



**HAL**  
open science

# Étude de la respiration “ nitrate-NO ” dans l’interaction symbiotique entre *Medicago truncatula* et *Sinorhizobium meliloti*

Marianne Prévôt

## ► To cite this version:

Marianne Prévôt. Étude de la respiration “ nitrate-NO ” dans l’interaction symbiotique entre *Medicago truncatula* et *Sinorhizobium meliloti* : A la recherche d’un transporteur de nitrite mitochondria. Biologie végétale. Université Nice Sophia Antipolis, 2012. Français. NNT : . tel-02809747

**HAL Id: tel-02809747**

**<https://hal.inrae.fr/tel-02809747>**

Submitted on 6 Jun 2020

**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.



Université de Nice-Sophia Antipolis - UFR Sciences  
Ecole doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

## THESE

Pour obtenir le titre de : Docteur en Sciences  
Discipline : Biologie moléculaire et cellulaire des interactions

Soutenue par

Marianne PREVOT

**Etude de la respiration « nitrate-NO » dans l'interaction symbiotique  
entre *Medicago truncatula* et *Sinorhizobium meliloti* - A la recherche  
d'un transporteur de nitrite mitochondrial.**

Travaux réalisés sous la direction du Dr Renaud BROUQUISSE  
Soutenance le 17 Décembre 2012

En présence du jury composé de :

<b>PUPPO Alain</b>	Professeur, Université de Nice	Président
<b>MACHEREL David</b>	Professeur, Université d'Angers	Rapporteur
<b>WENDEHENNE David</b>	Professeur, Université de Dijon	Rapporteur
<b>DELLEDONNE Massimo</b>	Professeur, Université de Vérone, Italie	Examineur
<b>GOJON Alain</b>	Directeur de Recherche, Montpellier	Examineur
<b>CANAGUIER Renaud</b>	Chef d'entreprise NIXE, Sophia Antipolis	Membre invité
<b>BROUQUISSE Renaud</b>	Directeur de Recherche, Sophia Antipolis	Directeur de thèse

Recherches réalisées au sein de l'Institut Sophia Agrobiotech  
INRA 1355 / CNRS 7254 / UNS  
400 routes des Chappes, BP167, 06903 Sophia Antipolis Cedex

# Résumé

La réduction de l'azote moléculaire en ammonium par la nitrogénase bactérienne, puis son assimilation par la cellule végétale constitue la fonction centrale des nodosités symbiotiques, qui sont le produit de la symbiose entre les légumineuses et les bactéries fixatrices d'azote (rhizobium). Ce processus, très coûteux en énergie, présente le paradoxe de se produire dans un organe très appauvri en oxygène, ce qui conduit à fortement réduire la respiration mitochondriale, principale source d'ATP. Sur la base d'observations récentes faites dans les racines en hypoxie, nous avons posé l'hypothèse selon laquelle, dans la nodosité fixatrice d'azote, une partie de l'ATP est régénérée par le biais d'une respiration nitrate-NO en quatre étapes: 1) le nitrate est réduit en nitrite dans le cytosol par la nitrate réductase ; 2) le nitrite est transporté du cytosol dans la mitochondrie par l'intermédiaire d'un (ou plusieurs) transporteur(s) ; 3) le nitrite est réduit en oxyde nitrique (NO) par les électrons de la chaîne respiratoire (permettant ainsi le fonctionnement de la respiration et la régénération de l'ATP); et 4) le NO diffuse librement vers le cytosol où il est oxydé en nitrate par la leghémoglobine (Lb). Au cours de ce travail de thèse, mené sur le modèle *Medicago truncatula-Sinorhizobium meliloti*, nous avons pu d'abord valider l'implication des étapes 1 et 3 dans la production de NO dans les nodosités fonctionnelles et le maintien de l'état énergétique pour la fixation de l'azote. Dans un second temps, nous avons entrepris de caractériser le transport du nitrite chez des mitochondries purifiées de racines (étape 2). L'objectif était ensuite d'identifier un ou plusieurs candidats pour le transport du nitrite dans les mitochondries. Par la combinaison de deux approches complémentaires, plusieurs candidats ont été révélés, puis étudiés plus en détails en ce qui concerne l'adressage subcellulaire et l'expression tissulaire au cours du développement de la nodosité.

Mots-clés : respiration nitrate-NO, hypoxie, monoxyde d'azote, mitochondries, transporteur de nitrite, symbiose légumineuses.

**« Nitrate-NO » respiration study in symbiotic interaction  
between *Medicago truncatula* and *Sinorhizobium meliloti* -  
Searching for mitochondrial nitrite transporter.**

## Abstract

Central function of nodules, that are the product of symbiosis between legume plants and nitrogen-fixing bacteria (rhizobium), is the enzymatic reduction of atmospheric nitrogen into ammoniac by the bacterial nitrogenase, and the subsequent assimilation in the plant cell. This highly energy-consuming process is a paradox as occurring in hypoxied tissue where mitochondrial respiration -the main ATP source- is strongly reduced. Based on recent observations on hypoxied roots, we rose the hypothesis that, in nodules, ATP is formed through a nitrate-NO respiration that consists in four steps: 1) nitrate reductase reduces nitrate into nitrite in the cytosol; 2) nitrite is transported from cytosol into mitochondria using transporter(s) protein(s); 3) electrons of mitochondrial transfer chain reduces nitrite into nitric oxide (NO), thus allowing respiration functioning and ATP formation; and 4) NO freely diffuses from mitochondria to cytosol to be oxidized back into nitrate through leghemoglobine (Lb) action. During this thesis, steps 1 and 3 were validated, using *Medicago truncatula-Sinorhizobium meliloti* system as a model, in their involvement in NO production of functioning nodules and maintaining energetic status required for nitrogen fixation. The second aim was to characterized nitrite transport across purified root mitochondria (step 2). Then, mitochondrial nitrite transporter candidate(s) were investigated. With the combination of two complementary approaches, several candidates were revealed and studied for sub-cellular localization and tissular expression during nodule development.

Key words: nitrate-NO respiration, hypoxia, nitric oxide, mitochondria, nitrite transporter, Legume symbiosis.

# Remerciements

En premier lieu, je tiens à remercier les membres du jury, **Renaud Canaguier**, **Massimo Delledonne**, **Alain Gojon**, **David Macherel**, **Alain Puppo** et **David Wendehenne** d'avoir accepté d'évaluer mon travail et en particulier ceux qui ont suivi mes travaux de près lors des comités de thèse pour leur discussion et leurs idées intéressantes.

\*\*\*

Je souhaite adresser un remerciement particulier à **Renaud Brouquisse** pour avoir encadré mes travaux de thèse et corrigé attentivement ce manuscrit. Je le remercie aussi de s'être investi pour que j'entretienne des discussions scientifiques avec les meilleurs ! et aussi pour avoir mis en place des collaborations fructueuses.

\*\*\*

Un grand merci à **Gilbert Engler** qui a réalisé de magnifiques images de microscopie et qui est d'une gentillesse incroyable, toujours prêt à aider et disponible pour des questions. Merci à **Emeline Deleury** pour la formation bio-informatique. Merci à **Sophia Pagnotta** pour la MET.

\*\*\*

Je souhaiterais remercier nos collaborateurs de Vérone, **Massimo Delledonne** qui m'a invitée à Vérone pour faire des manip que je n'aurais pas pu faire sinon et qui en plus ont marché !!!! Avec **Diana Belin**, ils m'ont accueillie dans leur laboratoire et j'ai pu avoir avec eux de bonnes discussions scientifiques. Merci à **Jian Chen** le responsable du chemiluminomètre et **Anne-Marie Digby** qui s'est occupée de réserver mon hébergement sur place.

\*\*\*

Je souhaite saluer nos collègues de Montpellier, **Michel Rossignol**, **Sonia Hem** et **Valérie Rofidal** pour le travail de MS et l'apprentissage du FASP. Merci aussi à **Jean-Marie Guigonis** de Nice pour l'analyse MS.

\*\*\*

Ensuite, je voudrais adresser un grand merci à toute l'équipe symbiose pour leur accueil et les nombreuses choses que j'ai appris pendant ces 3 années. En particulier, je remercie chaleureusement **Emilie Andrio** qui, en plus de m'avoir apporté son amitié et son soutien, m'a appris la technique et l'analyse de la QPCR. Je remercie aussi particulièrement **Marion Dunoyer de Segonzac** avec qui j'ai passé d'agréables moments et qui a eu la patience de me supporter dans mes coups de blues et aussi pendant quelques heures de confocal. Je remercie également **Elodie Oger** avec qui les pauses café déviaient toujours en discussion scientifiques qui nous donnait mutuellement plein d'idées et qui me donnait de bons conseils grâce à sa grande compétence. Je remercie et félicite ma stagiaire BTS **Marion Maccary** pour son travail rigoureux et efficace ; ça été un plaisir de travailler avec une personne aussi agréable.

\*\*\*

Un grand merci à **Alexandre Boscari** pour ses nombreux conseils avisés et pertinents, en particulier lors de mes moments de détresses de manips qui ne marchaient pas... et je lui suis reconnaissante pour avoir corrigé une partie de ce manuscrit. Merci à **Fabien Baldacci** qui m'a apporté son expérience en extraction d'ARN ainsi que bien d'autres domaines scientifiques. Merci aussi à **Nicolas Pauly** qui a prit le temps de me conseiller en biologie moléculaire. Un petit clin d'œil à **Sofiane Benyamina**, **Edouard Evangelisti** et **Anne-Lise Zaffini** avec qui j'ai partagé mon bureau et mon labo... et des moments de délires qui font du bien quand on est trop sérieux !

Bonne continuation à **Justine Lipuma** et **Olivier Pierre**, mon frère de thèse. Bon courage à **Mohammed Hanchi** pour son master...et peut être une thèse ?

\*\*\*

Merci à tous les autres membres de l'équipe, les "toxic girls" **Isabelle Garcia**, **Laurence Dupont**, **Aurélie Kiers** et **Marie Legleuher** ainsi que tous les autres **Geneviève Alloing**, **Eric Boncompagni**, **Pascale Bonin**, **Claude Castella**, **Céline Coste**, **Julie Hopkins**, **Annie Lambert**, **Karine Mandon** et **Jérôme Pedio** qui a su préserver le calme du bureau pendant ma rédaction, mais aussi **Jennifer del Guidice** et **Stéphanie Piardi** qui sont parties mais qu'on n'oublie pas.

\*\*\*

Enfin merci aux co-directeurs **Didier Hérouart** et **Alain Puppo** de m'avoir accueillie dans leur équipe. La relève est assurée par notre fraîchement nommé professeur **Pierre Frendo** dont j'ai pu apprécier les nombreuses qualités!

\*\*\*

Pour finir je souhaite remercier mes proches, famille ou amis, qui m'ont apporté leur soutien dans cette aventure périlleuse de la thèse !

# Sommaire

<b>Résumé</b>	2
<b>Abstract</b>	3
<b>Remerciements</b>	4
<b>Sommaire</b>	7
Liste des figures	11
Liste des tableaux	14
Liste des annexes	15
Liste des abréviations	16
<b>Introduction bibliographique</b>	19
A-La symbiose fixatrice d'azote	21
a) Les légumineuses	23
b) Les rhizobia	23
c) La mise en place de la symbiose	25
1-Dialogue moléculaire	25
2-Invasion bactérienne	27
3-Formation de la nodosité	29
4-Evolution du partenaire bactérien	31
d) Le fonctionnement de la nodosité	31
B-Le monoxyde d'azote : signal, régulateur et métabolite	35
a) Les espèces réactives de l'azote dérivées du NO	37
b) Les méthodes de détection du NO	39
c) La synthèse du NO	45
1-La voie réductrice	47
2-La voie oxydative	51
d) Les modification post-traductionnelles des protéines	55
1-Métal-nitrosylation	55
2-Tyrosine-nitration	55
3-S-nitrosylation	57
e) Le NO dans la symbiose fixatrice d'azote	59
1-Présence du NO dans l'interaction symbiotique	59



2-Réponse du partenaire plante au NO _____	61
3-Réponse du partenaire bactérien au NO _____	63
4-Rôle du NO dans la symbiose _____	65
f) La respiration Nitrate-NO _____	69
C-Le transport nitrate/nitrite _____	73
a) Le transport du nitrate chez les Eucaryotes _____	73
1-Les transporteurs de nitrate de type NRT1 _____	75
2-Les transporteurs de nitrate de type NRT2 _____	83
3-Les canaux à chlorure (ClC) _____	89
4-Les autres protéines transportant du nitrate _____	91
b) Le transport du nitrite chez les Eucaryotes _____	93
c) Le transport nitrate / nitrite chez les procaryotes _____	95
1-Les transporteurs de type NARK _____	97
2-Les transporteurs ABC _____	99
<b>Les objectifs de la thèse _____</b>	<b>100</b>
<b>Matériels et Méthodes _____</b>	<b>101</b>
A-Matériel biologique _____	103
a) Culture de <i>M. truncatula</i> _____	103
b) Inoculation par <i>S. meliloti</i> _____	103
c) Extraction et purification des mitochondries _____	105
1-Mitochondries de racines de <i>M. truncatula</i> _____	105
2-Mitochondries de nodosités _____	105
d) Transgénèse de <i>M. truncatula</i> _____	107
1-Méthode de Boisson-Dernier <i>et al.</i> (2001) _____	107
2-Méthode piqûres _____	107
B-Méthodes de biologie moléculaire et d'analyse <i>in silico</i> _____	109
a) Outils bio-informatiques _____	109
b) Extraction d'ARNs _____	111
c) Transcription reverse _____	111
d) Amplification d'ADN par PCR _____	113
e) Analyse d'expression par PCR en temps réel _____	113
f) Analyse d'une séquence par clonage _____	115
C-Méthodes de biochimie _____	115
a) Dosages d'activités enzymatiques _____	115

1-Fumarase :	_____	115
2-Catalase :	_____	117
3-Glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) :	_____	117
4-Phosphoénolpyruvate carboxylase (PEPC) :	_____	117
5-Nitrate réductase (NR) :	_____	119
6-Mesure de l'activité réductrice d'acétylène	_____	119
b) Mesures de production de NO	_____	119
1-Par chimiluminescence	_____	119
2-Par fluorescence	_____	121
c) Préparation des échantillons membranaires pour la spectrométrie de masse (MS)	___	121
D-Méthodes de microscopie	_____	125
a) Préparation d'échantillon pour la microscopie électronique à transmission (MET)	___	125
b) Localisation de l'expression d'un gène par fusion <i>promoteur-Gus</i> en microscopie optique	_____	127
c) Localisation de l'adressage protéique par fusion <i>gène::Gfp</i> en microscopie optique et visualisation des mitochondries colorées au Mitotracker Red en microscopie optique	__	127
<b>Résultats Partie 1 : Mise en évidence de l'existence d'une respiration Nitrate-NO dans les nodosités de <i>Medicago truncatula</i>.</b>	_____	128
A-Introduction	_____	130
B-Publication	_____	132
C-Résultats complémentaires et discussion	_____	150
a) Analyse de l'implication de NR1 et NR2 dans la production de NO chez des nodosités matures de <i>Medicago truncatula</i>	_____	150
b) Effets d'une inhibition des NR sur le métabolisme de la fixation de l'azote	_____	152
<b>Résultats Partie 2 : Caractérisation du transport du nitrite vers les mitochondries.</b>	_____	157
A-Introduction	_____	159
B-Résultats et discussion	_____	161
a) Mise au point d'un protocole de purification des mitochondries de racines de <i>Medicago truncatula</i>	_____	161
b) Caractérisation du transport de nitrite	_____	167
c) Vers une mise au point d'un protocole de purification de mitochondries de nodosités	_____	173
<b>Résultats Partie 3 : Identification et caractérisation de systèmes de transport du nitrite</b>	_____	176
A-Introduction	_____	178
B-Résultats et discussion	_____	180

a) Recherche <i>in silico</i> de gènes codant pour des systèmes de transport du nitrite au niveau de la mitochondrie _____	180
b) Analyse par spectrométrie de masse de systèmes des protéines membranaires mitochondriales _____	188
c) Analyse du profil d'expression des transporteurs putatifs de nitrite _____	200
d) Caractérisation des transporteurs putatifs de nitrite _____	204
<b>Conclusion générale et perspectives</b> _____	211
<b>Références bibliographiques</b> _____	214
Annexes _____	242

# Liste des figures

**Figure 1 :** Relations phylogénétiques entre les légumineuses d'après une analyse moléculaire.

**Figure 2 :** Relations phylogénétiques entre les rhizobia.

**Figure 3 :** Les facteurs Nod et leur motifs spécifiques de chaque souche de rhizobia.

**Figure 4 :** Stades précoces de l'infection des poils absorbants par les rhizobia.

**Figure 5 :** Développement de nodosités de type indéterminées (gauche) ou déterminées (droite).

**Figure 6 :** Schéma du métabolisme primaire azoté dans les nodosités.

**Figure 7 :** Réactions chimiques du NO dans ses environnements biologiques.

**Figure 8 :** Schéma de la réaction de Griess.

**Figure 9 :** Réactions de la DAF-2DA jusqu'à la DAF-2T fluorescente.

**Figure 10 :** Structures et réactions chimiques de la sonde CuFL.

**Figure 11 :** Détection de l'oxyde nitrique par chimiluminescence.

**Figure 12 :** Réaction catalysée par les NO synthases (NOS) animales.

**Figure 13 :** Les deux principales voies de formation du NO chez les plantes.

**Figure 14 :** Voies de production du NO chez les plantes.

**Figure 15 :** Modification post-traductionnelles des protéines.

**Figure 16 :** Les mécanismes biochimiques de dénitrosylation des protéines.

**Figure 17 :** Détection de la présence de NO par microscopie confocale lors des premières étapes de la symbiose entre *Medicago truncatula* et *Sinorhizobium meliloti*.

**Figure 18 :** Comparaison des cascades de signalisation du NO chez (a) *S. meliloti*, (b) *Rhizobium etli* et (c) *Bradyrhizobium japonicum*.

**Figure 19 :** La respiration nitrate-NO.

**Figure 20 :** Transport du nitrate par CHL1 (AtNRT1.1) d'*Arabidopsis thaliana*.

**Figure 21 :** Représentation schématique de la circulation du nitrate dans la plante *Arabidopsis*.

**Figure 22 :** Arbre phylogénétique de la famille NRT1.

**Figure 23 :** Relations phylogénétiques des séquences et comparaison des structures 2D des membres de la famille NNP des transporteurs nitrate/nitrite chez différents organismes.

**Figure 24 :** Schéma des systèmes de transport du nitrate / nitrite chez *Chlamydomonas reinhardtii*.

**Figure 25 :** Fonctionnement d'un canal à anion de type CIC : le couplage entre le flux d'anions et la régulation du pH en court-circuitant la pompe à protons.

**Figure 26 :** Représentation schématique de la localisation subcellulaire des protéines CIC d'*A. thaliana*.

**Figure 27 :** Arbre phylogénétique des membres NARK (NRT2).

**Figure 28 :** Activité nitrate réductase (A) et production de NO (B) dans les nodosités matures de *Medicago truncatula* chez les plantes transgéniques contrôles *pNcr001-Gus*, *pNcr001-RNAi::Nr1*, *pNcr001-RNAi::Nr2* et *pNcr001-RNAi::Nr1/2*.

**Figure 29 :** Mesure de l'ARA (activité nitrogénase), et teneurs en différents métabolites (saccharose, succinate, malate, asparagine et alanine) dans les nodosités de *Medicago truncatula* incubées en hypoxie (1 % O<sub>2</sub>) en présence de différents effecteurs et inhibiteurs de la nitrate reductase (10 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 1 mM NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, 1 mM Tungstate).

**Figure 30 :** Observation confocale de mitochondries purifiées de racines de *Medicago truncatula* obtenues après purification sur gradient discontinu de Percoll (60 - 45 - 28 - 5 % (v/v)).

**Figure 31 :** Observation de mitochondries de racines de *Medicago truncatula* par microscopie confocale, après purification sur gradient continu de 28 % (v/v) de Percoll.

**Figure 32 :** Observation en microscopie électronique à transmission (MET) des mitochondries purifiées extraites de racines de *Medicago truncatula* sur 28 % (v/v) de Percoll.

**Figure 33 :** Production de NO à différentes pressions partielles d'oxygène : 21 % (normoxie), 0,1 % (hypoxie) et 0 % (anoxie), par les mitochondries purifiées de racines de *Medicago truncatula*.

**Figure 34 :** Production de NO en anoxie, par les mitochondries purifiées de racines de *Medicago truncatula*, mesurée par chimiluminescence (bleu) ou fluorescence de la CuFL (orange) en présence de différents inhibiteurs.

**Figure 35:** Production de NO en hypoxie (0,1 % d'oxygène), par les mitochondries purifiées de racines de *Medicago truncatula*, mesurée par fluorescence de la CuFL (orange) en présence de différents inhibiteurs.

**Figure 36 :** Détermination des paramètres cinétiques apparents du transport de nitrite dans les mitochondries purifiées de racines de *M. truncatula*.

**Figure 37 :** Observation en microscopie électronique à transmission (MET) des mitochondries purifiées extraites de nodosités de *Medicago truncatula* sur gradient discontinu de Percoll 13 – 21 – 45 % (v/v).

**Figure 38** : Profil d'expression de transporteurs putatifs de nitrite de type (A) transporteur de nitrate (NRT) et (B) canaux à chlorures (CIC) dans les racines et les nodosités de *Medicago truncatula* en présence ou absence de nitrate, dans les puces d'expression.

**Figure 39** : Alignement de séquences protéiques sur NCBI BLAST entre (A) CsNiTR1 (Sbjct) et MtNRT1 (Query).

**Figure 40** : Préparation de membranes de mitochondries décapées par la méthode de Santoni *et al.* (2003) pour la spectrométrie de masse grâce la technique FASP ("Filter Aided Sample Preparation") décrite par Wisniewski *et al.* (2009).

**Figure 41** : Quantification des protéines membranaires mitochondriales de *M. truncatula* identifiées dans les trois répétitions d'analyse par spectrométrie de masse (MS) sur membranes décapées.

**Figure 42** : Les grandes fonctions des protéines issues de membranes de mitochondries de *Medicago truncatula* identifiées, communes aux quatre analyses de spectrométrie de masse (MS).

**Figure 43** : Protéines avec une fonction de transport, issues des membranes de mitochondries de *Medicago truncatula*, identifiées dans les trois répétitions de spectrométrie de masse (MS).

**Figure 44**: Alignement de séquences protéiques sur NCBI BLAST entre (B) AtNRT1.1 (Sbjct) et MtNRT1 (Query).

**Figure 45** : Analyse par qRT-PCR de l'expression des candidats au transport du nitrite, identifiés par l'approche *in silico*, dans les nodosités (A) et les racines (B) de *Medicago truncatula*.

**Figure 46**: Analyse, par qRT-PCR, de l'expression des candidats au transport du nitrite identifiés par spectrométrie de masse, dans les nodosités (A) et les racines (B) de *Medicago truncatula*.

**Figure 47** : Profil d'expression de transporteurs putatifs de nitrite *Nrt5*, *Nrt6* et *Nrt7*, dans les racines et les nodosités de *Medicago truncatula* en présence ou absence de nitrate.

