet, il a été montré récemment que l'induction de *katA* se ferait également lors d'une carence en phosphate (Krol et Becker, 2004) *via* le régulateur PhoB. Or, comme de nombreux stress environnementaux, une carence en phosphate peut engendrer une situation de stress oxydatif (Gerard *et al.*, 1999).

Le gène *katC*, l'équivalent fonctionnel de *katE* chez *E. coli* (Loewen et Switala, 1986), est induit en phase stationnaire de croissance et ne s'exprime que chez les bactéries non

différenciées en bactéroïdes, c'est à dire principalement dans les cordons d'infection (**article I**). Cela laisse à penser que les bactéries présentes dans les cordons d'infection se trouveraient dans un état physiologique proche de celui de la phase stationnaire de croissance ; cette hypothèse est largement confortée par les travaux de Denis Gage qui montrent que seules les bactéries situées dans les 60µm des extrémités des cordons d'infection se divisent (Gage, 2002 ; Gage, 2004). Récemment, l'utilisation d'une GFP dont la fluorescence varie en fonction de la phase de croissance des bactéries, a permis de montrer que seules les bactéries situées dans les 10 µm des extrémités des cordons d'infection se trouveraient en phase exponentielle de croissance, les autres se trouveraient en phase stationnaire de croissance (Smit *et al.*, 2004). La physiologie de la phase stationnaire joue un rôle essentiel dans la capacité des brucellae à établir et maintenir leur survie intracellulaire dans les macrophages (Roop II *et al.*, 2003). En effet, le gène *hfq* codant la protéine HF-I, est à la fois indispensable à l'entrée en phase stationnaire et un déterminant majeur de la virulence de la bactérie (Robertson et Roop II, 1999). Cela serait également le cas chez *S. meliloti* où un mutant *hfq* est très affecté dans ses capacités symbiotiques (Barra, 2003). Chez *E. coli*, *katE*, le gène codant « la catalase de la phase stationnaire », est régulé par le facteur alternatif de transcription RpoS (Loewen et Hengge-Aronis, 1994) lui-même régulé par HF-I codé par le gène *hfq* (Brown et Elliott, 1996). Dans la subdivision α des protéobactéries, de nombreux homologues de *hfq* sont connus, mais aucun homologue du gène *rpoS* n'a été identifié. Seul un régulateur contrôlant l'expression de la catalase *katG* chez *Caulobacter crescentus*, une α -protéobactérie, a été identifié. Ce gène nommé *skgA* pour « stationary-phase regulation of *katG* » (Rava *et al.*, 1999) n'a aucune homologie avec *rpoS* et pas d'homologue chez *S. meliloti*. Il serait extrêmement intéressant de trouver le ou les équivalents fonctionnels du régulateur RpoS chez *S. meliloti* ; cela serait envisageable par l'insertion aléatoire d'un transposon dans la souche recombinante GKCZ01 (*pkatC-lacZ*) et la caractérisation des candidats potentiels formant des colonies blanches ou bleu clair sur milieu minimum contenant du X-Gal.

La multiplicité des gènes de catalases chez *S. meliloti* n'est probablement pas due au besoin d'une défense catalasique importante et permanente comme cela avait d'abord été suggéré (Sigaud, 1998). En effet, le niveau d'activité catalase total de *S. meliloti* et d'autres bactéries symbiotiques est particulièrement bas comparé à celui d'autres genre bactériens du sol, et cela malgré la présence de trois gènes catalase (Ohwada *et al.*, 1999). Les bactéries symbiotiques sont ainsi beaucoup plus sensibles à l'H₂O₂ que de nombreux autres genres

bactériens (Ohwada *et al.*, 1999). Cette multiplicité apporte probablement une certaine « plasticité » à la régulation des catalases en augmentant la variabilité des réponses catalasiques à apporter en fonction des conditions rencontrées tant à l'état libre que symbiotique.

Les catalases ne sont probablement pas les seules enzymes capables de détoxifier l' H_2O_2 chez *S. meliloti*. En effet, l'alkyl hydroperoxydase Ahp, récemment décrite comme constituant la première ligne de défense contre l' H_2O_2 d'origine endogène (Seaver et Imlay, 2001) est présente chez *S. meliloti*. De plus, Smc01944, une chloroperoxydase (cpo) sécrétée, induite par un stress oxydatif extrêmement violent (10 mM H_2O_2) a récemment été décrite chez *S. meliloti* (Barloy-Hubler *et al.*, 2004). On ne connaît pas le rôle de cette peroxydase, ni celui des cinq autres peroxydases mises en évidence par le séquençage et l'annotation du génome de *S. meliloti* à savoir Sma1809 décrite comme une « probable non-hème haloperoxydase » et induite *via* le régulateur PhoB lors d'une carence en phosphate (Djordjevic *et al.*, 2003 ; Krol et Becker, 2004), Sma2031, Sma2032 et Smb20054 annotée comme des « hypothétiques non-hème chloroperoxydases », et Smb20860 comme une « hypothétique non-hème haloperoxydase, probable chloroperoxydase ».

De plus, la défense contre un stress oxydatif ne se limite pas seulement aux défenses enzymatiques. En effet, les composés antioxydants comme le glutathion semblent avoir une importance majeure chez *S. meliloti* (**article IV**). Ainsi, une bactérie affectée dans la synthèse du glutathion, voit sa croissance et ses capacités symbiotiques notablement modifiées. L'implication du glutathion dans la défense antioxydante de *S. meliloti* est donc maintenant établie. Plus largement, l'importance du glutathion pour la croissance bactérienne est soulignée par la capacité d'autres bactéries comme *Haemophilus influenzae* (Vergauwen *et al.*, 2003) ou *Streptococcus mutans* (Sherrill et Fahey, 1998) incapables de synthétiser le glutathion d'importer cette molécule. De plus, comme chez *E. coli* (Oktyabrsky *et al.*, 2001), le glutathion serait impliqué dans la régulation des catalases chez *S. meliloti* (**article IV**).

Les résultats obtenus ici renforcent l'hypothèse selon laquelle la régulation de la concentration des ERO et en particulier de l' H_2O_2 jouerait un rôle primordial dans la mise en place de la symbiose *Rhizobium*-légumineuse. En effet, le double mutant *katB⁻katC⁻* est très affecté dans ses capacités à établir une symbiose fonctionnelle. Ce résultat a permis de démontrer le rôle essentiel des catalases lors du processus infectieux (**article I**). Parallèlement

à cela, le mutant *RmkatB⁺⁺*, surexprimant le gène *katB*, est aussi affecté dans ses capacités symbiotiques et présente un phénotype « retardé » (chapitre 3). Un niveau seuil d' H_2O_2 serait donc nécessaire à une interaction optimale. Pas assez de catalase et l' H_2O_2 produit s'accumule et empêche une interaction efficace. Trop de catalase et une partie de l' H_2O_2 produit est dégradé ce qui entraînerait une diminution du nombre des cross-link et affecterait la progression des cordons d'infection. Cette dernière hypothèse sera testée à l'aide d'un anticorps monoclonal capable de détecter les ponts dityrosines (Kato *et al.*, 2000). En effet, si le nombre de dityrosines est diminué de façon significative dans les cordons d'infection formés par le mutant *RmkatB⁺⁺*, cela pourrait être quantifiable par immunolocalisation et démontrerait clairement l'implication de l' H_2O_2 dans les cross-link pariétaux. Cependant, l'hypothèse des cross-link oxydatifs n'est peut être pas la seule à retenir. En effet, les similitudes entre symbiose et pathogénie, font penser que l' H_2O_2 pourrait jouer un rôle non seulement au niveau du remodelage des parois cellulaires (Parniske, 2000), mais aussi de second messager. Celui-ci pourrait intervenir, comme dans la pathogénie, en tant que signal plante-plante ou pourquoi pas comme un signal plante-bactérie. Ainsi, comme il a été vu en introduction, la mono-ubiquitylation de l'actine, une modification post-traductionnelle présente lors des interactions plantes-pathogènes et qui fournit aux micro-filaments une stabilité contre les dégradations protéolytiques, est induite dans les nodosités de *P. vulgaris* (Dantan-Gonzalez *et al.*, 2001). Cette induction a également lieu dans des cultures cellulaires par application d' H_2O_2 suggérant que cette ERO ait un rôle dans certaines modifications du cytosquelette. Afin de vérifier cette hypothèse, des souches bactériennes Rm1021 et *RmkatB⁺⁺* exprimant de façon constitutive la GFP, la CFP ou la YFP (Stuurman *et al.*, 2000) sont en cours de construction. Ces souches permettront de suivre *in vivo* la progression des cordons d'infection et de déterminer si l'organisation du cytosquelette est affectée lors des premières étapes de l'infection avec une bactérie capable de dégrader activement l' H_2O_2 au sein des cordons d'infection.

Le rôle de l' H_2O_2 , en tant que molécule signal entre la plante et la bactérie, sera étudié à partir d'une approche de type génomique fonctionnelle. Une étude transcriptomique, visant à comparer les profils d'expression des souches Rm1021 et *RmkatB⁺⁺* traitées ou non par l' H_2O_2 , est actuellement en cours de réalisation par le Dr Karine Mandon en collaboration avec le Laboratoire de Génétique et Développement de l'Université de Rennes I sur les puces réalisées à l'Université de Bielefeld, Allemagne (Rüberg *et al.*, 2003). Les gènes candidats, ne s'exprimant que chez la bactérie sauvage en phase stationnaire en condition de stress à l' H_2O_2

mais pas chez le mutant de surexpression, seront étudiés afin de déterminer s'ils sont ou non indispensables à la mise en place de la symbiose.

Afin de confirmer la nécessité d'avoir un niveau seuil d' H_2O_2 pour une progression efficace des bactéries dans les cordons d'infection, une autre stratégie consisterait à bloquer directement les sites de production d' H_2O_2 de la plante, au niveau des cordons d'infection. Plusieurs sources d' H_2O_2 pourraient être impliquées : l'oxalate oxydase apoplastique (Brewin *et al.*, 2000), la diamine oxydase (Wisniewski *et al.*, 2000) ou certaines NADPH oxydases membranaires (Lamb et Dixon, 1997). Des lignées transgéniques de pois contenant des constructions anti-sens pour la diamine oxydase ne sont pas affectées dans leur nodulation. Cela indique que l'activité diamine oxydase n'est probablement pas indispensable au développement des nodosités (Wisniewski et Brewin, 2000) et que d'autres sources d' H_2O_2 pourraient être impliquées. La suppression de l'expression des gènes codant des NADPH oxydases par des approches RNAi est envisageable. Cependant, ce type de stratégie reste délicat à mettre en œuvre compte tenu du fait que l' H_2O_2 produit *via* les NADPH oxydases est impliqué dans une très large variété de processus physiologiques (Laloi *et al.*, 2004). Ainsi, la croissance des poils absorbants (Foreman *et al.*, 2003) ou la régulation de la fermeture des stomates (Kwak *et al.*, 2003) font appel à la production d' H_2O_2 *via* des NADPH oxydases. Il serait donc important de modifier la teneur en H_2O_2 des cordons d'infection sans toucher à la production de l' H_2O_2 dans les autres parties de la plante. Ceci ne serait réalisable qu'après identification des gènes NADPH oxydases s'exprimant au niveau des cordons d'infection, et suppression de leur expression par des approches de type RNAi en utilisant soit des promoteurs de gènes de la plante s'exprimant de façon spécifique dans les cordons d'infection – et qui restent à déterminer – soit des promoteurs inductibles lors des premières étapes de l'infection comme celui de *rip1* (Cook *et al.*, 1995).

Ces travaux ont permis de mettre clairement en évidence l'implication des catalases bactériennes et de l' H_2O_2 dans la mise en place de la symbiose. L'identification de gènes cibles inductibles par cette ERO devrait apporter un éclairage nouveau dans la compréhension du rôle de l' H_2O_2 dans le processus symbiotique. Cependant, comme il a été suggéré (**article III**), des ERO autres que l' H_2O_2 , des enzymes autres que les catalases ou des molécules antioxydantes pourraient également jouer un rôle fondamental dans les premières étapes de l'interaction symbiotique en régulant finement l'état rédox cellulaire des deux partenaires. Celui-ci pourrait être analysé grâce à l'expression ectopique de protéines fluorescentes

sensibles aux variations du potentiel rédox (Ostergaard *et al.*, 2001 ; Dooley *et al.*, 2004). Tant au niveau de la plante, qu'au niveau de la bactérie, des approches visant à modifier cet état rédox par génie génétique permettront de valider cette hypothèse.

Review

Reactive oxygen species, nitric oxide and glutathione: a key role in the establishment of the legume–*Rhizobium* symbiosis?

Didier Hérouart ^a, Emmanuel Baudouin ^a, Pierre Frendo ^a, Judith Harrison ^a, Renata Santos ^b, Alexandre Jamet ^a, Ghislaine Van de Sype ^a, Danièle Touati ^b, Alain Puppo ^{a,*}

^a *Laboratoire de Biologie Végétale et Microbiologie, Université de Nice-Sophia Antipolis, CNRS, FRE 2294, Parc Valrose, 06108 Nice, cedex 2, France*

^b *Laboratoire de Génétique Moléculaire des Réponses Adaptatives, Institut Jacques Monod, CNRS-Universités Paris 6 and Paris 7, 2 place Jussieu, 75251 Paris, cedex 05, France*

Received 6 March 2002; accepted 21 March 2002

Abstract

Reactive oxygen species are generated in the first steps of the *Rhizobium*–legume symbiosis. Superoxide radicals and hydrogen peroxide have been detected in infection threads and there is also evidence of the presence of nitric oxide in young alfalfa nodules. Moreover, rhizobial mutants, with a reduced antioxidant defense, exhibit an impaired capacity to nodulate. The oxidative burst generated in response to symbiotic infection can be consistent with rhizobia being initially perceived as invaders by the plant; in this framework, it may be correlated with the existence of abortive infections. However, the burst appears to be also involved in the expression of early nodulins associated with successful infections. Thus, in parallel to its involvement in defense processes, a positive role for the oxidative burst (including nitric oxide) in the establishment of the symbiotic interaction can also be proposed. The burst could trigger the expression of plant and/or bacterial genes which are essential for the nodulation process. In this framework, glutathione and homoglutathione could be key intermediates for gene expression, via the modification of the redox balance. Thus, the oxidative burst may have a dual role in the establishment of the symbiosis. © 2002 Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS. All rights reserved.

Keywords: Glutathione; Nitric oxide; Reactive oxygen species; *Rhizobium*–legume symbiosis

1. Introduction

Reactive oxygen species (ROS) appear to be central components of plant adaptation to both biotic and abiotic stresses. Under such conditions, they may play two divergent roles [8]. Beside their involvement in exacerbating damage, it is now well established that they activate multiple defense responses. Indeed ROS and reactive nitrogen species such as nitric oxide (NO^{*}) have been shown to be involved in the plant defense against abiotic stresses such as drought, air pollutants or UV-B radiation [24,29,31,36]. It is now apparent that ROS and NO^{*} are acting as key signal

molecules in plants [8,15,18]. This was first described in pathogenesis, where the initial defense response is often manifested as the so-called hypersensitive response (HR). One of the earliest events in the HR is the rapid accumulation of ROS—the so-called oxidative burst—and NO^{*} [2,11,16,28,47]. These activated species are involved in the regulation of gene expression during the HR and they appear to play a key role in the coordination of the plant responses to pathogen challenge [10,25,27]. Beside the production of activated species, ROS scavenging enzymes such as ascorbate peroxidase and catalase have been shown to be down regulated during HR [14,35]. Moreover, modulation of glutathione content (GSH) and redox state has been observed during plant–pathogen interactions [34,46] indicating that this major component of the antioxidant defense is another important molecule involved in these processes.

It is becoming more and more apparent that plant pathogenesis and symbiosis are variations on a common theme [3]. In the case of the legume–*Rhizobium* symbiosis,

Abbreviations: γ EC, γ -glutamylcysteine; GSH, glutathione; GSHS, glutathione synthetase; hGSH, homoglutathione; hGSHS, homoglutathione synthetase; H₂O₂, hydrogen peroxide; HR, hypersensitive response; Kat, catalase; Lb, leghemoglobin; NBT, nitroblue tetrazolium; NO^{*}, nitric oxide; ROS, reactive oxygen species; SOD, superoxide dismutase

* Corresponding author.

E-mail address: puppo@unice.fr (A. Puppo).

the bacteria respond to a plant signal (flavonoids) by producing Nod factors that elicit nodule organogenesis on legume roots [45]. The bacteria, once recognized, enter the plant through the root hairs via infection threads. At the same time, dedifferentiation and division of the root cortical cells occur, which lead to the formation of a new organ, the nodule. Inside the developing nodule, the bacteria differentiate into bacteroids able to reduce atmospheric nitrogen into ammonium. In contrast to infection by pathogens, a close association is established with symbiotic bacteria. However, it appears that bacteria are initially recognized as intruders but then prevent or overcome plant defense responses [3,13]. A symbiosis specific expression of genes encoding products homologous to plant defense proteins occurs and there is evidence for the existence of a HR [22,37,48]. In this framework, it is interesting to study the involvement of ROS, NO[•] and GSH in this symbiotic interaction.

2. ROS

To investigate the role of ROS in alfalfa–*Sinorhizobium meliloti* symbiosis, the detection of superoxide radicals (O₂^{•-}) and hydrogen peroxide (H₂O₂) was performed during the nodule development. In early stages of the symbiotic interaction, the oxidation of nitroblue tetrazolium (NBT) can be detected as a purple precipitate in infection threads, indicating that O₂^{•-} is produced during the infection process [41]. A similar staining can be observed in infected cells of young nodules up to 9 days revealing a prolonged production of this radical during the nodule development. H₂O₂ production was detected in ultrathin sections of mature 6-week-old nodules as an electron-dense precipitate stained with cerium chloride [4]. In infection zone II, a large cerium labeling was observed in the cell walls of infected cells and in some infection threads all around bacteria [41]. A strong cerium precipitate can also be observed around peribacteroid and bacteroid membranes of senescent infected cells of the zone IV, indicating clearly that H₂O₂ is involved in the senescence process (Hérouart D. et al., unpublished data). In contrast, no H₂O₂ accumulation can be detected in cells of meristematic zone I and in cells of fixation zone III. In conclusion, an H₂O₂ accumulation was observed during the infection process and during the degeneration of the symbiotic association. It is interesting to point out that in all steps of the development of the nodule, no H₂O₂ was detected inside bacteria and bacteroids, suggesting the presence of a very efficient bacterial antioxidant defense.

To analyze the importance of the bacterial defense against ROS during the establishment of symbiosis, we started to study two important ROS-scavenging enzymes, superoxide dismutase (SOD) and catalase in *S. meliloti*. The analysis of crude cell extracts on a native gel, using a NBT staining assay, revealed that only one SOD encoded by the *sodA* gene can be detected (although the entire genome

sequencing has now revealed the existence of a second *sod* gene). The null mutant was constructed and characterized in free-living conditions; the nodulation and fixation capacities of the *sodA* mutant were also studied [40]. The percentage of nodulated plants was almost halved with the mutant strain and the number of nodules per plant was also reduced as compared with a wild type strain. Moreover, only half of the nodulated plants showed a detectable nitrogen fixation capacity in the case of the *sodA* mutant. In those nodulated plants capable of fixing nitrogen, the *sodA* mutant bacteroid showed a significantly lower nitrogen fixation capacity as compared with the control strain. The analysis of defective nodules by electron microscopy showed that *sodA* mutant bacteroids are irregular in infection threads as compared with the perfect spherical wild type bacteroids. In addition, some of them are released in the plant cytoplasm without a peribacteroid membrane. Moreover in most infected cells in zone II, an earlier senescence has been detected with a large accumulation of ghost membranes and vesicles. Thus, the deletion of *sodA* in *S. meliloti* induces a poor nodulation in alfalfa and the development of abnormal bacteroids, indicating that SodA is essential for the symbiotic process [40].

Concerning the H₂O₂-scavenging enzymes, three achromatic bands corresponding to three different catalases, namely KatA, KatB, and KatC, can be visualized on a native gel by the inhibition of diamino benzidine oxidation by H₂O₂ [42]. Using PCR strategies, the three genes encoding these catalases have been cloned. The analysis of the expression of these catalases in free-living bacteria showed that KatB is always detected during bacterial growth. In contrast, KatA is detectable in the exponential phase whereas KatC is present in the stationary phase indicating a differential regulation of these catalases during bacterial growth [42]. Moreover, only KatA is induced in response to the addition of exogenous H₂O₂ into the culture medium [26]. Preliminary analysis of the expression of a *katA-lacZ* fusion *in planta* using X-gal as substrate for the β-galactosidase indicates that no blue staining can be observed in infection threads despite the presence of H₂O₂ all around bacteria in some infection threads. In contrast, a strong expression of the fusion is detected in nitrogen fixing bacteroids, confirming that KatA is the major catalase in the microsymbionts [42]. Several null mutant strains have been constructed and tested for their nodulation and nitrogen fixation capacities. No significant difference was observed between single catalase null mutants and the wild type strain [26,42]. In contrast, a severe reduction of the number of nodulated plants combined with a very low nitrogen fixation was observed with a *katA/katC* double mutant [42]. Analysis of these defective nodules by electron microscopy and the construction of the other double mutants (*katA/katB* and *katC/katB*) are in progress.

All these results indicate that superoxide dismutase and catalases of *S. meliloti* are essential for the establishment and the maintenance of symbiosis with alfalfa. Other genes encoding proteins such as CuZnSOD, alkyl hydroperoxide

reductase, glutaredoxin, thioredoxin, which are known to be involved in the response of other bacteria to oxidative stress, have also been found in the genome of *S. meliloti* and the role of these proteins in the symbiotic process needs further attention. Moreover, as ROS are produced by the plant partner, it would also be of interest to analyze the consequences of modifying ROS-scavenging activities of the plant on the symbiotic capacities. Furthermore, the availability of the complete sequence of *S. meliloti* genome and of large collections of *Medicago truncatula* ESTs will give the opportunity to identify target genes regulated by ROS during symbiosis in both partners.

3. NO[•]

Studies on animal cells point out that the biological output of the oxidative burst frequently comes from a synergistic effect between different reactive species. In this framework, the free radical gas NO[•], together with O₂⁻ and H₂O₂, is considered as a major component of the oxidative burst. Recent data indicate that NO[•] is also present in plants and participates in the regulation of plant development and plant defense to pathogens [10,25,27]. Interestingly, as described in animals, NO[•] can also act synergistically with other ROS to fulfill its physiological roles in plants [12].

Although its role in symbiosis has not been unraveled so far, several lines of evidence suggest that NO[•] could participate in the symbiotic process establishment and/or regulation. The presence of NO[•] complexed with leghemoglobin (Lb), a hemoprotein ensuring the oxygen flux to the bacteroids, has been detected in soybean nodules by Electron Paramagnetic Resonance [33]. More recently, the presence of NO[•] in young alfalfa nodules has also been shown by laser confocal microscopy, using a specific fluorescent probe (Baudouin E. et al., unpublished data). In mammals, NO[•] is synthesized as a byproduct of the transformation of arginine to citruline by NO[•] synthases [1]. As nodules present a high concentration of arginine [43], they could readily sustain a NO[•] synthase activity. Furthermore, the presence of a NO[•] synthase-like activity, which is inhibited by arginine analogs, has been reported in *Lupinus albus* roots and nodules [7]. The same analogs could partially inhibit NO[•] detection in alfalfa nodules, therefore suggesting that a NO[•] synthase-like enzyme could be involved in NO[•] production in plant nodules.

Until now, NO[•] has been only considered as a negative regulator of nitrogen fixation. NO[•] has been reported as a potent inhibitor of soybean bacteroid nitrogenase in vitro [44]. It could also interfere with O₂ level regulation, in relation to its binding to Lb. Indeed, Lb–NO complexes are much more stable than Lb–O₂ ones. NO[•] binding would therefore impair Lb functionality by competing with O₂ for binding sites. NO[•] can also form complexes with FixL, a membrane-bound hemoprotein involved in the regulation of nitrogen fixation in *S. meliloti* [9,30]. FixL functions as an

O₂-sensor and is inactivated by O₂ binding. Under low O₂ concentrations, FixL is activated and mediates the transcriptional activation of *nifA* and *fixK*, two genes required for nitrogen fixation. NO[•] binding leads to similar conformational changes of FixL as those observed upon O₂ binding, therefore raising the possibility of NO[•] functioning as an alternative regulator of FixL [23]. A role for NO[•] as a negative regulator of nitrogen fixation is rather improbable in functional nodules. Nevertheless, it would be of interest to address this question for plants under stress leading to severe fixation loss.

The role of NO[•] during symbiosis is unlikely to be restricted to the negative regulation of nitrogen fixation. Some evidence suggests that NO[•] could play a role in earlier steps of the symbiotic interaction. In particular, NO[•] has been detected in young nodules before the onset of nitrogen fixation. Moreover, pharmacological data indicate that the modulation of NO[•] level leads to the modification of the number of nodule per root (Baudouin E. et al., unpublished data). Future researches will have to clarify the putative role of NO[•] in the early steps of the interaction. In particular, one has to determine whether NO[•] belongs to vestigial defense processes (i.e. the abortion of the majority of the infection threads by a mechanism similar to the hypersensitive cell death) or participates in the regulation of specific symbiotic mechanisms. In this view, the identification of molecular targets regulated by NO[•] during the early steps of the symbiotic process will be of major interest. Moreover, as NO[•] is not the only reactive species produced during symbiotic interaction, the potential synergy between these species will have to be considered, taking into account the recent data on plant–pathogen interactions.

4. GSH

GSH is a low molecular mass thiol implicated in the antioxidant defense through the ascorbate/GSH cycle. It plays a crucial role in plant defense against abiotic and biotic stresses. GSH is also involved in heavy metal tolerance and xenobiotic detoxification [19] and modification of the reduced/oxidized GSH pool has been observed during plant–pathogen interactions [34,46]. Moreover, GSH has also been shown to be involved in the regulation of cell division in the apical meristem of *Arabidopsis* roots [39]. The biosynthesis pathway of GSH is a two step-process: in the first step, γ -glutamylcysteine synthetase (γ -ECS) catalyzes the formation of γ -glutamylcysteine (γ -EC) from glutamate and cysteine. In a second step, glutathione synthetase (GSHS) adds a glycine to the carboxy-terminal of γ -EC, which results in GSH.

One of the characteristics of legumes is the presence of homoglutathione (γ -glutamylcysteine- β -alanine; hGSH), a homologue of GSH, which is present instead of or in addition to GSH. The formation of hGSH is catalyzed by a specific enzyme, homoglutathione synthetase (hGSHS),

which adds β -alanine to the carboxy-terminal of γ -EC to form hGSH [21]. Studies have shown that both GSH and hGSH are more abundant in nodules than in the other organs of the plant [20,32]. The highest levels of GSH and hGSH are observed in the infected zones of both determinate and indeterminate nodules [32]. In addition, during both natural and induced senescence, thiol content and synthesis decline and the thiol pool becomes more oxidized [17,32]. Taken together, these results strongly suggest that GSH/hGSH have a role to play in the maintenance of the mature nodule.

Whereas the synthesis and the involvement of GSH/hGSH have been studied in the mature nitrogen-fixing nodule, no studies on their implication during the first steps of symbiosis have been performed. GSH/hGSH may have a role in the formation and the regulation of the nodule meristem as they have been shown to be very important in the functioning of root tip meristem [49]. Moreover, as GSH/hGSH induce the expression of plant defense genes [51], they may also be involved in the regulation of the number of nodules per plant. In a first step, to determine the importance of GSH/hGSH in nodule early development, *M. truncatula* plants were treated with L-buthionine (*S,R*)-sulfoximine (BSO), a specific inhibitor of γ -ECS, before inoculation with *S. meliloti*. Preliminary results show that BSO treated plants have less nodules than control plants suggesting that GSH/hGSH is indeed involved in the first steps of the nodule development. Genetic transformation of *M. truncatula* plants using γ -ECS, GSHS and hGSHS antisens constructions is in progress to validate this result and to examine the role of each thiol during the nodulation process.

5. Conclusion

The data reviewed in this paper point out that, in addition to their involvement in nodule functioning, ROS, NO^* and GSH also play an important role in the early steps of symbiotic interaction and nodule development. In this framework, different roles can be proposed for these reactive and antioxidant species (Fig. 1).

The oxidative burst generated in response to symbiotic infection can be consistent with rhizobia being initially perceived as invaders by the plant. H_2O_2 and peroxidase may be involved in the regulation of infection [6]. The burst may be correlated with the existence of abortive infections: the collapse of infection threads may be associated with local production of H_2O_2 , via the control of the fluidity of the matrix that surrounds rhizobia in the infection thread lumen [52]. On the other hand, some infections are successful. Thus, it can be suggested that rhizobia inhibit signaling pathways leading to the deleterious defense cascade. The prolonged maintenance of the oxidative burst might keep the plant's options open, allowing it, in the absence of an appropriate bacterial signal, to switch to a defense response.

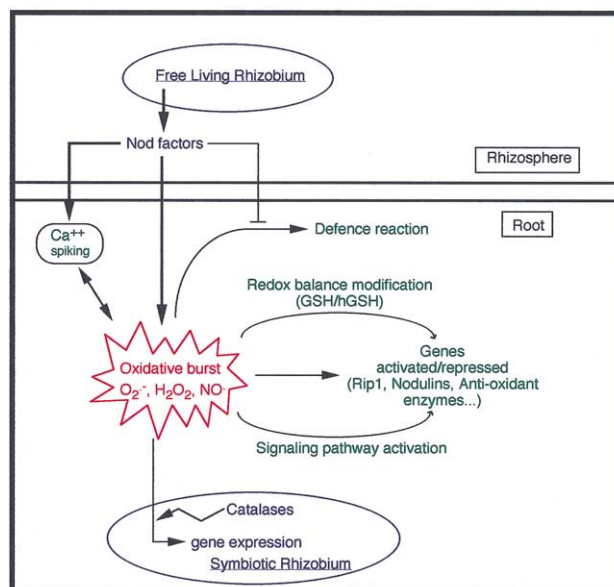


Fig. 1. General scheme summarizing the possible involvement of ROS, NO^* and GSH in the nodulation process.

In parallel to its involvement in defense processes, a positive role for the oxidative burst (including NO^*) in the establishment of the symbiotic interaction can also be proposed. In this way, the propagation of normal infection threads may also depend on the dynamic equilibrium between secretion of nodule extensin into the lumen and the insolubilisation of this matrix by locally generated H_2O_2 [52]. Moreover, the burst could trigger the expression of plant and/or bacterial genes that are essential for the nodulation process. It has been reported that an oxidative burst at the very early stage of infection is necessary for the induction of the early nodulin Rip1 peroxidase in the root of *M. truncatula* [38]. Furthermore, Nod factors stimulate the oxidative burst and pharmacological effectors that inhibit the burst were shown to block induction of plant marker genes for nodulation (Cook D.R., personal communication). In this framework, GSH and hGSH could be key intermediates for gene expression, via the modification of the cell redox balance. In the same way, a connection with the calcium spiking shown in the early steps of the nodulation process [50] could also occur, as reported for plant responses to stress [5].

Thus it appears that the oxidative burst may have a dual role in the establishment of the symbiosis (Fig. 1). The biochemical and genetic approaches described here, together with the analysis of nodulation mutants, should allow the determination of the burst targets, which is a crucial step to validate the model proposed here.

Acknowledgements

This work was supported by the Improving Human Potential European Programme (contract no. HPRN-CT-

2000-00094) and by the Programme de Recherche Fondamentale en Microbiologie (contract no. 010002-DR02).

References

- [1] W.K. Alderton, C.E. Cooper, R.G. Knowles, Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition, *Biochem J.* 357 (2001) 593–615.
- [2] C.J. Baker, E.W. Orlandi, Active oxygen in plant pathogenesis, *Annu. Rev. Phytopathol.* 33 (1995) 299–321.
- [3] C. Baron, P.C. Zambryski, The plant response in pathogenesis, symbiosis, and wounding: Variations on a common theme? *Annu. Rev. Genet.* 29 (1995) 107–129.
- [4] C.S. Bestwick, I.R. Brown, M.H.R. Bennett, J.W. Mansfield, Localization of hydrogen peroxide accumulation during the hypersensitive reaction of lettuce cells to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, *Plant Cell* 9 (1997) 209–221.
- [5] C. Bowler, R. Fluhr, The role of calcium and activated oxygens as signals for controlling cross-tolerance, *Trends Plant Sci.* 5 (2000) 241–245.
- [6] D. Cook, D. Dreyer, D. Bonnet, M. Howell, E. Nony, K. Vanden-Bosch, Transient induction of a peroxidase gene in *Medicago truncatula* precedes infection by *Rhizobium meliloti*, *Plant Cell* 7 (1995) 43–55.
- [7] M. Cueto, O. Hernandez-Perera, R. Martin, M.L. Bentura, J. Rodrigo, S. Lamas, et al., Presence of nitric oxide synthase activity in roots and nodules from *Lupinus albus*, *FEBS Lett.* 398 (1996) 159–164.
- [8] J.F. Dat, S. Vandenabeele, E. Vranova, M. Van Montagu, D. Inze, F. Van Breusegem, Dual action of the active oxygen species during plant stress responses, *Cell Mol. Life Sci.* 57 (2000) 779–795.
- [9] M. David, M.L. Daveran, J. Batut, A. Dedieu, O. Domergue, J. Ghai, et al., Cascade regulation of *nif* gene expression in *Rhizobium meliloti*, *Cell* 54 (1988) 671–683.
- [10] M. Delledonne, I. Murgia, D. Ederle, P.F. Sbicego, A. Biodani, A. Polverari, et al., Reactive oxygen intermediates modulate nitric oxide signaling in the plant hypersensitive disease resistance response, *Plant Physiol. Biochem.* 40 (2002) (in press).
- [11] M. Delledonne, Y. Xia, R.A. Dixon, C. Lamb, Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance, *Nature* 394 (1998) 585–588.
- [12] M. Delledonne, J. Zeier, A. Marocco, C. Lamb, Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (2001) 13454–13459.
- [13] M.A. Djordjevic, D.W. Gabriel, B.G. Rolfe, *Rhizobium*: The refined parasite of legumes, *Annu. Rev. Phytopathol.* 25 (1987) 145–168.
- [14] S. Dorey, F. Baillieux, P. Saindrenan, B. Fritig, S. Kauffmann, Tobacco class I and II catalases are differentially expressed during elicitor-induced hypersensitive cell death and localized acquired resistance, *Mol. Plant–Microbe Interact.* 11 (1998) 1102–1109.
- [15] J. Durner, D.F. Klessig, Nitric oxide as a signal in plants, *Curr. Opin. Plant Biol.* 2 (1999) 369–374.
- [16] J. Durner, D. Wendehenne, D.F. Klessig, Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 10328–10333.
- [17] P.J. Evans, D. Gallesi, C. Mathieu, M.J. Hernandez, M. de Felipe, B. Halliwell, et al., Oxidative stress occurs during soybean nodule senescence, *Planta* 208 (1999) 73–79.
- [18] C.H. Foyer, H. Lopez-Delgado, J.F. Dat, I.M. Scott, Hydrogen peroxide and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling, *Physiol. Plant.* 100 (1997) 241–254.
- [19] C.H. Foyer, H. Rennenberg, Regulation of glutathione synthesis and its role in abiotic and biotic stress defence, in: C. Brunold (Ed.), *Sulfur Nutrition and Sulfur Assimilation in Higher Plants*, Paul Haupt, Bern, 2000, pp. 127–153.
- [20] P. Frendo, D. Gallesi, R. Turnbull, G. Van de Sype, D. Hérouart, A. Puppo, Localisation of glutathione and homogluthathione in *Medicago truncatula* is correlated to a differential expression of genes involved in their synthesis, *Plant J.* 17 (1999) 215–219.
- [21] P. Frendo, M.J. Hernandez Jimenez, C. Mathieu, L. Duret, D. Gallesi, G. Van de Sype, et al., A *Medicago truncatula* homogluthathione synthetase is derived from glutathione synthetase by gene duplication, *Plant Physiol.* 126 (2001) 1706–1715.
- [22] P. Gamas, F. de Billy, G. Truchet, Symbiosis-specific expression of two *Medicago truncatula* nodulin genes, *MtNI* and *MtNI3*, encoding products homologous to plant defense proteins, *Mol. Plant–Microbe Int.* 11 (1998) 393–403.
- [23] W. Gong, B. Hao, M.K. Chan, New mechanistic insights from structural studies of oxygen-sensing domain of *Bradyrhizobium japonicum* FixL, *Biochemistry* 39 (2000) 3955–3962.
- [24] L.M. Guan, J. Zhao, J.G. Scandalios, Cis-elements and trans-factors that regulate expression of the maize Cat1 antioxidant gene in response to ABA and osmotic stress: H₂O₂ is the likely intermediary signaling molecule for the response, *Plant J.* 22 (2000) 87–95.
- [25] J.T. Hancock, R. Desikan, A. Clarke, R.D. Hurst, S.J. Neill, Cell signalling following plant/pathogen interactions involves the generation of reactive oxygen and reactive nitrogen species, *Plant Physiol. Biochem.* 40 (2002) (in press).
- [26] D. Hérouart, S. Sigaud, S. Moreau, P. Frendo, D. Touati, A. Puppo, Cloning and characterization of the *katA* gene of *Rhizobium meliloti* encoding a hydrogen peroxide-inducible catalase, *J. Bacteriol.* 178 (1996) 6802–6809.
- [27] X. Huang, E. Kiefer, U. von Rad, D. Ernst, I. Foissner, J. Durner, Nitric oxide burst and nitric oxide-dependent gene induction in plants, *Plant Physiol. Biochem.* 40 (2002) 000.
- [28] C. Lamb, R.A. Dixon, The oxidative burst in plant disease resistance, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48 (1997) 251–275.
- [29] C. Langebartels, M. Schraudner, W. Heller, D. Ernst, H. Sander-mann, Oxidative stress and defense reactions in plants exposed to air pollutants and UV-B radiation, in: D. Inze, M. Van Montagu (Eds.), *Oxidative stress in plants*, Harwood Academic Publishers, Amsterdam, 2000, pp. 105–135.
- [30] G.S. Lukat-Rodgers, K.R. Rodgers, Characterization of ferrous FixL-nitric oxide adducts by resonance Raman spectroscopy, *Biochemistry* 36 (1997) 4178–4187.
- [31] S.A.H. Mackerness, C.F. John, B. Jordan, B. Thomas, Early signaling components in ultraviolet-B responses: distinct roles for different reactive oxygen species and nitric oxide, *FEBS Lett.* 489 (2001) 237–242.
- [32] M.A. Matamoros, J.F. Moran, I. Iturbe-Ormaetxe, M.C. Rubio, M. Becana, Glutathione and homogluthathione synthesis in legume root nodules, *Plant Physiol.* 121 (1999) 879–888.
- [33] C. Mathieu, S. Moreau, P. Frendo, A. Puppo, M.J. Davies, Direct detection of radicals in intact soybean nodules: presence of nitric oxide-leghemoglobin complexes, *Free Rad. Biol. Med.* 24 (1998) 1242–1249.
- [34] M.J. May, K.E. Hammond-Kosack, J.D.G. Jones, Involvement of reactive oxygen species, glutathione metabolism, and lipid peroxidation in the Cf-gene-dependent defense response of tomato cotyledons induced by race-specific elicitors of *Cladosporium fulvum*, *Plant Physiol.* 110 (1996) 1367–1379.
- [35] R. Mittler, X. Feng, M. Cohen, Post-transcriptional suppression of cytosolic ascorbate peroxidase expression during pathogen-induced programmed cell death in tobacco, *Plant Cell* 10 (1998) 461–473.

- [36] Y. Murata, Z.M. Pei, I.C. Mori, J. Schroeder, Abscissic acid activation of plasma membrane Ca^{2+} channels in guard cells requires cytosolic NAD(P)H and is differentially disrupted upstream and downstream of reactive oxygen species production by *abi* and *abi2-1* protein phosphatase 2C mutants, *Plant Cell* 13 (2001) 2513–2523.
- [37] M. Parniske, C. Zimmermann, P.B. Cregan, D. Werner, Hypersensitive reaction of nodule cells in the *Glycine max* sp./*Bradyrhizobium japonicum* symbiosis occurs at the genotype specific level, *Bot. Acta* 103 (1990) 318–320.
- [38] S.K. Ramu, H.M. Peng, D. Cook, Rhizobial nod factor triggers a spatially localized oxidative burst that is implicated in early nodulin regulation (Abstr.), International Society for Molecular Plant–Microbe Interactions, St Paul, 1999, pp. 71.
- [39] R. Sanchez-Fernandez, M. Fricker, L.B. Corben, N.S. White, N. Sheard, C.J. Leaver, et al., Cell proliferation and hair tip growth in the *Arabidopsis* root are under mechanistically different forms of redox control, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 2745–2750.
- [40] R. Santos, D. Hérouart, A. Puppo, D. Touati, Critical protective role of bacterial superoxide dismutase in *Rhizobium*–legume symbiosis, *Mol. Microbiol.* 38 (2000) 750–759.
- [41] R. Santos, D. Hérouart, S. Sigaud, D. Touati, A. Puppo, Oxidative burst in alfalfa–*Sinorhizobium meliloti* symbiotic interaction, *Mol. Plant–Microbe Interact.* 14 (2001) 86–89.
- [42] S. Sigaud, V. Becquet, P. Frendo, A. Puppo, D. Hérouart, Differential regulation of two divergent HP11-like catalase genes of *Sinorhizobium meliloti* during free living growth and protective role of both catalases during symbiosis, *J. Bacteriol.* 181 (1999) 2634–2639.
- [43] J.G. Streeter, Carbohydrate, organic acid and amino acid composition of bacteroids and cytosol from soybean nodules, *Plant Physiol.* 85 (1987) 768–773.
- [44] J.C. Trinchant, J. Rigaud, Nitrite and nitric oxide as inhibitors of nitrogenase from soybean bacteroids, *Appl. Environ. Microbiol.* 44 (1982) 1385–1388.
- [45] G. Truchet, P. Roche, P. Lerouge, J. Vasse, S. Camut, F. de Billy, et al., Sulphated lipo-oligosaccharide signals of *Rhizobium meliloti* elicit root nodule organogenesis in alfalfa, *Nature* 351 (1991) 670–673.
- [46] H. Vanacker, T.L.W. Carver, C.H. Foyer, Pathogen-induced changes in the antioxidant status of the apoplast in barley leaves, *Plant Physiol.* 117 (1998) 1103–1114.
- [47] W. Van Camp, M. Van Montagu, D. Inze, H_2O_2 and NO: redox signals in disease resistance, *Trends Plant Sci.* 3 (1998) 330–334.
- [48] J. Vasse, F. de Billy, J. Truchet, Abortion of infection during the *Rhizobium meliloti*–alfalfa symbiotic interaction is accompanied by a hypersensitive reaction, *Plant J.* 4 (1993) 555–566.
- [49] T. Vernoux, R.C. Wilson, K.A. Seeley, J.P. Reichheld, S. Muroy, S. Brown, et al., The *ROOT MERISTEMLESS1/CADMIUM SENSITIVE2* gene defines a glutathione-dependent pathway involved in initiation and maintenance of cell division during postembryonic root development, *Plant Cell* 12 (2000) 97–109.
- [50] R.J. Wais, C. Galera, G. Oldroyd, R. Catoira, R.V. Penmetza, D. Cook, et al., Genetic analysis of calcium spiking responses in nodulation mutants of *Medicago truncatula*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (2000) 13407–13412.
- [51] V.P.M. Wingate, M.A. Lawton, C.J. Lamb, Glutathione causes a massive and selective induction of plant defense genes, *Plant Physiol.* 87 (1988) 206–210.
- [52] J.P. Wisniewski, E.A. Rathbun, J.P. Knox, N.J. Brewin, Involvement of diamine oxidase and peroxidase in insolubilization of extracellular matrix: Implications for pea nodule initiation by *Rhizobium leguminosarum*, *Mol. Plant–Microbe Int.* 13 (2000) 413–420.

MATERIELS ET METHODES

MATERIELS ET METHODES

1. MATERIEL BIOLOGIQUE ET CONDITIONS DE CULTURE

1.1. Matériel bactérien, plasmides et conditions de culture

Les souches et les plasmides utilisés sont présentés dans les tableaux de souches et de plasmides de la partie « Résultats ». Les souches d'*Escherichia coli* utilisées dérivent toutes de la souche DH5 α (Woodcock *et al.*, 1989). Elles sont cultivées à 37°C en milieu riche de Luria Bertani (LB) (extrait de levure, 5g/L ; tryptone, 10g/L ; NaCl, 5g/L). Les souches de *Sinorhizobium meliloti* utilisées dérivent de plusieurs souches : Rm5000 (Finan *et al.*, 1984), GMI211 (Niel *et al.*, 1977), Rm1021 (Meade *et al.*, 1982). Elles sont cultivées à 30°C en milieu riche LBMC (LB additionné de 2,5mM de MgSO₄ et de 2,5mM de CaCl₂) ou en milieu minimum M9 (42,5mM de Na₂HPO₄, 22mM de KH₂PO₄, 8,5mM de NaCl, 18,7mM de NH₄Cl, 1mM de MgSO₄, 0,25mM de CaCl₂, 4g/L de glucose) ou Vincent modifié (14,7mM de K₂HPO₄, 11,5mM de KH₂PO₄, 0,46mM de CaCl₂.2H₂O, 0,037mM de FeCl₃, 1mM de MgSO₄.7H₂O, 4,1 μ M de biotine (préparée dans NaOH 0,1M), 1mL d'oligo-éléments (pour 1L : 3g de H₃BO₃, 2,23g de MnSO₄.7H₂O, 0,287g de ZnSO₄.7H₂O, 0,125g de CuSO₄.5H₂O, 0,065g de CoCl₂.6H₂O, 0,12g de Na₂MoO₄.2H₂O), 10mM de Na₂-succinate.6H₂O) (Vincent, 1970).