**Figure 48**: Vecteurs d'expression utilisés: (A) pKGWFS7 pour la construction avec la séquence du promoteur devant les gènes rapporteurs *Gfp* et *Gus*, et (B) pK7FWG2 pour la construction de la partie codante (CDS) en fusion C-terminale du gène avec la *Gfp* et derrière un promoteur fort *p35S*.

**Figure 49** : Observation au microscope Zeiss Axioplan 2 de l'expression du gène *Gus* induit par *pNrt1* dans des racines et les nodosités de *Medicago truncatula*.

**Figure 50** : Observation confocale de la construction *p35S::Nrt5-Gfp*.

# Liste des tableaux

**Tableau 1 :** Capacités de nodulation des membres symbiotiques de la famille des *Rhizobium*.

**Tableau 2 :** Principales fonctions physiologiques du NO chez les plantes.

**Tableau 3 :** Activité NOS reportées chez quelques plantes.

**Tableau 4 :** Exemple de protéines régulées par S-nitrosylation chez les plantes.

**Tableau 5:** Quelques membres NRT1 identifiés chez les végétaux.

**Tableau 6:** La famille NRT2 chez les plantes et les algues.

**Tableau 7:** Amorces utilisées en QPCR.

**Tableau 8:** Amorces utilisées pour les clonages Gateway.

**Tableau 9 :** Activités spécifiques des marqueurs subcellulaires de mitochondries, de peroxyosomes et de plastes dans l'extrait brut (EB) et les mitochondries purifiées (MP) de racines de *Medicago truncatula*. Le gradient de Percoll utilisé est un gradient discontinu (de bas en haut) : 60 - 45 - 28 - 5 % (v/v).

**Tableau 10 :** Activités spécifiques des marqueurs subcellulaires de mitochondries, peroxyosomes et plastes dans l'extrait brut (EB) et dans les mitochondries purifiées (MP) de racines de *Medicago truncatula*. Le gradient de Percoll utilisé est un gradient continu de 28 % (v/v).

**Tableau 11 :** Production de NO par les mitochondries purifiées (MP) de *Medicago truncatula* intactes (extraites ex-temporairement), ou éclatées (congelées, soniquées) en anoxie en présence de différents effecteurs.

**Tableau 12 :** Pourcentage d'inhibition de la production de NO en anoxie par différents inhibiteurs des voies connues de biosynthèse du NO sur les mitochondries purifiées (MP) de racines de *Medicago truncatula*.

**Tableau 13 :** Activités spécifiques des marqueurs subcellulaires de mitochondries, de peroxyosomes et de plaste dans l'extrait brut (EB) et les mitochondries purifiées (MP) de nodosités de *Medicago truncatula*. Le gradient de Percoll utilisé est un gradient continu de 25 % (v/v).

**Tableau 14 :** Activités spécifiques des marqueurs subcellulaires de mitochondries, dans l'extrait brut (EB) et dans les mitochondries purifiées (MP) de nodosités de *Medicago truncatula*. Le gradient de Percoll utilisé est un gradient discontinu (de bas en haut) : 45 – 21 – 13 % (v/v).

**Tableau 15** : Analyse génomique des transporteurs membranaires de *Medicago truncatula*.

**Tableau 16** : Les 30 plus abondantes familles de transporteurs chez *Medicago truncatula*.

**Tableau 17** : Liste des gènes candidats pour le transport du nitrite mitochondrial retenus sur la base de leur annotation après analyse *in silico*.

**Tableau 18**: Répartition fonctionnelle des protéines identifiées à partir de membranes de mitochondries purifiées de *Medicago truncatula* par spectrométrie de masse (MS) en pourcentage du total.

## Liste des annexes

Annexe 1: Protéines ayant une fonction dans le transport, identifiées par spectrométrie de masse (MS).



# Liste des abréviations

**AA** : acides aminés

**AO** : acides organiques

**ABC** : *ATP binding cassette*

**ADN** : acide déoxyribonucléique

**ADNc** : ADN complémentaire

**AOX** : alternative oxydase

**ARN** : acide ribonucléique

**ARNm** : ARN messenger

**ATD** : 1H-anthra-[1,2d]-[1,2,3]triazole-6,11-dione

**ATP** : Adenosine triphosphate

**AS** : activité spécifique

**BSA** : sérum d'albumine bovine

**CDS** : séquence codante pour la protéine

**CIC** : canaux à chlorures

**COX** : cytochrome oxydase

**cPTIO** : carboxy-2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-3-oxide-1-oxyl

**CTE** : chaîne de transfert des électrons

**CuFL** : complexe entre le chlorure de cuivre et la FL : 2-{2-chloro-6-hydroxy-5-[(2-methylquinolin-8-yl-amino)-methyl]-3-oxo-3H-xanthen-9-yl} benzoic acid)

**DABODIPY** : 8-(3',4'-diaminophenyl)-difluoroboradiaza-S-indacence

**DAF** : diaminofluoresceine

**DAF-FM** : 3-Amino-4-(N-méthylamino)- 2'-7'-difluofluorescein

**DAF-2T** : triazole fluorescent

**DAN** : 2,3-Diaminonaphthalene

**DAQ** : 1,2-diaminoanthraquinone

**DETA-NO** : 2,2-(hydroxynitrosohydrazono) bis-ethanimine

**DHA** : acide déhydroascorbique

**DO** : densité optique

**EB** : extrait brut

**EST** : *Expressed Sequenced Tag*

**FAD** : flavine adénine dinucléotide

**FASP** : *Filter Aided Sample Preparation*

**FCCP** : Trifluorocarbonylcyanide Phenylhydrazone

**FFE** : *free-flow electrophoresis*

**FMN** : flavine mononucléotide

**FNOCT** : *fluorescent nitric oxide chelotropic traps*

**FNT** : transporteurs de type formate/nitrite

**G6PDH** : glucose 6 phosphate déhydrogénase

**GFP** : *green fluorescent protein*

**GO** : *Gene Ontology annotation*

**GOGAT** : glutamate synthase

**GS** : glutamine synthétase

**GSNO(R)** : S-nitrosoglutathion (réductase)

**GUS** :  $\beta$ -glucuronidase

**HANT** : transporteur nitrate à forte affinité

**Hb/ Lb/ MetHb** : hémoglobine/léghémoglobine/méthémoglobine

**IAA** : acide indole-3-acétique

**IMGAG** : *International Medicago Genome Annotation Group*

**LANT** : transporteur nitrate à faible affinité

**LC** : chromatographie liquide

**I-NAME** : N(G)-nitro-L-arginine-méthyl ester

**I-NMMA** : N -monométhyl-l-arginine

**I-NNA** : N -nitro-l-argine

**MC** : *Mitochondrial Carriers*

**MIMS** : *Membrane Inlet Mass Spectrometry*

**MET** : microscopie électronique à transmission

**MFS** : *Major Facilitator Superfamily*

**MP** : mitochondries purifiées

**MPB** : membrane péribactéroïdienne

**MS** : spectrométrie de masse

**MTGI** : *Medicago truncatula Gene Index*

**N<sub>2</sub>** : azote atmosphérique

**NAD(P)H** : nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate) réduit

**NAT** : 2,3-naphthotriazole

**NED** : N-(1-naphthyl) ethylenediamine

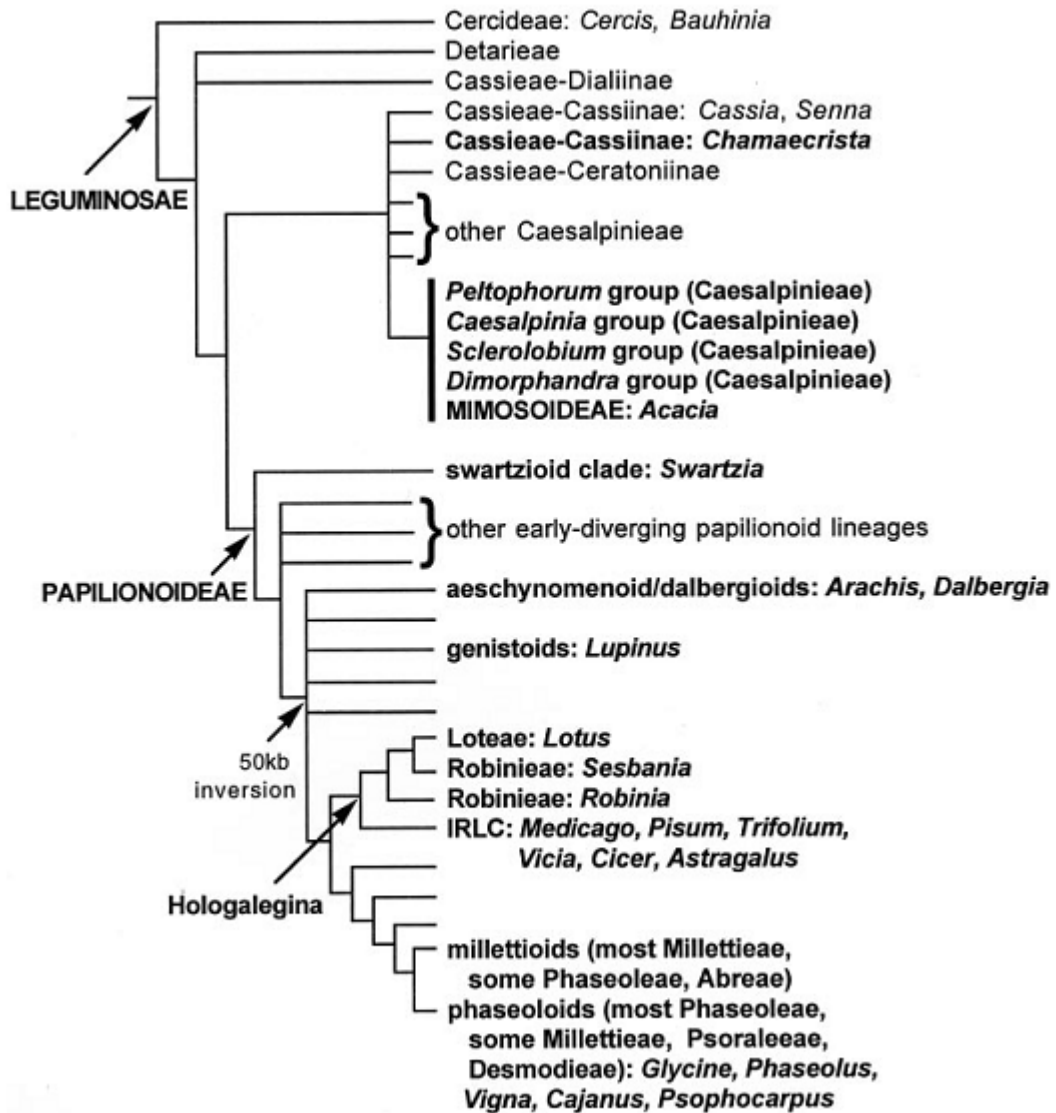
**NH<sub>4</sub><sup>+</sup>** : ammoniacque  
**Ni-NOR / Nor** : nitrite-NO réductase / Ni-NOR bactérienne  
**NiR / NirK** : nitrite réductase / NiR bactérienne  
**NiRT** : transporteur de nitrite  
**NO** : oxyde nitrique  
**NO<sub>3</sub><sup>-</sup>** : nitrate  
**NOS** : NO synthases  
**NR / Nap** : nitrate réductase / NR bactérienne  
**NRT** : transporteur de nitrate  
**PA** : polyamine  
**pb** : paires de bases  
**PEP-C** : phosphoénol pyruvate carboxylase  
**PM** : membrane plasmique  
**POT/PTR** : *Proton-dependent Oligopeptide Transporter*  
**PVP** : polyvinylpyrrolidone  
**QTL** : *Quantitative Trait Loci*  
**RIMS** : *Restriction capillary Inlet Mass Spectrometry*  
**RNAi** : ARN interférent  
**RNS** : espèces réactives de l'azote  
**RPE** : résonance paramagnétique de l'électron  
**ROS** : espèces réactives de l'oxygène  
**SDS-PAGE** : *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*  
**SM** : milieu de resuspension des mitochondries  
**SNP** : sodium nitroprusside  
**TCDB** : *Transporter Classification Database*  
**Tg** : tungstate  
**TIM/TOM** : *Translocases Inner/Outer Membrane*  
**TM** : transmembranaire  
**Trx(R)** : thiorédoxine thiorédoxine (réductase)  
**VDAC** : *Voltage-dependent Anion-selective Channel*  
**XOR** : xanthine oxydoréductase

# **Introduction bibliographique**



## A-La symbiose fixatrice d'azote

Les plantes sont des organismes autotrophes, dont la croissance et le développement dépendent de leur capacité à prélever dans l'environnement l'énergie et les nutriments dont elles ont besoin. Grâce à la photosynthèse, les parties aériennes fixent le carbone. Les parties racinaires ont pour rôle de prélever l'eau et les sels minéraux, comme l'azote ou le phosphate. Après la disponibilité en eau, l'assimilation de l'azote est le second facteur limitant pour la croissance des végétaux. Les plantes peuvent acquérir l'azote de 2 manières: soit en prélevant l'azote disponible dans le sol sous forme de nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) ou d'ammoniaque ( $\text{NH}_4^+$ ), soit par fixation symbiotique de l'azote atmosphérique ( $\text{N}_2$ ). La symbiose fixatrice d'azote résulte de l'interaction d'une légumineuse (le plus souvent) et de son partenaire bactérien (de type rhizobium). Une fois établie, la symbiose apporte des bénéfices aux deux partenaires: la plante fournit des substrats carbonés et la bactérie réduit le  $\text{N}_2$  atmosphérique en  $\text{NH}_4^+$  grâce à une enzyme, la nitrogénase, présente uniquement en conditions symbiotiques. Malgré la diversité des interactions plante-micro-organismes, peu d'espèces sont capables de mettre en place une symbiose fixatrice d'azote. Pour les autres plantes, il est nécessaire de prélever l'azote dans le sol, c'est pourquoi l'agriculture intensive a souvent recours à l'application d'engrais azotés. Les principaux inconvénients de l'apport d'engrais azoté sont: la consommation d'énergie fossile pour la production des engrais, le coût des engrais pour les agriculteurs, la perte du nitrate par dispersion dans le sol, la contamination des nappes phréatiques, et les émissions de gaz à effet de serre qui en découlent. L'exploitation de la symbiose comme apport d'azote présente des intérêts cruciaux pour le développement durable (Vance, 2001). La symbiose entre les légumineuses et les rhizobia est la plus répandue et conduit à la formation de nodosités fixatrices d'azote. Il existe néanmoins d'autres familles de plantes: les plantes actinorhizales, capables de mettre en place des symbioses fixatrices d'azote avec certains types d'actinomycètes, comme les espèces de *Frankia*. Certaines plantes d'intérêt agronomique importantes comme le maïs (*Zea mays*), la canne à sucre (*Saccharum officinarum*) et le riz (*Oryza sativa*) peuvent s'associer à différentes bactéries fixatrices d'azote parmi les espèces de *Glucoaceto-bacter*, *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, et *Azoarcus* (Hirsch *et al.*, 2001).



**Figure 1** : Relations phylogénétiques entre les légumineuses d'après une analyse moléculaire.

Tiré de Doyle et Luckow, 2003.

## a) Les légumineuses

Les légumineuses, *Leguminosae* ou *Fabaceae*, sont des plantes Eudicotylédones de l'ordre des Fabales. Elles comptent 18 000 espèces regroupées en 650 genres environ (Polhill et Raven, 1981). Cette famille est divisée en trois sous-familles : Mimosoideae, Caesalpinioideae, et Papilionoideae (Figure 1). Parmi elles, les Papilionoideae représentent la plus grande de ces sous-famille avec 476 genres et près de 14 000 espèces (Doyle et Luckow, 2003), dont les espèces d'intérêt agronomique les plus importantes comme le soja (*Glycine max*), l'arachide (*Arachis hypogaea*), le haricot mungo (*Vigna radiata*), le pois chiche (*Cicer arietinum*), la lentille (*Lens culinaris*), le haricot (*Phaseolus vulgaris*), le pois (*Pisum sativum*) ou encore la luzerne (*Medicago sativa*), (Zhu *et al.*, 2005). Les Mimosoideae incluent 77 genres et environ 3 000 espèces ; le mimosa et l'acacia en sont deux exemples (Doyle et Luckow, 2003). Enfin les Caesalpinioideae sont une famille diversifiée avec principalement des espèces tropicales de 162 genres différents et approximativement 3000 espèces comme l'arbre de Judée (*Cercis siliquastrum*), le caroubier (*Ceratonia siliqua*), et le tamarinier (*Tamarindus indica*), (Doyle et Luckow, 2003). Les légumineuses sont connues pour leur capacité à former des nodosités fixatrices d'azote lors de la symbiose. Ceci dit, toutes les espèces de légumineuses ne font pas de symbiose fixatrice d'azote. En effet seules 90 % des Papilionoïdées et des Mimosoïdées peuvent établir une symbiose et seulement 25 % des Caesalpinioïdées en sont capables (Hirsch *et al.*, 2001).

## b) Les rhizobia

Le terme rhizobia, qui est un genre de bactérie appartenant à la famille des *Rhizobiaceae*, est plus souvent utilisé comme terme générique pour qualifier les bactéries fixatrices d'azote en symbiose avec les légumineuses. Elles ne correspondent pas à un groupe phylogénétique unique. L'ensemble de ces bactéries est rassemblé au sein du phylum des Protéobactéries, qui sont des bactéries Gram-négatives. Une étude de 2003 a réalisé une classification phylogénétique de toutes les bactéries connues à ce jour pour établir une symbiose fixatrice d'azote avec des légumineuses, ce qui représente 44 espèces dans 12 genres (Sawada *et al.*, 2003). Elles sont distribuées parmi les alphaprotéobactéries et les betaprotéobactéries, et réparties dans 9 groupes monophylétiques (Figure 2).



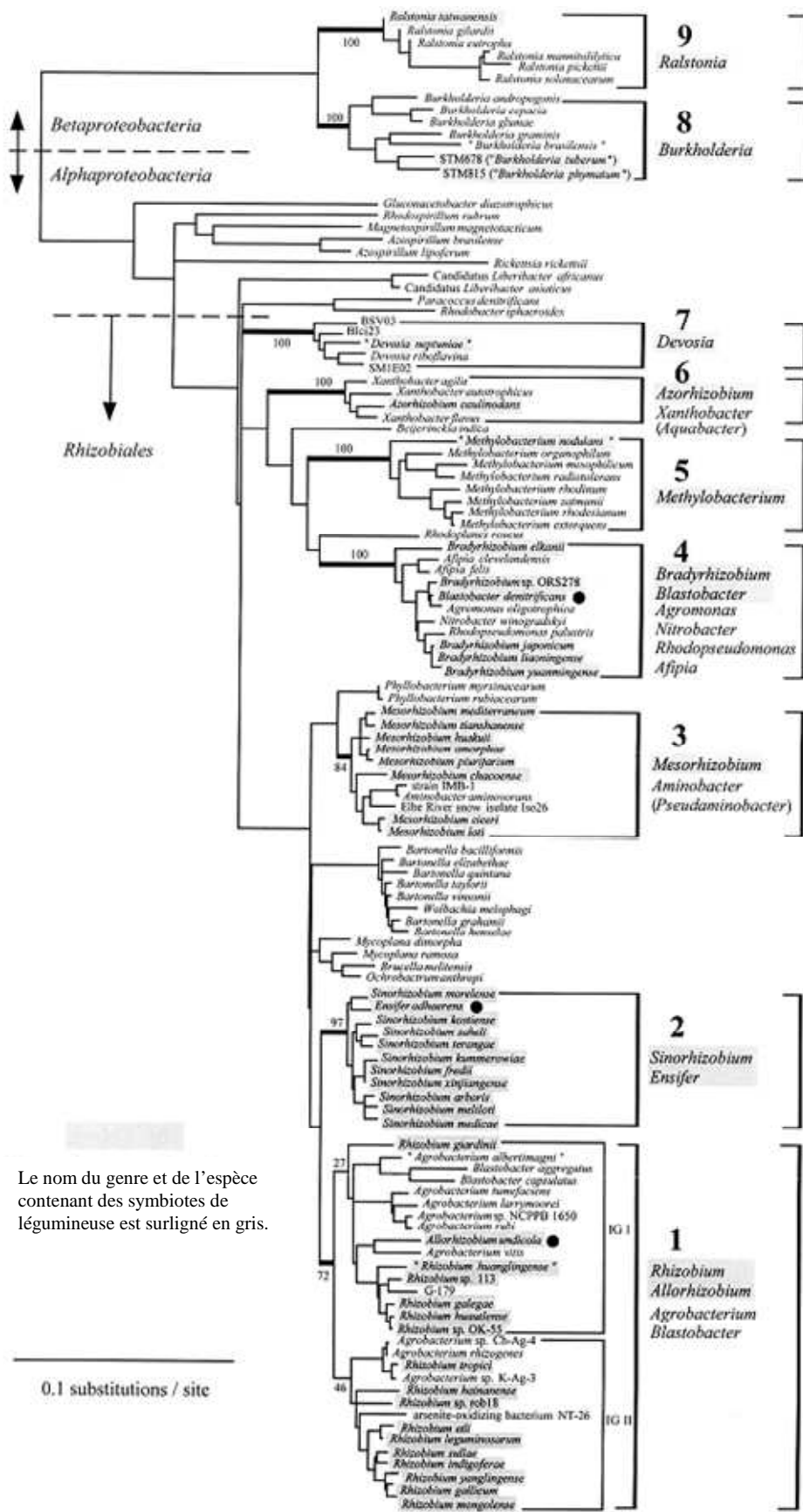


Figure 2 : Relations phylogénétiques entre les rhizobia. Tiré de Sawada *et al.*, 2003.

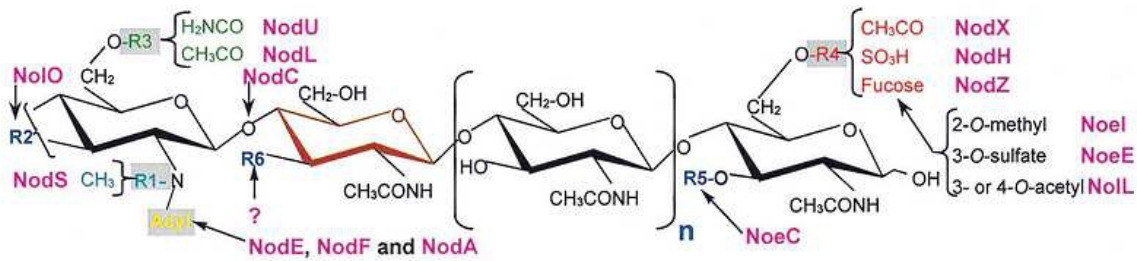
Le groupe 1 est représenté par les espèces *Rhizobium* et *Allorhizobium* qui contiennent des symbiotes de légumineuses (mais aussi par les espèces *Agrobacterium* et *Blastobacter* qui ne sont pas symbiotiques). Le groupe 2 est constitué des espèces *Sinorhizobium* et *Ensifer*. Le groupe 3, des espèces *Mesorhizobium*, contient les espèces non symbiotiques *Aminobacter* et *Pseudaminobacter*. Le groupe 4 contient les espèces *Bradyrhizobium* et *Blastobacter denitrificans* (et les espèces non symbiotiques *Agromonas*, *Nitrobacter*, *Afipia* et *Rhodopseudomonas*). Le groupe 5 est représentée par l'espèce "*Methylobacterium nodulans*" et les autres espèces non symbiotiques *Methylobacterium*. Le groupe 6 est dédié aux espèces *Azorhizobium* (avec les espèces non symbiotiques *Xanthobacter* et *Aquabacter*). Le groupe 7 est attribué à l'espèce "*Devosia neptuniae*", mais contient également les espèces non symbiotiques *Devosia*. Le groupe 8 comporte les souches symbiotiques de *Burkholderia* (mais contient aussi les espèces non symbiotiques de *Burkholderia*). Enfin, le groupe 9 est formé par l'espèce *Ralstonia taiwanensis* et les espèces non symbiotiques de *Ralstonia* (Figure 2, Sawada *et al.*, 2003).