Les cultures sont faites en présence des antibiotiques adéquats : rifampicine (30 μ g/mL), streptomycine (200 μ g/mL), ampicilline (100 μ g/mL), chloramphénicol (10 μ g/mL), néomycine (200 μ g/mL), kanamycine (100 μ g/mL). Les milieux sont solidifiés par ajout d'agar (15g/L).

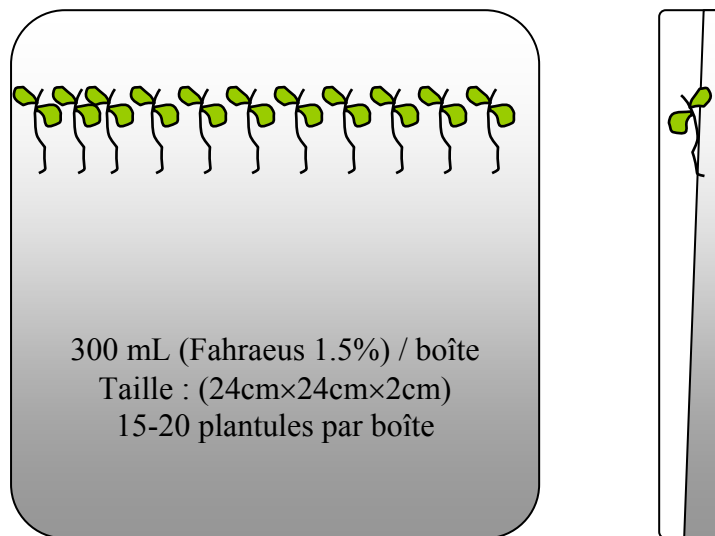
Test de sensibilité à l'H₂O₂ : la sensibilité des mutants à l'H₂O₂ est déterminée par un test d'inhibition de croissance. 0,1mL de culture est étalé sur milieu LBMC dépourvu d'antibiotique et des disques de papier (7mm, Whatman 3M) imprégnés d'H₂O₂ (5 μ L, 1M) sont disposés sur les étalements bactériens. Les diamètres des zones d'inhibition de croissance sont mesurés au bout de trois jours de croissance à 30°C.

1.2. Matériel végétal et conditions de culture

Les graines de *Medicago sativa* L. var Europe ont été fournies par l'INRA de Rennes (Domaine de la Motte, La Rhu). Les graines sont stérilisées pendant 15 minutes dans une solution de chlorure mercurique à 0,02% sous agitation dans des tubes Falcon de 50 mL, puis

rincées au moins cinq fois dans de l'eau distillée stérile. Une cinquantaine de graines est déposée en conditions stériles dans des boîtes de plastiques carrés (12×12 cm) stériles, contenant 30 mL de milieu Farhaeus gélosé à 0,8 % (Farhaeus, 1957). La germination a lieu à l'obscurité pendant 48 heures à 24°C. Les plantules (taille du germe d'environ 1cm) sont ensuite transférées dans des tubes ou dans des boîtes de plastiques carrés (20×20 cm) stériles, contenant du milieu Farhaeus gélosé à 1,5 %. Les plantes poussent en chambres de culture à 22°C, avec 16h de jour / 8h de nuit, 60 % d'humidité et un éclairage de 65 $\mu\text{E/s/m}^2$. Les racines sont placées à l'obscurité grâce à des portoirs en bois pour les tubes et à du papier aluminium pour les boîtes. Trois jours après transfert des plantules, chaque racine est infectée par 100 μL d'inoculum (solution bactérienne à $\text{DO}_{600} = 0,1$ dans de l'eau distillée stérile).

Milieu Fahraeus : CaCl_2 , 0.132 g/L ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.12 g/L ; KH_2PO_4 , 0.1 g/L ; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.0075 g/L ; Fe-citrate, 5 mg/L ; micro-éléments : 0.07 mg/L de chaque $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, ZnCl_2 , H_3BO_3 et $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Le milieu est ajusté à $\text{pH}=7.2$ avec une solution de KOH avant l'addition d'agar (0,8 ou 1,5 %) et autoclavé.



2. METHODES DE GENETIQUE BACTERIENNE

2.1. Transfert d'ADN entre souches par conjugaison

La conjugaison triparentale est utilisée pour le transfert de plasmides d'une souche d'*E. coli* vers une souche de *S. meliloti*, elle permet la construction de mutants recombinants (Ditta *et al.*, 1980). Elle fait intervenir trois partenaires : une souche *E. coli* ou *S. meliloti* donneuse

contenant le plasmide à transférer, une souche *E. coli* auxiliaire (MT616) contenant le plasmide pRK600 nécessaire à la mobilisation en *trans* des plasmides de la souche donneuse et une souche *S. meliloti* receveuse. Les trois souches sont cultivées séparément en milieu riche jusqu'en phase exponentielle. 1mL de chacune des cultures est centrifugé, lavé afin d'éliminer les antibiotiques contenus dans les milieux de cultures et repris dans 200 μ L de milieu LBMC. Les différentes souches sont mélangées dans les proportions suivantes : 20 μ L de receveuse, 10 μ L de donneuse et 10 μ L de souche auxiliaire. Le mélange est déposé sur filtre de nitrocellulose stérile (Millipore 0,45 μ m) sur milieu LBMC gélosé. Après une nuit de croissance à la température optimale de croissance de la souche receveuse, les bactéries sont resuspendues dans 2mL d'une solution stérile de NaCl 0,85%. Ce mélange de conjugaison est concentré ou dilué selon l'efficacité de la conjugaison et étalé sur milieu de sélection contenant les antibiotiques adéquats pour sélectionner les transconjugués.

2.2. Transformation bactérienne

Dans cette technique, la pénétration de l'ADN dans les bactéries est rendue possible par un bref choc thermique sur des bactéries rendues préalablement perméables à l'ADN par un traitement chimique approprié. Après une période d'incubation en milieu riche pendant laquelle le gène de résistance à l'antibiotique est exprimé, les bactéries sont étalées et sélectionnées sur milieu sélectif. Cette technique permet généralement le transfert d'une construction plasmidique chez *E. coli*.

2.2.1. Préparation de cellules compétentes

La souche d'*E. coli* à transformer estensemencée dans 5mL de milieu LB et incubée à 37°C sous agitation pendant une nuit. La culture est diluée au 1/100^{ème} dans 200mL de milieu LB jusqu'à atteindre une DO₆₀₀=0,6 sous agitation à 37°C (environ 3h). La culture est placée 10 minutes sur la glace, centrifugée 10 minutes à 5000 rpm à 4°C. Le surnageant est éliminé stérilement et le culot bactérien remis en suspension dans 70mL de Tampon I froid (Acétate de potassium pH=5,8 30mM ; RbCl 100mM ; CaCl₂ 10mM ; MnCl₂ 50mM ; glycérol 15% ; H₂O qsp 500mL). Le mélange est placé sur la glace pendant 10 minutes, centrifugé 10 minutes à 5000 rpm à 4°C. Le surnageant est éliminé stérilement et le culot bactérien remis en suspension dans 32mL de Tampon II froid (MOPS pH=6,5 10mM ; RbCl 10mM ; CaCl₂ 75mM ; glycérol 5% ; H₂O qsp 250mL). Les cellules sont aliquotées par 150 μ L dans des tubes de 2mL et congelées à -80°C.

2.2.2. Transformation de cellules compétentes

50 à 100ng d'ADN de ligature sont ajoutées aux cellules compétentes. Le tout est incubé dans la glace pendant 30 minutes. Le tube est transféré dans un bain-marie à 42°C pendant 1 minutes puis replacé dans la glace 2 minutes. 850µL de milieu SOC (Bacto tryptone Difco 20g ; Bacto yeast extract Difco 5g ; NaCl 10mM ; KCl 2,5mM ; H₂O qsp 1L → autoclaver et ajouter MgCl₂ 10mM, MgSO₄ 10mM et glucose 20mM stériles) préchauffé à 42°C sont ajoutés et le tout est incubé à 37°C avec agitation pendant 1 heure. Les bactéries transformées sont sélectionnées sur des milieux gélosés contenant les antibiotiques adéquats.

2.3. Transduction généralisée

Les mutations sont transférées d'une souche de *S. meliloti* à l'autre par transduction généralisée. L'ADN de la souche donneuse est transféré à la souche receveuse grâce au phage ΦM12, selon le protocole standard (Finan *et al.*, 1984 ; Glazebrook et Walker, 1991).

3. METHODES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

3.1. Extraction et purification des acides nucléiques

3.1.1. Préparation d'ADN génomique de *S. meliloti*

La préparation de l'ADN génomique est effectuée selon une méthode dérivée du protocole décrit précédemment (Sambrook *et al.*, 1989). 1,5 mL d'une culture d'une nuit de *S. meliloti* est centrifugé 5 minutes à 6000 rpm. Les cellules sont resuspendues dans 600µL de tampon de lyse : 567µL de tampon TE (10mM Tris-HCl pH=8 ; 25mM EDTA pH=8), 30µL de SDS 10% et 3µL de protéinase K (20mg/mL). La lyse totale des bactéries est obtenue en 1h à 37°C. Les débris cellulaires sont précipités avec 100µL de NaCl (5M) et 80µL de CTAB/NaCl, le tout est incubé 10 minutes à 65°C. Après centrifugation 10 minutes à 12000 rpm, le surnageant est récupéré. Deux extractions avec un volume de phénol/chloroforme/isoamyl alcool (25:24:1) sont réalisées. Après centrifugation, le surnageant est récupéré et l'ADN est précipité avec 0,7 volumes d'isopropanol. Le culot est ensuite rincé avec 1mL d'éthanol à 70%. L'ADN est repris dans 100 µL de tampon TE contenant de la RNase.

3.1.2. Préparation d'ADN plasmidique d'*E. coli*

La préparation d'ADN plasmidique est réalisée selon la méthode de la lyse alcaline classique (Birnboim et Doly, 1979). Les préparations sont reprises dans 20µL de tampon TE (pH=8). Pour la purification d'ADN à séquencer, le kit Nucleospin (Macherey-Nagel, Hoerd, France) est utilisé. Les échantillons sont séquencés par la société MWG (, France)

3.1.3. Préparation d'ARN de *S. meliloti*

Le 1^{er} jour, 10mL de culture bactérienne sont récoltés par filtration sur filtre de nitrocellulose stérile (Millipore 0,2µm). Les filtres sont récupérés, placés dans des tubes Falcon de 15mL et congelés dans l'azote liquide. Cette étape ne doit pas excéder 20 secondes. Les filtres sont repris dans 1,5mL de tampon de lyse (1,4% SDS, 4mM EDTA) préchauffé à 65°C et 125µL de protéinase K (5mg/mL). Le tout est mis à incuber 10 minutes à 65°C en vortexant de temps en temps, aliquoté en 5 tubes (5×325µL). 150µL de NaCl (5M) sont ajoutés, la suspension est maintenue 10 minutes à 4°C, centrifugée 10 minutes à 14000, la phase aqueuse récupérée. 1350µL d'éthanol à 100% conservé à -20°C sont ajoutés, la suspension est vortexée et laissée une nuit à -80°C.

Le 2^{ème} jour, la suspension est centrifugée à 15300 rpm 30 minutes à 4°C. Le culot est repris dans 170µL d'H₂O DEPC, traité 30 minutes à 37°C à la DNase I (20µL de tampon 10×, 4µL de DNase I RQI, 4µL de RNase IN). 1 volume (200µL) de phénol acide (pH=4,5) / chloroforme / isoamyl alcool (25:25:1) est ajouté. Le tout est mélangé 3 minutes et centrifugé 5 minutes à 10000rpm. La phase aqueuse est récupérée et une nouvelle extraction avec 200µL de chloroforme est réalisée. Les ARN sont précipités avec 40µL de Na-acétate (3M pH=5,2) et 1200µL d'éthanol 100%, une nuit à -80°C.

Le 3^{ème} jour, la suspension est centrifugée à 15300 rpm 30 minutes à 4°C. Le culot est repris dans 1mL d'éthanol à 70%. Le tout est centrifugé à 15300 rpm 10 minutes à 4°C et le culot séché est repris dans 100µL d'H₂O DEPC. Les ARNs sont immédiatement dosés et stockés en aliquotes de 10µg à -20°C.

3.2. Techniques de transferts et d'hybridations

3.2.1. Hybridation ADN-ADN

Après digestion et migration sur gel d'agarose, l'ADN cible est dénaturé *in situ* et transféré sur membrane de nylon selon la méthode de Southern (Sambrook *et al.*, 1989). Il est

fixé à 80°C pendant 3 heures. La membrane est incubée 3 heures dans du tampon d'hybridation (30mL de SSC 20× (3M NaCl, 0,3M Na₃-citrate), 10mL de solution de Denhart 50×, 50mg de pyrophosphate de sodium, 200µL d'ADN de sperme de saumon préalablement dénaturé 5 minutes à 95°C, qsp 100mL) à la température adéquate. La sonde est marquée au hasard avec du [α -³²P]dCTP avec le kit « Prime-a-gene labeling system » (Promega, Charbonnières, France), purifiée sur colonne Microspin S-200 (Amersham, Orsay, France) et rajoutée au tampon d'hybridation. L'hybridation se fait pendant une nuit. Après plusieurs rinçages avec une solution de lavage (SSC 6×, SDS 0,5%) à la température d'hybridation, la membrane est autoradiographiée 48 heures à -80°C puis révélée.

3.2.2. Hybridation ADN-ARN

Les ARNs totaux (10 µg) sont séparés sur gel d'agarose à 1,2% en conditions dénaturantes (MOPS/formaldéhyde), puis transférés durant 16 heures sur membrane de nylon (Amersham) par capillarité avec du tampon phosphate (2,5mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH 7,2) contenant 1mM d'EDTA. Les ARNs sont ensuite fixés sur la membrane à 80°C pendant 2 heures. La sonde est marquée comme précédemment (3.2.1.). La membrane est préhybridée 2 heures à 65°C dans du tampon de préhybridation (500mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH 7,2, 1mM EDTA, 7% SDS), puis hybridée sur la nuit dans le même tampon contenant la sonde dénaturée (95°C, 5 minutes). Après deux lavages à la température d'hybridation dans une solution de lavage (100mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH 7,2, 1mM EDTA, 0,5% SDS), la membrane est autoradiographiée 48 heures à -80°C puis révélée.

3.3. Extension d'amorce et séquençage d'ADN

3.3.1. Extension d'amorce

L'extension d'amorce (ou point +1) permet de déterminer le point d'initiation de transcription d'un gène. Ce protocole provient du site de l'Université de Stanford, USA (<http://cmgm.stanford.edu/biology/long/protocols.htm>) dérivé de celui de Barnett *et al.*, (Barnett *et al.*, 1996). L'extension d'amorce doit être faite en condition sans-RNase.

Marquage de l'oligonucléotide : l'oligonucléotide est marqué au [γ -³²P]dATP par la T4 polynucléotide kinase : 10µL (100µCi) de [γ -³²P]dATP, 1µL (50ng) de l'oligonucléotide (30-40 pb), 1,33µL de tampon kinase 10× (Promega), 1µL (4unités) de T4 polynucléotide kinase (Promega). Le marquage est fait à 37°C pendant 30 minutes. La kinase est stoppée par la

chaleur (10 minutes à 65°C). 10µL de TE sont ajoutés et le tout est purifié sur colonne G-25 (Amersham, France) afin d'éliminer la radioactivité non incorporée.

Extension proprement dite : 50µg d'ARN bactérien sont mélangés dans un volume final de 30µL avec 100.000 cpm d'oligonucléotide marqué et 3µL de tampon (10×) d'hybridation ADN-ARN (0,5mL de KCl 3M ; 0,1mL de Tris pH=8,5 ; 4µL d'EDTA 0,25M ; 0,4mL H₂O DEPC). Le tout est mis à incuber à 65°C pendant 1h puis refroidi lentement (1 à 2h) jusqu'à 35-40°C. 170µL d'acétate de sodium (0,3M pH=5,5) et 500µL d'éthanol sont ajoutés. Le complexe ADN-ARN est précipité à -20°C une nuit, centrifugé et lavé avec 1mL d'une solution 75% éthanol / 25% Na-acétate 0,1M. Le complexe est centrifugé à nouveau et repris délicatement dans 25µL de mixe de transcription inverse (3,5µL de dNTPs à 4mM ; 5µL de tampon Superscript 5× ; 2,5µL de DTT à 0,1M ; 14µL d'H₂O DEPC). Le mélange est équilibré à 47-48°C pendant 2 minutes et 200 unités de transcriptase inverse Superscript II (1µL) sont ajoutées. La transcription inverse se fait à cette température pendant 30 minutes.

La transcriptase inverse est inactivée par la chaleur et les ARN sont dégradés avec 0,2µL de RNase pancréatique 15 minutes à 37°C. 100µL de Na-acétate (2,5M) sont ajoutés et le produit de l'extension est purifié avec 125µL de phénol-chloroforme. Une nouvelle précipitation est faite avec 300µL d'éthanol, un lavage à l'éthanol 75%, le culot est séché puis repris dans 3µL de TE et 4µL de tampon de charge au formamide provenant du kit de séquençage. La moitié du volume est chargé sur le gel de séquençage.

3.3.2. Séquençage manuel d'ADN

Le séquençage manuel d'ADN est réalisé avec le « CycleReader DNA sequencing kit » de Fermentas (Euromedex, Mundolsheim, France). 30µL de mix sont préparés à partir de : 4µL de tampon de séquençage, 1µL d'amorce, 10µL de matrice (100 fmol soit 0,258µg), 1µL de Taq, 13µL d'H₂O, 1µL [$\alpha^{33}\text{P}$]-dCTP (10µCi). 6µL de mix sont ajoutés aux 4 tubes contenant 2µL d'un mélange de dNTP plus l'un des 4 terminateurs de réaction (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP). Le marquage radioactif est réalisé avec du [$\alpha^{33}\text{P}$]-dCTP incorporé pendant la réaction de séquence (3 minutes à 94°C puis 25 fois le cycle suivant : 30 secondes à 94°C, 30 secondes à 60°C, 1 minute à 72°C). A la fin de la réaction 4µL de tampon STOP sont ajoutés à chaque réaction de séquence. Les 12 µL des 4 réactions (ACGT) permettent de faire 4 gels de séquençage. La séparation des brins d'ADN marqués est réalisée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Le transfert sur papier 3MM est autoradiographié 5 jours à -80°C puis révélé.

4. METHODES DE BIOCHIMIE

4.1. Mise en évidence et dosage d'activités enzymatiques

4.1.1. Activités catalasiques

L'extraction des protéines totales solubles de la bactérie est réalisée à 4°C et en condition non-dénaturante. 150 mL de bactérie sont centrifugés (10 minutes à 5000 rpm), le culot est repris dans 2 mL de tampon phosphate d'extraction ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 50mM, pH=7 ; EDTA 0,1mM). Cette suspension est soniquée afin de rompre les membranes et les parois bactériennes (6 × 30s pulsées). Les débris cellulaires éliminés par centrifugation (5 minutes à 15300 rpm). La concentration de protéine est évaluée par la méthode de Bearden (Bearden, 1978) ou grâce au kit « Quick Start Bradford 1× Dye Reagent » (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) qui utilise la technique de Bradford (Bradford, 1976).

4.1.1.1. Visualisation des activités catalasiques

L'activité catalase est visualisée selon le protocole précédemment décrit (Clare *et al.*, 1984). 30µg de protéines sont chargés par ligne de dépôt sur gel non-dénaturant de composition suivante : gel de séparation à 7% (pour 15mL finaux) : acrylamide + bis 30% (3,5mL), Tris HCl pH=8,8 (3,75mL), H₂O (7,75mL), Ammonium persulfate (5mg) et Temed (7µL) ; gel de concentration à 4% (pour 10mL finaux) : acrylamide + bis 30% (1,3mL) Tris HCl pH=6,8 (2,5mL), H₂O (6,2mL), Ammonium persulfate (5mg) et Temed (10µL). Tampon de migration à pH=8,2 (Tris base à 0,025M, Glycine à 0,192M). Le gel migre à 4°C à l'obscurité afin d'éviter toute dégradation des catalases. La migration est faite à 130V jusqu'à ce que le front de migration sorte du gel.

Le gel est démoulé et incubé sous agitation pendant 30 minutes à l'obscurité dans 15mL de tampon phosphate ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 50mM, pH=7,0) en présence de 5mg de peroxydase de radis de cheval (HRP). De l'H₂O₂ est ensuite ajouté à une concentration finale de 5mM (8,5µL d'une solution mère à 30 % = 880mM) et le gel à nouveau est incubé sous agitation pendant 10 minutes à l'obscurité. La solution d'incubation est éliminée à l'aide d'une trompe à vide et remplacée par 15mL de tampon phosphate contenant du 3,3'-diaminobenzidine (DAB) à 0,5 mg/mL. Pour dégrader l'H₂O₂, la HRP oxyde le DAB qui devient alors visible (précipité brun dans le gel). La présence d'une activité catalasique sur gel est donc visualisée par une bande achromatique sur fond brun.

4.1.1.2. Dosage de l'activité catalasique totale

L'activité catalasique totale est déterminée *in vitro* par l'observation de la dégradation de l'H₂O₂ à 240 nm ($E = 42 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Jones, 1982). Les extraits protéiques sont dilués dans du tampon phosphate (KH₂PO₄/K₂HPO₄ 100mM, pH=6) et de l'H₂O₂ est rajouté à une concentration finale de 20mM. Une unité d'activité catalasique correspond à 1µmole de H₂O₂ dégradée par minute.

4.1.2. Activités β-galactosidase et β-glucuronidase

L'activité β-galactosidase est dosée selon la méthode de Miller (Miller, 1972) sur des cultures bactériennes. 500µL de suspension cellulaire sont prélevés et centrifugés 10 min à 15300rpm. Le culot bactérien est resuspendu dans 500µL de tampon Z (Na₂HPO₄ 7H₂O 60mM ; NaH₂PO₄ H₂O 40mM ; KCl 10mM ; MgSO₄ 7H₂O 50mM; β-mercaptoéthanol 50mM pH=7) et 20µL de toluène pour perméabiliser les bactéries. Après 5 min d'incubation à 28°C, 100µL d'orthonitrophényl-β-D-galactopyranoside (ONPG) (à 4 mg/mL dans du tampon phosphate) sont ajoutés. La réaction est arrêtée par ajout de 250µL de Na₂CO₃, t minutes après addition de l'ONPG. La mesure de DO à 420nm correspond à l'absorbance de orthonitrophénol (ONP) de laquelle est soustraite l'absorbance des débris cellulaires (lue à 550nm). L'activité β-galactosidase est calculée en unités Miller selon l'équation :

$$\text{Activité } \beta\text{-galactosidase (Unités Miller)} = \frac{1000 \times (\text{D.O.}_{420} - 1,75 \times \text{D.O.}_{550})}{t \times V \times \text{D.O.}_{600}}$$

V : volume de culture pour l'essai (en mL)

t : temps de réaction avec l'ONPG (en minutes)

Le dosage de l'activité β-glucuronidase est réalisé de façon similaire au dosage β-galactosidase en utilisant du paranitrophényl-β-D-glucuronide (PNPU) à la place de l'ONPG.

4.1.3. Activité de réduction de l'acétylène

La nitrogénase peut, en plus de l'azote, réduire l'acétylène en éthylène. Cette propriété est utilisée pour évaluer les capacités fixatrices des nodosités. Un mélange gazeux contenant 10% d'acétylène, 20% d'oxygène et 70% d'argon est injecté dans un flacon de 30mL, étanche, contenant les nodosités d'une dizaine de plantes, puis des prélèvements de 200µL de

l'atmosphère du flacon sont analysés à intervalles réguliers pendant une heure. L'éthylène formé est séparé des autres gaz par chromatographie en phase gazeuse (Unicam, 610) et quantifié par ionisation de flamme (Hardy *et al.*, 1968).

4.2. Dosage de l'H₂O₂

Le dosage de l'H₂O₂ est fait grâce à une méthode fluorométrique utilisant une sonde la 10-acétyl-3,7-dihydroxyphenoxazine (réactif Amplex Red) très sensible à l'H₂O₂. Cette sonde provient du kit « Amplex Red Hydrogen Peroxide Assay Kit (A-12212) » de Molecular Probes (Interchim, Montluçon, France). En présence d'une peroxydase, la sonde réagit avec l'H₂O₂ avec une stœchiométrie (1:1) pour produire la résorufine, une molécule hautement fluorescente.

La concentration intracellulaire en H₂O₂ est mesurée selon le protocole décrit précédemment (Zhou *et al.*, 1997). Les bactéries sont mises à pousser 24 heures en culture liquide. Elles sont centrifugées, lavées et resuspendues à une DO₆₀₀=1 dans un tampon phosphate (50 mM pH=7,4). L'H₂O₂ généré par les cellules passe au travers des membranes jusqu'à atteindre un équilibre. L'équilibre entre les concentrations d'H₂O₂ intérieure et extérieure est atteint au bout de 10 minutes (Gonzalez-Flecha et Demple, 1997). Après 20 minutes d'équilibration, la suspension cellulaire est centrifugée à 4°C pendant 1 minute à 6000 rpm. Les concentrations en H₂O₂ sont mesurées directement sur le surnageant : 100µL du surnageant est mélangé à 100µL de la sonde à une concentration de 100µM et 1 U/mL⁻¹ de peroxydase. Les mesures sont faites avec une longueur d'onde d'excitation de 540nm et une longueur d'onde d'émission de 590nm. La concentration est calculée à partir d'une gamme étalon réalisée simultanément.

5. TECHNIQUES DE CYTOLOGIE

5.1. Localisation des activités β-galactosidase et β-glucuronidase

5.1.1. Préparation des tissus

Pour la localisation de l'activité β-galactosidase, les racines inoculées ou les nodosités sont récoltées à différentes étapes du développement. Les tissus sont fixés dans du tampon de fixation (2% glutaraldéhyde dans 0,2 M de tampon Na-Cacodylate à pH=7,2) 30 minutes sous vide puis 1 heure à pression atmosphérique. Les racines entières ou les nodosités sont ensuite rincées et conservées dans du tampon Na-Cacodylate (pH=7,2).

Pour la localisation de l'activité β -glucuronidase, les tissus sont fixés dans l'acétone 90% froid pendant 1 heure à -20°C . Ils sont ensuite rincés 2 \times dans un tampon phosphate de sodium (100mM à pH=7,4).

5.1.2. Détection des activités

Pour la localisation de l'activité β -galactosidase, la méthode utilisée est une adaptation des méthodes décrites par Teeri *et al.* (Teeri *et al.*, 1989) et Boivin *et al.* (Boivin *et al.*, 1990). L'activité est observée sur des racines entières de trois jours à une semaine et sur des coupes longitudinales de nodosités de trois à six semaines. Les nodosités fixées sont coupées en sections de 100 μm au vibratome (VT 1000 Plus, LaboNord, France) dans du tampon Na-Cacodylate à pH=7,2. Pour éliminer l'activité β -galactosidase endogène des tissus, les sections sont fixées de nouveau pendant 30 minutes dans le tampon de fixation. Après lavage, dans le tampon Na-Cacodylate, les racines et les sections sont colorées dans la solution de coloration (800 μL Na-Cacodylate 0,2M pH=7,2 ; 50 μL de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 100mM ; 50 μL de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 100mM ; 40 μL de X-Gal 2% (V/V) dans de la N-N diméthylformamide). Après 5 à 18 heures de coloration à l'obscurité et à température ambiante, les échantillons sont rincés 3 fois 10 minutes dans du tampon Na-Cacodylate, 2 fois 5 minutes dans de l'eau distillée. Pour augmenter le contraste entre les tissus colorés et les autres, les échantillons sont éclaircis dans l'eau de javel à 3% pendant une minute (Truchet *et al.*, 1989).

Pour la localisation de l'activité β -glucuronidase, la méthode utilisée est proche de celle utilisée pour la localisation de l'activité β -galactosidase sauf que le tampon utilisé est un tampon phosphate de sodium (100mM à pH=7,4) et le substrat du X-Gluc (0,5 mg/mL) (Jefferson *et al.*, 1986).

5.2. Localisation de l' H_2O_2 dans les nodosités

5.2.1. Préparation des nodosités

L' H_2O_2 est localisé en microscopie électronique selon la méthode de Bestwick *et al.*, (Bestwick *et al.*, 1995 ; Bestwick *et al.*, 1997). Les nodosités sont incubées pendant une heure dans la solution de marquage (5mM CeCl_3 dans du tampon MOPS (acide 3-(N-morpholino) propanesulfonique) 50mM, pH=7,2). Afin de contrôler la spécificité du marquage, des témoins sont réalisés en ajoutant de la catalase de foie de bœuf (25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) à la solution de marquage. Les nodosités sont ensuite fixées 1h sous vide dans une solution contenant du

glutaraldéhyde (1,25 %) et du paraformaldéhyde (1,25 %) dans du tampon Na-Cacodylate 50mM pH=7,2. Elles sont ensuite rincées 2 × 15 minutes dans du tampon Na-Cacodylate et traitées 45 minutes au tetroxyde d'osmium (1 % dans du tampon Na-Cacodylate). Après rinçage les nodosités sont déshydratées dans une gamme de concentration croissante d'éthanol : 30 % (15 min), 50 % (15 min), 70 % (15 min), 80 % (15 min), 90 % (15 min) et 100 % (3 × 20 min). Les nodosités sont ensuite traitées par de l'oxyde de propylène (2 × 20 min) puis incluses dans de la résine (Eponaraldite). Elles sont ensuite coupées (70 à 90 nm) et déposées sur des grilles d'observation en cuivre.

5.2.2. Détection de l'H₂O₂

Les coupes sont examinées au microscope électronique à transmission à un voltage d'accélération de 60kV. L'H₂O₂ est détecté *via* un précipité d'oxyde de cérium qui apparaît sous la forme d'un précipité dense aux électrons. Afin de vérifier que le précipité observé contient bien du cérium, il est possible de l'analyser en spectrométrie aux rayons X.

ANNEXES

1 **Glutathione plays a fundamental role in growth and symbiotic capacity of**
2 ***Sinorhizobium meliloti***

3

4

5 Judith Harrison², Alexandre Jamet, Cecilia I. Muglia¹, Ghislaine Van de Sype, O. Mario
6 Aguilar¹, Alain Puppo* and Pierre Frendo

7

8

9 Interactions Plantes-Microorganismes et Santé Végétale, UMR CNRS-INRA-Université de
10 Nice-Sophia Antipolis, 400, Route des Chappes, BP167, 06903 Sophia-Antipolis Cedex.
11 France.

12 ¹Instituto de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad
13 Nacional de La Plata, La Plata, Argentina.

14 ²present address: Faculty of Applied Sciences, Frenchay Campus, Coldharbour Lane,
15 University of the West of England, Bristol, BS32 1QY, United Kingdom.

16

17 Running title: GSH roles in *S. meliloti*

18

19

20 *Mailing address: Interactions Plantes-Microorganismes et Santé Végétale, UMR CNRS-
21 INRA-Université de Nice-Sophia Antipolis, 400, Route des Chappes, BP167, 06903 Sophia-
22 Antipolis Cedex. France. Phone: (33) 492 38 66 31; Fax: (33) 492 38 66 40. E-Mail:
23 puppo@unice.fr.

24

25

26

1 **ABSTRACT**

2 *Rhizobia* form a symbiotic interaction with plants of the legume family to produce nitrogen-
3 fixing root nodules under nitrogen-limiting conditions. We have examined the importance of
4 glutathione (GSH) during free living growth and symbiosis of *Sinorhizobium meliloti*. *S.*
5 *meliloti* mutant strain (SmgshA) which is unable to synthesise GSH due to a gene disruption
6 in *gshA*, encoding the enzyme for the first step in the biosynthesis of GSH, was unable to
7 grow under non-stress conditions precluding any nodulation. In contrast, a *S. meliloti* strain
8 (SmgshB) deleted for *gshB*, encoding the enzyme involved in the second step in GSH
9 synthesis, was able to grow indicating that γ -glutamylcysteine, the dipeptide intermediate, can
10 partially substitute for GSH. However, the SmgshB strain showed a delayed nodulation
11 phenotype coupled to a 75% reduction in the nitrogen fixation capacity. This phenotype was
12 linked to an abnormal nodule development. Both SmgshA and SmgshB mutant strains
13 exhibited a higher catalase activity than the wild-type *S. meliloti* strain suggesting that both
14 mutant strains are under oxidative stress. Taken together, these results show that GSH plays a
15 critical role in the growth of *S. meliloti* and during its interaction with the plant partner.

1 INTRODUCTION

2 All aerobic organisms are exposed to reactive oxygen species (ROS) such as the superoxide
3 anion, hydrogen peroxide (H_2O_2), and the hydroxyl radical, during normal aerobic
4 metabolism or after exposure to stress conditions. ROS can cause irreversible damage to
5 cellular components, if they are not rapidly detoxified by antioxidant defence systems (15).
6 To protect themselves against oxidant damage, cells contain effective defence mechanisms
7 including scavenging enzymes such as catalases, superoxide dismutases and glutathione
8 peroxidases and antioxidants such as the tripeptide glutathione, γ -glutamyl-L-cysteinylglycine
9 (GSH).

10 GSH is synthesised by a two step process. In a first step glutamate and cysteine are
11 conjugated by γ -glutamyl cysteine synthetase (γ ECS) to form γ -glutamyl cysteine (γ EC). In a
12 second step, glycine is added to γ EC to form GSH in a reaction catalysed by glutathione
13 synthetase. The redox active sulphhydryl group of GSH protects cells from ROS by directly
14 scavenging free radicals and acting as a co-factor for antioxidant enzymes such as glutathione
15 peroxidases. GSH oxidised in this manner forms GSH disulphide (GSSG) which is recycled
16 back to its reduced form by glutathione reductase (GR).

17 Initial studies on the requirement for GSH and its role in the protection against oxidative
18 stress were performed on bacteria. *E. coli* mutants devoid of GSH were isolated by means of a
19 transposon insertion in *gshA* which encodes γ ECS (13). From these studies it was found that
20 not only was GSH non-essential under normal growth conditions, but also, rather surprisingly,
21 these mutants were unaffected in their resistance to compounds which cause oxidative
22 damage. These results contrast with the situation found in mammalian cells where GSH
23 deficiency results in cellular damage, suggesting an important difference in GSH function
24 between prokaryotes and eukaryotes. Yeast mutants lacking GSH through transposon

1 insertion into the *gshI* gene which encodes γ ECS showed a severely retarded growth
2 phenotype and an enhanced sensitivity to oxidative stress (10, 11).

3 *Sinorhizobium meliloti* is an aerobic Gram-negative bacterium from the rhizosphere able to
4 infect roots of *Medicago* species and develop symbiosis. During this process an exchange of
5 recognition signals occurs between the two partners (20) leading to the development of
6 infection threads and finally to the formation of the root nodule (23). Inside the root nodule
7 the bacteria differentiate into their symbiotic forms which are capable of reducing
8 atmospheric nitrogen into ammonium. Soil rhizobia are constantly challenged by a variety of
9 stresses in their natural environments including elevated temperature, acidity, or osmotic and
10 oxidative shock. Moreover, it has been suggested that during the symbiotic interaction,
11 bacteria are potentially exposed to oxidative stress during the oxidative burst that follows the
12 infection process (28). In addition, the functional nodule is prone to high levels of ROS due to
13 the high rate of respiration necessary to supply energy required by the nitrogen reduction
14 process. Thus, it appears important to understand the roles played by the various antioxidants
15 in both free-living and symbiotic *Rhizobia*.

16 In this study we investigated the requirement for GSH in free-living *Sinorhizobium meliloti*
17 and the effects of depletion in GSH on the ability of the bacteria to produce nitrogen fixing
18 nodules with its symbiotic partner *Medicago sativa*.

19

1 MATERIAL AND METHODS

2 **Bacterial strains and growth conditions.** The bacterial strains and plasmids used are listed
3 in Table 1. *E. coli* strains were grown in Luria-Bertani (LB) media at 37°C, and *S. meliloti*
4 strains were grown in LB supplemented with 2,5mM MgSO₄ and 2,5mM CaCl₂ (LB_{MC}) at
5 30°C. Antibiotics were added as required at the following concentrations (µg/mL): ampicillin
6 100, chloroamphenicol 10, kanamycin 100, neomycin 100, spectinomycin 100, tetracycline
7 10, gentamycine 10. For growth curve analysis, HPLC analysis and catalase activity, cultures
8 of *S. meliloti* grown on LB_{MC} were inoculated at an initial OD₆₀₀ of 0,1 onto M9 minimal
9 media.

10

11 **General molecular biology techniques.** Molecular cloning techniques, restriction analysis,
12 ligation, transformation were essentially performed according to the standard methods (26).
13 DNA probes were labelled using the Prime-a-gene random priming system (Promega,
14 Charbonnières, France) and [α -³²P]dCTP (Amersham Biosciences, Orsay, France). Plasmids
15 and DNA fragments were purified using Nucleospin (Macherey Nagel EURL, Hoert, France)
16 and Qiagen kits (Qiagen, Courtaboeuf, France).

17

18 **Construction of the SmgshA, SmgshB strains and of the pgshAc plasmid.** *S. meliloti*
19 Rm1021 *gshA* and *gshB* DNA fragments was amplified by PCR using oligonucleotides
20 designed against the predicted *gshA* sequence (5'-G TTCCTGATCCGCACCGAAC-3' and
21 5'-GACGGACGTGAAAGAGG-3') and the *gshB* sequence (5'-
22 ACCATGTTTCGGGCATCACCATT-3' and 5'-ATGCATGTTGGAGCGAGAATCG-3').
23 The 800 bp (*gshA*) and 784 bp (*gshB*) fragments amplified were cloned respectively into
24 pGEM[®]-T and pGEM-T[®] Easy (Promega, Charbonnières, France). The *gshA* DNA fragment
25 was subsequently subcloned into vector pSUP202 using *Bam*HI - *Hind*III sites. A kanamycin

1 resistance cassette from pKOK4 was added in the *psfI* site of the *gshA* DNA fragment. The
2 resulting recombinant plasmid was named pJHgshA. The *gshB* DNA fragment was subcloned
3 into vector pSUP202 using *EcoRI* site. The resulting recombinant plasmid was named
4 pCMgshB. The recombinant suicide plasmids were transferred to the Rm1021 recipient strain
5 by triparental mating using the MT616 *E. coli* strain as a helper, as described previously (9).
6 Simple recombinant clones were selected on LB_{MC} media containing spectinomycin and
7 neomycine to select *gshA* mutant strain and spectinomycin and tetracycline to select *gshB*
8 mutant strain. Recombination at the correct location was checked by Southern hybridisation.
9 One *S. meliloti* mutant clone in which the *gshA* gene was interrupted and one *S. meliloti*
10 mutant clone in which the *gshB* gene was interrupted were selected for further analysis. These
11 two stains were respectively named SmgshA and SmgshB. *S. meliloti* Rm1021 *gshA* gene
12 containing the promoter region was amplified by PCR using oligonucleotides designed
13 against the predicted *gshA* sequence (5'-aaggatccccgcggcgctccg-3' and 5'-
14 aaaagcttggcgatgagccgtccatcc-3'). The 1500 bp amplified DNA fragment was cloned into
15 pGEM[®]-T and sequenced. The *gshA* gene was subsequently subcloned into vector
16 pBBR1MCS-5 using *BamHI* and *HindIII* sites (underlined sequences in the oligonucleotides).
17 The resulting recombinant plasmid was named pgshAc. The recombinant plasmid was
18 transferred to the SmgshA recipient strain by triparental mating using the MT616 *E. coli*
19 strain as a helper. Exconjugants SmgshA(pgshAc) were selected on LB_{MC} media containing
20 neomycine, spectinomycin and gentamicine. Strains and plasmids used during the study are
21 shown in Table 1.

22

23 **High-performance liquid chromatography (HPLC) analysis of low molecular weight**
24 **thiols.** 10⁹ bacterial cells were taken and centrifuged at 5000g for 10 mins. The resulting
25 pellet was resuspended in 150 µL of 0,1N HCl and derivatised using monochlorobimane and

1 quantified following separation on reverse phase HPLC according to the protocol described
2 previously (6). Commercial GSH (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) and γ EC
3 (Promochem, Molsheim, France) were used as standards.

4

5 **Catalase activity and in gel assays.** Bacterial crude extracts were prepared from free-living
6 bacteria by sonication in a phosphate buffer as described previously (14). Catalase was
7 visualised on non-denaturing polyacrylamide gels by inhibition of diaminobenzidine
8 oxidation (3). Total catalase activity was measured spectrophotometrically by following the
9 decomposition of H₂O₂ at 240nm (17). Protein concentration was determined with the Bio-
10 Rad protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France) using bovine
11 serum albumine as standard.

12

13 **Plant nodulation assays.** *Medicago sativa* L. var. Europe (alfalfa) was used as a host plant to
14 test nodulation of the *S. meliloti* strains. Surface sterilised germinating seedlings were grown
15 in test tubes on modified Fahraeus media (2) containing 1.5% agarose. Five days after
16 germination, roots were inoculated with 200 μ L/plant of the appropriate strain of bacterial
17 suspension culture. The bacterial suspension culture was prepared from overnight LB_{MC}
18 cultures of the bacteria (containing the appropriate antibiotics), washed three times and
19 diluted to the desired concentration (5.10⁷/mL) with sterile distilled water. Nitrogen fixation
20 capacity of the nodules was determined by the acetylene reduction assay as described
21 previously (14).

22

23 **Microscopy studies.** For microscopy, nodules were harvested 4 weeks after inoculation. The
24 nodules were fixed, post-fixed and embedded as previously described (27). Sections were
25 performed with a diamond knife in a Reichert Ultracut Ultramicrotome (Leica, Rueil-

1 Malmaison, France). After staining with uranyl acetate and Reynold's lead citrate, ultrathin
2 sections were examined in a transmission electron microscope (CM12, Philipps, Cambridge,
3 U.K.).

4
5 **Statistical analysis.** All the data presented for the thiol concentrations, catalase activity,
6 acetylene reduction assays and nodule numbers are given as means with the standard error.
7 The significance of the results was assessed using the Student's *t* test.

8 9 **RESULTS**

10 **GSH synthesis pathway is essential for *S. meliloti* growth.** In a first step to study the role of
11 GSH in the growth of *S. meliloti*, *in silico* analysis of the bacterial genome (8) was performed
12 to find the genes involved in GSH synthesis. The deduced aminoacid sequence of the ORF
13 SMc00825 showed about 75% of identity with putative Rhizobiales γ ECS (*Agrobacterium*
14 *tumefaciens*, *Brucella melitensis* biovar Suis1330 and *Mesorhizobium* sp. BNC1) and about
15 55% of identity with plant γ ECS (*Arabidopsis thaliana* and *Medicago truncatula*). Similarly,
16 the translational product of the ORF SMc00419 was found to display 85% of protein identity
17 with the GSHS from *Rhizobium tropici* (AAL91575). In order to investigate the importance of
18 endogenous GSH production by *S. meliloti* in free-living growth and during the interaction
19 with the host plant alfalfa, γ ECS and GSHS defective mutants strains (SmgshA and SmgshB
20 respectively) derived of wild type *S. meliloti* Rm1021 were constructed. (see experimental
21 procedures).

22 The GSH and γ EC content of wild type and glutathione deficient mutants was determined
23 during growth on M9 minimal medium (M9) (Table 2). γ EC was not detectable in wild-type
24 (wt) Rm1021 under our assay conditions. GSH concentration was found to be higher during
25 the exponential growth phase and early stationary phase reaching a maximal of 7nmol/10⁹

1 cells after 24 hours of growth, which was followed by a decrease in GSH content. As
2 expected, both γ EC and GSH were found to be undetectable in the SmgshA strain. The
3 analysis of the thiol content of the mutant strain SmgshA expressing the *gshA* gene
4 constitutively, SmgshA(pgshAc), revealed the accumulation of both γ EC and GSH which
5 showed a similar growth phase dependant accumulation to that found with the wt Rm1021.
6 The presence of a multicopy plasmid however resulted in concentrations of GSH twice those
7 detected in the wt Rm1021. GSH was undetectable in the SmgshB mutant that showed, in
8 contrast, a marked accumulation of γ EC (up to 19nmols/10⁹ cells).

9 The growth curves of free-living *S. meliloti* wt Rm1021 and mutant strains SmgshA and
10 SmgshB on M9 following over night culture on LB_{MC} are shown in Fig. 1A. In comparison to
11 the wt Rm1021, both mutant strains showed a reduced growth rate, with that of SmgshA
12 being the most severely affected. The growth of the wt Rm1021 and mutant strains on M9
13 following an overnight adaptation to M9 is shown in Fig. 1B. Although the exponential
14 growth phase of all cultures was slightly slower in comparison to those shown in Fig. 1A, the
15 most striking result was the complete growth arrest of the SmgshA mutant. Under both
16 culture conditions, growth of the SmgshA strain was fully restored by complementation with
17 a plasmid containing the *S. meliloti* γ ECS gene (pgshAc) or by addition of 1 mM GSH or γ EC
18 to the growth media (data not shown). Taken together, these results show that the GSH
19 synthesis pathway is essential for the free-living growth of *S. meliloti*. However, γ EC which is
20 present at a high concentration in the SmgshB strain is able to complement the lack of GSH.

21 Since it has been proposed that the oxidised/reduced ratio of GSH in the cells is essential
22 for proper scavenging of ROS, we examined whether low levels of the thiol content resulted
23 in a change in the GSH redox state. Due to the severely retarded growth phenotype following
24 the overnight adaptation to M9, all experiments were performed on cultures grown overnight
25 on LB_{MC} and subsequently subcultured into M9. Both reduced and oxidised GSH and γ EC

1 pools were determined during the exponential growth phase. The percentage of the oxidised
2 γ EC pool was found to be $34\pm 4\%$ in the SmgshB mutant strain whereas the oxidised GSH and
3 γ EC pools represented just $10\pm 6\%$ in the wt Rm1021 and the complemented
4 SmgshA(pgshAc) strains. This suggests that the SmgshB strain is under an oxidative stress.