## c) La mise en place de la symbiose

La mise en place de la symbiose légumineuse-rhizobia se caractérise par 3 étapes séquentielles : (i) la reconnaissance des partenaires par une perception moléculaire et une compatibilité (spécificité d'hôte) ; (ii) la pénétration des bactéries et la mise en place de structures particulières chez la plante pour accueillir les bactéries ; et (iii) la formation d'un nouvel organe : la nodosité, lieu d'échange entre les 2 organismes.

### 1-Dialogue moléculaire

Les plantes secrètent dans le sol, en importantes quantités, des composés organiques (hydrates de carbone, acides organiques, vitamines, acides aminés et dérivés phénoliques) qui favorisent la croissance des micro-organismes de la rhizosphère. Parmi ces composés se trouvent les flavonoïdes (dérivés 2-phenyl-1,4-benzopyrone), qui sont les plus importants du point de vue de la symbiose. Ces composés activent spécifiquement l'expression des gènes rhizobiens requis pour la nodulation: les gènes *nod* (Perret *et al.*, 2000). Le plus souvent ce mécanisme implique la protéine NodD qui joue le rôle d'activateur des gènes *nod* bactériens en présence de flavonoïdes d'une plante hôte. NodD appartient à la famille des régulateurs



**Figure 3 :** Les facteurs Nod et leur motifs spécifiques de chaque souche de rhizobia. Tiré de Perret *et al.*, 2000.

**Tableau 1 :** Capacités de nodulation des membres symbiotiques de la famille des *Rhizobium*. Tiré de Perret *et al.*, 2000.

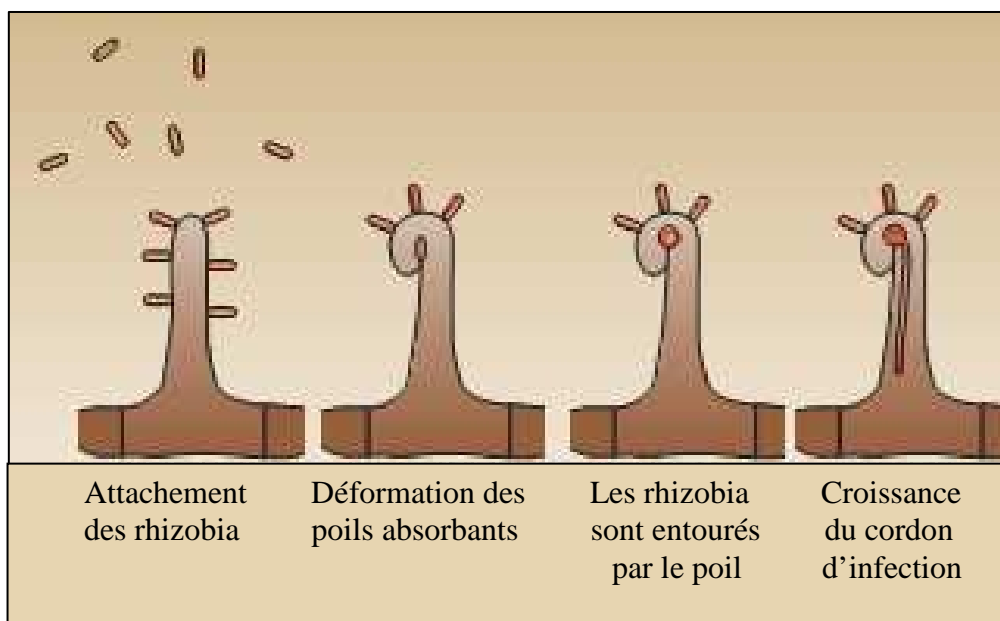
Espèces	Hôte(s) habituel(s)	Spectre d'hôte	Exemples de plantes non-hôtes
<i>Azorhizobium caulinodans</i>	Robinieae (P), <i>Sesbania</i> spp.	Compatible only with <i>Sesbania punctata</i> and <i>S. rostrata</i>	MIMOSOIDEAE, PAPILIONOIDEAE (except <i>Sesbania</i> )
<i>Bradyrhizobium</i> spp. <i>Lupinus</i> isolates <i>Vigna</i> isolates	Genisteae (P), <i>Lupinus</i> spp. Phaseoleae (P), <i>Macroptilium</i> , <i>Vigna</i> spp.	Acacieae (M), Mimoseae (M), Desmodieae (P), Loteae (P), Psoraleae (P), Phaseoleae (P), Aeschynomeneae (P)	Vicieae (P), Cicereae (P), Trifolieae (P)
<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	Phaseoleae (P), <i>Glycine</i> spp.	Phaseoleae (P), <i>Macroptilium</i> , <i>Vigna</i> spp.	Vicieae (P), Cicereae (P), Trifolieae (P)
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Phaseoleae (P), <i>Glycine</i> spp.	Aeschynomeneae (P), <i>Arachis</i> spp., Phaseoleae (P), <i>Macroptilium</i> , <i>Vigna</i> spp.	Vicieae (P), Cicereae (P), Trifolieae (P)
<i>Mesorhizobium huakuii</i>	<i>Astragalus sinicus</i>	Galegeae (P), <i>Astragalus</i> spp.	MIMOSOIDEAE, PAPILIONOIDEAE
<i>Mesorhizobium loti</i>	Loteae (P), <i>Lotus</i> spp., Genisteae (P), <i>Lupinus</i> spp.	Mimoseae (M), <i>Mimosa pudica</i> , <i>Leucaena leucocephala</i> ; Phaseoleae (P), <i>Macroptilium atropurpureum</i>	Vicieae (P), Cicereae (P), Trifolieae (P)
<i>Rhizobium</i> sp. strain NGR234	Phaseoleae (P), Desmodieae (P)	Mimoseae (M), Acacieae (M), Ingeae (M), Sopho- reae (P), Dalbergieae (P), Amorpheae (P), Millet- tieae (P), Robinieae (P), Indigoferae (P), Loteae (P), Galegeae (P), Bossiaee (P), Mirbelieae (P), Podalyrieae (P), Crotalariae (P), Thermopsidae (P), Genisteae (P), Psoraleae (P)	Vicieae (P), Cicereae (P), Trifolieae (P)
<i>Rhizobium etli</i>	Phaseoleae (P), <i>Phaseolus</i> spp.	Ingeae (M), Crotalariae (P), Galegeae (P), Mimoseae (M), Desmodieae (P), Robinieae (P)	Robinieae (P)
<i>Rhizobium fredii</i>	Phaseoleae (P), Desmodieae (P)	Mimoseae (M), Ingeae (M), Sophoreae (P), Amorpheae (P), Millettieae (P), Robinieae (P), Indigoferae (P), Loteae (P)	Vicieae (P), Cicereae (P), Trifolieae (P)
<i>Rhizobium galegae</i>	Galegeae (P), <i>Galega</i> spp.	Compatible only with <i>Galega</i> spp.	MIMOSOIDEAE, PAPILIONOIDEAE (except <i>Galega</i> )
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. phaseoli	Phaseoleae (P), <i>Phaseolus</i> spp.	Phaseoleae (P)	MIMOSOIDEAE, Trifolieae (P)
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. trifolii	Trifolieae (P), <i>Trifolium</i> spp.	Phaseoleae (P), Desmodieae (P), Trifolieae (P), <i>Medicago</i> spp.	MIMOSOIDEAE, Phaseoleae (P)
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. viciae	Vicieae (P), <i>Psium sativum</i> , <i>Vicia</i> spp.	<i>Lathyrus</i> spp. (e.g., <i>L. sativus</i> )	MIMOSOIDEAE, Phaseoleae (P), Desmodieae (P)
<i>Rhizobium meliloti</i>	Trifolieae (P), <i>Medicago</i> spp., <i>Melilotus</i> spp., <i>Trigonella</i> spp.	Acacieae (M), Desmodieae (P), Mimoseae (M), Phaseoleae (P), Vicieae (P)	Acacieae (M), Desmodieae (P), Mimoseae (M), Phaseoleae (P), Vicieae (P)
<i>Rhizobium saheli</i>	Robinieae (P), <i>Sesbania</i> spp.	Acacieae (M), Mimoseae (M)	Acacieae (M), Mimoseae (M)
<i>Rhizobium teranga</i> bv. acaciae	Acacieae (M), <i>Acacia</i> spp.	Mimoseae (M), <i>Leucaena leucocephala</i> , <i>Prosopis juliflora</i>	Robinieae (P), <i>Sesbania</i> spp.
<i>Rhizobium teranga</i> bv. sesbaniae	Robinieae (P), <i>Sesbania</i> spp.	Acacieae (M), Mimoseae (M)	Acacieae (M), Mimoseae (M)
<i>Rhizobium tropici</i>	Phaseoleae (P), <i>Phaseolus</i> spp.	Galegeae (P), Crotalariae (P), Desmodieae (P), Mimoseae (M), Robinieae (P), Loteae (P)	Vicieae (P), Cicereae (P), Trifolieae (P)

transcriptionnels LysR-like. Ceux-ci se lient sur des motifs ADN (nod boxes) qui se trouvent dans des régions promotrices de nombreux loci de gènes *nod*. Ainsi, NodD agit à la fois comme senseur du signal de la plante et comme activateur de la transcription des loci *nod* (Perret *et al.*, 2000). Le produit des loci *nod* sont les facteurs Nod. Ces composés sont des lipo-chito-oligosaccharides constitués d'une succession de 3 à 5 groupes  $\beta$ -1-4-N-acétyl glucosamine raccordés à une chaîne d'acide gras insaturé. La complexité des modifications et décorations de ces facteurs Nod (Figure 3) rend compte de la spécificité de ce dialogue moléculaire et détermine le spectre d'hôte (Tableau 1, Perret *et al.*, 2000). Ces facteurs Nod, sont perçus par la plante à de très faibles concentrations ( $10^{-8}$  M) grâce aux récepteurs membranaires LysM-RKs auxquels ils se lient, et entraînent une réaction de signalisation (Geurts *et al.*, 2005). Les facteurs Nod induisent chez leur hôte de multiples réponses qui vont permettre l'invasion bactérienne. En particulier, une réponse sous forme de signal calcique est émise par la plante : le niveau de calcium intracellulaire augmente dans les poils absorbants, suivi d'oscillations de concentrations en calcium. Le cytosquelette dans les poils absorbants subit des modifications en réponse aux facteurs Nod pour conduire à la courbure des poils. En parallèle, les facteurs Nod ré-initient la mitose dans les cellules du cortex racinaire (Jones *et al.*, 2007 ; Oldroyd et Downie, 2004).

## 2-Invasion bactérienne

L'étape suivant le dialogue moléculaire est l'adhésion des bactéries aux poils absorbants de l'hôte. L'adhésion des bactéries se fait principalement grâce à des adhésines (rhicadhésines) sécrétées à la surface des bactéries, qui permettent d'accrocher les bactéries aux pointes des poils absorbants de manière calcium-dépendante (Smit *et al.*, 1989). Des fibrilles de cellulose sont impliquées dans la fixation des bactéries en provoquant un agglutinement de celles-ci autour de la pointe du poil absorbant (Smit *et al.*, 1987). Côté plante, les lectines présentes sur les parois des poils absorbant se lient aux polysaccharides présents à la surface des bactéries pour aider l'adhésion de ces dernières (Hirsch, 1999).

Sous l'influence des facteurs Nod, les poils absorbants se recourbent et forment une structure en « crosse de berger » qui entoure les bactéries (Figure 4). A ce moment, la paroi végétale est hydrolysée et la membrane plasmique s'invagine pour former le cordon d'infection à l'intérieur duquel entrent les bactéries. Le cordon d'infection est une structure extérieure à la cellule végétale. Sa paroi contient les mêmes composés que la paroi végétale,

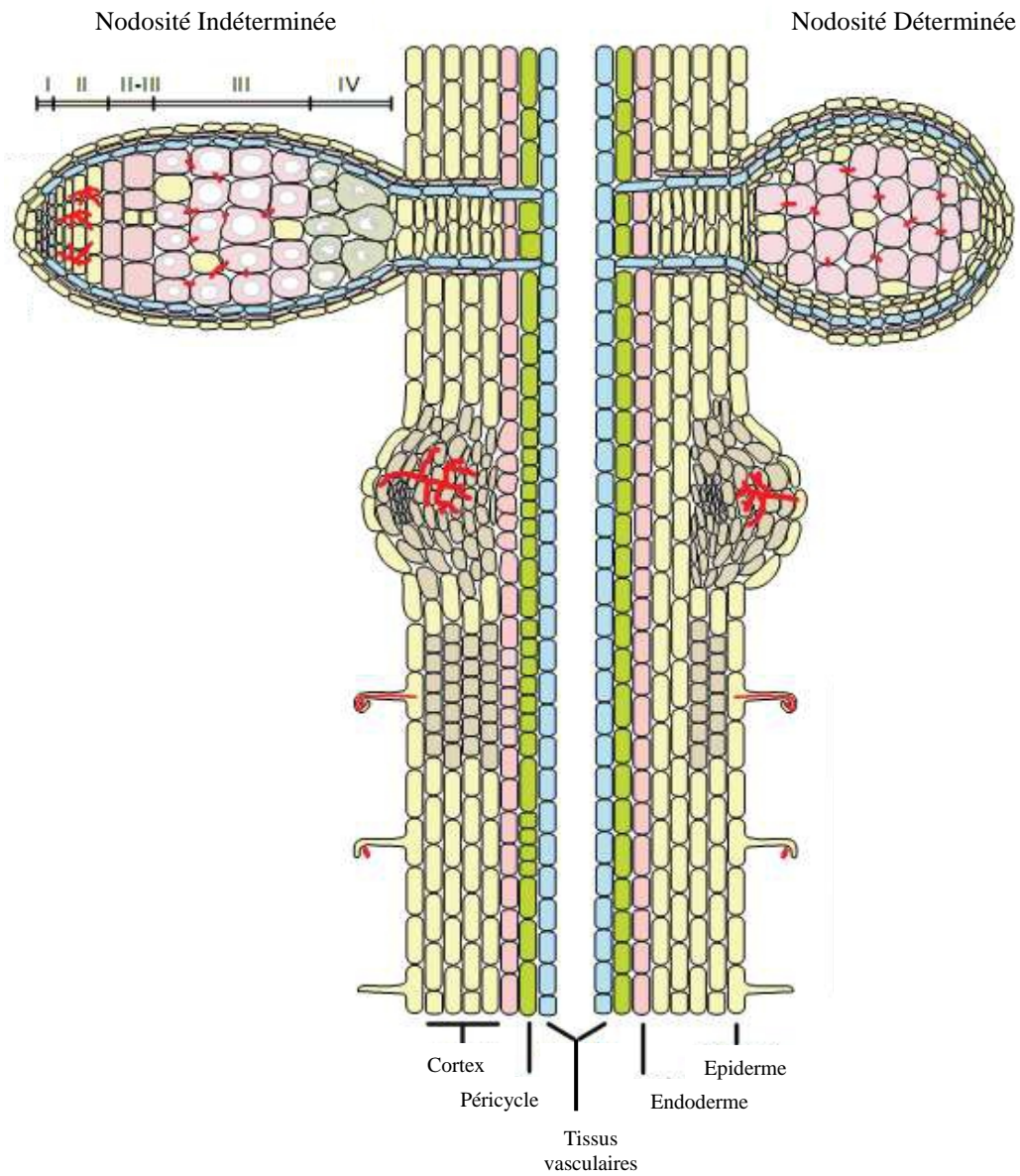


**Figure 4** : Stades précoces de l'infection des poils absorbants par les rhizobia. Tiré d'Oldroyd et Downie, 2004.

tels que des pectines, des xyloglucanes et de la cellulose (Gage, 2004). Les exopolysaccharides présents à la surface des bactéries jouent un rôle indispensable dans la colonisation efficace du cordon d'infection par les bactéries et la formation de nodosités fixatrices d'azote (Frayse *et al.*, 2003). Les bactéries se divisent à l'intérieur du cordon d'infection ce qui permet la colonisation de celui-ci. La zone de division des bactéries est estimée à 60  $\mu\text{m}$  de la pointe du cordon d'infection en élongation. Dans les autres zones les bactéries semblent statiques (Gage, 2002). Ces éléments tendent à montrer que les deux partenaires évoluent de manière synergique dans la mise en place de cette symbiose.

### 3-Formation de la nodosité

La partie végétale prépare l'arrivée des bactéries par la formation d'un nouvel organe : la nodosité. Celle-ci se met en place en parallèle avec l'étape d'infection des bactéries. En réponse aux facteurs Nod, le signal calcique émit par la plante active des facteurs de transcriptions qui induisent à leur tour l'expression des gènes nécessaires à la nodulation : les nodulines (Geurt *et al.*, 2005). Sous l'action des nodulines précoces, les cellules entrent en division active: d'abord les cellules du péricycle (16-18 h après inoculation), puis celles du cortex interne racinaire qui formera le primordium nodositaire initial (18-24 h après inoculation). Il s'ensuit, 24-48 h après inoculation, l'activation des cellules du cortex médian et externe qui formeront une partie du méristème de la nodosité. Environ 48 h après inoculation, les cordons d'infections progressent et se ramifient jusqu'à pénétrer dans le primordium initial. Environ 60 à 72 h après inoculation, le méristème nodositaire se forme à partir des cellules non infectées du cortex milieu et externe. Il est important de noter que cette organogénèse ne requière pas l'infection efficace des bactéries mais peut avoir lieu après ajout de facteurs Nod (Timmers *et al.*, 1999). Deux types de nodosités peuvent alors se former : les nodosités de type indéterminé, à croissance continue, ou de type déterminé, à croissance définie. Dans le cas de nodosités de type indéterminées (cas de *Medicago truncatula*), le développement du primordium nodositaire est lié à la présence d'un méristème persistant qui conduit à une zonation de la nodosité avec : le méristème (zone I), la zone d'infection (II), une interzone (II-III), la zone de fixation (III) et la zone de sénescence (IV), (Figure 5). Dans le cas de nodosités de type déterminées (cas de *Lotus japonicus*), les nodosités dérivent des cellules en divisions du cortex externe chez lequel l'activité méristématique est perdue dans les nodosités matures (Figure 5, Popp et Ott, 2011).



**Figure 5 :** Développement de nodosités de type indéterminées (gauche) ou déterminées (droite). Tiré de Popp et Ott, 2011.

## 4-Evolution du partenaire bactérien

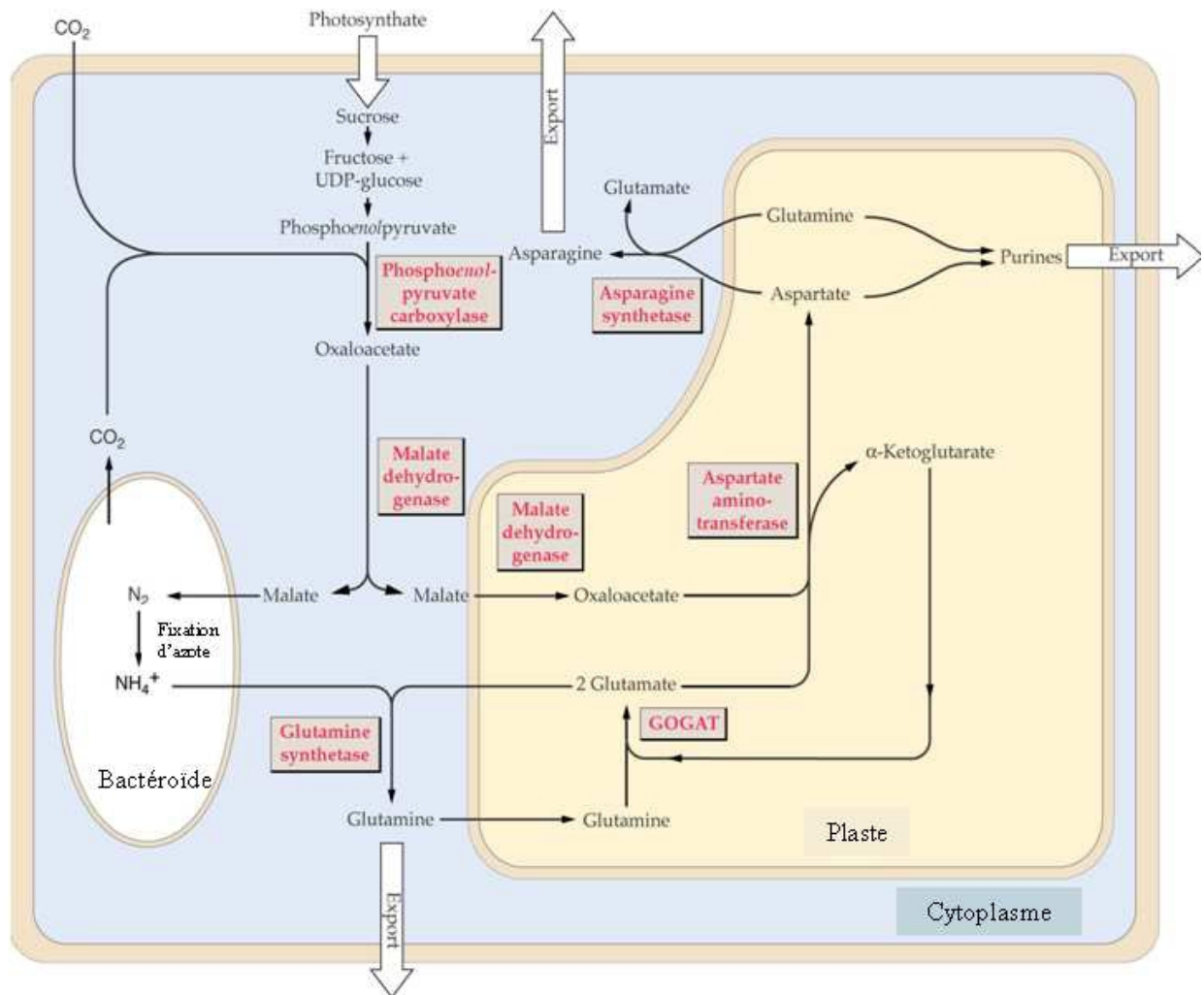
Le partenaire végétal met en place une structure d'accueil de la bactérie symbiotique. De son côté, le partenaire bactérien subit des modifications nécessaires pour parvenir à l'état symbiotique et réaliser les échanges bénéfiques pour les deux partenaires symbiotiques, appelés aussi symbiontes.

Dans la zone d'infection (zone II), les bactéries sont relarguées, par endocytose, des cordons d'infections dans les cellules de la nodosité en cours de développement. Elles sont entourées par une membrane plasmique d'origine végétale : la membrane péribactéroïdienne (MPB). Cet ensemble est appelé symbiosome. Une fois à l'intérieur des cellules, les bactéries se différencient en bactéroïdes et acquièrent la capacité à réduire l'azote atmosphérique. Les cellules végétales de nodosités sont polyploïdes à la suite de plusieurs cycles d'endoréduplication (réplication du génome sans mitose et cytokinèse) et sont par conséquent de tailles importantes (Foucher et Kondorosi, 2000). Dans le cas de nodosités indéterminées, les bactéroïdes subissent une différenciation similaire par endoréduplication et allongement des cellules. Ces bactéroïdes sont métaboliquement actifs, mais perdent leur capacité à se diviser et sont non-viables (en dehors du contexte symbiotique). A l'opposé, les bactéroïdes de nodosités déterminées conservent les caractéristiques de bactéries libres (Mergaert *et al.*, 2006). De manière générale, l'adaptation à l'état symbiotique engendre une répression du métabolisme bactérien et la mise en place de la capacité fixatrice d'azote qui se manifeste par l'activation des gènes correspondants (Becker *et al.*, 2004).

### d) Le fonctionnement de la nodosité

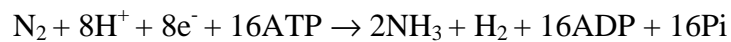
Une fois établie, la symbiose apporte des bénéfices aux deux partenaires : la plante fournit des substrats carbonés à la bactérie, tandis que la bactérie convertit le  $N_2$  en  $NH_4^+$  grâce à la nitrogénase (présente uniquement en conditions symbiotiques) et fournit le  $NH_4^+$  à la plante. La MPB sert d'interface pour les échanges. Les produits principaux du catabolisme des sucres fournis par la plante aux bactéroïdes sont les acides organiques : di-carboxylates en  $C_4$ , comme le malate et le succinate (Figure 6). Certains acides aminés comme le glutamate, la glutamine, la sérine, la glycine et le tryptophane joueraient un rôle dans l'apport énergétique aux bactéroïdes (Udvardi et Day, 1997).





**Figure 6 :** Schéma du métabolisme primaire azoté dans les nodosités. Le métabolisme carboné de la plante produit des acides dicarboxyliques qui sont utilisés pour générer de l'ATP et du pouvoir réducteur nécessaires pour la fixation de l'azote dans les bactéroïdes. L'azote réduit libéré est assimilé dans le cytoplasme végétal et dans les plastes pour produire les acides aminés, glutamine et asparagine, qui sont ensuite transportés vers le reste de la plante à travers le xylème. Tiré de Buchanan *et al.*, 2000.

La nitrogénase bactéroïdienne convertit le N<sub>2</sub> en NH<sub>4</sub><sup>+</sup> selon l'équation suivante :



L'ammoniaque produit est relargué par le bactéroïde et assimilé dans le cytoplasme végétal par la voie: glutamine synthétase (GS) - glutamate synthase (GOGAT) (Figure 6, Udvardi et Day, 1997). Une particularité importante des nodosités est l'existence d'une barrière à l'oxygène présente dans le cortex, qui permet de maintenir la pression partielle en oxygène à des valeurs proches de 10 à 40 nM dans le centre des cellules infectées (Hunt *et al.*, 1988). La raison de cette faible teneur en oxygène s'explique par le fait que l'oxygène est un puissant inhibiteur de l'activité nitrogénase (Trinchant et Rigaud, 1982 ; Kato *et al.*, 2010). Dans ce contexte le rôle de la leghémoglobine (Lb) est primordial puisque cette flavoprotéine, très affine pour l'oxygène, permet de réduire efficacement la teneur en oxygène dans les nodosités (Hunt *et al.*, 1988). Comme les enzymes GS et GOGAT, la Lb fait partie des nodulines tardives qui assurent le bon fonctionnement de la nodosité. Le mode de fonctionnement de la Lb permet de conserver de faibles teneurs en oxygène tout en facilitant l'apport de celui-ci aux chaînes respiratoires mitochondriales (Wittenberg *et al.*, 1974). Cependant, il est possible que ce seul système ne soit pas suffisant pour fournir l'ATP aux cellules en conditions hypoxique. La partie bactéroïdienne, quand à elle, produit de l'ATP en conditions hypoxique par la voie de dénitrification (O'Hara *et al.*, 1983) qui génère du pouvoir réducteur par les différentes réactions de réduction et fournit l'accepteur terminal à la chaîne respiratoire.

**Tableau 2 :** Principales fonctions physiologiques du NO chez les plantes. Adapté de Besson-Bard *et al.*, 2008b.

Processus	Références	Espèces
<b>A. Croissance et développement</b>		
Stimulation du développement des graines	Beligni et Lamattina, 2000 Guo <i>et al.</i> , 2003 Kopyra et Gwózdź, 2003 Simontacchi <i>et al.</i> , 2004 Bethke <i>et al.</i> , 2006	<i>Lactuca sativa</i> <i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Lupinus luteus</i> <i>Sorghum bicolor</i> <i>A. thaliana</i>
Implication dans le verdissement des jeunes pousses induit par la lumière	Zhang <i>et al.</i> , 2006a	<i>Hordeum vulgare</i>
Croissance des feuilles, lignification de la paroi cellulaire, croissance du tube pollinique	Prado <i>et al.</i> , 2004	<i>Lilium longiflorum</i>
Floraison	He <i>et al.</i> , 2004	<i>A. thaliana</i>
Sénescence	Leshem et Pinchasov, 2000 Guo et Crawford, 2005	<i>Fragaria ananassa</i> ; <i>Persea americana</i> <i>A. thaliana</i>
<b>Dans les processus régulés par l'auxine:</b>		
Promotion de la croissance racinaire	Gouvêa <i>et al.</i> , 1997	<i>Zea mays</i>
Formation de racines adventives	Pagnussat <i>et al.</i> , 2003 Lanteri <i>et al.</i> , 2006	<i>Cucumis sativus</i> <i>Cucumis sativus</i>
Implication dans la formation de racines latérales et inhibition de la croissance des racines primaires	Correa-Aragunde <i>et al.</i> , 2004	<i>Lycopersicon esculentum</i>
Réponse au gravitropisme	Hu <i>et al.</i> , 2005	<i>Glycine max</i>
Activation du cycle cellulaire	Ötvös <i>et al.</i> , 2005 Correa-Aragunde <i>et al.</i> , 2006	<i>Medicago sativa</i> <i>Lycopersicon esculentum</i>
Développement des poils racinaires	Lombardo <i>et al.</i> , 2006	<i>Lactuca sativa</i> ; <i>A. thaliana</i>
<b>Dans les processus régulés par l'acide abscissique (ABA):</b>		
Fermeture des stomates	Desikan <i>et al.</i> , 2002 Garcia-Mata et Lamattina, 2002 Guo <i>et al.</i> , 2003 Bright <i>et al.</i> , 2006	<i>A. thaliana</i> <i>Vicia faba</i> <i>A. thaliana</i> <i>A. thaliana</i>
Mobilisation du calcium	Garcia-Mata <i>et al.</i> , 2003	<i>Vicia faba</i>
Induction d'enzymes anti-oxydantes	Zhou <i>et al.</i> , 2005 Zhang <i>et al.</i> , 2007	<i>Stylosanthes guianensis</i> <i>Zea mays</i>
<b>Dans les processus régulés par les cytokinines:</b>		
Accumulation de la bêtaïne	Scherer et Holk, 2000	<i>Amaranthus caudatus</i>
Mort cellulaire	Carimi <i>et al.</i> , 2005	<i>A. thaliana</i>
<b>B. Dans les réponses et l'adaptation à divers stress abiotiques</b>		
En réponse à la sécheresse ou à un stress osmotique	Garcia-Mata et Lamattina, 2001 Gould <i>et al.</i> , 2003 Xing <i>et al.</i> , 2004	<i>Triticum aestivum</i> ; <i>Vicia faba</i> ; <i>Tradescantia et Salpichroa organifolia</i> <i>Nicotiana tabacum</i> <i>Triticum aestivum</i>
En réponse à un stress salin	Gould <i>et al.</i> , 2003 Kopyra et Gwózdź, 2003 Zhao <i>et al.</i> , 2004 Zhang <i>et al.</i> , 2006b	<i>Nicotiana tabacum</i> <i>Lupinus luteus</i> <i>Phragmites communis</i> <i>Zea mays</i>
En réponse à l'ozone	Velikova <i>et al.</i> , 2005 Mahalingam <i>et al.</i> , 2006	<i>Phragmites australis</i> <i>A. thaliana</i>
En réponse à des variations de températures	Gould <i>et al.</i> , 2003 Cantrel <i>et al.</i> , 2011	<i>Nicotiana tabacum</i> <i>A. thaliana</i>
En réponse à une blessure	Orozco-Cárdenas et Ryan, 2002 Huang <i>et al.</i> , 2004 París <i>et al.</i> , 2007	<i>Lycopersicon esculentum</i> <i>A. thaliana</i> <i>Solanum tuberosum</i>
En réponse à un stress mécanique	Garcès <i>et al.</i> , 2001	<i>A. thaliana</i>
En réponse au cisaillement	Gong et Yuan, 2006	<i>Taxus cuspidata</i>
En réponse à une exposition aux métaux	Kopyra et Gwózdź, 2003 Bartha <i>et al.</i> , 2005 Arnaud <i>et al.</i> , 2006 Barroso <i>et al.</i> , 2006 Rodríguez-Serrano <i>et al.</i> , 2006 Groppa <i>et al.</i> , 2008 Besson-Bard et Wendehenne, 2009	<i>Lupinus luteus</i> <i>Brassica juncea</i> ; <i>Pisum sativum</i> <i>A. thaliana</i> <i>Pisum sativum</i> <i>Pisum sativum</i> <i>Triticum aestivum</i> <i>A. thaliana</i>
En réponse aux stress oxydatifs	Zhao <i>et al.</i> , 2008	<i>Phragmites communis</i>
En réponse aux ultrasons	Wang <i>et al.</i> , 2006 Zhang <i>et al.</i> , 2003a	<i>Taxus yunnanensis</i> <i>Zea mays</i>
En réponse aux UV	An <i>et al.</i> , 2005 He <i>et al.</i> , 2005 Shi <i>et al.</i> , 2005	<i>Zea mays</i> <i>Vicia faba</i> <i>Phaseolus vulgaris</i>
En réponse à un stress hypoxique	Dordas <i>et al.</i> , 2003 Perazzolli <i>et al.</i> , 2004 Igamberdiev <i>et al.</i> , 2006 Benamar <i>et al.</i> , 2008	<i>Medicago sativa</i> <i>A. thaliana</i> <i>Medicago sativa</i> <i>Pisum sativum</i>

## B-Le monoxyde d'azote : signal, régulateur et métabolite

Dans la nature, les plantes sont soumises en permanence aux modifications des conditions de l'environnement et doivent s'adapter à de nombreux stress d'origine biotique (agents pathogènes, ravageurs) ou abiotique (température, sécheresse, polluants, ...). Pour cela, il est vital pour les cellules végétales d'avoir une perception fine des stimuli extérieurs et de les "interpréter" pour fournir une réponse adaptée à l'échelle des organes ou de la plante entière.

Le monoxyde d'azote, ou oxyde nitrique (NO), est une molécule gazeuse qui diffuse librement à travers les systèmes biologiques. Pendant longtemps, il a été considéré comme un gaz toxique pour les cellules. L'identification du NO comme un produit biologique remonte à 1967, lorsqu'il a été démontré qu'il constituait une intermédiaire de la voie de dénitrification anaérobie chez l'algue marine *Pseudomonas perfectomarinus* (Barbaree et Payne, 1967). Puis, à partir des années 1990s, il est apparu que le NO intervient normalement chez les animaux dans de nombreux processus physiologiques, tels que la vasodilatation sanguine, la neurotransmission, la reproduction, l'embryogénèse, l'inflammation ou l'apoptose (Moncada *et al.*, 1991 ; Schmidt et Walter, 1994). Vers la fin des années 1990s, le NO a été identifié comme étant une molécule signal chez les végétaux (Lamattina *et al.*, 2003 ; Wendehenne *et al.*, 2004 ; Desikan *et al.*, 2004). La réactivité chimique du NO avec les protéines, les lipides et d'autres composés cellulaires, lui permet de réguler de nombreux processus en tant que médiateur ou molécule signal. Ainsi, le NO, via les modifications post traductionnelles qu'il entraîne, est capable de modifier l'activité des facteurs de transcription et réguler ainsi l'expression de nombreux gènes (Besson-Bard *et al.*, 2008a ; Moreau *et al.*, 2010). Il peut également se lier à des enzymes impliquées dans des voies de signalisation, comme la guanylate cyclase, pour l'activer et entraîner une augmentation de GMPc cellulaire, qui à son tour régule de nombreux processus (Wilson *et al.*, 2008 ). De manière générale, le NO module l'activité de nombreuses protéines. Ainsi, le NO intervient dans de nombreux processus dont quelques exemples sont montrés Tableau 2, en particulier dans la croissance et le développement, mais aussi dans la réponse aux stress abiotiques, comme les stress hydrique, thermique ou salin (Corpas *et al.*, 2011), dans la réponse à des agents pathogènes par l'induction de la mort cellulaire, de gènes de défense et l'interaction avec des espèces actives

**Tableau 2** (suite): Principales fonctions physiologiques du NO chez les plantes. Adapté de Besson-Bard *et al.*, 2008b.

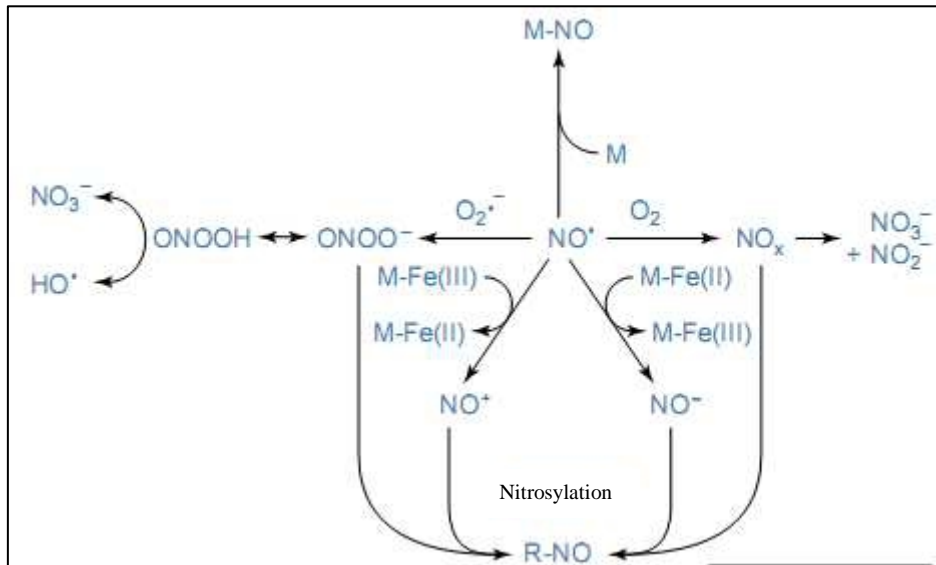
Processus	Références	Espèces
<b>C. Dans les réponses et l'adaptation à divers interactions biotiques</b>		
Dans les interactions incompatibles plantes/agents pathogènes		
Production de NO dans les tissus de plantes ou de cultures cellulaires	Delledonne <i>et al.</i> , 1998 Durner <i>et al.</i> , 1998 Clarke <i>et al.</i> , 2000 Foissner <i>et al.</i> , 2000 Conrath <i>et al.</i> , 2004 Lamotte <i>et al.</i> , 2004 Yamamoto <i>et al.</i> , 2004 Zeidler <i>et al.</i> , 2004 Modolo <i>et al.</i> , 2005 Mur <i>et al.</i> , 2005 Vandelle <i>et al.</i> , 2006 Laxalt <i>et al.</i> , 2007	<i>Glycine max-P.syringae</i> pv. <i>glycinea</i> ; <i>A. thaliana-P. syringae</i> pv. <i>maculicola</i> et <i>avrRpm1</i> <i>Nicotiana tabacum</i> - Virus de la mosaïque du tabac (TMV) <i>A. thaliana-P. syringae</i> pv <i>maculicola</i> <i>Nicotiana tabacum</i> - cryptogéine <i>Nicotiana tabacum-P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> ; suspensions cellulaires <i>Glycine max-P. syringae</i> pv. <i>glycinea</i> Suspensions cellulaires <i>Nicotiana tabacum</i> -cryptogéine Suspensions cellulaires <i>Nicotiana tabacum</i> - elicitin (INF1) <i>A. thaliana</i> - LPS (éliciteur) et <i>A. thaliana-P. syringae</i> <i>A. thaliana-P. syringae</i> <i>Nicotiana tabacum-P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> et <i>tabaci</i> Suspensions cellulaires <i>Vitis vinifera</i> -endopolygalacturonase I Suspensions cellulaires <i>Solanum lycopersicon</i> -xylanase
Implication dans la mort cellulaire localisée chez l'hôte (HR)	Delledonne <i>et al.</i> , 1998 Zhang <i>et al.</i> , 2003b Tada <i>et al.</i> , 2004 Modolo <i>et al.</i> , 2006 Ali <i>et al.</i> , 2007	<i>A. thaliana-P. syringae</i> <i>A. thaliana-P. syringae</i> <i>Avena sativa-Puccinia coronata</i> <i>A. thaliana-P. syringae</i> pv. <i>maculicola</i> <i>A. thaliana-P. syringae</i> ; <i>Nicotiana tabacum/Vicia faba</i> -LPS
Implication dans la résistance systémique	Song et Goodman, 2001 Florysak-Wieczorek <i>et al.</i> , 2007 Rustérucci <i>et al.</i> , 2007	<i>Nicotiana tabacum</i> - TMV <i>Pelargonium peltatum-Botrytis cinerea</i> <i>A. thaliana-Peronospora parasitica</i>
Dans les interactions symbiotiques		
Fixation de l'azote	Creus <i>et al.</i> , 2005 Shimoda <i>et al.</i> , 2005	<i>Lycopersicon esculentum-Azospirillum brasilense</i> <i>Lotus japonicus-Mesorhizobium loti</i>
Régulation de la symbiose	Baudoin <i>et al.</i> , 2006 Ferrarini <i>et al.</i> , 2008 Horchani <i>et al.</i> , 2010 Moche <i>et al.</i> , 2010 Pauly <i>et al.</i> , 2011	<i>Medicago truncatula-Sinorhizobium meliloti</i> <i>Medicago truncatula-Sinorhizobium meliloti</i> <i>Medicago truncatula-Sinorhizobium meliloti</i> <i>Nicotiana tabacum-Glomus mosseae</i> <i>Medicago truncatula-Sinorhizobium meliloti</i>
<b>C. Autres</b>		
Dans l'homéostasie du fer	Graziano <i>et al.</i> , 2002 Murgia <i>et al.</i> , 2002	<i>Zea mays</i> <i>A. thaliana</i>
Dans la mobilisation du calcium	Lamotte <i>et al.</i> , 2006	<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>
En réponse aux polyamines	Tun <i>et al.</i> , 2006	<i>A. thaliana</i>
En réponse à l'acide salicylique	Zottini <i>et al.</i> , 2007	<i>A. thaliana</i>

de l'oxygène (ROS) (Delledonne *et al.*, 1998 ; Wendehenne *et al.*, 2004 ; Delledonne, 2005), et dans les symbioses rhizobienne (Baudouin *et al.*, 2006) ou mycorhizienne (Moche *et al.*, 2010).

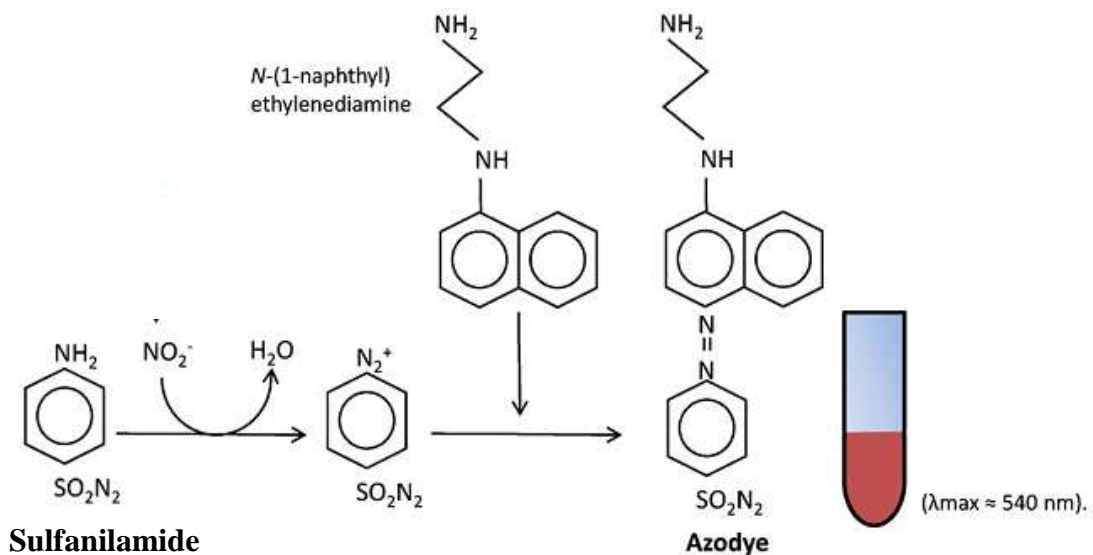
## a) Les espèces réactives de l'azote dérivées du NO

Le terme espèces réactives de l'azote (RNS) regroupe le NO et d'autres molécules plus ou moins dérivées du NO comme le S-nitrosoglutathion (GSNO), le peroxy-nitrite (ONOO<sup>-</sup>), le trioxyde de diazote (N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), le radical dioxyde d'azote (NO<sub>2</sub><sup>•</sup>), etc (voir pour revue Hughes, 2008). Le NO existe en fait sous trois formes: radicalaire (NO<sup>•</sup>), cationique (NO<sup>+</sup>, nitrosonium) et anionique (NO<sup>-</sup>, nitroxyle). A moins que ce ne soit précisé, le terme NO est utilisé pour désigner indifféremment ces trois formes. Le radical NO<sup>•</sup> peut réagir principalement avec le dioxygène O<sub>2</sub>, les métaux de transition ou le radical superoxyde O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (Wendehenne *et al.*, 2001). La réaction du NO<sup>•</sup> avec le dioxygène O<sub>2</sub>, conduit à la génération de composés de type NO<sub>x</sub>, comme N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ou N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, qui réagissent ensuite avec les amines ou les thiols, ou qui s'hydrolysent pour former à la fin du nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) ou du nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) (Figure 7). Le NO<sup>•</sup> peut induire des modifications post-traductionnelles sur les protéines, telles que la métal-nitrosylation, la tyrosine-nitration et la S-nitrosylation (voir paragraphe B-d). Le peroxy-nitrite résulte de la réaction entre le radical NO<sup>•</sup> et le radical superoxyde O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Ce composé hautement réactif provoque des réactions d'oxydation, qui causent en particulier des dommages à l'ADN, aux protéines et la peroxydation des lipides (Vandelle et Delledonne, 2011). Enfin, le radical NO<sup>•</sup> peut subir soit une oxydation pour former le cation nitrosonium, NO<sup>+</sup>, qui réagit avec les groupements thiols des cystéines pour former des groupements S-nitrosothiols, soit une réduction qui conduit à la formation de l'anion nitroxyle, NO<sup>-</sup>, qui peut également réaliser la S-nitrosylation des protéines (Wendehenne *et al.*, 2001).