5

6 **Catalase activity is modulated by GSH deficiency in *S. meliloti*.** It has previously been
7 demonstrated that catalases are induced by oxidative stress in *S. meliloti* (14, 29) and as such
8 we concluded that catalase activity represents a good physiological marker to assess whether
9 the bacteria are under oxidative stress. It had been reported that three distinct
10 hydroperoxidases of *S. meliloti* are involved in the dismutation of H_2O_2 , two monofunctional
11 catalases KatA and KatC and one bifunctional catalase-peroxidase KatB. Each of these
12 catalases has a distinctive expression profile during growth of bacteria under free-living
13 conditions and in response to particular stresses (14, 16, 29). *katA* is expressed during the
14 exponential growth phase and is induced by H_2O_2 . *katB* encodes a house keeping catalase-
15 peroxidase which is expressed constitutively. *katC* is expressed during the stationary phase
16 and is induced by environmental stresses.

17 In order to examine whether catalase activity was higher in mutant strains than in wt
18 Rm1021 strain, the level of total catalase activity was determined in cells during late
19 exponential growth phase (Fig. 2A). The mutant SmgshA was found to have a 7 fold-higher
20 total catalase activity compared to the wt Rm1021. Total catalase activity of the SmgshB
21 mutant also exhibited a 3-4 fold increase compared to the wt Rm1021. These results showed
22 that catalase activity is enhanced in GSH-deficient mutant strains. In order to extend this
23 analysis we evaluated the effect of GSH deficiency on the catalase activity profile by using
24 catalase activity gel (Fig. 2B). As previously reported (29), only KatA and KatB are
25 expressed in *S. meliloti* during the late exponential phase. An increase in KatA and KatB and

1 in addition the detection of KatC could be observed in the SmgshA strain as compared to the
2 wt Rm1021. The SmgshB strain showed an intermediate phenotype in which activity of the
3 three catalases was found to be high albeit to a lower level than in the SmgshA strain.
4 Complementation of the SmgshA strain by plasmid pgshAc resulted in the recovery of a wild-
5 type phenotype in terms of total catalase activity and catalase profile. The higher level of
6 oxidation of the γ EC pool in the SmgshB strain which correlated with the higher level of
7 catalase activity observed in SmgshA and SmgshB strains demonstrates that GSH deficiency
8 causes an oxidative stress in *S. meliloti*.

9
10 **Glutathione deficiency strongly affects the nodulation process.** In order to test the
11 implication of GSH in the symbiotic process, the capacity of the SmgshA and SmgshB mutant
12 strains to nodulate and produce nitrogen fixing nodules was examined by alfalfa inoculation
13 experiments. No nodules were produced by plants inoculated with the SmgshA mutant strain.
14 The nodulation efficiency following inoculating with Rm1021 and SmgshB is shown in Fig.
15 3. Seven days post inoculation significantly fewer nodules were observed on plants inoculated
16 with strain SmgshB compared to those inoculated with the *S. meliloti* strain Rm1021.
17 However, this difference was no longer significant 11 and 14 days post inoculation,
18 suggesting that although nodulation capacity itself was unaffected, the timing of nodule
19 formation was delayed in the SmgshB mutant.

20 To test the functionality of nodules, their nitrogen fixing capacity was also determined
21 4 weeks after inoculation with Rm1021 and SmgshB strains. Using the acetylene reduction
22 assay, it was found that the nitrogen fixation capacity was severely affected in the SmgshB
23 mutant with a reduction from 11.0 ± 2 nmol C₂H₄/mg nodules/hr in the wt Rm1021 to 2.7 ± 0.7
24 nmolC₂H₄ /mg nodules/hr in the mutant.

1 Microscopic analysis of the nodules was performed to visualize the nodule structure
2 (Fig. 4). All the steps in cell differentiation were observed in nodules after infection with
3 Rm1021 (31). The different zones observed in a wt Rm1021 nodule are presented in Fig. 4A.
4 The meristematic zone I was bacteria-free. Bacteria released from infection threads in plant
5 cells were surrounded by a peribacteroid membrane in the distal infection zone II (bacteroids
6 of type 1). Bacteroids elongated without dividing in the proximal infection zone II (bacteroids
7 of type 2). In interzone II-III (IZ), bacteroids stopped their elongation and displayed
8 cytoplasmic heterogeneity (bacteroids of type 3). In zone III, bacteroids showed a higher
9 cytoplasmic heterogeneity and corresponded to nitrogen-fixing rhizobia (bacteroids of type 4)
10 (Fig. 4C and 4E). Finally, symbionts degenerated in the senescent zone IV. In contrast,
11 SmgshB nodules exhibited a large senescent zone IV (Fig. 4B). The fixing-zone III was not
12 clearly defined and amyloplast-rich cells which are characteristic of IZ appeared to be
13 adjacent to senescent zone IV (Fig. 4D). Ultrastructural studies (Fig. 4F) showed that SmgshB
14 bacteria were released but rapidly underwent senescence, often before differentiating into
15 fixing-bacteroids. Both non-fixing bacteroids (type 1 to 3) and senescent bacteroids could be
16 observed in a same plant cell (Fig. 4F). Taken together, these results demonstrated that *S.*
17 *meliloti* requires GSH in order to achieve an efficient symbiotic interaction with alfalfa,
18 particularly in preventing early senescence.

19

20 **DISCUSSION**

21 During this study, the synthesis of glutathione and the importance of this low molecular
22 weight thiol were examined in free living and symbiotic *S. meliloti*. The function of *gshA* and
23 *gshB* was confirmed by the HPLC analysis of low molecular weight thiol content of the
24 strains mutated in *gshA* and *gshB* genes, respectively. A mutant strain defective in synthesis
25 of γ ECS (SmgshA strain) does not accumulated γ EC and GSH, and a strain lacking

1 glutathione synthetase (SmgshB strain) accumulates γ EC. Therefore, there are no other genes
2 coding for functions able to replace those sequences altered in our mutants. In order to test the
3 importance of the GSH synthesis pathway in *S. meliloti*, the growth, antioxidant status and
4 nodulation capacity of the mutant strains SmgshA and SmgshB were compared to the wild-
5 type Rm1021. Our study demonstrates that the growth of a *S. meliloti* strain mutated in the
6 *gshA* gene was severely impaired whereas, only a slightly reduced growth phenotype was
7 observed in the SmgshB strain. These results indicate that γ EC is able to compensate for the
8 absence of glutathione during growth under free-living conditions and are remarkably
9 different from the results observed in *E. coli*. Mutation of gene *gshA* and the subsequent
10 deficiency in glutathione or γ EC did not modify the growth rate of *E. coli*, indicating a non
11 essential role for GSH synthesis pathway under non-stress conditions (13). In contrast, it was
12 demonstrated that a yeast mutant deleted for γ ECS was unable to grow whilst mutation in
13 GSHS resulted in an impaired growth phenotype (10, 11). Thus, our study demonstrated that
14 *S. meliloti* behaves in a similar manner to yeast while diverges of that of *E. coli*.

15 Hydroperoxidases are implicated in the detoxification of H_2O_2 . Our studies showed that a
16 lack of glutathione is associated to an increase of the total catalase activity. Gel assays
17 revealed that this increase is due to an augmentation in KatA and KatB and the appearance of
18 KatC. The fact that a decrease in GSH content induces both KatA and KatC activity suggests
19 that the mutant strains SmgshA and SmgshB are facing stress conditions. Moreover, the
20 highly oxidised γ EC pool present in the SmgshB strain suggests that the 3-fold higher γ EC
21 concentration does not suffice for the maintenance of the redox state found in the Rm1021
22 strain. Previous studies have shown that although mutation in the *gshA* gene of *E. coli* did not
23 result in a growth phenotype, the bacteria were found to be more sensitive to H_2O_2 and had a
24 higher level of catalase activity (22). The authors suggested that glutathione may play a role
25 in the regulation of catalases, possibly through its regulation of intracellular H_2O_2 or through

1 its interaction with redox-sensitive sites in the OxyR regulatory protein. Yeast GSH-deficient
2 mutants as well as *R. tropici* gshB mutants showed a dramatic sensitivity to H₂O₂ (12, 24). All
3 together, these data suggest that GSH and catalases provide overlapping defenses for
4 protection against H₂O₂ both in prokaryotic and eukaryotic cells.

5 The nodulation efficiency of *S. meliloti* glutathione pathway-deficient mutants was
6 investigated by inoculating *Medicago sativa* plants with the SmgshA and SmgshB strains.
7 Under our experimental procedures we found no evidence that the mutant SmgshA was
8 capable of nodulating *M. sativa*. Since the growth of the mutant rhizobia was severely
9 affected, it seems logical to expect that its nodulation ability will be also negatively affected.
10 However, the stage of the early interaction between the mutant strain and alfalfa such as
11 attachment, curling, infection thread formation, which might be affected, remains to be
12 determined. The emergence of nodules on *M. sativa* following inoculation with mutant strain
13 SmgshB was delayed in comparison to wt Rm1021, although final nodule number was
14 unaffected. Similarly, the number of nodules on *Phaseolus vulgaris* and *Leucaena*
15 *leucocephala* 4 weeks post-inoculation with the gshB deficient strain was found to be similar
16 to that of plants inoculated with the wild-type strain (24). A highly significant feature from
17 our study was the large reduction in the nitrogen fixation capacity of nodules. This phenotype
18 is consistent with the microscopical studies in which early senescence is observed in the
19 mutant strain SmgshB. Studies do suggest that redox balance is an important factor in
20 nodulation. Superoxide anions and H₂O₂ are produced during the initial stages of the
21 plant/microbial interaction (28). To protect itself from this oxidative burst, *S. meliloti*
22 possesses three catalases and two superoxide dismutases (SodA and SodC). Transcriptome
23 analysis of *S. meliloti* has shown that sodC is induced during the infection process (1) and Sod
24 activity appears to play an important role during the early steps of symbiosis (27). In addition,
25 catalases present a differential pattern of expression during nodule development. katB is

1 constitutively expressed in the nodules, *katA* is expressed in zone III and *katC* is expressed in
2 zones II and IV (16). Whereas single null mutants of *katA*, *katB*, *katC* have wild-type
3 nodulation phenotype, *katB katC* and *katA katC* double mutants have a reduced infection
4 efficiency and a decreased nitrogen fixation capacity showing that degradation of H₂O₂ *in*
5 *planta* is essential to allow an efficient nodulation process (14,16, 29). The reduction of
6 nitrogen fixation capacity observed in the *gshB* mutant strain could be associated to an
7 alteration of the bacterial antioxidant defence which promotes early senescence. It could also
8 be suggested that the γ EC produced in the *gshB* strain may not be able to fully substitute for
9 the specific GSH function during cell differentiation occurring in the symbiotic process. This
10 deficiency may cause early senescence of nodule which is reflected by lower nitrogenase
11 activity.

12 The requirement of *Rhizobia* for the GSH synthesis pathway during growth in free-living
13 conditions seems to be analogous to that in yeast and higher eukaryotes and unlike the
14 situation in *E. coli*. This dissimilarity in physiology may be paralleled to phylogenetic
15 differences between *S. meliloti* and *E. coli* γ ECS. Indeed, the sequences of *gshA* from γ -
16 proteobacteria (*E. coli*) and α -proteobacteria (*S. meliloti*) fall into two distinct groups (4). The
17 latter group consists primarily of α -proteobacteria such as *Mesorhizobium loti*,
18 *Agrobacterium tumefaciens* and *Sinorhizobium meliloti* and flowering plants such as
19 *Arabidopsis thaliana*, *Medicago truncatula* and *Glycine max*. The different influence of GSH
20 deficiency on cell growth observed between *S. meliloti* and *E. coli* may arise from a divergent
21 evolutionarily process of these two bacteria genera which is evidenced by the γ ECS gene
22 evolution.

23 In *S. meliloti*, it appears that GSH may be replaced by γ EC under free-living conditions but
24 not during the symbiotic association with *M. sativa*. This differential behaviour may also be
25 linked to the evolution of the GSH synthesis pathway. Copely and Dhillon (2002) suggested

1 that *gshB* was recruited later than *gshA* during evolution. In this scenario, bacterial γ EC may
2 have played multiple functions including those carried on by GSH before the recruitment of
3 the *gshB* gene. However, our study also shows that glutathione itself is important for an
4 optimal nitrogen fixation showing that endogenous γ EC could not fully restore some essential
5 functions of GSH which may have been acquired after the recruitment of the *gshB* gene.

6 Taken altogether, our results indicate that the GSH synthesis pathway plays a crucial role
7 in growth and symbiotic capacity of *Sinorhizobium meliloti*. The transcriptome analysis of the
8 SmgshA and SmgshB strains should bring significant insights on the different roles of γ EC
9 and GSH.

10

11

12 REFERENCES

- 13 1. **Ampe, F., E. Kiss, F. Sabourdy, and J. Batut.** 2003. Transcriptome analysis of
14 *Sinorhizobium meliloti* during symbiosis. *Genome Biol.* **4**:R15.
- 15 2. **Boisson-Dernier, A., M. Chabaud, F. Garcia, G. Bécard, C. Rosenberg , and D.G.**
16 **Barker.** 2001. *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Medicago truncatula* for
17 the study of nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations. *Mol. Plant-*
18 *Microbe Interact.* **14**:695-700.
- 19 3. **Clare, D.A., M.N. Duong, D. Darr, F. Archibald, and I. Fridovich.** 1984. Effects of
20 molecular oxygen on detection of superoxide radical with nitroblue tetrazolium and on
21 activity stains for catalase. *Anal. Biochem.* **140**:532-537.
- 22 4. **Copely, S.D., and J.K. Dhillon.** 2002. Lateral gene transfer and parallel evolution in
23 the history of the glutathione biosynthesis genes. *Genome Biol.* **3**:1-16.

- 1 5. **Finan, T.M., B. Kunkel, G.F. De Vos, and E.R. Signer.** 1986. Second symbiotic
2 megaplasmid in *Rhizobium meliloti* carrying exopolysaccharide and thiamine synthesis
3 genes. *J. Bacteriol.* **167**:66-72.
- 4 6. **Frendo, P., D. Gallesi, T. Turnbull, G. Van de Sype, D. Hérouart, and A. Puppo.**
5 1999. Localization of glutathione and homoglutathione in *Medicago truncatula* is
6 correlated to a differential expression of genes involved in their synthesis. *Plant J.*
7 **17**:215-219.
- 8 7. **Friedman, A.M., S.R. Long, S.E. Brown, W.J. Buikema, and F.M. Ausubel.** 1982.
9 Construction of a broad host range cosmid cloning vector and its use in the genetic
10 analysis of *Rhizobium* mutants. *Gene* **18**:289-296.
- 11 8. **Galibert F., T.M. Finan, S.R. Long, A. Puhler, P. Abola, F. Ampe, F. Barloy-
12 Hubler, M.J. Barnett, A. Becker, P. Boistard, G. Bothe, M. Boutry, L. Bowser, J.
13 Buhrmester, E. Cadieu, D. Capela, P. Chain, A. Cowie, R.W. Davis, S. Dreano,
14 N.A. Federspiel, R.F. Fisher, S. Gloux, T. Godrie, A. Goffeau, B. Golding, J.
15 Gouzy, M. Gurjal, I. Hernandez-Lucas, A. Hong, L. Huizar, R.W. Hyman, T.
16 Jones, D. Kahn, M.L. Kahn, S. Kalman, D.H. Keating, E. Kiss, C. Komp, V.
17 Lelaure, D. Masuy, C. Palm, M.C. Peck, T.M. Pohl, D. Portetelle, B. Purnelle, U.
18 Ramsperger, R. Surzycki, P. Thebault, M. Vandenbol, F.J. Vorholter, S. Weidner,
19 D.H. Wells, K. Wong, K.C. Yeh, and J. Batut.** 2001. The composite genome of the
20 legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science* **293**:668-672.
- 21 9. **Glazebrook, J., and G.C. Walker.** 1991. Genetic techniques in *Rhizobium meliloti*.
22 *Methods Enzymol.* **204**:398-418.
- 23 10. **Grant, C.M., F.H. MacIver, and I.W. Dawes.** 1996. Glutathione is an essential
24 metabolite required for resistance to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces*
25 *cerevisiae*. *Curr. Genet.* **29**:511-515.

- 1 11. **Grant, C.M., F.H. MacIver, and I.W. Dawes.** 1997. Glutathione synthetase is
2 dispensable for growth under both normal and oxidative stress conditions in the yeast
3 *Saccharomyces cerevisiae* due to the accumulation of the dipeptide gamma-
4 glutamylcysteine. *Mol. Biol. Cell.* **8**:1699-1707.
- 5 12. **Grant, C.M., G. Perrone, and I.W. Dawes.** 1998. Glutathione and catalase provide
6 overlapping defenses for protection against hydrogen peroxide in the yeast
7 *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **253**:893-898.
- 8 13. **Greenberg, J.T., and B. Demple.** 1986. Glutathione in *Escherichia coli* is dispensible
9 for resistance to H₂O₂ and gamma radiation. *J. Bacteriol.* **168**:1026-1029.
- 10 14. **Hérouart, D., Sigaud S., Moreau S., Frenedo P., Touati D., and Puppo A.** 1996.
11 Cloning and characterisation of the *katA* gene of *Rhizobium meliloti* encoding a
12 hydrogen peroxide inducible catalase. *J. Bacteriol.* **178**:6802-6809.
- 13 15. **Imlay, J.A.** 2003. Pathway of oxidative damage. *Annu. Rev. Microbiol.* **57**:395-418.
- 14 16. **Jamet, A., S. Sigaud, G. Van de Sype, A. Puppo, and D. Hérouart.** 2003. Expression
15 of the bacterial catalase genes during *Sinorhizobium meliloti-Medicago sativa* symbiosis
16 and their crucial role during the infection process. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **16**:217-
17 225.
- 18 17. **Jones, D.P.** 1982. Intercellular catalase function: Analysis of the catalytic activity by
19 product formation in isolated liver cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **214**:806-814.
- 20 18. **Kokotek, W., and W. Lotz.** 1989. Construction of a lacZ-kanamycin-resistance
21 cassette, useful for site-mutagenesis and as promoter probe. *Gene* **84**:467-471.
- 22 19. **Kovach, M.E., R.W. Phillips, P.H. Elzer, R.M. Roop II, and K.M. Peterson.** 1994.
23 pBBRMCS: a broad-host-range cloning vector. *Biotechniques* **16**:800-802.
- 24 20. **Long, S.R.** 1996. *Rhizobium* symbiosis: nod factors in perspective. *Plant Cell* **8**:1885-
25 1898.

- 1 21. **Niel, C., J.B. Guillaume, and M. Bechet.** 1977. Mise en evidence de deux enzymes
2 présentant une activité β -galactosidase chez *Rhizobium meliloti*. Can. J. Microbiol.
3 **23**:1178-1181.
- 4 22. **Oktyabrsky, O.N., G.V. Smirnova, and N.G. Muzyka.** 2001. Role of glutathione in
5 regulation of hydroperoxidase 1 in growing *Escherichia coli*. Free Radic. Biol. Med.
6 **31**:250-255.
- 7 23. **Perret, X., C. Staehelin, and W.J. Broughton.** 2000. Molecular basis of symbiotic
8 promiscuity. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **64**:180-201.
- 9 24. **Riccillo, P.M., C.I. Muglia, F.J. de Bruijn, A.J. Roe, I.R. Booth, and O.M. Aguilar.**
10 2000. Glutathione is involved in environmental stress responses in *Rhizobium tropici*,
11 including acid tolerance. J. Bacteriol. **182**:1748-1753.
- 12 25. **Rosenberg, C., P. Boistard, J. Denarie, and F. Casse-Delbart.** 1981. Genes
13 controlling early and late functions in symbiosis are located on a megaplasmid in
14 *Rhizobium meliloti*. Mol. Gen. Genet. **184**:326-333.
- 15 26. **Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. Molecular cloning: a laboratory
16 manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor, New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory
17 Press.
- 18 27. **Santos R., D. Hérouart, A. Puppo, and D. Touati.** 2000. Critical protective role of
19 bacterial superoxide dismutase in *Rhizobium*-legume symbiosis. Mol. Microbiol.
20 **38**:750-759.
- 21 28. **Santos R., D. Hérouart, S. Sigaud, D. Touati, and A. Puppo.** 2001. Oxidative burst in
22 alfalfa-*Sinorhizobium meliloti* symbiotic interaction. Mol. Plant-Microbe Interact.
23 **14**:86-89.
- 24 29. **Sigaud, S., V. Becquet, P. Frendo, A. Puppo, and D. Hérouart.** 1999. Differential
25 regulation of two divergent *Sinorhizobium meliloti* genes for HPII-like catalases during

- 1 free-living growth and protective role of both catalase during symbiosis. J. Bacteriol.
2 **181**:2634-2639.
- 3 30. **Simon, R., U. Prierer, and A. Pülher.** 1983. A broad host range mobilization system for
4 *in vivo* genetic engineering: Transposon mutagenesis in gram negative bacteria.
5 Bio/Technology **1**:784-791.
- 6 31. **Vasse, J., F. de Billy, S. Camut, and G. Truchet.** 1990. Correlation between
7 ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules. J.
8 Bacteriol. **172**:4295-4306.

1 **Figure legends**

2 FIG. 1. Growth curve of *Sinorhizobium meliloti* strains. At time zero, rhizobia cells were
3 diluted with minimal medium (M9) to an OD₆₀₀ of 0.1. Growth of wild-type Rm1021
4 (diamond), mutant strain SmgshA (closed square), mutant strain SmgshB (closed triangle)
5 and mutant strain SmgshA complemented with pgshAc (open square) was monitored by
6 measuring the OD₆₀₀. (A) Growth curves of free-living *S. meliloti* strains on M9 media
7 following over night culture on LB_{MC}. (B) Growth curves of free-living *S. meliloti* strains on
8 M9 media following an overnight adaptation to M9. The data are the means from three
9 experiments.

10

11 FIG. 2. Catalase activity of *Sinorhizobium meliloti* strains. At time zero, rhizobia cells were
12 diluted with M9 medium to an OD₆₀₀ of 0.1. Cell extracts were prepared from the Rm1021
13 strain (1201), SmgshA strain (SmgshA), SmgshB strain (SmgshB) and SmgshA strain
14 complemented with pgshAc (SmcgshA) after 24 h. (A) Total catalase activity for the different
15 strains. The data are the means of triplicate from three experiments.* indicates significant
16 difference (P<0.05). (B) Catalase activity pattern. Proteins (20 µg) were submitted to
17 electrophoresis on a native polyacrylamide gel (7%) that had been stained for catalase
18 activity. The position of KatA, KatB and KatC are indicated according to Sigaud *et al.* (1999).

19

20 FIG. 3. Plant nodulation efficiency. Plants inoculated with *S. meliloti* Rm1021 strain (1021)
21 and SmgshB strain (SmgshB). The total number of nodules per tube was assessed 7, 11 and
22 14 days post inoculation. Each tube contained three plants. The data are the means of 48 tubes
23 from two experiments * indicates significant difference (P<0.05).

24

1 FIG. 4. Structure and ultrastructure of 4 week-old nodules. Nodules were incited by Rm1021
2 (A, C, E) and SmsgshB (B, D, F) strains. The meristematic (I), infection (II), II/III inter- (IZ),
3 fixing (III) and senescent (IV) zones are represented in A and B. a = amyloplast and s =
4 senescing bacteroid. Scale bars = 100 μm (A, B), 10 μm (C, D) and 1 μm (E, F).
5

1 **Table 1.** Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Relevant characteristic(s) ^a	References
Strains		
<i>S. meliloti</i>		
RCR2011	SU47, wild type, Nod ⁺ Fix ⁺	25
Rm1021	RCR2011 derivative, Sm ^R	21
SmgshA	Same as Rm1021 but with <i>gshA</i> insertion mutation, Sm ^R , Nm ^R	This study
SmgshB	Same as Rm1021 but with <i>gshB</i> insertion mutation, Sm ^R , Tc ^R	This study
<i>E. coli</i>		
DH5α	<i>F^{supE44} ΔlacU169(Φ80dlacZDM15) hsdR17(r_K⁺m_K⁺) recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Bethesda Research Laboratories
MT607	<i>pro-82 thi-1 hsdR17 supE44 recA56</i>	5
MT616	MT607 (pRK600)	5
Plasmids		
pLAFR1	IncP1 cosmid cloning vector Tc ^R	7
pRK600	ColE1 replicon with RK2 transfer region Cm ^R	5
pBluescriptKS(+)	Derivative of pUC19 with f1(+) <i>oriR</i> , Ap ^R	Stratagene
pGEM [®] -T	T vector with f1 <i>oriR</i> , Ap ^R	Promega corporation
pGEM [®] -T easy	T vector with f1 <i>oriR</i> , Ap ^R	Promega corporation
pSUP202	ColE1, Mob+, Tc ^R Ap ^R Cm ^R	30
pKOK4	Ap ^f Km ^f , pSUP202 derivative; source of Km ^R	18
pBBR1MCS-5	Derivate of pBBR1-MCS, Gm ^R	19
pGEMgshA	pGEM [®] -T, with 800 bp. PCR amplified fragment of <i>gshA</i>	This study
pSUPgshA	pSUP202, with 800 bp PCR amplified fragment of <i>gshA</i>	This study
pJHgshA	pSUP202, with 800 bp PCR amplified fragment of <i>gshA</i> and Km ^R from pKOK4	This study
pGEMcgshA	pGEM [®] -T, with 1500 bp. PCR amplified fragment of <i>gshA</i>	This study
pgshAc	pBBR1MCS-5, with 1500 bp. PCR amplified fragment of <i>gshA</i>	This study
pGMgshB	pGEM [®] -T, with 784 bp. PCR amplified fragment of <i>gshB</i>	This study
pCMgshB	pSUP202, with 800 bp PCR amplified fragment of <i>gshB</i>	This study

2 ^a Abbreviations: Tc, tetracycline; Sm, streptomycin; Ap, ampicillin; Km, kanamycine; Cm, chloramphenicol; Sp,
3 spectinomycin; Gm, gentamycine, Nm, neomycin.

4

5

6

7

1
2
3
4
5
6
7
8

Table 2. Growth dependent accumulation of γ -EC and GSH in *S. meliloti*. γ -EC and GSH were measured by HPLC as described in experimental procedures. Data represent the means of three experiments and error bars denote standard errors. ^a ___ not detected.

Strains	12h		24h		48h		72h	
	γ -EC	GSH	γ -EC	GSH	γ -EC	GSH	γ -EC	GSH
1021	___ ^a	6±1	___	7±1	___	7±1	___	3±0.3
SmgshA	___	___	___	___	___	___	___	___
SmgshB	17±3	___	19±2	___	19±2	___	14±3	___
SmgshA (pgshAc)	0.4±0.2	14±2	0.5±0.1	14±3	0.5±0.1	14±3	___	8±2

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24

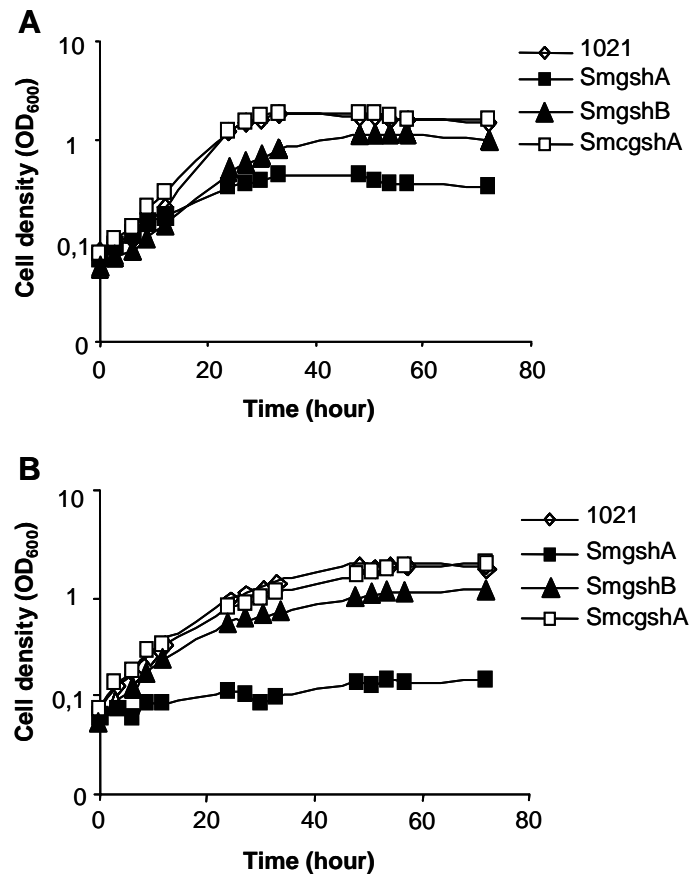


Figure 1

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20

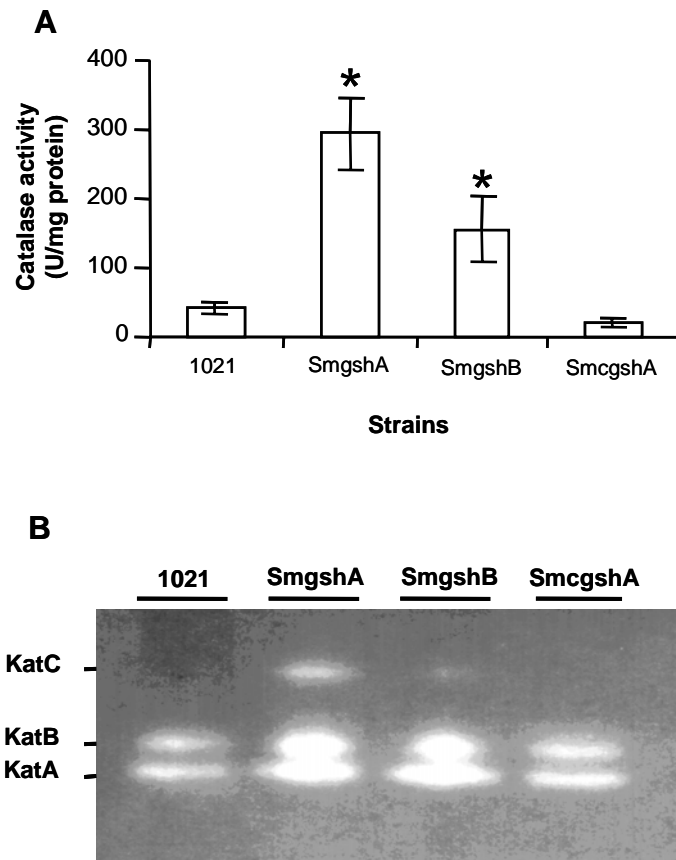


Figure 2

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19

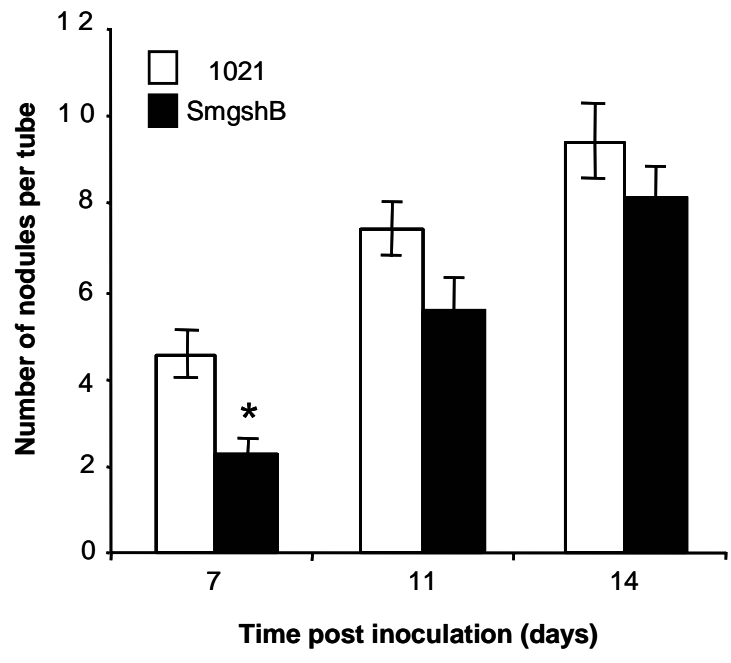


Figure 3

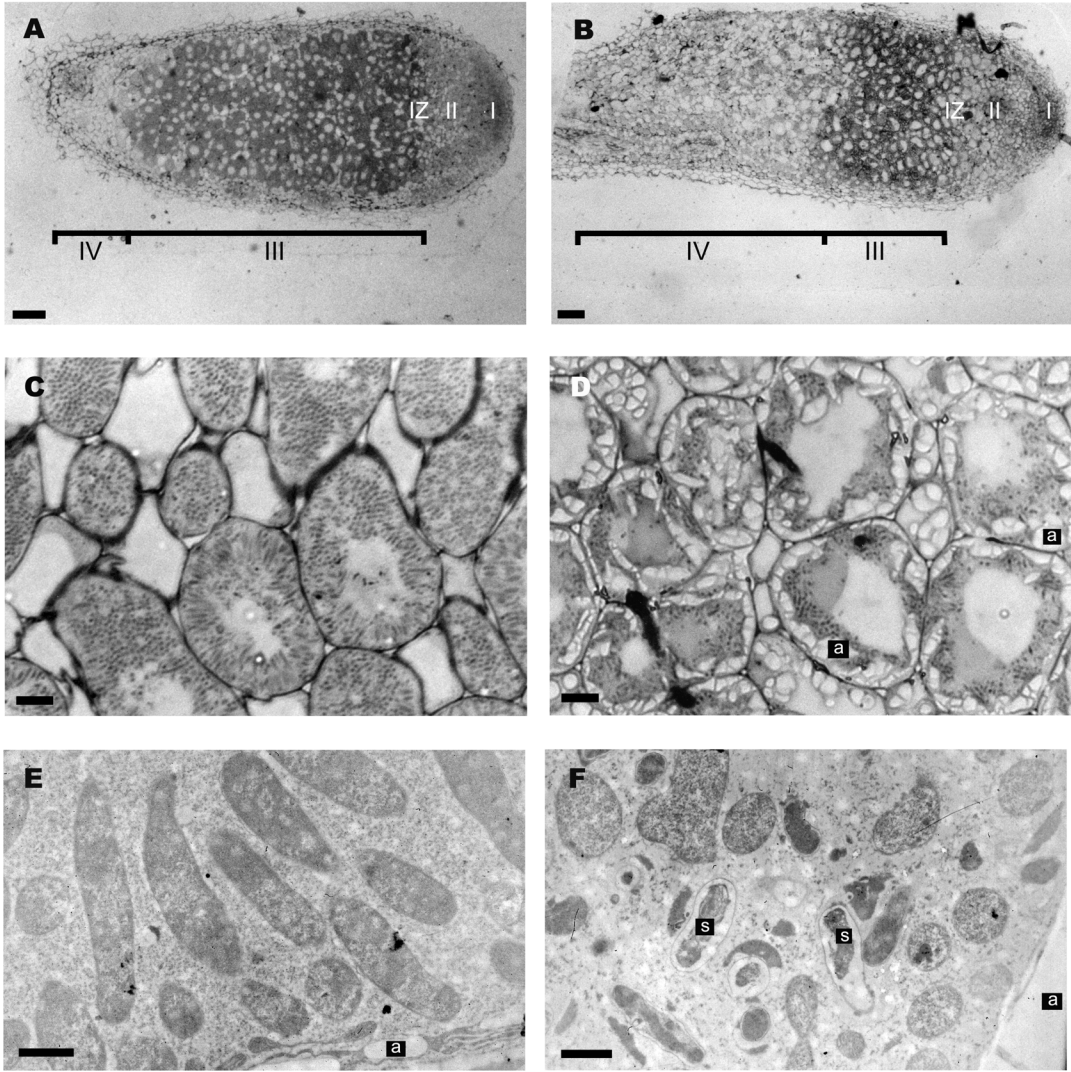


Figure 4

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Albus, U., R. Baier, O. Holst, A. Puhler et K. Niehaus** (2001). Suppression of an elicitor-induced oxidative burst reaction in *Medicago sativa* cell cultures by *Sinorhizobium meliloti* lipopolysaccharides. *New Phytol.* **151**: 597-606.
- Alesandrini, F., P. Frendo, A. Puppo et D. Hérouart** (2003). Isolation of a molecular marker of soybean nodule senescence. *Plant Physiol. Biochem.* **41**: 727-732.
- Allan, A. C. et R. Fluhr** (1997). Two distinct sources of elicited reactive oxygen species in tobacco epidermal cells. *Plant Cell* **9**: 1559-1572.
- Ampe, F., E. Kiss, F. Sabourdy et J. Batut** (2003). Transcriptome analysis of *Sinorhizobium meliloti* during symbiosis. *Genome Biol.* **4**: R15.
- Andersson, S. G. E., A. Zomorodipour, J. O. Andersson, T. Sicheritz-Ponten, U. C. M. Alsmark, R. M. Podowski, A. K. Näslund, A.-S. Eriksson, H. H. Winkler et C. G. Kurland** (1998). The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature* **396**: 133-140.
- Ané, J.-M., G. B. Kiss, B. K. Riely, R. V. Penmetza, G. E. D. Oldroyd, C. Ajax, J. Lévy, F. Debelle, J.-M. Baek, P. Kalo, et al.** (2004). *Medicago truncatula DMII* required for bacterial and fungal symbiosis in legumes. *Science* **303**: 1364-1367.
- Apel, K. et H. Hirt** (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**: 373-399.
- Appleby, C. A.** (1984). Leghemoglobin and *Rhizobium* respiration. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* **35**: 443-478.
- Ardissone, S., P. Frendo, E. Laurenti, W. Jantschko, C. Obinger, A. Puppo et R. P. Ferrari** (2004). Purification and physical characterization of the three hydroperoxidases from the symbiotic bacterium *Sinorhizobium meliloti*. *Biochemistry* **Sous presse**.
- Aslund, F., M. Zheng, J. Beckwith et G. Storz** (1999). Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol-disulfide status. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 6161-6165.
- Barloy-Hubler, F., A. Cheron, A. Hellegouarch et F. Galibert** (2004). Smc01944, a secreted peroxidase induced by oxidative stresses in *Sinorhizobium meliloti* 1021. *Microbiology* **150**: 657-664.
- Barnett, M. J., R. F. Fisher, T. Jones, C. Komp, A. P. Abola, F. Barloy-Hubler, L. Bowser, D. Capela, F. Galibert, J. Gouzy, et al.** (2001). Nucleotide sequence and predicted functions of the entire *Sinorhizobium meliloti* pSymA megaplasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 9883-9888.

- Barnett, M. J. et S. R. Long** (1990). DNA sequence and translational product of a new nodulation regulatory locus: *syrM* has sequence similarity to NodD proteins. *J. Bacteriol.* **172**: 3695-3700.
- Barnett, M. J., B. G. Rushing, R. F. Fisher et S. R. Long** (1996). Transcription start sites of *syrM* and *nodD3* flank an insertion sequence relic in *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **178**: 1782-1787.
- Barra, L.** (2003). Caractérisation de gènes impliqués dans l'osmoprotection de *Sinorhizobium meliloti* ou dans l'établissement de la symbiose *S. meliloti-Medicago sativa*. Thèse de doctorat, Université de Rennes I, France.
- Batut, J., M. L. Daveran-Mingot, M. David, J. Jacobs, G. A. M et D. Kahn** (1989). *fixK*, a gene homologous with *fnr* and *crp* from *Escherichia coli*, regulates nitrogen fixation genes both positively and negatively in *Rhizobium meliloti*. *EMBO J.* **8**: 1279-1286.
- Bearden, J. C.** (1978). Quantitation of submicrogram quantities of protein by an improved protein-dye binding assay. *Biochim. Biophys. Acta* **533**: 525-529.
- Becker, A., H. Berges, E. Krol, C. Bruand, S. Ruberg, D. Capela, E. Lauber, E. Meilhoc, F. Ampe, F. J. de Bruijn, et al.** (2004). Global changes in gene expression in *Sinorhizobium meliloti* 1021 under microoxic and symbiotic conditions. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **17**: 292-303.
- Bergès, H., C. Checroun, S. Guiral, A.-M. Garnerone, P. Boistard et J. Batut** (2001). A glutamine-amidotransferase-like protein modulates FixT anti-kinase activity in *Sinorhizobium meliloti*. *BMC Microbiol.* **1**:6.
- Bestwick, C. S., M. H. Bennett et J. W. Mansfield** (1995). Hrp mutant of *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola* induces cell wall alteration but not membrane damage leading to the hypersensitive reaction in lettuce. *Plant Physiol.* **108**: 503-516.
- Bestwick, C. S., I. R. Brown, M. H. Bennett et J. W. Mansfield** (1997). Localisation of hydrogen peroxide accumulation during the hypersensitive reaction of lettuce cells to *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. *Plant Cell* **9**: 209-221.
- Beynon, J. L., M. K. Williams et F. C. Cannon** (1988). Expression and functional analysis of *Rhizobium meliloti nifA* gene. *EMBO J.* **7**: 7-14.
- Bielski, B. H. J., R. L. Arudi et M. W. Sutherland** (1983). A study of the reactivity of HO₂/O₂⁻ with unsaturated fatty acids. *J. Biol. Chem.* **258**.
- Birnboim, H. C. et J. Doly** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7**: 1513-1523.
- Biteau, B., J. Labarre et M. B. Toledano** (2003). ATP-dependant reduction of cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin. *Nature* **425**: 980-984.

- Boivin, C., S. Camut, C. A. Malpica, G. Truchet et C. Rosenberg** (1990). *Rhizobium meliloti* genes encoding catabolism of trigonelline are induced under symbiotic conditions. *Plant Cell* **2**: 1157-1170.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Bradley, D. J., P. Kjeebom et C. J. Lamb** (1992). Elicitor- and wound induced oxidative cross-linking of proline-rich plant cell wall protein: a novel, rapid defense response. *Cell* **70**: 21-30.
- Brady, J. D. et S. C. Fry** (1997). Formation of di-isodityrosine and loss of isodityrosine in the cell walls of tomato cell-suspension cultures treated with fungal elicitors or H₂O₂. *Plant Physiol.* **115**: 87-92.
- Brewin, N. J.** (2003). Novel symbiotic organelles in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *XIth International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, St Petersburg, Russia Livre des résumés*: p. 12.
- Brewin, N. J.** (2004). Plant cell wall remodelling in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Crit. Rev. Plant Sci.* **25**: 1-24.
- Brewin, N. J., E. A. Rathbun et J.-P. Wisniewski** (2000). Structure and development of infection threads. In *Nitrogen Fixation: From Molecules to Crop Productivity*. F. E. Pedrosa, M. Hungria, M. G. Yates and W. E. Newton (Eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 381-382.
- Brot, N., L. Weissbach, J. Werth et H. Weissbach** (1981). Enzymatic reduction of protein-bound methionine sulfoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**: 2155-2158.
- Brown, L. et T. Elliott** (1996). Efficient translation of the RpoS sigma factor in *Salmonella typhimurium* requires host factor I, an RNA-binding protein encoded by the *hfq* gene. *J. Bacteriol.* **178**: 3763-3770.
- Buck, M. et W. Cannon** (1992). Specific binding of the transcription factor sigma-54 to promoter DNA. *Nature* **358**: 422-424.
- Bueno, P., M. J. Soto, M. P. Rodriguez-Rosales, J. Sanjuan, J. Olivares et J. P. Donaire** (2001). Time-course of lipoxygenase, antioxidant enzyme activities and H₂O₂ accumulation during the early stages of *Rhizobium*-legume symbiosis. *New Phytol.* **152**: 91-96.
- Cadet, J., A.-G. Bourdat, C. D'Ham, V. Duarte, D. Gasparutto, A. Romieu et J.-L. Ravanat** (2000). Oxidative base damage to DNA: specificity of base excision repair enzymes. *Mutat. Res.* **462**: 121-128.
- Campbell, G. R., B. L. Reuhs et G. C. Walker** (2002). Chronic intracellular infection of alfalfa nodules by *Sinorhizobium meliloti* requires correct lipopolysaccharide core. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 3938-3943.

- Campbell, G. R., L. A. Sharypova, H. Scheidle, K. M. Jones, K. Niehaus, A. Becker et G. C. Walker** (2003). Striking complexity of lipopolysaccharide defects in a collection of *Sinorhizobium meliloti* mutants. *J. Bacteriol.* **185**: 3853-3862.
- Capela, D., F. Barloy-Hubler, J. Gouzy, G. Bothe, F. Ampe, J. Batut, P. Boistard, A. Becker, M. Boutry, E. Cadieu, et al.** (2001). Analysis of the chromosome sequence of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti* strain 1021. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 9877-9882.
- Carlioz, A., M. L. Ludwig, W. C. Stalling, J. A. Fee, H. M. Steinman et D. Touati** (1988). Iron superoxide dismutase. Nucleotide sequence of the gene from *Escherichia coli* K 12 and correlations with crystal structures. *J. Biol. Chem.* **263**: 1555-1562.
- Carlioz, A. et D. Touati** (1986). Isolation of superoxide dismutase mutants in *Escherichia coli*: Is superoxide dismutase necessary for aerobic life? *EMBO J.* **5**: 623-630.
- Chelikani, P., I. Fita et P. C. Loewen** (2004). Diversity of structures and properties among catalases. *Cell. Mol. Life Sci.* **61**: 192-208.
- Chen, H., J. Higgins, I. J. Oresnik, M. F. Hynes, S. Natera, M. A. Djordjevic, J. J. Weinman et B. G. Rolfe** (2000). Proteome analysis demonstrates complex replicon and luteolin interactions in pSyma-cured derivatives of *Sinorhizobium meliloti* strain 2011. *Electrophoresis* **21**: 3833-3842.
- Cheng, H.-P. et G. C. Walker** (1998). Succinoglycan is required for initiation and elongation of infection threads during nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **180**: 5183-5191.
- Choi, H.-J., S.-J. Kim, P. Mukhopadhyay, S. Cho, J.-R. Woo, G. Storz et S.-E. Ryu** (2001). Structural basis of the redox switch in the OxyR transcription factor. *Cell* **105**: 103-113.
- Christman, M. F., R. W. Morgan, F. S. Jacobson et B. N. Ames** (1985). Positive control of a regulon for defenses against oxidative stress and some heat-shock proteins in *Salmonella typhimurium*. *Cell* **41**: 753-762.
- Christman, M. F., G. Storz et B. N. Ames** (1989). OxyR, a positive regulator of hydrogen peroxide-inducible genes in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, is homologous to a family of bacterial regulatory proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 3484-3488.
- Clare, D. A., M. N. Duong, D. Darr, F. Archibald et I. Fridovich** (1984). Effects of molecular oxygen on detection of superoxide radical with nitroblue tetrazolium and on activity stains for catalase. *Anal. Biochem.* **140**: 532-537.
- Cook, D., D. Dreyer, D. Bonnet, M. Howell, E. Nony et K. VandenBosch** (1995). Transient induction of a peroxidase gene in *Medicago truncatula* precedes infection by *Rhizobium meliloti*. *Plant Cell* **7**: 43-55.
- Cren, M., A. Kondorosi et E. Kondorosi** (1994). An insertional point mutation inactivates NolR repressor in *Rhizobium meliloti* 1021. *J. Bacteriol.* **176**: 518-519.