Le GSNO est formé à partir de NO et de glutathion réduit (GSH) en présence d'oxygène (Schrammel *et al.*, 2003). L'action de la GSNO réductase (GSNOR) permet de former du glutathion oxydé (GSSG) et NH<sub>3</sub>, tandis qu'en présence d'ascorbate et d'ion cuivre, le GSNO relargue du NO. Par cette propriété le GSNO est considéré comme une forme de stockage mobile du NO pour la cellule (Barroso *et al.*, 2006).



**Figure 7** : Réactions chimiques du NO dans ses environnements biologiques. M-NO : métal-nitrosylé ; M : protéines hémiques ou ferriques ; M-Fe(II)/Fe(III) : metalloprotéines contenant du Fe(II)/Fe(III) ; NO<sub>x</sub> : NO<sub>2</sub><sup>•</sup>, N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> et N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> ; R-NO : protéines nitrosyllées. Tiré de Wendehenne *et al.*, 2001.



**Figure 8** : Schéma de la réaction de Griess. La formation d'un composé chromophore "Azodye" est montrée. Tiré de Mur *et al.*, 2011.

## b) Les méthodes de détection du NO

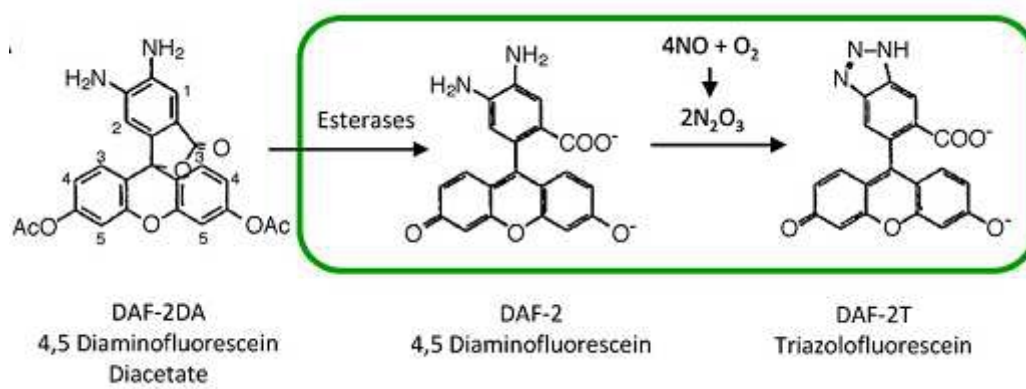
Les effets biologiques du NO dépendent de son lieu de synthèse, de l'environnement oxydo-réducteur et de sa concentration, ce qui nécessite de pouvoir mesurer le NO sur une large gamme de concentration (du pM au mM). Plusieurs méthodes de détection du NO ont été mises au point, dont certaines sont utilisables pour quantifier le NO à l'intérieur de la plante, tandis que d'autres ne mesurent que le NO émis dans le milieu extérieur. Les principales méthodes utilisées pour détecter la présence ou la production de NO dans les systèmes biologiques sont détaillées ci-après (pour revue, voir Mur *et al.*, 2011).

L'oxyhémoglobine (HbO<sub>2</sub>), qui absorbe à 415-421 nm, peut réagir avec le NO pour former du nitrate et de la méthémoglobine (MetHb) qui, elle, absorbe à 401 nm. Cette technique est très sensible avec un seuil de détection de l'ordre de 1,3-2,8 nM. Malgré cela, la difficulté technique pour préparer l'enzyme HbO<sub>2</sub> et sa capacité à réagir avec les ROS font que cette méthode a été délaissée au profit de méthodes plus récentes et plus simples à mettre en œuvre (Mur *et al.*, 2011).

Le NO peut être oxydé en NO<sub>2</sub> (par CrO<sub>3</sub>) pour être ensuite dosé par la méthode de Griess (Figure 8, Ghafourifar *et al.*, 2008). Dans cette méthode, le nitrite réagit avec la sulphanilamide et le N-(1-naphthyl) éthylènediamine (NED), en condition acide, pour former un produit chromophore avec un maximum d'absorbance à 546 nm. Bien que cette réaction soit facile à mettre en œuvre, son utilisation chez les végétaux est compromise par la présence de nitrite à des concentrations de l'ordre du micromolaire. Cet inconvénient peut être contourné par l'ajout d'un piège à nitrites avant d'oxyder le NO en nitrite (Vitecek *et al.*, 2008). Une autre limite est le manque de sensibilité : 0,5 µM de NO. Cette limite a été améliorée jusqu'au nM par la mesure en phase gazeuse du NO et l'ajout d'une colonne oxydante (CrO<sub>3</sub>), (Vitecek *et al.*, 2008).

Les sondes fluorescentes de type diaminofluoresceine (DAF) sont les plus utilisées et présentent le double avantage de détecter le NO sur cellules vivantes et l'utilisation en microscopie confocale (Mur *et al.*, 2011). En revanche, l'utilisation de ce type de sonde requière la présence d'oxygène ce qui les rend difficiles d'utilisation en anoxie (Vandelle et Delledonne, 2008). En effet, le NO réagit avec l'O<sub>2</sub> pour former du N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Ce dernier réagit avec la sonde DAF-2 pour former un triazole fluorescent (DAF-2T) qui peut être excité à 495 nm pour émettre à 515 nm. La forme diacétate de la DAF-2 (DAF-2-DA) est perméante. Le





**Figure 9** : Réactions de la DAF-2DA jusqu'à la DAF-2T fluorescente. Tiré de Mur *et al.*, 2011.

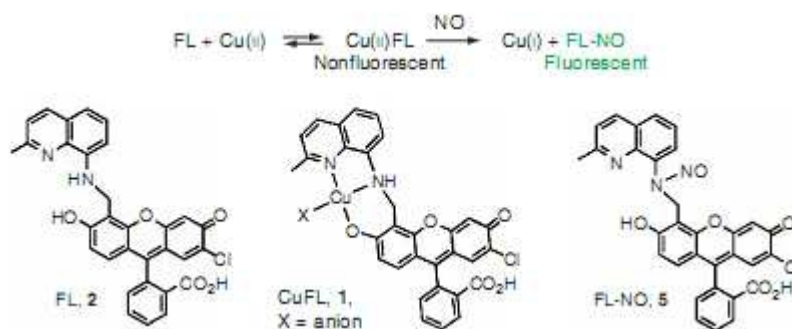
groupement diacétate est enlevé par les estérases de la paroi pour relarguer la DAF-2 disponible pour réagir avec  $N_2O_3$  (Figure 9). La sensibilité est de 5 nM (Mur *et al.*, 2011). Le problème est que la DAF-2 réagit aussi avec l'acide déhydroascorbique (DHA) et l'acide ascorbique pour générer des nouveaux composés qui ont des profils de fluorescence similaire à la DAF-2T (Zhang *et al.*, 2002) d'où la nécessité de contrôles rigoureux. De plus, la fluorescence des dérivés triazoles des DAFs dépend du pH. Une version améliorée, la DAF-FM (3-Amino-4-(N-méthylamino)-2'-7'-difluorofluorescein) présente une fluorescence stable pour une large gamme de pH (Vandelle et Delledonne, 2008).

De manière similaire à la DAF, la sonde 2,3-Diaminonaphthalene (DAN) réagit avec le NO en présence d'oxygène, pour former un composé hautement fluorescent le 2,3-naphthotriazole (NAT), excitable à 375 nm pour émettre à 415 nm (Nagano, 1999). Le seuil de détection est de 10 nM. Cependant DAN réagit aussi avec le nitrite en condition acide. Il ne peut être utilisé pour détecter le NO seulement en conditions neutres et présente d'autres inconvénients, en particulier la cytotoxicité et l'autofluorescence générée par l'excitation UV (Nagano, 1999).

Une autre sonde permet de détecter le NO *in vivo*, la 1,2-diaminoanthraquinone (DAQ). Le NO réagit avec les groupements amino aromatiques de DAQ à pH neutre et en présence d'oxygène pour former un produit fluorescent (excitation 520 nm, émission > 580 nm) 1H-anthra-[1,2d]-[1,2,3]triazole-6,11-dione (ATD). La DAQ ne réagit pas avec les ROS et ne présente pas d'effet toxique mais elle est sensible au pH. Le produit ATD formé précipite ce qui évite la diffusion du NO du point de génération (Shuchmann *et al.*, 2002).

La sonde 8-(3',4'-diaminophenyl)-difluoroboradiaza-S-indacence (DABODIPY) réagit avec le NO en présence de dioxygène pour former un composé benzotriazole fluorescent (excitation 500 nm, émission 510 nm). La fluorescence est instable à pH acide. Comme les autres sondes fluorescentes, la limite de détection est de l'ordre d'une dizaine de nM de NO (Zhang *et al.*, 2004).

Une autre sonde commerciale, plus spécifique pour le NO que les sondes de type DAF, est également disponible : la CuFL (Lim *et al.*, 2006). Cette sonde, qui est composée d'un complexe entre le chlorure de cuivre et le FL : 2-{2-chloro-6-hydroxy-5-[(2-méthylquinolin-8-yl-amino)-methyl]-3-oxo-3H-xanthen-9-yl} benzoic acid), réagit directement avec le NO grâce à son cœur métallique et devient fluorescente (excitation 488 nm, émission 516 nm) (Figure 10, Lim, 2007). Cette sonde permet la détection directe du NO contrairement aux autres sondes précédemment citées qui réagissent avec des dérivées oxydés du NO. De même que les autres sondes fluorescentes, la CuFL peut être utilisée pour l'imagerie. De plus, elle



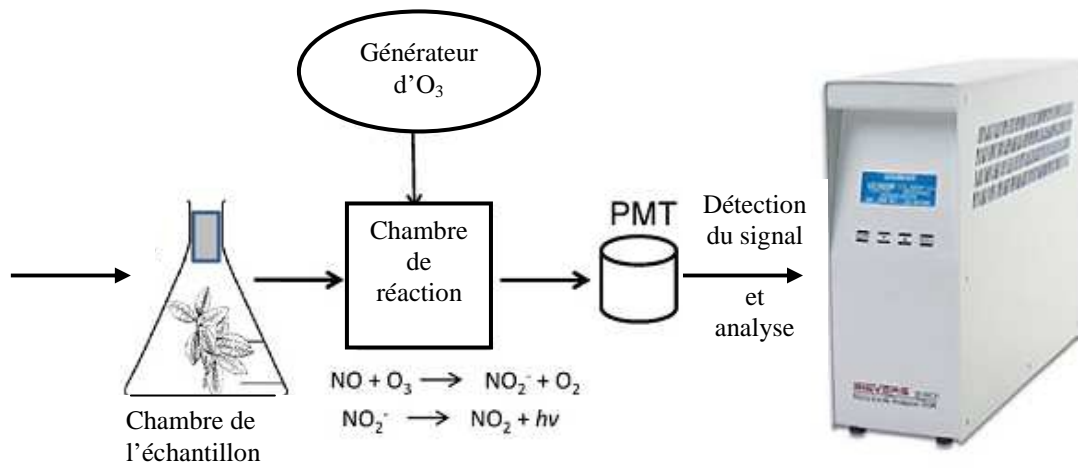
**Figure 10** : Structures et réactions chimiques de la sonde CuFL. Tiré de Lim *et al.*, 2006.

peut être utilisée en anoxie puisque la réaction ne requière pas la présence d'oxygène. En revanche en présence d'oxygène, le complexe CuFL peut réagir avec les S-nitrosothiols (produits de la réaction de S-nitrosylation du NO sur les résidus cystéines des protéines), pouvant générer de la fluorescence (Lim *et al.*, 2006).

Récemment, une nouvelle sonde, la "fluorescent nitric oxide chelotropic traps" (FNOCT) a été développée pour détecter le NO (Duppe *et al.*, 2010). La FNOCT réagit directement avec le NO pour le transformer en une entité fluorescente. Elle est constituée d'oxoquinodimethanes cycliques sur une base en pyrène. Ces composés réagissent avec le NO de manière chélotropique pour former un pyrène aromatique fluorescent. Cette sonde (non commercialisée) détecte le NO à des concentrations de l'ordre du nM et permet de détecter la production de NO de manière spatio-temporelle (Düppe *et al.*, 2010). La version FNOCT 8a (excitation 360 nm et émission 408 nm) est utilisée en raison de sa stabilité en conditions physiologiques, sa spécificité de réaction avec le NO et pas les ROS/RNS, pour sa sensibilité et son utilisation en microscopie confocale et en mesure *in vivo* (Vandana *et al.*, 2012).

La résonance paramagnétique de l'électron (RPE) est une technique de spectroscopie sous champ magnétique. Elle permet une détection directe des radicaux libres comme le NO. Ces derniers sont en effet caractérisés par la présence d'un électron libre qui, en tournant sur lui-même comme une toupie, induit un champ magnétique. Si le radical libre est placé dans un champ magnétique produit par deux puissants aimants, il en résultera une absorption d'énergie qui pourra être visualisée sous la forme d'un spectre. La RPE permet la détection de NO à des concentrations de l'ordre du pM, mais elle est peu utilisée à cause du coût élevé des appareils et du haut niveau d'expertise requis pour les utiliser (Mur *et al.*, 2011).

Les électrodes à NO sont relativement moins chères et facilement utilisables. La technique est basée sur le potentiel d'oxydation du NO en NO<sub>3</sub> à l'anode et permet la mesure du NO pour des concentrations de l'ordre du nM (Ghafourifar *et al.*, 2008). L'électrode est constituée de platine entourée de Teflon, et l'électrode de référence est en Ag/AgCl. Les deux électrodes baignent dans une solution 30 mM NaCl / 0,3 nM HCl et sont recouvertes d'une membrane imperméable au NO. Il est possible de l'introduire directement dans le tissu végétal (en particulier pour les micro-électrodes). Les électrodes sont spécifiques du NO et n'interfèrent pas avec les ROS ou RNS présents (Mur *et al.*, 2011). De plus, le NO mesuré peut être quantifié avec la réalisation d'une courbe étalon. En revanche, il n'est pas possible d'utiliser les électrodes pour la détection du NO produit par des organelles (mitochondries...) d'une part, parce qu'elles ne peuvent pas rentrer dedans et, d'autre part, parce que les



**Figure 11** : Détection de l'oxyde nitrique par chimiluminescence. Tiré de Mur *et al.*, 2011.

électrodes mesurent le NO émit, et que le NO produit réagit avec d'autres composés (superoxyde, glutathion...) avant de pouvoir être détecté (Ghafourifar *et al.*, 2008).

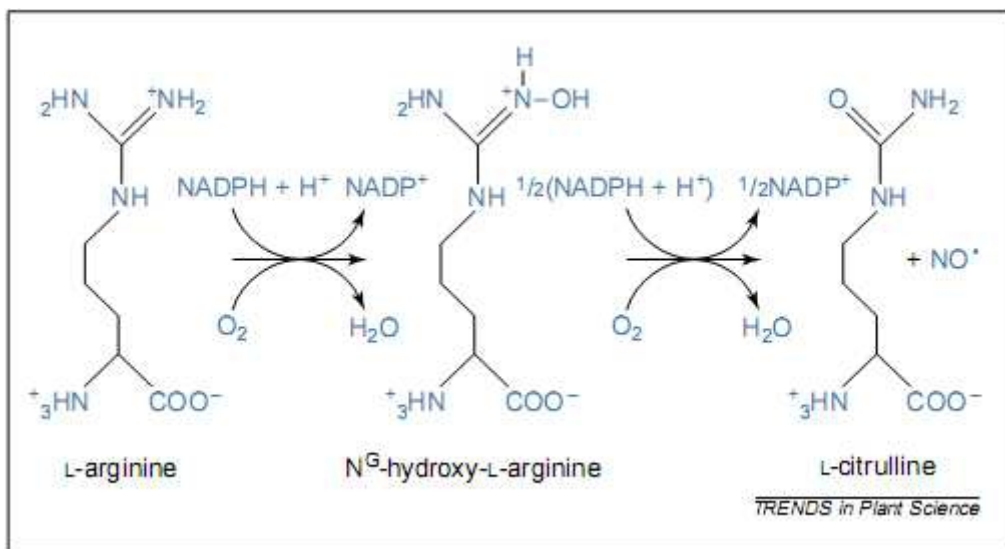
La spectrométrie de masse (MS) peut aussi être utilisée pour la détection du NO grâce à l'utilisation d'une membrane (MIMS, "Membrane Inlet Mass Spectrometry") ou d'un capillaire (RIMS, "Restriction capillary Inlet Mass Spectrometry") qui sépare l'appareil de l'échantillon mais permet la diffusion de gaz de faible poids moléculaire comme le NO. L'intérêt particulier de cette méthode est son utilisation avec le l'azote marqué  $^{15}\text{N}$  en particulier pour étudier la contribution d'une enzyme donnée, grâce au marquage de son substrat, dans formation de NO (Mur *et al.*, 2011). Bien que la MIMS/RIMS permette la détection de NO rapide, directe, spécifique et non invasive, seul le NO extracellulaire peut être mesuré (Vandelle et Delledonne, 2008).

La mesure du NO par chimiluminescence est la mieux établie (Figure 11). Elle est basée sur la réaction de l'ozone ( $\text{O}_3$ ) avec le NO qui produit du dioxyde d'azote ( $\text{NO}_2^*$ ) sous forme excitée et émet un photon lors du relâchement. La lumière émise, supérieur à 600 nm, est proportionnelle à la quantité de NO et peut être mesurée par un photomultiplicateur. Cette méthode est donc quantitative. De plus la sensibilité est très bonne : 20-50 pmoles. En revanche, il n'est pas possible de mesurer le NO intracellulaire (Vandelle et Delledonne, 2008), ni de différencier le NO provenant de différentes sources sub-cellulaires (Ghafourifar *et al.*, 2008). En ce qui concerne la spécificité, même si l'éthylène et certains composés sulfures sont aussi capables de réagir avec l'ozone, l'émission de photons qui en découle est à une autre longueur d'onde que pour la réaction avec le NO ; les réactions sont donc différenciables (Mur *et al.*, 2011).

Il existe des techniques de spectroscopie laser basées sur l'absorption du NO dans l'infrarouge :  $5,3 \mu\text{m}$  ( $1876 \text{ cm}^{-1}$ ). Néanmoins ces techniques sont lourdes en équipement et en techniques, et sont donc peu utilisées (Mur *et al.*, 2011).

### c) La synthèse du NO

Chez les animaux, le NO est synthétisé grâce à des enzymes NO synthases (NOS). Il en existe 3 types selon l'origine tissulaire: deux constitutives localisées dans les neurones nNOS ou de l'endothélium eNOS, et une inductible iNOS dans les macrophages et d'autres types cellulaires en réponse à des agents inflammatoires (Nathan et Xie, 1994). Les NOSs sont des enzymes bi-domaines avec un domaine N-terminal oxygénase qui utilise le



**Figure 12 :** Réaction catalysée par les NO synthases (NOS) animales. Tiré de Wendehenne *et al.*, 2001.

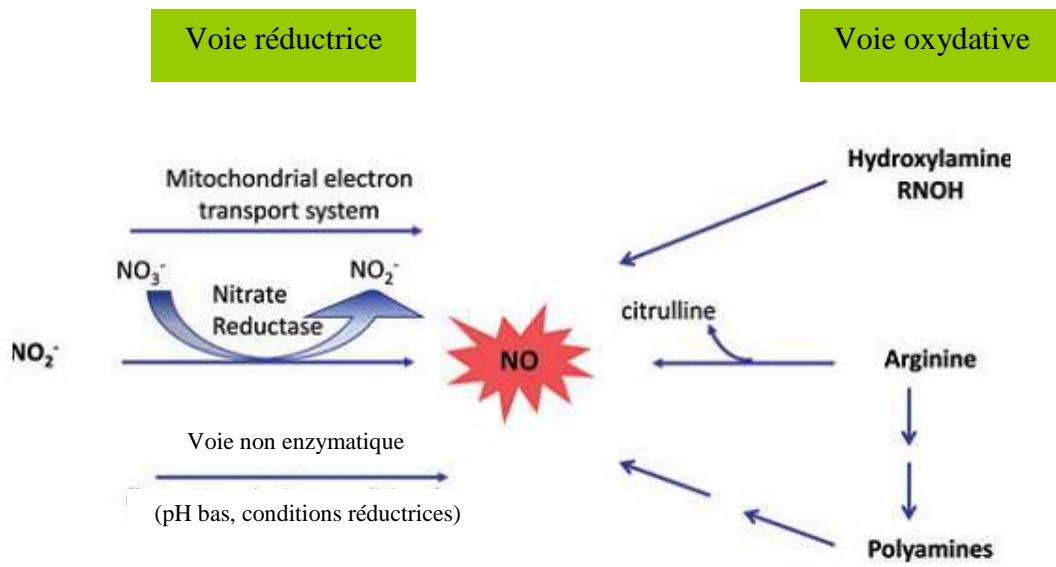
co-facteur tétrahydrobioptérine et un domaine C-terminal qui utilise la flavine adénine dinucléotide (FAD), la flavine mononucléotide (FMN) et le NADPH comme co-facteurs. L'activité des NOSs constitutives dépend de la concentration en calcium libre qui se lie sur la calmoduline (CaM) présente entre les deux domaines de NOS. L'enzyme, active sous forme homodimère, oxyde la L-arginine en L-citrulline et NO (Figure 12). En absence de L-arginine, les NOSs réduisent le dioxygène en anion superoxyde  $O_2^{\cdot-}$ . Ce dernier réagit avec le NO pour former du peroxynitrite ( $ONOO^{\cdot-}$ ) (Wendehenne *et al.*, 2001). Chez les végétaux, les sources du NO sont moins bien caractérisées. Celui-ci peut être produit par voie réductrice (nitrate réductase – NR, nitrite-NO réductase – Ni-NOR, xanthine oxydoréductase – XOR, chaîne de transfert des électrons mitochondriale – CTE, ou réduction chimique), ou par voie oxydative (NOS-like, voie des polyamines – PA- ou hydroxylamines), (Figures 13 et 14, Stöhr et Stremlau, 2006 ; Besson-Bard *et al.*, 2008a ; Moreau *et al.*, 2010 ; Fröhlich et Durner, 2011).

## 1-La voie réductrice

L'activité habituelle de la NR cytoplasmique est la réduction du nitrate en nitrite. Cependant, une activité additionnelle de production de NO à partir du nitrite a été révélée. Grâce au suivi du nitrate marqué au  $^{15}N$ , la formation de NO qui découle de la réduction du nitrate a été observée dans les feuilles de soja (*G. max*) et *Psophocarpus tetragonolobus* mais pas chez le mutant de la NR chez le soja (Dean et Harper, 1986). De plus, l'activité de production de NO (avec un  $K_m$  apparent de 0,49 nM pour le nitrite) en présence de NAD(P)H est corrélée à la présence de l'enzyme NR (forme constitutive) *in vitro* chez le soja (Dean et Harper, 1988). L'étude de la production de NO *in vitro* par la NR purifiée de maïs a permis d'évaluer cette activité à environ 1 % de l'activité NR, avec un  $K_m$  pour le nitrite de 100  $\mu M$  ce qui est relativement élevé comparé aux concentrations physiologiques en nitrite dans les feuilles de 10  $\mu M$  (Rockel *et al.*, 2002). La régulation de l'émission de NO a été étudiée *in vivo* sur des feuilles de tournesol (*Helianthus annuus*) et d'épinard (*Spinacia oleracea*). L'émission de NO est régulée négativement par la compétition avec le nitrate et la phosphorylation de l'enzyme ; elle est améliorée en conditions microoxiques (Rockel *et al.*, 2002).

Une autre enzyme présente une activité de synthèse du NO à partir de nitrite : la Ni-NOR (Stöhr et Ullrich, 2002). Cette enzyme, présente uniquement dans les racines, est liée à



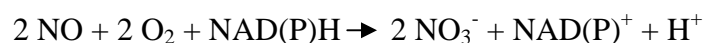


**Figure 13 :** Les deux principales voies de formation du NO chez les plantes. Tiré de Moreau *et al.*, 2010.

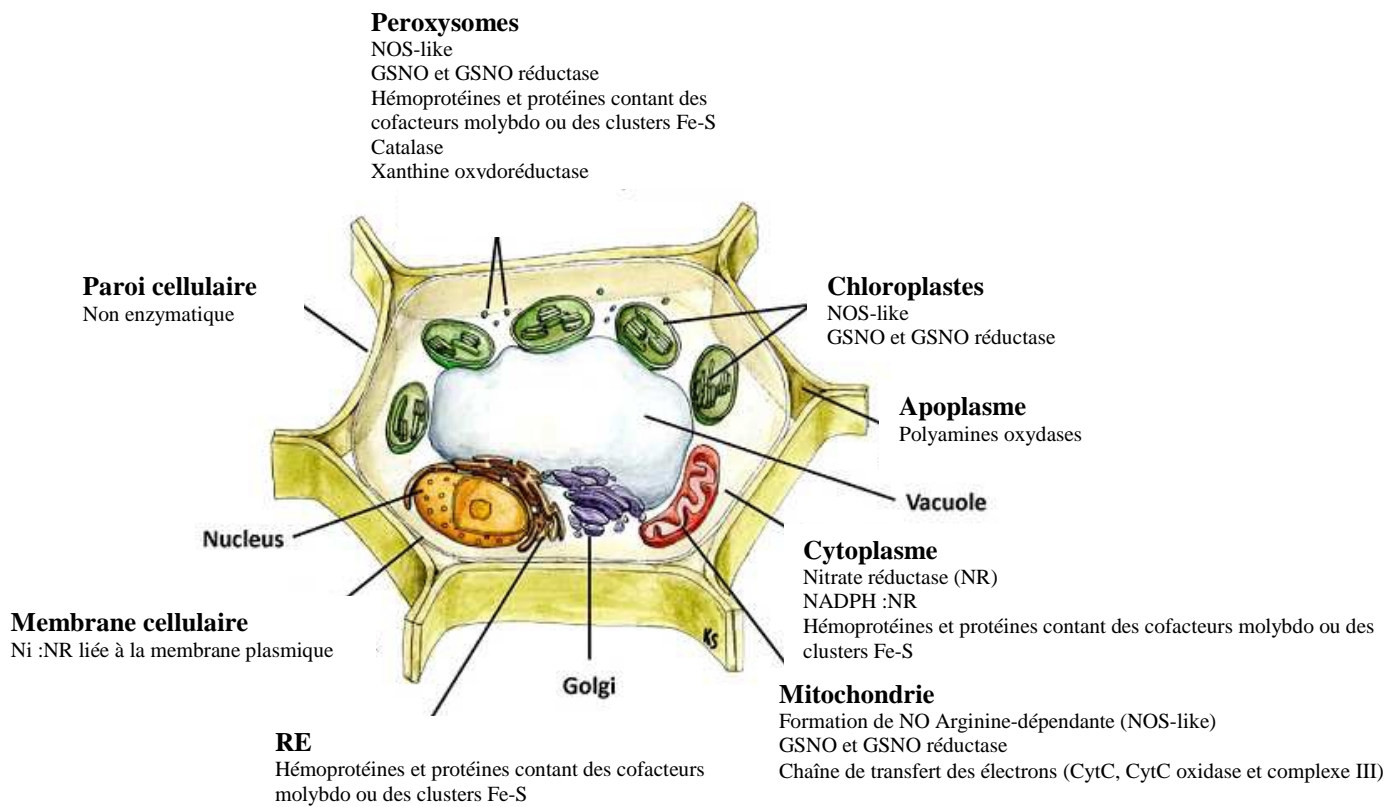
la membrane plasmique (PM) et fonctionne en coordination avec une NR, elle aussi liée au plasmalemmes. Cette enzyme étudiée principalement chez *Nicotiana tabacum*, utiliserait le cytochrome c réduit comme donneur d'électron (*in vitro*) pour former du NO dans l'apoplasme (Stohr *et al.*, 2001). La synthèse de NO par la Ni-NOR a été démontrée lors de la symbiose mycorrhizienne chez le tabac (Moche *et al.*, 2010).

La xanthine oxydoréductase est une enzyme capable de produire du NO à partir de nitrite en anoxie chez les animaux et il est possible qu'elle ait cette fonction chez les végétaux (Li *et al.*, 2008 ; Igamberdiev *et al.*, 2010).

Il existe trois classes d'hémoglobines (Hb) chez les végétaux: les Hb de classe 1 (Hb1), les Hb de classe 2 (Hb2) et les Hb tronquées (Hb3). Certaines Hb sont non symbiotiques (nsHb) et d'autres sont associées au fonctionnement des nodosités fixatrices d'azote et sont appelées leghémoglobines (Lb). Grâce à leur affinité pour le dioxygène, les Hb2 ont pour fonction de faciliter le flux d'oxygène dans les tissus en développement. En plus de ce rôle, Lb servent de tampon d'oxygène dans la symbiose en particulier pour préserver la nitrogénase (Herold et Puppo, 2005 ; Smaghe *et al.*, 2009 ; Gupta *et al.*, 2011). Les Hb1, mais aussi les Lb, sont connues pour jouer un rôle dans la détoxification du NO en nitrate selon la réaction suivante (Igamberdiev *et al.*, 2011) :

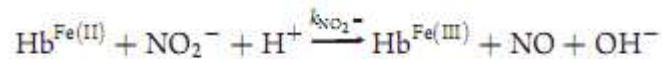


Au cours de cette réaction l'Hb est réduite en metHb (forme ferrique de l'Hb, voir aussi paragraphe B-b). Cette fonction de dioxygénase du NO a été montrée en particulier chez *M. truncatula* chez qui l'expression hétérologue d'une Hb1 d'orge conduit à une augmentation de la dégradation du NO avec la formation de nitrate (Igamberdiev *et al.*, 2004a). Chez *A. thaliana*, Hb1 se lie au NO pour en diminuer la teneur en situation d'hypoxie (Perazzolli *et al.*, 2004; Angelo *et al.*, 2008). La surexpression d'Hb1 lors de la symbiose chez le lotier (*L. japonicus*) et chez la plante actinorhizienne *Alnus firma* résulte dans l'amélioration de la fixation de l'azote et de la nodulation liées à la diminution du niveau de NO (Shimoda *et al.*, 2009). Herold et Puppo (2005) ont montré qu'outre le NO, le nitrite est également capable de se lier aux formes oxy-ferry<sup>IV</sup> (ferryLb) et ferry<sup>III</sup> de la Lb (metLb) et que la forme ferryLb est alors réduite en metLb. Ceci souligne un rôle différent de la détoxification du NO des Hb/Lb. Chez le lotier, Hb1 est induit dans les racines 4h après l'inoculation avec son partenaire rhizobien *Mesorhizobium loti* et la localisation de cette expression est corrélée avec une production de NO (Nagata *et al.*, 2008). Chez le riz, la



**Figure 14 :** Voies de production du NO chez les plantes. Dans certains cas l'origine est connue (par exemple la nitrate réductase) et dans d'autres elle est putative (par exemple la voie arginine dépendante), voire spéculative (catalase et xanthine oxydoréductase). Tiré de Fröhlich et Durner, 2011.

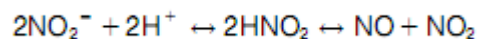
réaction de nsHb1 avec le nitrite pour former du NO et de la metHb a été mise en évidence (Sturms *et al.*, 2011), selon la réaction suivante :



Cette activité nitrite réductase des Hb a une réalité physiologique lorsque le nitrite s'accumule lors de situations d'hypoxie (Sturms *et al.*, 2011).

Les mitochondries peuvent également être une source de NO à plusieurs niveaux : cytochrome oxydase c (COX), cytochrome c, complexe III et peut être d'autres sites (Igamberdiev *et al.*, 2010). En effet les mitochondries purifiées de racines sont capables de réduire le nitrite en NO de manière dépendante de la CTE mitochondriale, (Gupta *et al.*, 2005 ; Planchet *et al.*, 2005 ; Gupta et Kaiser, 2010). Cette réduction est réalisée en l'absence d'oxygène par les deux oxydases terminales: la COX, dont la capacité à réduire le nitrite a été démontré sur l'enzyme *in vitro* (Basu *et al.*, 2008) et l'alternative oxydase (AOX), qui est activée par l'accumulation de NO et prend le relais de la COX dont l'activité peut être inhibée en cas de forte teneur en NO (Hachiya et Noguchi, 2011). La production de NO par la CTE est une source de NO lors de la symbiose comme cela a été démontré dans les nodosités de *M. truncatula* (Horchani *et al.*, 2011).

Enfin, le nitrite peut être réduit de manière non enzymologique. En conditions acides, le nitrite provenant du milieu extérieur est transformé acide nitreux (HNO<sub>2</sub>) qui se dissocie en NO et dioxyde d'azote (NO<sub>2</sub>) selon la réaction suivante (Yamasaki, 2000) :



Cette réaction est très lente mais elle peut être accélérée par des agents réducteurs, comme l'ascorbate (Yamasaki, 2000). La conversion chimique dans l'apoplasme du nitrite en NO dépend de l'acidité du pH et de l'accumulation du nitrite (Stöhr et Ullrich, 2002). Cette réaction a été montrée dans les graines en germination chez l'orge (*Hordeum vulgare*), (Bethke *et al.* 2004).

## 2-La voie oxydative

Malgré la disponibilité de nombreux génomes végétaux, aucune séquence ne présente d'homologie avec les NOS animales. Néanmoins, plusieurs éléments tendent à démontrer qu'il existe des "NOS-like" chez les végétaux. Premièrement, des protéines de maïs et de pois sont détectées par des anticorps de NOS animales, mais une analyse protéomique a révélé que

**Tableau 3** : Activité NOS reportées chez quelques plantes. Tiré de del Río *et al.*, 2004.

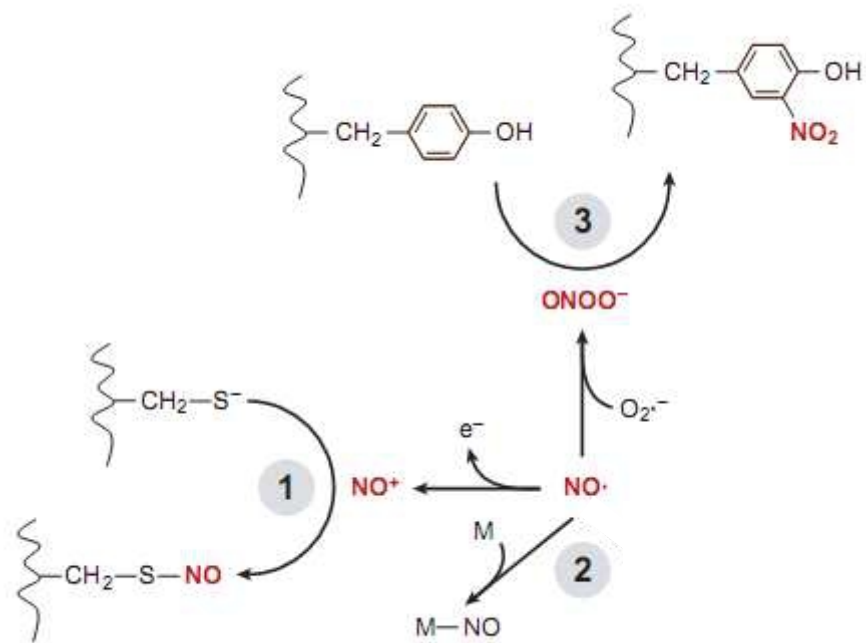
<b>Espèce/Tissu ou type cellulaire</b>	<b>Expérience</b>	<b>Référence</b>
<i>Pisum sativum</i> / Feuilles	Emission de NO sensible aux inhibiteurs NOS	Leshem et Haramaty, 1996
<i>Pisum sativum</i> / Peroxysomes foliaires	Test arginine-citrulline et RPE	Barroso <i>et al.</i> , 1999 ; Corpas <i>et al.</i> , 2004
<i>Lupinus albus</i> / Racines et nodosités	Test arginine-citrulline	Cueto <i>et al.</i> , 1996
<i>Mucuna hassjoo</i>	Test arginine-citrulline	Ninnemann et Maier, 1996
<i>Glycine max</i> / Cellules infectées par <i>Ps. syringae</i>	Production de NO sensible aux inhibiteurs NOS	Delledonne <i>et al.</i> , 1998
<i>Nicotiana tabacum</i> / Feuilles infectées par TMV	Test arginine-citrulline	Durner <i>et al.</i> , 1998
<i>Glycine max</i> / Axes embryonnaires	Activité NADPH-diaphorase	Caro et Puntarulo, 1999
<i>Zea mays</i> / Pointes racinaires et jeunes feuilles	Test arginine-citrulline	Ribeiro <i>et al.</i> , 1999
<i>Taxus brevifolia</i> / Cals	Production de NO sensible aux inhibiteurs NOS	Pedroso <i>et al.</i> , 2000
<i>Nicotiana tabacum</i> / Cellules épidermiques foliaires	Production de NO sensible aux inhibiteurs NOS	Foissner <i>et al.</i> , 2000
<i>Nicotiana tabacum</i> / Cultures cellulaires	Production de NO sensible aux inhibiteurs NOS	Tun <i>et al.</i> , 2001
<i>Arabidopsis</i> / Cultures cellulaires		
<i>Petrosilenum crispum</i> / Cultures cellulaires		
<i>Glycine max</i> / Cotylédons	Test arginine-citrulline	Modolo <i>et al.</i> , 2002
<i>Sorghum bicolor</i> L. / Graines	Activité NADPH-diaphorase et RPE	Simontacchi <i>et al.</i> , 2004

les protéines identifiées n'ont aucun lien avec le métabolisme du NO ce qui prouve le manque de spécificité de cette méthode (del Río *et al.*, 2004). Le deuxième argument est la validation fonctionnelle de l'activité NOS en suivant par radioactivité la conversion de L-[<sup>3</sup>H]arginine en L-[<sup>3</sup>H]citrulline, ou en suivant la production de NO en fournissant les substrats et les cofacteurs de NOS animales (Tableau 3, voir pour revue del Río *et al.*, 2004). Enfin, le troisième argument est que les inhibiteurs des NOS animales ont un effet inhibiteur sur la production de NO chez les plantes. Cet effet a été observé lors de la production de NO durant nombreux stress biotiques et abiotiques (Tableau 3, cités dans la revue del Río *et al.*, 2004). Cependant rien ne prouve que ces inhibiteurs soient réellement spécifiques chez les plantes (Besson-Bard *et al.*, 2008b).

Un candidat NOS a été identifiée chez *A. thaliana* : AtNOS1 dont le mutant est affecté dans la production de NO (Guo *et al.*, 2003). En réalité cette enzyme n'est pas capable de produire du NO et possède une activité GTPase, elle a donc été renommée AtNOA1 (pour NO associated) par la suite (Moreau *et al.*, 2008). Chez l'algue *Ostreococcus tauri*, une NOS a été trouvée avec 45% d'homologie de séquence protéique en comparaison aux NOS humaines. L'enzyme est fonctionnelle pour la production du NO et utilise la L-arginine comme substrat (Foresi *et al.*, 2010).

Dans le contexte de la symbiose, une activité NOS-like a été mesurée dans les racines et les nodosités du lupin (*Lupinus albus*) en suivant la conversion de de L-[<sup>14</sup>C]arginine en L-[<sup>14</sup>C]citrulline. La synthèse de L-[<sup>14</sup>C]citrulline est inhibée par le N -monométhyl-L-arginine (1-NMMA), un inhibiteur de NOS, ce qui renforce l'argument d'une activité de type NOS (Cueto *et al.*, 1996). L'utilisation de ce même inhibiteur de NOS empêche la détection du NO dans les coupes de nodosités de *M. truncatula* suggérant qu'une voie NOS-like pourrait participer à la production de NO dans les nodosités (Baudouin *et al.*, 2006). Dans les nodosités de soja, le N -nitro-L-argine (1-NNA), un autre inhibiteur de NOS engendre un effet inhibiteur sur la croissance et la viabilité des nodosités ; cet effet est reversé par l'application d'un donneur de NO 2,2-(hydroxynitrosohydrazono) bis-ethanimine (DETA-NO). Ces résultats suggèrent que le NO résultant probablement d'une activité de type NOS est nécessaire pour le développement et le fonctionnement des nodosités (Leach *et al.*, 2010).

Il a été montré, chez des plantules d'*Arabidopsis thaliana*, que l'ajout de PA, telles que la spermidine ou la spermine, stimule la production de NO (Tun *et al.* 2006). Par ailleurs, cette production de NO est sensible aux inhibiteurs d'activité NOS animales (2-aminoéthyl-2-thiopseudourea -AET), les auteurs en ont conclu qu'il existe une voie inconnue pour la synthèse de NO en réponse aux PAs (Yamasaki et Cohen, 2006). Les hydroxylamines peuvent



**Figure 15** : Modification post-traductionnelles des protéines. 1 : S-nitrosylation d'un résidu cystéine pour former un S-nitrosothiol. 2 : Métal-nitrosylation de protéines avec un centre ferrique, hémique ou à doit de zinc. 3 : Tyrosine nitration sur le carbone 3 du cercle aromatique des résidus tyrosine pour former du 3-nitro-tyrosines. Tiré de Besson-Bard *et al.*, 2008a.

également être une source de NO dans des conditions générant des espèces actives de l'oxygène (ROS) ou après ajout de peroxyde d'hydrogène (Rümer *et al.*, 2009).

## d) Les modifications post-traductionnelles des protéines

De part sa haute réactivité, le NO et les autres RNS, en particulier le peroxydinitrite, induisent des modifications spécifiques de certains acides aminés tels que les cystéines et les tyrosines (Figure 15), qui se traduisent par l'activation ou l'inactivation des protéines concernées (Besson-Bard *et al.*, 2008a ; Leitner *et al.*, 2009 ; Moreau *et al.*, 2010 ; Astier *et al.*, 2011 ; Gupta, 2011 ; Vandelle et Delledonne, 2011 ; Astier *et al.*, 2012). Les modifications post-traductionnelles des protéines sont de trois sortes : la métal-nitrosylation, la tyrosine-nitration et la S-nitrosylation.

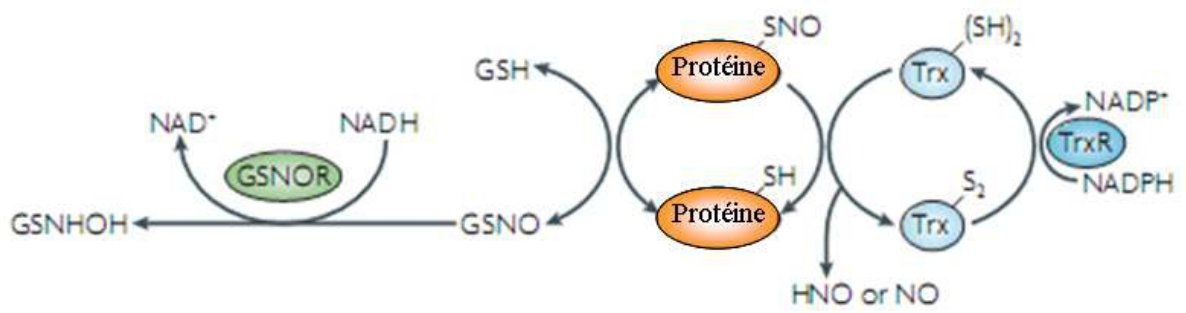
### 1-Métal-nitrosylation

La réaction de métal-nitrosylation consiste en une oxydation du NO qui transfère un électron à un métal de transition d'une métalloprotéine, pour former une liaison covalente avec ce métal (Figure 15). Cette réaction réversible concerne les protéines aux centres fer-soufre, cuivre, hémique ou à doigts de zinc (Besson-Bard *et al.*, 2008a). Une telle réaction se retrouve dans l'interaction du NO avec les formes oxygénées de la Lg, (Herold et Puppò, 2005) et de l'Hb de classe I (Igamberdiev *et al.* 2004a). Dans les deux cas, l'interaction conduit à la formation de nitrate et de metLb ou metHb. Ce processus permet de recycler le NO en nitrate pour réduire les niveaux intracellulaires de NO trop élevés qui causent des dommages importants aux cellules en particulier en condition hypoxiques (Besson-Bard *et al.*, 2008a).

### 2-Tyrosine-nitration

La nitration des résidus tyrosine a lieu sur le carbone 3 du cercle aromatique. Cette réaction, réalisée par le peroxydinitrite, conduit à la formation de résidus 3-nitro-tyrosine (3-NO<sub>2</sub>-Tyr) (Figure 15, Vandelle et Delledonne, 2011). Cette modification peut causer un gain de fonction comme c'est le cas du cytochrome c (Cassina *et al.*, 2000), ou à l'inverse une





**Figure 16** : Les mécanismes biochimiques de dénitrrosylation des protéines. Tiré de Benhar *et al.*, 2009.

perte de fonction comme pour la GSNOR (Savvides *et al.*, 2002). En plus de l'effet activateur ou inhibiteur sur l'activité des protéines ciblées, la tyrosine nitration a pour conséquence d'interférer avec la phosphorylation/déphosphorylation des tyrosines ce qui impact potentiellement sur un plus grand nombre de processus cellulaires (Gow *et al.*, 1996). D'un autre côté, la nitration des tyrosines mime l'effet d'une phosphorylation par ajout d'une charge négative similaire pouvant ainsi activer d'autres voies de signalisation activées par phosphorylation (Minetti *et al.*, 2002).