- Cren, M., A. Kondorosi et E. Kondorosi** (1995). NodR controls expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes involved in the core Nod factor synthesis. *Mol. Microbiol.* **15**: 733-747.
- Cullimore, J. et J. Dénarié** (2003). How legumes select their sweet talking symbionts. *Science* **302**: 575-578.
- Dangl, J. L. et J. D. G. Jones** (2001). Plant pathogens and integrated defense responses to infection. *Nature* **411**: 826-833.
- Dantan-Gonzalez, E., Y. Rosenstein, C. Quinto et F. Sanchez** (2001). Actin monoubiquitylation is induced in plants in response to pathogens and symbionts. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **14**: 1267-1273.
- David, M., M. L. Daveran, J. Batut, A. Dedieu, O. Domergue, J. Ghai, C. Hertig, B. P et D. Kahn** (1988). Cascade regulation of *nif* gene expression in *Rhizobium meliloti*. *Cell* **54**: 671-683.
- Davies, M. J. et A. Puppo** (1992). Direct evidence of a globin-derived radical in leghaemoglobin treated with peroxides. *Biochem. J.* **281**: 197-201.
- Dazzo, F. B., G. L. Truchet, J. E. Sherwood, E. M. Hrabak, M. Abe et S. H. Pankratz** (1984). Specific phases of root hair attachment in the *Rhizobium trifolii*-clover symbiosis. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**: 1140-1150.
- Dedon, P. C., Z. W. Jiang et I. H. Goldberg** (1992). Neocarzinostatin-mediated DNA damage in a model AGT.ACT site: mechanistic studies of thiol-sensitive partitioning of C4' DNA damage. *Biochemistry* **31**: 1917-1927.
- Delledonne, M., Y. Xia, R. A. Dixon et C. Lamb** (1998). Nitric oxide functions as a signal in plant disease. *Nature* **394**: 585-588.
- D'Haese, W., R. De Rycke, R. Mathis, S. Goormachtig, S. Pagnotta, C. Verplancke, W. Capoen et M. Holsters** (2003). Reactive oxygen species and ethylene play a positive role in lateral root base nodulation of a semiaquatic legume. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 11789-11794.
- D'Haese, W., J. Glushka, R. De Rycke, M. Holsters et R. W. Carlson** (2004). Structural characterization of extracellular polysaccharides of *Azorhizobium caulinodans* and importance for nodule initiation on *Sesbania rostrata*. *Mol. Microbiol.* **52**: 485-500.
- Dimitrijevic, L., A. Puppo et J. Rigaud** (1984). Superoxide dismutase activities in *Rhizobium phaseoli* bacteria and bacteroids. *Arch. Microbiol.* **139**: 174-178.
- Ditta, G., S. Stanfield, D. Corbin et D. R. Helinski** (1980). Broad host range DNA cloning system for Gram negative bacteria: Construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**: 7347-7351.

- Djaman, O., F. W. Outen et J. A. Imlay** (2004). Repair of oxidized iron-sulfur clusters in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **Sous presse**.
- Djordjevic, M. A., H. Cai Chen, S. Natera, G. Van Noorden, C. Menzel, S. Taylor, C. Renard, O. Geiger, the Sinorhizobium meliloti Consortium et G. F. Weiller** (2003). A global analysis of protein expression profiles in *Sinorhizobium meliloti*: discovery of new genes for nodule occupancy and stress adaptation. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **16**: 508-524.
- Doherty, D., J. A. Leigh, J. Glazebrook et G. C. Walker** (1988). *Rhizobium meliloti* mutants that overproduce the *R. meliloti* acidic calcofluor-binding exopolysaccharide. *J. Bacteriol.* **170**: 4249-4256.
- Dooley, C. T., T. M. Dore, G. T. Hanson, W. C. Jackson, S. J. Remington et R. Y. Tsien** (2004). Imaging dynamic redox changes in mammalian cells with green fluorescent protein indicators. *J. Biol. Chem.* **279**: 22284-22293.
- Esseling, J. J., F. G. P. Lhuissier et A. M. C. Emons** (2003). Nod factor-induced root hair curling: continuous polar growth towards the point of Nod factor application. *Plant Physiol.* **132**: 1982-1988.
- Fahey, R. C., W. C. Brown, W. B. Adams et M. B. Worsham** (1978). Occurrence of glutathione in bacteria. *J. Bacteriol.* **133**: 1126-1129.
- Farhaeus, G.** (1957). The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by simple glass slide technique. *J. Gen. Microbiol.* **16**: 374-381.
- Ferguson, G. P. et I. R. Booth** (1998). Importance of glutathione for growth and survival of *Escherichia coli* cells: detoxification of methylglyoxal and maintenance of intracellular K⁺. *J. Bacteriol.* **180**: 4314-4318.
- Finan, T. M., E. Hartweg, K. LeMieux, K. Bergman, G. C. Walker et E. R. Signer** (1984). General transduction in *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **159**: 120-124.
- Finan, T. M., S. Weidner, K. Wong, J. Buhrmester, P. Chain, F. J. Vorhölter, I. Hernandez-Lucas, A. Becker, A. Cowie, J. Gouzy, et al.** (2001). The complete sequence of the 1,683-kb pSymB megaplasmid from the N₂-fixing endosymbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 9889-9894.
- Flint, D. H., E. Smyk-Randall, J. F. Tuminello, B. Draczyska-Lusiak et O. R. Brown** (1993). The inactivation of dihydroxyacid dehydratase in *Escherichia coli* treated with hyperbaric oxygen occurs because of the destruction of its Fe-S cluster, but the enzyme remains in the cell in a form that can be reactivated. *J. Biol. Chem.* **268**: 22369-22376.
- Foreman, J., V. Demidchik, J. H. F. Bothwell, P. Mylona, H. Miedema, M. A. Torres, P. Linstead, S. Costa, C. Brownlee, J. D. G. Jones, et al.** (2003). Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* **422**: 442-446.
- Foussard, M., A. M. Garnerone, F. Ni, E. Soupene, P. Boistard et J. Batut** (1997). Negative autoregulation of the *Rhizobium meliloti* *fixK* gene is indirect and requires a newly identified regulator, FixT. *Mol. Microbiol.* **25**: 27-37.

- Fraysse, N., F. Couderc et V. Poinso** (2003). Surface polysaccharide involvement in establishing the rhizobium-legume symbiosis. *Eur. J. Biochem.* **270**: 1365-1380.
- Fry, S. C.** (1982). Isodityrosine, a new cross-linking amino acid from plant cell-wall glycoprotein. *Biochem. J.* **204**: 449-455.
- Gage, D. J.** (2002). Analysis of infection thread development using Gfp- and DsRed-expressing *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **184**: 7042-7046.
- Gage, D. J.** (2004). Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**: 280-300.
- Gage, D. J., T. Bobo et S. R. Long** (1996). Use of green fluorescent protein to visualize the early events of symbiosis between *Rhizobium meliloti* and alfalfa (*Medicago sativa*). *J. Bacteriol.* **178**: 7159-7166.
- Galibert, F., T. M. Finan, S. R. Long, A. Pühler, P. Abola, F. Ampe, F. Barloy-Hubler, M. J. Barnett, A. Becker, P. Boistard, et al.** (2001). The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science* **293**: 668-672.
- Gardner, P. R. et I. Fridovich** (1991). Superoxide sensitivity of the *Escherichia coli* aconitase. *J. Biol. Chem.* **266**: 19328-19333.
- Garnerone, A. M., D. Cabanes, M. Foussard, P. Boistard et J. Batut** (1999). Inhibition of the FixL sensor kinase by the FixT protein in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Biol. Chem.* **274**: 32500-32506.
- Gerard, F., A. M. Dri et P. L. Moreau** (1999). Role of *Escherichia coli* RpoS, LexA and H-NS global regulators in metabolism and survival under aerobic, phosphate-starvation conditions. *Microbiology* **145**: 1547-1562.
- Geurts, R. et T. Bisseling** (2002). Rhizobium Nod factor perception and signalling. *Plant Cell* **14**: S239-S249.
- Geurts, R., E. Limpens, P. Smit, C. Franken, J. Willems et T. Bisseling** (2003). Regulation of the rhizobial infection process in *Medicago*. *XIth International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions Livre des résumés*.
- Glazebrook, J. et G. C. Walker** (1991). Genetic techniques in *Rhizobium meliloti*. *Methods Enzymol.* **204**: 398-418.
- Gonzalez, J. E. et M. M. Marketon** (2003). Quorum sensing in nitrogen-fixing Rhizobia. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**: 574-592.
- Gonzalez-Flecha, B. et B. Demple** (1995). Metabolic sources of hydrogen peroxide in aerobically growing *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **270**: 13681-13687.
- Gonzalez-Flecha, B. et B. Demple** (1997). Homeostatic regulation of intracellular hydrogen peroxide concentration in aerobically growing *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**: 382-388.

- Gort, A. S., D. M. Ferber et J. A. Imlay** (1999). The regulation and role of the periplasmic copper, zinc superoxide dismutase of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **32**: 179-191.
- Gralnick, J., E. Webb, B. Beck et D. Downs** (2000). Lesions in *gshA* (encoding γ -L-glutamyl-L-cysteine synthetase) prevent aerobic synthesis of thiamine in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *J. Bacteriol.* **182**: 5180-5187.
- Greenberg, J. T. et B. Demple** (1986). Glutathione in *Escherichia coli* is dispensable for resistance to H₂O₂ and gamma radiation. *J. Bacteriol.* **168**: 1026-1029.
- Grimaud, R., B. Ezraty, J. K. Mitchell, D. Lafitte, C. Briand, P. J. Derrick et F. Barras** (2001). Repair of oxidized proteins. Identification of a new methionine sulfoxide reductase. *J. Biol. Chem.* **276**: 48915-48920.
- Halliwell, B. et J. M. C. Gutteridge** (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* **219**: 1-14.
- Hardy, R. W., R. D. Holsten, E. K. Jackson et R. C. Burns** (1968). The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiol.* **43**: 1185-1207.
- Hausladen, A., C. T. Privalle, T. Keng, J. DeAngelo et J. S. Stamler** (1996). Nitrosative stress: activation of the transcription factor OxyR. *Cell* **86**: 719-729.
- Helal, H. M. et D. Sauerbeck** (1989). Carbon turnover in the rhizosphere. *Z. Pflanzenernaehr. Bodenkd.* **152**: 211-216.
- Hérouart, D., S. Sigaud, S. Moreau, P. Frendo, D. Touati et A. Puppo** (1996). Cloning and characterization of the *katA* gene of *Rhizobium meliloti* encoding a hydrogen peroxide-inducible catalase. *J. Bacteriol.* **178**: 6802-6809.
- Hertig, C., R. Y. Li, A. M. Louarn, A. M. Garnerone, M. David, J. Batut, D. Kahn et P. Boistard** (1989). *Rhizobium meliloti* regulatory gene *fixJ* activates transcription of *R. meliloti* *nifA* and *fixK* genes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **171**: 1736-1738.
- Hirsch, A. M.** (1999). Role of lectins (and rhizobial exopolysaccharides) in legume nodulation. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**: 320-326.
- Honma, M. A. et F. M. Ausubel** (1987). *Rhizobium meliloti* has three functional copies of the *nodD* symbiotic regulatory gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 8558-8562.
- Imlay, J. A.** (2003). Pathways of oxidative damage. *Annu. Rev. Microbiol.* **57**: 395-418.
- Imlay, J. A. et I. Fridovich** (1991). Assay of metabolic superoxide production in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **266**: 6957-6965.
- Imlay, J. A. et S. Linn** (1988). DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science* **240**: 1302-1309.

- Imlay, K. R. et J. A. Imlay** (1996). Cloning and analysis of *sodC*, encoding the copper-zinc superoxide dismutase of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **178**: 2564-2571.
- Jackson, A. O. et C. B. Taylor** (1996). Plant-microbe interactions: life and death at the interface. *Plant Cell* **8**: 1651-1668.
- Jacobson, S. F., R. W. Morgan, M. F. Christman et B. N. Ames** (1989). An alkyl hydroperoxide reductase from *Salmonella typhimurium* involved in defense of DNA against oxidative damage: purification and properties. *J. Biol. Chem.* **264**: 1488-1496.
- Jefferson, R. A., S. M. Burgess et D. Hirsh** (1986). β -glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 8447-8451.
- Jones, D. P.** (1982). Intracellular catalase function: analysis of the catalytic activity by product formation in isolated liver cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **214**: 806-814.
- Kaneko, T., Y. Nakamura, S. Sato, E. Asamizu, T. Kato, S. Sasamoto, A. Watanabe, K. Idesawa, A. Ishikawa, K. Kawashima, et al.** (2000). Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA Res.* **7**: 331-338.
- Kasai, H. et S. Nishimura** (1983). Hydroxylation of the C-8 position of deoxyguanosine by reducing agents in the presence of oxygen. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **12**: 165-167.
- Kasai, H. et S. Nishimura** (1984). Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents. *Nucleic Acids Res.* **12**: 2137-2145.
- Kato, Y., X. Wu, M. Naito, H. Nomura, N. Kitamoto et T. Osawa** (2000). Immunochemical detection of protein dityrosine in atherosclerotic lesion of Apo-E deficient mice using a novel monoclonal antibody. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **275**: 11-15.
- Kawalleck, P., E. Schmelzer, K. Hahlbrock et I. E. Somssich** (1995). Two pathogen responsive genes in parsley encode a tyrosine-rich hydroxyproline-rich glycoprotein (HRGP) and an anionic peroxidase. *Mol. Gen. Genet.* **247**: 444-452.
- Kawano, T.** (2003). Roles of the reactive oxygen species-generating peroxidase reactions in plant defense and growth induction. *Plant Cell Rep.* **21**: 829-837.
- Kim, J.-A. et J. E. Mayfield** (2000). Identification of *Brucella abortus* OxyR and its role in control of catalase expression. *J. Bacteriol.* **182**: 5631-5633.
- Kim, S. O., K. Merchant, R. Nudelman, W. F. Beyer Jr., T. Keng, J. DeAngelo, A. Hausladen et J. S. Stamler** (2002). OxyR: a molecular code for redox-related signaling. *Cell* **109**: 383-396.
- Klessig, D. F., J. Durner, R. Noad, D. A. Navarre, D. Wendehenne, D. Kumar, J. M. Zhou, J. Shah, S. Zhang, P. Kachroo, et al.** (2000). Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 8849-8855.

- Kondorosi, E., J. Gyuris, J. Schmidt, M. John, E. Duda, B. Hoffmann, J. Schell et A. Kondorosi** (1989). Positive and negative control of *nod* gene expression in *Rhizobium meliloti* is required for optimal nodulation. *EMBO J.* **8**: 1331-1340.
- Kondorosi, E., M. Pierre, M. Cren, U. Haumann, M. Buire, B. Hoffmann, J. Schell et A. Kondorosi** (1991). Identification of NolR, a negative transacting factor controlling the *nod* regulon in *Rhizobium meliloti*. *J. Mol. Biol.* **222**: 885-896.
- Krol, E. et A. Becker** (2004). Global transcriptional analysis of the phosphate starvation response in *Sinorhizobium meliloti* strains 1021 and 2011. *Mol. Genet. Genomics* **272**: 1-17.
- Kullik, I., J. Stevens, M. B. Toledano et G. Storz** (1995). Mutational analysis of the redox-sensitive transcriptional regulator OxyR: regions important for DNA binding and multimerisation. *J. Bacteriol.* **177**: 1285-1291.
- Kullik, I., M. B. Toledano, L. A. Tartaglia et G. Storz** (1995). Mutational analysis of the redox-sensitive transcriptional regulator OxyR: regions important for oxidation and transcriptional activation. *J. Bacteriol.* **177**: 1275-1284.
- Kuo, C. F., T. Mashino et I. Fridovich** (1987). α,β -dihydroxyisovalerate dehydratase: a superoxide-sensitive enzyme. *J. Biol. Chem.* **262**: 4724-4727.
- Kurland, C. G. et S. G. E. Andersson** (2000). Origin and evolution of the mitochondrial proteome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**: 786-820.
- Kustu, S., E. Santero, J. Keener, D. Popham et D. Weiss** (1989). Expression of sigma 54 (*nrA*)-dependent genes is probably united by a common mechanism. *Microbiol. Rev.* **53**: 367-376.
- Kwak, J. M., I. C. Mori, Z. M. Pei, N. Leonhardt, M. A. Torres, J. L. Dangl, R. E. Bloom, S. Bodde, J. D. Jones et J. I. Schroeder** (2003). NADPH oxidase *AtrbohD* and *AtrbohF* genes function in ROS-dependent ABA signaling in *Arabidopsis*. *EMBO J.* **22**: 2623-2633.
- Laloi, C., K. Apel et A. Danon** (2004). Reactive oxygen signalling: the latest news. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**: 323-328.
- Lamb, C. et R. A. Dixon** (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**: 251-275.
- Lawton, M. A. et C. J. Lamb** (1987). Transcriptional activation of plant defence genes by fungal elicitor, wounding and infection. *Mol. Cell Biol.* **7**: 335-341.
- Leong, S. A., P. H. Williams et G. S. Ditta** (1985). Analysis of the 5' regulatory region of the gene for δ -aminolevulinic acid synthetase of *Rhizobium meliloti*. *Nucl. Acids Res.* **13**: 5965-5976.
- Lerouge, P., P. Roche, C. Faucher, F. Maillet, G. Truchet, J. C. Promé et J. Dénarié** (1990). Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature* **344**: 781-784.

- Lévy, J., C. Bres, R. Geurts, B. Chalhoub, O. Kulikova, G. Duc, E.-P. Journet, J.-M. Ané, E. Lauber, T. Bisseling, *et al.* (2004). A putative Ca²⁺ and calmodulin-dependent protein kinase required for bacterial and fungal symbiosis. *Science* **303**: 1361-1364.
- Liochev, S. I. et I. Fridovich (1993). Modulation of the fumarases of *Escherichia coli* in response to oxidative stress. *Arch. Biochem. Biophys.* **301**: 379-384.
- Liu, M., J. E. Gonzalez, L. B. Willis et G. C. Walker (1998). A novel screening method for isolating exopolysaccharide-deficient mutants. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 4600-4602.
- Lodwig, E. M., A. H. F. Hosie, A. Bourdès, K. Findlay, D. Allaway, R. Karunakaran, J. A. Downie et P. S. Poole (2003). Amino-acid cycling drives nitrogen fixation in the legume-*Rhizobium* symbiosis. *Nature* **422**: 672-674.
- Loewen, P. C. et R. Hengge-Aronis (1994). The role of the sigma factor σ^S (KatF) in bacterial global regulation. *Annu. Rev. Microbiol.* **48**: 53-80.
- Loewen, P. C., M. G. Klotz et D. J. Hassett (2000). Catalase-an "old" enzyme that continue to surprise us. *ASM News* **66**: 76-82.
- Loewen, P. C. et J. Switala (1986). Purification and characterization of catalase HP11 from *Escherichia coli* K12. *J. Biol. Chem.* **64**: 638-646.
- Lois, A. F., M. Weinstein, G. S. Ditta et D. R. Helinski (1993). Autophosphorylation and phosphatase activities of the oxygen-sensing protein FixL of *Rhizobium meliloti* are coordinately regulated by oxygen. *J. Biol. Chem.* **268**: 4370-4375.
- Loprasert, S., M. Fuangthong, W. Whangsuk, S. Atichartpongkul et S. Mongkolsuk (2000). Molecular and physiological analysis of an OxyR-regulated *ahpC* promoter in *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. *Mol. Microbiol.* **37**: 1504-1514.
- Madsen, E. B., L. H. Madsen, S. Radutoiu, M. Olbryt, M. Rakwalska, K. Szczyglowski, S. Sato, T. Kaneko, S. Tabata, N. Sandal, *et al.* (2003). A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. *Nature* **425**: 637-640.
- Marketon, M. M., S. A. Glenn, A. Eberhard et J. E. Gonzalez (2003). Quorum sensing controls exopolysaccharide production in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **185**: 325-331.
- Massey, V. (1994). Activation of molecular oxygen by flavins and flavoproteins. *J. Biol. Chem.* **269**: 22459-22462.
- Matamoros, M. A., D. A. Dalton, J. Ramos, M. R. Clemente, M. C. Rubio et M. Becana (2003). Biochemistry and molecular biology of antioxidants in the Rhizobia-legume symbiosis. *Plant Physiol.* **133**: 499-509.
- McCord, J. M. et I. Fridovich (1969). Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyte hemocoupein. *J. Biol. Chem.* **244**: 6049-6055.