### 3-S-nitrosylation

La S-nitrosylation désigne la réaction du NO sur l'atome soufre d'un résidu cystéine pour former une liaison S-NO. Cette réaction résulte de l'attaque électrophile du cation nitrosonium  $\text{NO}^+$  sur le groupement thiolate (Figure 15). De manière moins fréquente, cette réaction peut également être causée par l'attaque nucléophile du  $\text{NO}^-$  sur le soufre ou de la réaction entre le radical thiyl ( $\text{RS}^\bullet$ ) et  $\text{NO}^\bullet$ . Certains résidus cystéines ne présentent pas des thiols suffisamment réactifs, dans ce cas le pont S-NO se forme par transnitrosylation qui correspond à l'échange direct de  $\text{NO}^+$  d'un groupement thiolate réactif vers la protéine ciblée (Astier *et al.*, 2011). Cette réaction concerne le GSNO qui résulte de la S-nitrosylation du GSH, constituant ainsi un réservoir endogène de donneur de NO. De plus, l'action de la GSNO réductase (GSNOR) permet d'enlever le NO du GSNO, ce qui contribue à la régulation de la teneur en S-nitrosothiols dans la cellule (Besson-Bard *et al.*, 2008a). En plus de ce mécanisme, le système enzymatique thiorédoxine (Trx)/thiorédoxine réductase (TrxR) permet de réguler spécifiquement la dénitrosylation (Figure 16, Benhar *et al.* 2009). Les Trx possèdent des groupements thiol capables de s'oxyder sous forme de ponts disulfure. Lorsque ceux-ci sont réduits (forme SH), les Trx peuvent interagir avec les protéines S-nitrosylées pour relarguer la protéine dénitrosylée, du HNO ou du NO, et la Trx oxydée (forme SS). La Trx oxydée est ensuite réduite par la TrxR, ce qui permet de régénérer le système. La liaison S-NO peut aussi être détruite de manière non spécifique par la chaleur, la lumière, les agents réducteurs intracellulaires (GSH, ascorbate) ou encore les ions métalliques réducteurs (cuivre, fer), (Behar *et al.*, 2009). La présence de ponts S-NO a un impact sur la formation de pont disulfures intra/inter protéines et donc sur l'activité de ces dernières. Parmi les protéines identifiées comme étant S-nitrosylées, certaines ont été étudiées plus finement pour déterminer l'impact de la modification post-traductionnelle sur la structure, la fonction et

**Tableau 4 :** Exemple de protéines régulées par S-nitrosylation chez les plantes. Tiré de Astier *et al.*, 2011.

Protéine Identifiée		Organisme	Effet de la S-nitrosylation	Références
Hémoglobine non symbiotique	AHb1	<i>A. thaliana</i>	Détoxification du NO	Perazzolli <i>et al.</i> , 2004
Prométacaspase 9	AtMC9	<i>A. thaliana</i>	Inhibition de la maturation et de l'activité	Belenghi <i>et al.</i> , 2007
S-adénosylméthionine synthétase 1	SAMS1	<i>A. thaliana</i>	Inhibition de l'activité	Lindermayr <i>et al.</i> , 2005
Peroxyrédoxine II E	PrxII E	<i>A. thaliana</i>	Inhibition de l'activité	Romero-Puertas <i>et al.</i> , 2007
MYB domain protein 2	AtMYB2	<i>A. thaliana</i>	Inhibition de la liaison à l'ADN	Serpa <i>et al.</i> , 2007
Non expressor of pathogenesis related genes 1	NPR1	<i>A. thaliana</i>	Changements conformationnels	Tada <i>et al.</i> , 2008
Salicylic acid-binding protein 3	AtSABP3	<i>A. thaliana</i>	Inhibition de l'activité et de la liaison au SA	Wang <i>et al.</i> , 2009
TGAGG motif binding factor 1	TGA1	<i>A. thaliana</i>	Changements conformationnels et dans la liaison à NPR1/ADN	Lindermayr <i>et al.</i> , 2010
Phytochélatines	PC	<i>A. thaliana</i>	Non déterminé	De Michele <i>et al.</i> , 2009, Elviri <i>et al.</i> , 2010
Glyceraldehyde-3-phosphate deshydrogénase	GAPDH	<i>A. thaliana</i>	Inhibition de l'activité	Lindermayr <i>et al.</i> , 2005, Holtgreffe <i>et al.</i> , 2008
Glyceraldehyde-3-phosphate deshydrogénase	GAPDH	<i>N. tabacum</i>	Inhibition de l'activité	Wawer <i>et al.</i> , 2010
Glycine décarboxylase	GDC	<i>A. thaliana</i>	Inhibition de l'activité	Palmieri <i>et al.</i> , 2010
Ribulose 1,5 biphosphate carboxylase/oxygénase	Rubisco	<i>K. pinnata</i>	Inhibition de l'activité	Abat <i>et al.</i> , 2007
Ribulose 1,5 biphosphate carboxylase/oxygénase	Rubisco	<i>B. juncea</i>	Inhibition de l'activité	Abat and Deswal, 2008

l'effet physiologique de ces protéines listées Tableau 4 (Astier *et al.*, 2011). Par exemple la S-nitrosylation d'Hb1 chez *Arabidopsis* permet de diminuer le NO lors du stress hypoxique (Perazzoli *et al.*, 2004).

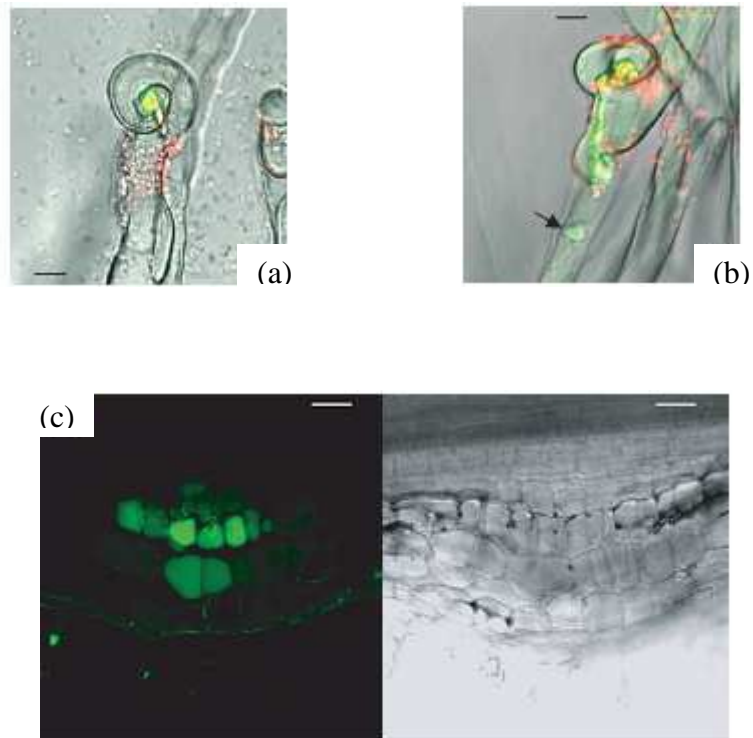
## e) Le NO dans la symbiose fixatrice d'azote

### 1-Présence du NO dans l'interaction symbiotique fixatrice d'azote

La présence de NO dans des interactions symbiotiques entre des légumineuses et des rhizobia a été mise en évidence pour la première fois à travers l'association du NO avec la Lb sous forme de complexe nitrosyl-Lb (LbNO), (Maskall *et al.*, 1977). La présence de ce complexe a ensuite été démontrée par spectroscopie de résonance paramagnétique électronique (RPE), en particulier dans les nodosités de soja (*G. max*), de niébé (*Vigna unguiculata*) et de pois (*Pisum sativum*) (Maskall *et al.*, 1977 ; Kanayama *et al.*, 1990 ; Mathieu *et al.*, 1998 ; Herold et Puppo, 2005 ; Meakin *et al.*, 2007 ; Sanchez *et al.*, 2010). La présence de NO a également été mise en évidence dans des nodosités de luzerne (*M. truncatula*), (Baudouin *et al.*, 2006, del Giudice *et al.*, 2011) et de lotier (*L. japonicus*), (Shimoda *et al.*, 2009), à l'aide des sondes fluorescentes DAF-2 et DAR-4M, respectivement.

Les travaux menés sur la symbiose fixatrice d'azote montrent que le NO est présent dès le début de l'interaction et tout au long du processus symbiotique. Ainsi, lors de l'interaction entre *L. japonicus* et *M. loti*, une production de NO a été détectée dès 4 h post-inoculation (Shimoda *et al.*, 2005). Le NO semble jouer un rôle clé dans l'établissement de la symbiose comme l'ont démontré del Giudice *et al.* (2011). Du NO est détecté dans les étapes précoces (de 2 à 6 jours après inoculation) en particulier dans l'espace apoplastique enroulé par la courbure du poil absorbant de la « crosse de berger » (Figure 17a), les cordons d'infection (Figure 17b) et les cellules corticales des primordium nodositaires (Figure 17c). De manière générale, le NO a été révélé dans les nodosités de *M. truncatula* et *M. sativa* (Pii *et al.*, 2007).

La présence de NO a aussi été mise en évidence dans la zone III, de fixation de l'azote, de nodules fonctionnels contenant des bactéroïdes de *M. truncatula/Sinorhizobium meliloti*, ce qui permet de penser que, dans la nodosités fixatrice, le NO a une fonction en lien avec la fixation de l'azote (Baudouin *et al.*, 2006). Le rôle du NO dans la sénescence des nodosités a



**Figure 17** : Détection de la présence de NO par microscopie confocale lors des premières étapes de la symbiose entre *Medicago truncatula* et *Sinorhizobium meliloti*. La fluorescence verte correspond au NO détecté par la sonde DAF2-DA. La coloration rouge marque les bactéries "étiquetées" avec la protéine RFP (GFP rouge). (a) Observation de la fluorescence sur une « crosse de berger ». (b) Observation de la fluorescence dans les cordons d'infection. Barres : 10  $\mu$ m. (c) Observation de la fluorescence dans les cellules corticales du primordium nodositaire (gauche) ; image en transmission (droite). Barre : 50  $\mu$ m. Tiré de Del Giudice *et al.*, 2011.

également été récemment mis en évidence dans des nodosités de *M. truncatula* (Cam *et al.*, 2012).

## 2-Réponse du partenaire plante au NO

Un certain nombre d'analyses transcriptomiques ont été menées pour identifier les gènes régulés par le NO chez les plantes. L'une d'entre elle a été réalisée sur des racines de *M. truncatula* traitées par des donneurs de NO (sodium nitroprusside – SNP et GSNO), (Ferrarini *et al.*, 2008). Celle-ci a permis de sélectionner 999 gènes répondant au NO, dont, 290 sont exprimés différemment durant le développement de la jeune nodosité *M. truncatula/S. meliloti* (durant les 10 premiers jours), ce qui conforte l'hypothèse que le NO participe au développement nodositaire (Ferrarini *et al.*, 2008).

Parmi les gènes régulés par le NO lors de la symbiose, plusieurs gènes impliqués dans la biosynthèse des flavonoïdes (dont la chalcone synthase) sont induits par le NO. Le NO stimule l'expression de plusieurs kinases, récepteurs kinases et facteurs de transcription dans les jeunes nodosités (10 jours) ce qui concorde avec les nombreuses modifications nécessaires au développement des racines durant le phénomène de nodulation. La signalisation redox joue aussi un rôle clé dans la mise en place de nodules fonctionnels. La GSH synthétase, connue pour être impliquées dans le contrôle de réponses redox cellulaire mais aussi dans le développement des nodosités, est induite par le NO. La régulation positive par le NO de l'expression de deux gènes impliqués dans la génération d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (une peroxydase et une oxalate oxidase germinale-like) suggère qu'il existe un croisement possible entre les voies de signalisation NO et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Enfin, le métabolisme primaire est affecté dans le processus de nodulation comme le montre l'activation de nombreux gènes correspondant à des protéines ribosomiques et la stimulation des enzymes glutamine et asparagine synthase ainsi que celle d'un transporteur d'acide aminés. De plus, le catabolisme des sucres permet de fournir des acides di-carboxyliques au bactéroïde. Ceci est illustré par l'induction par le NO de deux sucrose synthases et un transporteur de saccharose ainsi que plusieurs enzymes impliquées dans la glycolyse et la biosynthèse d'acides di-carboxyliques comme la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, l'isocitrate déshydrogénase ou la malate déshydrogénase.

Une autre étude qui porte sur les étapes précoces de l'infection et du développement nodositaire dans l'interaction *M. truncatula/S. meliloti* a montré que deux gènes *MtCRE1* et *MtCCS52A* sont régulés positivement par le NO (del Giudice *et al.*, 2011). *MtCRE1* code pour



un récepteur aux cytokinines qui module la progression de l'infection et la formation du primordium nodositaire. MtCCS52A est impliquée dans la transition de cycles mitotiques vers des cycles d'endoréduplication nécessaires pour la différenciation des cellules symbiotiques. Chez *L. japonicus*, *LjHb1* est régulé positivement par le NO et par l'inoculation avec son partenaire *M. loti* (Shimoda *et al.*, 2005).

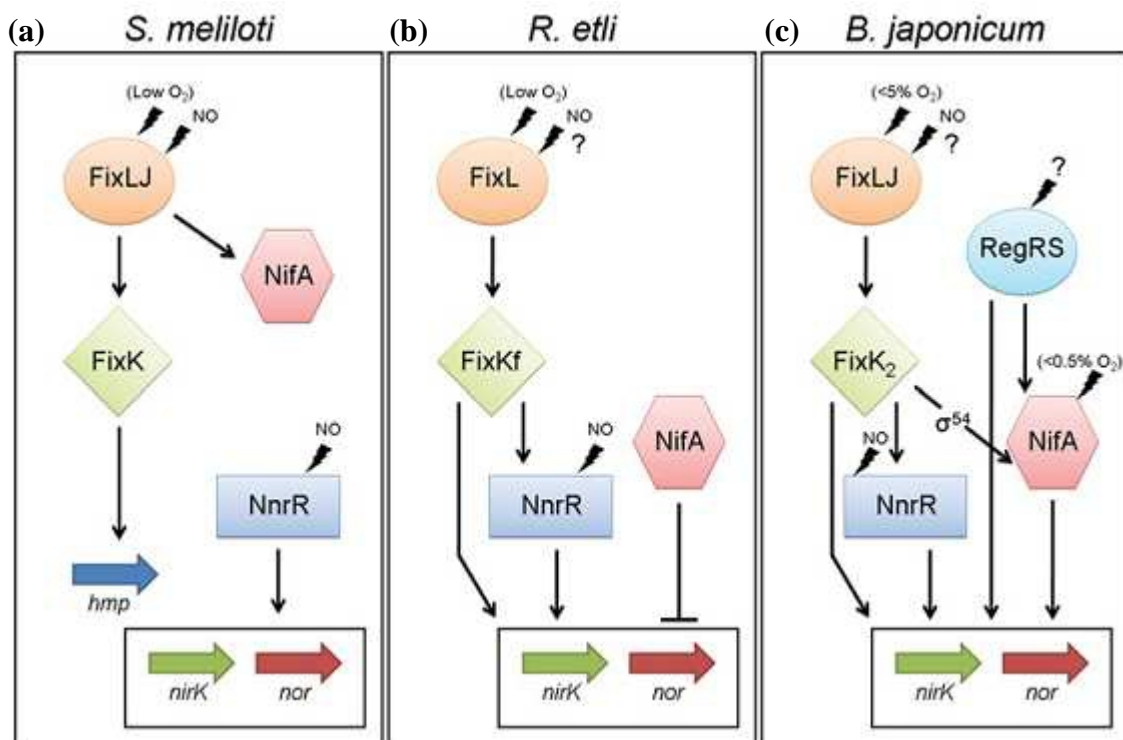
### 3-Réponse du partenaire bactérien au NO

Le NO est un composé toxique pour les bactéries qui doivent développer des mécanismes de défense contre lui en le neutralisant ou le dégradant (Cabrera *et al.*, 2011). Ainsi, la réponse du partenaire symbiotique bactérien au NO ont été étudiées en culture libre chez plusieurs bactéries fixatrices d'azote telles que *S. meliloti* (partenaire de la luzerne), *Bradyrhizobium japonicum* (partenaire du soja) et chez *Rhizobium etli* (partenaire du haricot) (Cabrera *et al.*, 2011 ; Gómez-Hernández *et al.*, 2011 ; Meilhoc *et al.*, 2011 ; Torres *et al.*, 2011). En revanche, l'étude transcriptomique complète pour identifier les gènes répondant au NO n'a été menée que chez *S. meliloti* (Meilhoc *et al.*, 2010).

L'analyse transcriptomique de la réponse au NO de *S. meliloti* a montré qu'une centaine de gènes sont induits spécifiquement par le NO (Meilhoc *et al.*, 2010). Un important recouvrement (70 %) est retrouvé entre les gènes activés par le NO et par les conditions microaérobiques. Parmi les gènes induits par le NO, des gènes de la voie de dénitrification (ou en lien avec la dénitrification) ont été identifiés comme la NO réductase (*Nor*). La voie de dénitrification a pour fonction principale fournir des accepteurs d'électrons en condition microaérobiques (Zumft, 1997). Un autre gène induit par le NO (*sma1195*) est similaire à *ytfE* d'*Escherichia coli*, connu pour avoir une fonction réparatrice des dommages aux protéines à centre ferriques causés par le stress oxydatif ou nitrosatif (Overton *et al.*, 2008). Enfin, cette étude a révélé l'induction par le NO du gène *Hmp* codant pour une flavohémoglobine qui participe à la détoxification du NO et joue un rôle important pour la capacité fixatrice de la bactérie (voir pour revue Bonamore et Boffi, 2008). Parmi les gènes induits par le NO, beaucoup sont régulés par le système FixLJ et en particulier ses cibles directes NifA et FixK ce qui montre l'action du NO au niveau de FixLJ.

Ce système est un régulateur majeur qui contrôle les deux-tiers des gènes induits en conditions micro-oxiques et la majorité des gènes rhizobiens exprimés dans la plante (Bobik *et al.*, 2006). Les faibles PO<sub>2</sub> sont perçues par FixL, une histidine kinase, qui





**Figure 18 :** Comparaison des cascades de signalisation du NO chez (a) *S. meliloti*, (b) *Rhizobium etli* et (c) *Bradyrhizobium japonicum*. Tiré de Cabrera *et al.*, 2011.

s'autophosphoryle et transfère le groupement phosphate à FixJ, un régulateur qui active à son tour l'expression de FixK et de NifA qui sont des régulateurs responsables de l'activation des gènes *fix* (respiration) et *nif* (fixation de l'azote), respectivement. Le régulateur NnrR est aussi impliqué dans la réponse au NO et régule une partie des gènes induits par le NO (Meilhoc *et al.*, 2010). NnrR est un facteur de transcription, déjà connu pour répondre au NO, qui active l'expression de gènes comme la nitrite (*NirK*) ou la NO (*Nor*) réductase (Figure 18a).

Chez *R. etli* la réponse au NO a été moins étudiée que chez *S. meliloti* et *B. japonicum* (Meilhoc *et al.*, 2011). Une partie de la voie de dénitrification, en particulier la NR (*Nap*), est absente chez cette bactérie qui n'est donc pas capable d'utiliser le nitrate pour la respiration (Gómez-Hernández *et al.*, 2011). Dans ce cas, la réponse à la microoxie est médiée par FixL (pas d'homologue de FixJ chez *R. etli*), qui régule à son tour FixKf. Ce dernier active l'expression de NnrR. Chez *R. etli*, la réponse au NO est régulée par NnrR (Figure 18b), (Gómez-Hernández *et al.*, 2011). Chez *B. japonicum*, l'expression des gènes *Nor* en réponse aux conditions microoxiques ou au NO est contrôlée par deux cascades de signalisation : les systèmes FixLJ/FixK<sub>2</sub>-NnrR et RegSR/NifA (Torres *et al.*, 2011). Contrairement à *S. meliloti*, NnrR est sous le contrôle de FixK<sub>2</sub>. L'expression de *nirK* et *nor* a besoin du régulateur NifA (Figure 18c), (Torres *et al.*, 2011).

#### 4-Rôle du NO dans la symbiose

Le rôle du NO dans la symbiose peut être étudié en modulant son niveau dans les nodosités, soit par des approches pharmacologiques avec des donneurs, des piègeurs ou des effecteurs du NO, soit par des approches génétiques (transformation, RNAi, mutants) en sur-exprimant ou sous-exprimant des protéines impliquées dans le métabolisme du NO ou la transduction de son signal. Une émission de NO très précoce a été observée lors de l'interaction entre le lotier (*L. japonicus*) et *M. loti*, ce qui suggère que cette production de NO résulte de la l'interaction entre les deux partenaires (Shimoda *et al.*, 2005).

Le NO est présent dès la formation de la poche d'infection, lors de la formation du cordon d'infection et dans les cellules corticales des primordium nodositaires (del Giudice *et al.*, 2011). En diminuant le niveau de NO chez la plante (par un piègeur de NO, le cPTIO et par sur-expression du gène *hmp* bactérien qui catabolise le NO), les auteurs ont observé un



retard de nodulation et une diminution de l'expression de gènes nécessaires dans les étapes précoces de l'interaction et de l'organogénèse de la nodosité. De la même manière, pour le partenaire bactérien, des souches de *S. meliloti* qui surexpriment *hmp* sont moins compétitives que la souche sauvage pour initier une symbiose (del Giudice *et al.*, 2011). Ces résultats montrent que, pour les deux partenaires, la présence de NO est nécessaire au bon déroulement du processus d'infection lors des premières étapes.

De manière générale, le NO est nécessaire à la formation de la nodosité de type indéterminée. Pii *et al.* (2007) ont montré que la production de NO est plus élevée dans les nodosités sur-produisant de l'auxine IAA (acide indole-3-acétique) et que cela a pour conséquence d'augmenter le nombre de nodosités et la croissance latérale des racines. L'effet inverse est observé lors de la diminution du niveau de NO par le cPTIO, qui contrecarre l'effet de l'auxine. Ces données montrent également l'importance du NO dans la formation des nodosités de type indéterminées.

Dans les nodosités de *M. truncatula/S. meliloti*, le NO joue aussi un rôle dans les étapes tardives, en particulier dans le contrôle de l'entrée en sénescence. En effet, l'augmentation de la teneur en NO conduit à une baisse de la fixation de l'azote et à une entrée en sénescence (Cam *et al.*, 2012). Le NO semble donc agir comme un signal local aussi bien dans le développement de la nodosité que dans la sénescence induite par le stress.