- Meade, H. M., S. R. Long, G. B. Kuvkun, S. E. Brown et F. M. Ausubel** (1982). Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutant of *Rhizobium meliloti* induced by transposon Tn5 mutagenesis. *J. Bacteriol.* **149**: 114-122.
- Meister, A. et M. E. Anderson** (1983). Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* **52**: 711-760.
- Messner, K. R. et J. A. Imlay** (1999). The identification of primary sites of superoxide and hydrogen peroxide formation in the aerobic respiratory chain and sulfite reductase complex of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **274**: 10119-10128.
- Messner, K. R. et J. A. Imlay** (2002). Mechanism of superoxide and hydrogen peroxide formation by fumarate reductase, succinate dehydrogenase, and aspartate oxidase. *J. Biol. Chem.* **277**: 42563-42571.
- Michaels, M. L., C. Cruz, A. P. Grollman et J. H. Miller** (1992). Evidence that MutY and MutM combine to prevent mutations by an oxidatively damaged form of guanine in DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 7022-7025.
- Miller, J. H.** (1972). Experiments in molecular genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 352-355.
- Minghetti, K. C. et R. B. Gennis** (1988). The two terminal oxidases of the aerobic respiratory chain of *Escherichia coli* each yield water and not peroxide as a final product. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **155**: 243-248.
- Mittler, R., E. H. Herr, B. L. Orvar, W. van Camp, H. Willekens, D. Inzé et B. E. Ellis** (1999). Transgenic tobacco plants with reduced capability to detoxify reactive oxygen intermediates are hyperresponsive to pathogen infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 14165-14170.
- Mohammad, A., J. Miranda-Rios, G. Estrada Navarrete, C. Quinto, J. E. Olivares, B. Garcia-Ponce et F. Sanchez** (2004). Nodulin 22 from *Phaseolus vulgaris* protects *Escherichia coli* cells from oxidative stress. *Planta Sous presse*.
- Moreau, S., M. J. Davies, C. Mathieu, D. Hérouart et A. Puppo** (1996). Leghemoglobin-derived radicals. Evidence for multiple protein-derived radicals and the initiation of peribacteroid membrane damage. *J. Biol. Chem.* **271**: 32557-32562.
- Mou, Z., W. Fan et X. Dong** (2003). Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell* **113**: 935-944.
- Mukhopaday, S. et H. E. Schellhorn** (1997). Identification and characterization of hydrogen peroxide-sensitive mutants of *Escherichia coli*: genes that require OxyR for expression. *J. Bacteriol.* **179**: 330-338.
- Muraoka, S., R. Okumura, N. Ogawa, T. Nonaka, K. Miyashita et T. Senda** (2003). Crystal structure of the full-length LysR-type transcriptional regulator, CbnR: unusual combination of two subunit forms and molecular bases for causing and changing DNA bend. *J. Mol. Biol.* **328**: 555-566.

- Niel, C., B. Guillaume et M. Bechet** (1977). Mise en évidence de deux enzymes présentant une activité β -galactosidasique chez *Rhizobium meliloti*. *Can. J. Microbiol.* **23**: 1178-1181.
- Niimura, Y. L., L. B. Poole et V. Massey** (1995). *Amphibacillus xylanus* NADH oxidase and *Salmonella typhimurium* alkyl-hydroperoxide reductase flavoprotein components show extremely high scavenging activity for both alkyl hydroperoxide and hydrogen peroxide in the presence of *S. typhimurium* alkyl-hydroperoxide reductase 22-kDa protein component. *J. Biol. Chem.* **270**: 25645-25650.
- Ohwada, T., Y. Shirakawa, M. Kusumoto, H. Masuda et T. Sato** (1999). Susceptibility to hydrogen peroxide and catalase activity of root nodule bacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **63**: 457-462.
- Okado-Matsumoto, A. et I. Fridovich** (2000). The role of the α,β -dicarbonyl compounds in the toxicity of short chain sugars. *J. Biol. Chem* **275**: 34853-34857.
- Oktyabrsky, O. N., G. V. Smirnova et N. G. Muzyka** (2001). Role of glutathione in regulation of hydroperoxidase I in growing *Escherichia coli*. *Free Radical Bio. Med.* **31**: 250-255.
- Oldroyd, G. E. D., E. M. Engstrom et S. R. Long** (2001). Ethylene inhibits the Nod factor signal transduction pathway of *Medicago truncatula*. *Plant Cell* **13**: 1835-1849.
- Oresnik, I. J., S.-L. Liu, C. K. Yost et M. F. Hynes** (2000). Megaplasmid pRme2011 of *Sinorhizobium meliloti* is not required for viability. *J. Bacteriol.* **182**: 3582-3586.
- Ostergaard, H., A. Henriksen, F. G. Hansen et J. R. Winther** (2001). Shedding light on disulfide bond formation: engineering a redox switch in green fluorescent protein. *EMBO J.* **20**: 5853-5862.
- Paau, A. S., C. B. Bloch et W. J. Brill** (1980). Developmental fate of *Rhizobium meliloti* bacteroids in alfalfa nodules. *J. Bacteriol.* **143**: 1480-1490.
- Paget, M. S. B. et M. J. Buttner** (2003). Thiol-based regulatory switches. *Annu. Rev. Genet.* **37**: 91-121.
- Parniske, M.** (2000). Intracellular accommodation of microbes by plants: a common developmental program for symbiosis and disease? *Curr. Opin. Plant Biol.* **3**: 320-328.
- Paulsen, I. T., R. Seshadri, K. E. Nelson, J. A. Eisen, J. F. Heidelberg, T. Read, R. J. Dodson, L. Umayam, L. M. Brinkac, M. J. Beanan, et al.** (2002). The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 13148-13153.
- Pellock, B. J., H.-P. Cheng et G. C. Walker** (2000). Alfalfa root nodule invasion efficiency is dependent on *Sinorhizobium meliloti* polysaccharides. *J. Bacteriol.* **182**: 4310-4318.
- Penninckx, M.** (2000). A short review on the role of glutathione in the response of yeasts to nutritional, environmental, and oxidative stresses. *Microb. Technol.* **26**: 737-742.

- Perret, X., C. Staehelin et W. J. Broughton** (2000). Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**: 180-201.
- Peters, J. W., K. Fisher et D. R. Dean** (1995). Nitrogenase structure and function: A biochemical-genetic perspective. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**: 335-366.
- Pieterse, C. M. et L. Van Loon** (2004). NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**: 456-464.
- Preobrazhenskaya, Y., A. I. Voskoboev et V. N. Burd** (2003). Phosphatase activity of non-heme chloroperoxidase from the bacterium *Serratia marcescens*. *FEBS Lett.* **536**: 41-44.
- Puppo, A. et B. Halliwell** (1988). Generation of hydroxyl radicals by soybean nodule leghaemoglobin. *Planta* **173**: 405-410.
- Puppo, A. et J. Rigaud** (1986). Superoxide dismutase: an essential role in the protection of the nitrogen fixation process? *FEBS Lett.* **201**: 187-189.
- Puppo, A., J. Rigaud et D. Job** (1981). Role of the superoxide anion in the leghemoglobin autoxidation. *Plant Sci. Lett.* **22**: 353-360.
- Radutoiu, S., L. H. Madsen, E. B. Madsen, H. H. Felle, Y. Umehara, M. Gronlund, S. Sato, Y. Nakamura, S. Tabata, N. Sandal, et al.** (2003). Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature* **425**: 585-592.
- Rae, A. L., P. Bonfante-Fasolo et N. J. Brewin** (1992). Structure and growth of infection threads in the legume symbiosis with *Rhizobium leguminosarum*. *Plant J.* **2**: 385-395.
- Rahman, M. A., H. Nelson, H. Weissbach et N. Brot** (1992). Cloning, sequencing and expression of the *Escherichia coli* peptide methionine sulfoxide reductase gene. *J. Biol. Chem.* **267**: 15549-15551.
- Ramu, S. K., H.-M. Peng et D. R. Cook** (2002). Nod factor induction of reactive oxygen species production is correlated with expression of the early nodulin gene *rip1* in *Medicago truncatula*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **15**: 522-528.
- Rathbun, E. A., M. J. Naldrett et N. J. Brewin** (2002). Identification of a family of extensin-like glycoproteins in the lumen of *Rhizobium*-induced infection threads in Pea root nodules. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **15**: 350-359.
- Rava, P. S., L. Somma et H. M. Steinman** (1999). Identification of a regulator that controls stationary-phase expression of catalase-peroxidase in *Caulobacter crescentus*. *J. Bacteriol.* **181**: 6152-6159.
- Riccillo, P. M., C. I. Muglia, F. J. de Bruijn, A. J. Roe, I. R. Booth et M. Aguilar** (2000). Glutathione is involved in environmental stress responses in *Rhizobium tropici*, including acid tolerance. *J. Bacteriol.* **182**: 1748-1753.

- Robbe-Saule, V., C. Coynault, M. Ibanez-Ruiz, D. Hermant et F. Norel** (2001). Identification of a non-haem catalase in *Salmonella* and its regulation by RpoS (σ^S). *Mol. Microbiol.* **39**: 1533-1545.
- Robertson, G. T. et R. M. Roop II** (1999). The *Brucella abortus* host factor I (HF-I) protein contributes to stress resistance during stationary phase and is a major determinant of virulence in mice. *Mol. Microbiol.* **34**: 690-700.
- Rolfe, B. G. et P. G. Gresshoff** (1988). Genetic analysis of legume nodule initiation. *Ann. Rev. Physiol. Plant. Mol. Biol.* **39**: 297-319.
- Roop II, R. M., J. M. Gee, G. T. Robertson, J. M. Richardson, W.-L. Ng et M. E. Winkler** (2003). *Brucella* stationary-phase gene expression and virulence. *Annu. Rev. Microbiol.* **57**: 57-76.
- Rostas, K., E. Kondorosi, B. Horvath, A. Simoncsits et A. Kondorosi** (1986). Conservation of extended promoter regions of nodulation genes in *Rhizobium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 1757-1761.
- Rüberg, S., Z.-X. Tian, E. Krol, B. Linke, F. Meyer, Y. Wang, A. Pühler, S. Weidner et A. Becker** (2003). Construction and validation of a *Sinorhizobium meliloti* whole genome DNA microarray: genome-wide profiling of osmoadaptive gene expression. *J. Biotechnol.* **106**: 255-268.
- Rush, J. D., Z. Maskos et W. H. Koppenol** (1990). Reactions of iron(II) nucleotide complexes with hydrogen peroxide. *FEBS lett.* **261**: 121-123.
- Ruvkun, G. B. et F. M. Ausubel** (1980). Interspecies homology of nitrogenase genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**: 191-195.
- Ruvkun, G. B., V. Sundaresan et F. M. Ausubel** (1982). Directed transposon Tn5 mutagenesis and complementation analysis of *Rhizobium meliloti* symbiotic nitrogen fixation genes. *Cell* **29**: 551-559.
- Ryals, J. A., U. H. Neuenschwander, M. G. Willits, A. Molina, H.-Y. Steiner et M. D. Hunt** (1996). Systemic acquired resistance. *Plant Cell* **8**: 1809-1819.
- Salzer, P., H. Corbiere et T. Boller** (1999). Hydrogen peroxide accumulation in *Medicago truncatula* roots colonized by the arbuscular mycorrhiza-forming fungus *Glomus intraradicis*. *Planta* **208**: 319-325.
- Salzwedel, J. L. et F. B. Dazzo** (1993). pSym *nod* gene influence on elicitation of peroxidase activity from white clover and pea roots by rhizobia and their cell-free supernatants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **6**: 127-134.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, T. Maniatis et N. Irwin** (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd ed., Cold Spring Harbor University Press, New York.
- Sancar, A. et G. B. Sancar** (1988). DNA repair enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* **57**: 29-67.

- Santos, R., S. Bocquet, A. Puppo et D. Touati** (1999). Characterization of an atypical superoxide dismutase from *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **181**: 4509-4516.
- Santos, R., D. Hérouart, A. Puppo et D. Touati** (2000). Critical protective role of bacterial superoxide dismutase in *Rhizobium*-legume symbiosis. *Mol. Microbiol.* **38**: 750-759.
- Santos, R., D. Hérouart, S. Sigaud, D. Touati et A. Puppo** (2001). Oxidative burst in Alfalfa-*Sinorhizobium meliloti* symbiotic interaction. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **14**: 86-89.
- Schell, M. A.** (1993). Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**: 597-626.
- Schlaman, H. R., R. J. Okker et B. J. J. Lugtenberg** (1992). Regulation of nodulation gene expression by NodD in rhizobia. *J. Bacteriol.* **174**: 5177-5182.
- Schofield, M. J. et P. Hsieh** (2003). DNA mismatch repair: molecular mechanisms and biological function. *Annu. Rev. Microbiol.* **57**: 579-608.
- Seaver, L. C. et J. A. Imlay** (2001). Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **183**: 7173-7181.
- Seaver, L. C. et J. A. Imlay** (2001). Hydrogen peroxide fluxes and compartmentalization inside growing *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **183**: 7182-7189.
- Sham, S. L. et S. R. Long** (2003). Nod factor inhibition of reactive oxygen efflux in a host legume. *Plant Physiol.* **132**: 2196-2204.
- Shaw, V. K. et W. J. Brill** (1977). Isolation of an iron-molybdenum cofactor from nitrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 3249-3253.
- Sherrill, C. et R. C. Fahey** (1998). Import and metabolism of glutathione by *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.* **180**: 1454-1459.
- Shibutani, S., M. Takeshita et A. P. Grollman** (1991). Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature* **349**: 431-434.
- Sigaud, S.** (1998). Formation de peroxyde d'hydrogène dans les nodosités de luzerne et caractérisation moléculaire des catalases du partenaire symbiotique *Sinorhizobium meliloti*. Thèse de doctorat, Université de Nice-Sophia Antipolis, France.
- Sigaud, S., V. Becquet, P. Frendo, A. Puppo et D. Hérouart** (1999). Differential regulation of two divergent *Sinorhizobium meliloti* genes for HP11-like catalases during free-living growth and protective role of both catalases during symbiosis. *J. Bacteriol.* **181**: 2634-2639.
- Smit, P., T. Bisseling et R. Geurts** (2004). Rhizobial bacteria grow only in the tip of infection threads. *V1th. European Nitrogen Fixation Conference Livre des résumés*: p. 38.
- Soballe, B. et R. K. Poole** (2000). Ubiquinone limits oxidative stress in *Escherichia coli*. *Microbiology* **146**: 787-796.

- Stadtman, E. R. et B. S. Berlett** (1991). Fenton chemistry. Amino acid oxidation. *J. Biol. Chem.* **266**: 17201-17211.
- Sticher, L., B. Mauch-Mani et J. P. Métraux** (1997). Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* **35**: 235-270.
- Storz, G., L. A. Tartaglia et B. N. Ames** (1990). Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes: direct activation by oxidation. *Science* **248**: 189-194.
- Stuurman, N., C. P. Bras, H. R. M. Schlaman, A. H. M. Wijfjes, G. Bloemberg et H. P. Spauk** (2000). Use of green fluorescent protein color variants expressed on stable broad-host-range vectors to visualize rhizobia interacting with plants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **13**: 1163-1169.
- Tao, K., C. Zou, N. Fujita et A. Ishihama** (1995). Mapping of the OxyR protein contact site in the C-terminal region of RNA polymerase α subunit. *J. Bacteriol.* **177**: 6740-6744.
- Teeri, T. H., H. Lehvälaiho, M. Franck, J. Uotila, P. Heino, E. T. Palva, M. Van Montagu et L. Herrera-Estrella** (1989). Gene fusions to *lacZ* reveal new expression patterns of chimeric genes in transgenic plants. *EMBO J.* **8**: 343-350.
- Tenhaken, R., A. Levine, L. F. Brisson, R. A. Dixon et C. J. Lamb** (1995). Function of the oxidative burst in hypersensitive disease resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 4158-4163.
- Timmers, A. C. J., M.-C. Auriac et G. Truchet** (1999). Refined analysis of early symbiotic steps of the *Rhizobium-Medicago* interaction in relationship with microtubular cytoskeleton rearrangements. *Development* **126**: 3617-3628.
- Timmers, A. C. J., E. Soupène, M.-C. Auriac, F. de Billy, J. Vasse, P. Boistard et G. Truchet** (2000). Saprophytic intracellular *Rhizobia* in alfalfa nodules. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **13**: 1204-1213.
- Toledano, M. B., I. Kullik, F. Trinh, P. T. Baird, T. D. Schneider et G. Storz** (1994). Redox-dependent shift of OxyR-DNA contacts along an extended DNA-binding site: a mechanism for differential promoter selection. *Cell* **78**: 897-909.
- Torres, M. A., J. L. Dangel et J. D. G. Jones** (2002). *Arabidopsis* gp91^{phox} homologues *AtrbohD* and *AtrbohF* are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 517-522.
- Touati, D.** (1983). Cloning and mapping of the manganese superoxide dismutase gene (*sodA*) of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **155**: 1078-1087.
- Truchet, G., D. G. Barker, S. Camut, F. Debilly, J. Vasse et T. Huguet** (1989). Alfalfa nodulation in the absence of *Rhizobium*. *Mol. Gen. Genet.* **219**: 65-68.
- Truchet, G., M. Michel et J. Dénarié** (1980). Sequential analysis of the organogenesis of lucerne (*Medicago sativa*) root nodules using symbiotically-defective mutants of *Rhizobium meliloti*. *Differentiation* **16**: 163-172.

- van Rhijn, P., R. B. Goldberg et A. M. Hirsch** (1998). *Lotus corniculatus* nodulation specificity is changed by the presence of a soybean lectin gene. *Plant Cell* **10**: 1233-1249.
- van Spronsen, P. C., R. Bakhuizen, A. A. van Brussel et J. W. Kijne** (1996). Cell wall degradation during infection thread formation by the root nodule bacterium *Rhizobium leguminosarum* is a two-step process. *Eur. J. Cell Biol.* **64**: 88-94.
- van Spronsen, P. C., T. Tak, A. M. M. Rood, A. A. N. van Brussel, K. J. M. Kijne et K. J. M. Boot** (2003). Salicylic acid inhibits indeterminate-type nodulation but not determinant-type nodulation. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **16**: 83-91.
- VandenBosch, K. A., D. J. Bradley, J. Knox, P. S. G. W. Butcher et N. J. Brewin** (1989). Common components of the infection thread matrix and the intercellular space identified by immunocytochemical analysis of pea nodules and uninfected root. *EMBO J.* **8**: 335-342.
- Vasse, J., F. de Billy, S. Camut et G. Truchet** (1990). Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules. *J. Bacteriol.* **172**: 4295-4306.
- Vasse, J., F. De Billy et G. Truchet** (1993). Abortion of infection during the *Rhizobium meliloti*-alfalfa symbiotic interaction is accompanied by a hypersensitive reaction. *Plant J.* **4**: 555-566.
- Vergauwen, B., F. Pauwels, M. Vaneechoutte et J. J. Van Beeumen** (2003). Exogenous glutathione completes the defense against oxidative stress in *Haemophilus influenzae*. *J. Bacteriol.* **185**: 1572-1581.
- Vincent, J. M.** (1970). A manual for the practical study of root-nodule bacteria, Blackwell Scientific Publication, Oxford, UK.
- Wells, D. H. et S. R. Long** (2002). The *Sinorhizobium meliloti* stringent response affects multiple aspects of symbiosis. *Mol. Microbiol.* **43**: 1115-1127.
- Wendehenne, D., J. Durner et D. Klessig** (2004). Nitric oxide: a new player in plant signalling and defence responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**: 449-455.
- Wieger, H., R. Renirie, H. L. Dekker, P. Barnett et R. Wever** (1997). From phosphatase to vanadium peroxidases: A similar architecture to the active site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 2145-2149.
- Williamson, M. P.** (1994). The structure and function of proline-rich regions in proteins. *Biochem. J.* **297**: 249-260.
- Wisniewski, J.-P. et N. J. Brewin** (2000). Construction of transgenic pea lines with modified expression of diamine oxidase and modified nodulation responses with exogenous putrescine. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **13**: 922-928.
- Wisniewski, J.-P., E. A. Rathbun, J. P. Knox et N. J. Brewin** (2000). Involvement of diamine oxidase and peroxidase in insolubilization of the extracellular matrix: implications

for pea nodule initiation by *Rhizobium leguminosarum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **13**: 413-420.

Woodcock, D. M., P. J. Crowther, J. Doherty, S. Jefferson, E. DeCruz, M. Noyer-Weider, S. S. Smith, M. Z. Michael et M. W. Graham (1989). Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res.* **17**: 3469-3478.

Xu, X. Q., L. P. Li et S. Q. Pan (2001). Feedback regulation of an *Agrobacterium* catalase gene *katA* involved in *Agrobacterium*-plant interaction. *Mol. Microbiol.* **42**: 645-657.

Yamamura, E., T. Nunoshiba, T. Nohmi et K. Yamamoto (2003). Hydrogen peroxide-induced microsatellite instability in the *Escherichia coli* K-12 endogenous *tonB* gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **306**: 570-576.

Zaim, J. et A. M. Kierzek (2003). The structure of full-length LysR-type transcriptional regulators. Modeling of the full-length OxyR transcription factor dimer. *Nucleic Acids Res.* **31**: 1444-1454.

Zheng, M., F. Aslund et G. Storz (1998). Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation. *Science* **279**: 1718-1721.

Zheng, M., X. Wang, B. Doan, K. A. Lewis, T. A. Schneider et G. Storz (2001). Computation-directed identification of OxyR DNA binding site in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **183**: 4571-4579.

Zheng, M., X. Wang, L. J. Templeton, D. R. Smulski, R. A. LaRossa et G. Storz (2001). DNA microarray-mediated transcriptional profiling of the *Escherichia coli* response to hydrogen peroxide. *J. Bacteriol.* **183**: 4562-4570.

Zhou, M., Z. Diwu, N. Panchuk-Voloshina et R. P. Haugland (1997). A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in the detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases. *Anal. Biochem.* **253**: 162-168.

RESUME

Sinorhizobium meliloti est une bactérie du sol capable d'induire, chez des plantes de la famille des *Fabaceae*, la formation de nodosités racinaires au sein desquelles les bactéries se différencient en bactéroïdes capables de fixer l'azote atmosphérique. Lors de l'établissement de la symbiose, des espèces réactives de l'oxygène, comme le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et le radical superoxyde, ont été détectées dans les cordons d'infections (Santos *et al.*, 2001). Pour lutter contre une accumulation excessive d'H₂O₂, *S. meliloti* possède trois catalases codées par les gènes *kata*, *katB* et *katC* (Hérouart *et al.*, 1996 ; Sigaud *et al.*, 1999).

L'expression des gènes *kat* a été caractérisée chez la bactérie libre et en condition symbiotique grâce à la construction de fusions *kat::lacZ*. Une expression différentielle de ces gènes a été observée au cours du développement de la nodosité. Ainsi, *kata* s'exprime fortement chez le bactéroïde alors que *katB* et *katC* s'expriment dans les cordons d'infection. L'analyse phénotypique des simples mutants catalases montre qu'ils ne sont pas affectés dans leurs capacités symbiotiques. Par contre, celles-ci diminuent fortement chez le double mutant *katBkatC*. Ce résultat souligne le rôle essentiel des catalases lors du processus infectieux.

En condition libre de croissance, seul *kata* est inductible par l'H₂O₂. L'analyse du génome de *S. meliloti* a révélé un cadre ouvert de lecture localisé en amont du gène *kata* et qui présente de fortes homologues avec le régulateur OxyR. La caractérisation d'un mutant *oxyR*⁻ a permis de démontrer que ce régulateur transcriptionnel, activable par l'H₂O₂, se révèle être responsable de l'induction de l'expression de *kata* non seulement chez la bactérie libre mais aussi chez le bactéroïde.

Afin de déterminer si l'H₂O₂ présent dans les cordons d'infection pourrait avoir un effet positif lors de l'établissement de la symbiose, le phénotype d'une bactérie surexprimant le gène codant la catalase KatB, a été étudié. Les cordons d'infections formés par cette souche mutante ne contiennent plus d'H₂O₂ et leurs diamètres sont largement augmentés. Cela suggère que l'H₂O₂, qui aurait un rôle dans la formation de liaisons au sein des cordons d'infection, participerait à sa progression de façon ordonnée.