Enfin dans les nodosités fonctionnelles de *M. truncatula*, la présence de NO dans les cellules de la zone III contenant des bactéroïdes fixateurs suggère qu'il pourrait jouer un rôle en relation avec la fixation de l'azote (Baudouin *et al.*, 2006). L'étude du rôle du NO dans les nodosités du lotier a montré que l'augmentation de la teneur en NO dans les nodosités inhibe la fixation de l'azote (Shimoda *et al.*, 2008). Inversement, en diminuant le niveau de NO, par surexpression d'Hb1 ou en présence de cPTIO, la fixation de l'azote est stimulée. Selon Shimoda *et al.* (2008), Hb1 permettrait de détoxifier le NO (en le piégeant) pour éviter son effet inhibiteur sur la nitrogénase. La formation de complexe Lb-NO a été observée dans les nodosités de soja (Meakin *et al.*, 2007 ; Sanchez *et al.*, 2010), en particulier lors de situations d'hypoxie où la production de NO est accrue. En effet, les auteurs ont observé dans les deux études un niveau élevé de complexe Lb-NO lors de l'hypoxie. La formation de ce complexe proviendrait de l'accumulation du NO produit par la voie de dénitrification bactéroïdienne et dépendrait de l'activité NR (Sanchez *et al.*, 2010).



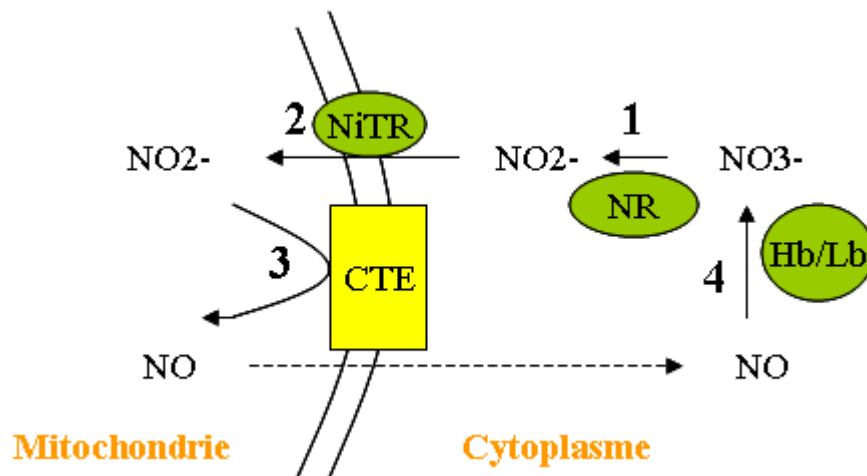
## f) La respiration Nitrate-NO

Outre son rôle de molécule signal qui régule de nombreux processus cellulaires, il a été montré que le NO joue un rôle crucial dans le métabolisme pour régénérer l'ATP cellulaire en condition d'hypoxie (Igamberdiev et Hill, 2009 ; Gupta *et al.*, 2011b ; Igamberdiev *et al.*, 2010).

En effet, Dordas *et al.*, (2003) ont constaté que la production de NO est plus élevée en hypoxie qu'en normoxie. Les Hbs sont connues pour former un complexe avec le NO (voir paragraphe précédent). Les auteurs ont montré qu'en l'absence d'Hb, le niveau d'ATP diminue de manière significative lors de l'hypoxie. A partir de ces observations, les auteurs ont posé l'hypothèse selon laquelle le NO serait impliqué dans la réponse des plantes à l'hypoxie et que les Hbs joueraient le rôle de modulateur du niveau de NO lors de l'hypoxie. Cette hypothèse a été renforcée par les travaux de Dordas *et al.*, (2004) qui ont montré qu'en anoxie l'interaction de l'Hb avec le NO permet de former du nitrate et de la metHb. De plus, le NO produit en anoxie provient du nitrate comme le montre les expériences avec du  $^{15}\text{NO}_3^-$ . (Dordas *et al.*, 2004). Planchet *et al.*, (2005) ont ensuite montré que le NO produit en hypoxie provenait de la réduction du  $\text{NO}_3^-$  en  $\text{NO}_2^-$ , puis de la réduction du nitrite par la CTE mitochondriale.

Stoimenova *et al.*, (2007) ont démontré qu'en condition d'anaérobie et en présence de pouvoir réducteur (NAD(P)H), les mitochondries purifiées d'orge et de riz sont capables d'utiliser le nitrite comme accepteur terminal de la CTE pour le réduire en NO, générer un gradient de proton nécessaire au fonctionnement de l'ATPase mitochondriale et produire de l'ATP. Tischner *et al.*, (2004) avaient déjà montré que l'émission de NO par les cellules de *Chlorella sorokiniana* dépendait du fonctionnement de la CTE. La production de NO par les mitochondries de racines à partir de nitrite et de NADH en condition d'anoxie a été mise en évidence chez plusieurs plantes comme le tabac (Planchet *et al.*, 2005 ; Gupta *et al.*, 2005), le riz (Stoimenova *et al.*, 2007), et l'orge (Gupta *et al.*, 2010 ; Stoimenova *et al.*, 2007).

Le NO ainsi produit est oxydé en nitrate par les Hb1 qui sont induites lors du stress hypoxique (Igamberdiev et Hill, 2004b). Ces données ont conduit au modèle de la "respiration nitrate-NO", appelée aussi cycle Hb/NO. Ce serait le mécanisme central qui permettrait de maintenir l'état énergétique et redox de la cellule en situation d'hypoxie et prolongerait sa survie (Igamberdiev et Hill, 2004b ; Igamberdiev *et al.*, 2005, 2010 ; Gupta *et al.*, 2011a).



**Figure 19** : La respiration nitrate-NO. NR : nitrate réductase, NiTR : nitrite transporteur, CTE : chaîne de transfert des électrons, Hb : hémoglobine, Lb : leghémoglobine. Adapté de Horchani *et al.*, 2011.

Ainsi, la respiration nitrate-NO, qui permet de régénérer une partie de l'ATP, fonctionne selon un cycle constitué de quatre étapes: 1) le nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) est réduit en nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) dans le cytosol par la NR ; 2) le  $\text{NO}_2^-$  est transporté du cytosol dans la mitochondrie par l'intermédiaire d'un (ou plusieurs) transporteur(s); 3) le  $\text{NO}_2^-$  est réduit en NO par les électrons de la chaîne respiratoire (permettant ainsi le fonctionnement de la respiration et la régénération de l'ATP); et 4) le NO diffuse librement vers le cytosol où il est oxydé en  $\text{NO}_3^-$  par l'Hb1/Lb (Figure 19).

Deux arguments ont conduit à poser l'hypothèse du fonctionnement de la respiration nitrate-NO dans les nodosités de *M. truncatula/S. meliloti*. Premièrement, les nodosités sont des organes fortement microoxiques (Hunt *et al.*, 1988), qui ont de très forts besoins en énergie pour assurer le fonctionnement du métabolisme de la fixation de l'azote (Udvardi et Day, 1997). Dans le même temps, une forte production de NO a été observée dans la zone III des nodosités matures (Baudouin *et al.*, 2006). La présence d'une respiration nitrate-NO pourrait expliquer comment le métabolisme actif de fixation de l'azote pourrait fonctionner dans un organe fortement microoxique.





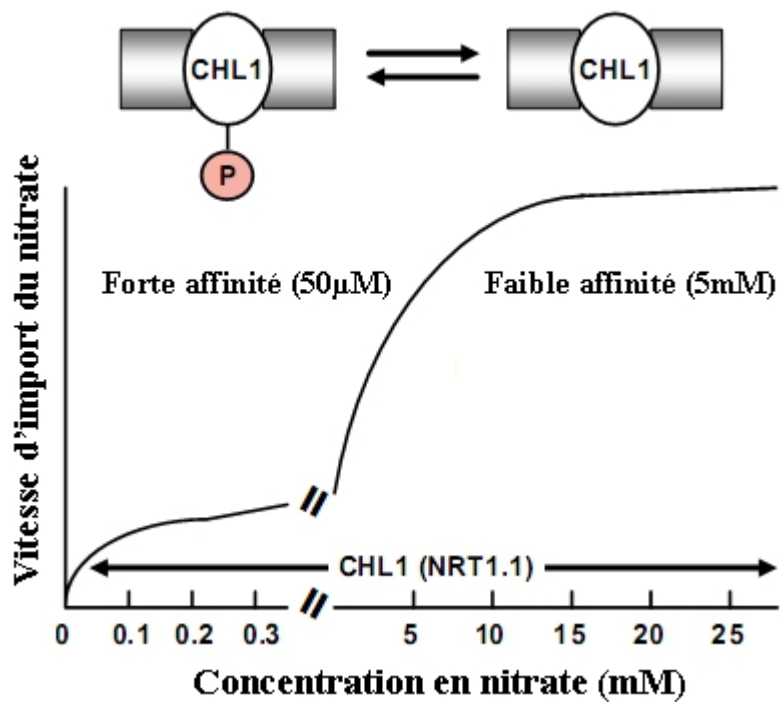
## C-Le transport nitrate/nitrite

Dans le schéma de fonctionnement de la respiration nitrate-NO, le nitrite doit traverser les membranes mitochondriales pour parvenir au site de la COX et être réduit en NO par les électrons de la chaîne respiratoire. Le nitrite est une molécule chargée qui ne peut pas diffuser à travers la membrane interne. Elle nécessite donc l'aide d'un transporteur pour aller à l'encontre du gradient électrochimique et passer du cytosol dans la matrice. Dans la majorité des cas répertoriés chez les végétaux, le nitrite est transporté par l'intermédiaire de transporteurs nitrate (NRT, nitrate transporter).

Chez les plantes, la principale source d'azote est le nitrate présent dans le sol. Pour être assimilé, le nitrate est transporté à travers la membrane plasmique (PM) pour atteindre le cytoplasme où il est réduit en nitrite par la NR. Puis, celui-ci est transporté dans le plaste où il est réduit en  $\text{NH}_4^+$  par la nitrite réductase (NiR). Le transport du nitrate est une étape clé dans l'assimilation du nitrate car il doit permettre l'import du nitrate du sol de manière efficace (Galván et Fernández, 2001). Ceci explique le nombre important de NRTs présents dans le génome végétal: par exemple, 60 gènes *Nrt* sont identifiés chez *A. thaliana*, et 80 chez le riz (Tsay *et al.*, 2007). Chez les Eucaryotes, NRTs sont divisés en deux groupes sur la base de leur séquence : *Nrt1* et *Nrt2* (Galván et Fernández, 2001). En plus des NRTs, les canaux à chlorures (CIC), qui transportent de manière générale des anions ou des cations, peuvent dans certains cas transporter le nitrate et même si cela n'a pas été montré, il est possible qu'ils puissent transporter du nitrite (De Angeli *et al.*, 2006).

### a) Le transport du nitrate chez les Eucaryotes

Sur le plan physiologique, les NRTs sont classés selon leur affinité. On distingue les transporteurs à forte affinité (H, high) qui peuvent être inductibles (iHANT) ou constitutifs (cHANT), et les transporteurs à faible affinité (L, low), également inductibles ou constitutifs (iLANT et cLANT). Les HANTs sont fonctionnels avec de faibles concentration en nitrate (<250  $\mu\text{M}$ ), alors que les LANTs ont besoin de fortes concentrations externes en nitrate (>1 mM) pour être actifs. Les deux groupes de gènes *Nrt1* et *Nrt2* sont respectivement associés au LANT et au HANT (Galván et Fernández, 2001). Les deux familles transportent le nitrate en même temps qu'un proton dans un mécanisme de symport possible grâce au gradient de pH à



**Figure 20** : Transport du nitrate par CHL1 (AtNRT1.1) d'*Arabidopsis thaliana*. CHL1 est un transporteur à double affinité impliqué à la fois dans le transport à forte et à faible affinité du nitrate. Le passage d'un mode de transport à l'autre se fait par un mécanisme de phosphorylation/déphosphorylation. Tiré de Tsay *et al.*, 2007.

travers les membranes (Miller *et al.*, 2007). Les transporteurs NRTs ont une sélectivité pour le nitrate mais peuvent aussi transporter d'autres anions comme le nitrite ou le chlorate avec une efficacité plus ou moins importante selon les cas. Par exemple, AtNRT1.1 transporte du nitrate et du chlorate (Tsay *et al.*, 1993) et BnNRT1.2 transport du nitrate, l'histidine et dans une moindre mesure les acides aminés basiques (arginine et lysine) (Zhou *et al.*, 1998).

## 1-Les transporteurs de nitrate de type NRT1

Les transporteurs de type NRT1 appartiennent à la famille protéique des transporteurs d'oligopeptides protons-dépendants (POT ou PTR). Ces protéines ont une structure constituée de 12 hélices transmembranaires (TM) avec une boucle cytosolique qui sépare les 6 premières hélices des autres. Deux motifs caractérisent cette famille : le motif PTR1 localisé entre les TM2 et 3[GA]-[GAS]-[LIVMFYWA]-[LIVM]-[GAS]-D-x-[LIVMFYWT]-[LIVMFYW]-G-x<sub>3</sub>-[TAV]-[IV]-x<sub>3</sub>-[GSTAV]-x-[LIVMF]-x<sub>3</sub>-[GA], et le motif PTR2 dans le domaine TM5 [FYT] -x<sub>2</sub>-[LMFY]-[FYV]-[LIVMFYWA]-x-[IVG]-N-[LIVMAG]-G-[GSA] - [LIMF] - [FYT] - x<sub>2</sub> -[LMFY]-[FYV]-[LIVMFYWA]-x-[IVG]-N-[LIVMAG]-G-[GSA]-[LIMF], (Okamoto *et al.*, 2003).

Le premier membre identifié de cette famille est *AtNrt1.1* d'*A. thaliana* (Tsay *et al.*, 1993). Il est aussi appelé *Chl1* car le mutant de ce gène est résistant au chlorate. Cette résistance est due au fait que ce mutant est affecté dans le transport du chlorate, mais aussi du nitrate. Le transport du nitrate/chlorate a été caractérisé par l'expression hétérologue en œufs de Xénope (Tsay *et al.*, 1993). AtNRT1.1 présente une activité de LANT, mais il a été démontré comme ayant une activité HANT (Liu *et al.*, 1999). En effet, l'activité d'AtNRT1.1 présente deux phases d'import du nitrate: une à faible affinité (Km = 4 mM) et une de forte affinité (Km = 50 µM). Par conséquent il a été qualifié de transporteur à double affinité (Liu *et al.*, 1999). Chez AtNRT1.1, le passage d'un mode de transport de faible affinité à un transport de forte affinité est régulé par la phosphorylation de la thréonine 101 (Figure 20, Liu et Tsay, 2003). Cette double affinité permet à la cellule de réagir rapidement lorsque les concentrations en nitrate fluctuent dans le sol. L'expression abondante du gène dans les pointes de racine et sa localisation au niveau de la PM semblent indiquer que NRT1.1 jouerait un rôle dans l'import du nitrate (Liu et Tsay, 2003).

D'autres transporteurs NRT1 ont été identifiés chez les végétaux (Tableau 5). Chez *A. thaliana*, 53 gènes *Nrt1* ont été identifiés dans le génome, dont plus d'une dizaine ont été

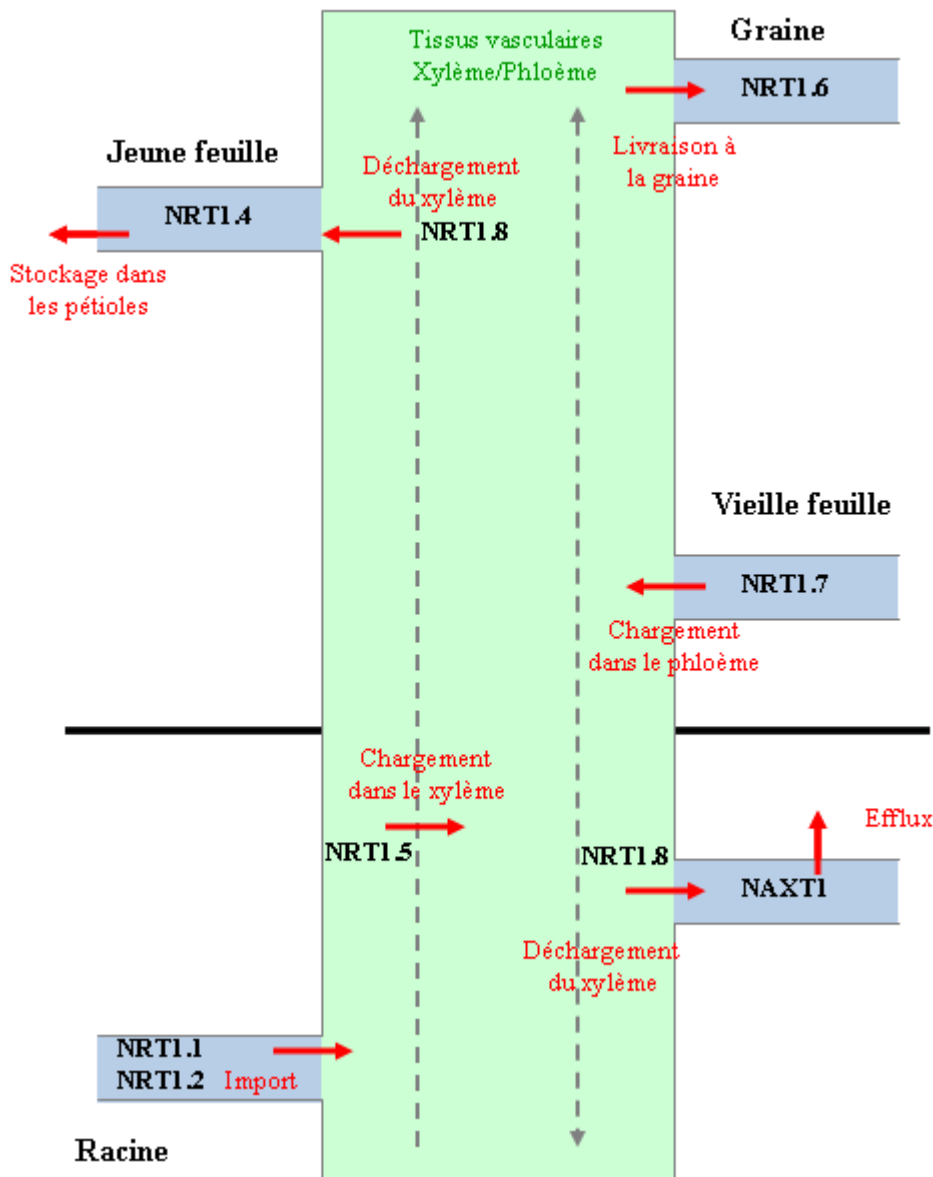
**Tableau 5 :** Quelques membres NRT1 identifiés chez les végétaux. Liste non exhaustive. ND : non déterminé, LANT : transporteur nitrate à faible affinité, HANT : transporteur nitrate à forte affinité.

Nom	Code (GenBank)	gène	Organisme	Régulation	Substrat	Fonction	Références
<i>AtNrt1.1</i>	Q05085		<i>Arabidopsis thaliana</i>	induit nitrate	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /ClO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	LANT/HANT	Tsay <i>et al.</i> , 1993
<i>AtNrt1.2</i>	AF073361		<i>Arabidopsis thaliana</i>	constitutif	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	LANT	Huang <i>et al.</i> , 1999
<i>AtNrt1.3</i>	AB019232		<i>Arabidopsis thaliana</i>	induit absence nitrate	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	LANT	Okamoto <i>et al.</i> , 2003
<i>AtNrt1.4</i>	AC003105		<i>Arabidopsis thaliana</i>	ND	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	LANT	Chiu <i>et al.</i> , 2004
<i>AtNrt1.5</i>	NM_102980		<i>Arabidopsis thaliana</i>	induit nitrate	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	LANT	Lin <i>et al.</i> , 2008
<i>AtNrt1.6</i>	EU266070		<i>Arabidopsis thaliana</i>	induit nitrate	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	LANT	Almagro <i>et al.</i> , 2008
<i>AtNrt1.7</i>	NM_105655		<i>Arabidopsis thaliana</i>	ND	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	LANT	Fan <i>et al.</i> , 2009
<i>AtNrt1.8</i>	NM_118288		<i>Arabidopsis thaliana</i>	induit nitrate	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	LANT	Li <i>et al.</i> , 2010
<i>BcNrt1</i>	JF439305		<i>Brassica campestris</i>	induit nitrate	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /ClO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	LANT	Yang <i>et al.</i> , 2012
<i>BnNrt1.2</i>	U17987		<i>Brassica napus</i>	induit nitrate	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /histidine	LANT	Zhou <i>et al.</i> , 1998
<i>MtNrt1.3</i>	GU966590		<i>Medicago truncatula</i>	induit absence nitrate	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	LANT/HANT	Morère-Le Paven <i>et al.</i> , 2011
<i>Latd/Nip</i>	GQ401665		<i>Medicago truncatula</i>	constitutif	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /ClO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	HANT	Bagchi <i>et al.</i> , 2012
<i>LeNrt1.1</i>	X92853		<i>Lycopersicon esculentum</i>	constitutif	ND	ND	Lauter <i>et al.</i> , 1996
<i>LeNrt1.2</i>	X92852		<i>Lycopersicon esculentum</i>	induit nitrate	ND	ND	Lauter <i>et al.</i> , 1996
<i>OsNrt1.1</i>	RICR2778 (EST)		<i>Oryza sativa</i>	constitutif	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	LANT	Lin <i>et al.</i> , 2000

caractérisés fonctionnellement (Tsay *et al.*, 2007). C'est le cas d'*AtNrt1.2* (*Nt11*) qui code pour un cLANT exprimé de manière prédominante dans l'épiderme racinaire et les poils absorbants (Huang *et al.*, 1999). L'étude phénotypique du mutant indique qu'il jouerait un rôle dans l'import du nitrate du sol. Le gène *AtNrt1.3* (*Npt3*), réprimé en présence de nitrate et induit en son absence, présente le profil d'un iLANT (Okamoto *et al.*, 2003). *AtNRT1.4* (*NPT2*) est un transporteur de type cLANT responsable de l'accumulation du nitrate dans les pétioles, ce qui lui confère un rôle dans le stockage du nitrate et donc dans l'homéostasie du nitrate (Chiu *et al.*, 2004).

Certains transporteurs sont aussi capables d'export comme c'est le cas de *AtNRT1.5*, un iLANT capable à la fois d'importer et d'exporter le nitrate de manière proton-dépendante. C'est donc un transporteur bidirectionnel (Lin *et al.*, 2008). Son expression dans les cellules du péricycle racinaire proche du xylème et le phénotype du mutant du gène *AtNrt1.5*, altéré dans le transport du nitrate de la racine vers la feuille, suggèrent que ce transporteur aurait un rôle dans le chargement du nitrate dans le xylème (Lin *et al.*, 2008). En plus d'*AtNRT1.5*, il a été montré qu'un autre membre de la famille NRT1 d'*A. thaliana*, le transporteur NAXT1 (Nitrate Excretion Transporter1), possède une activité d'efflux de nitrate (Segonzac *et al.*, 2007). Son expression dans le cortex racinaire et sa localisation à la PM sont cohérents avec son activité d'export en milieu acide du nitrate vers l'extérieur. A l'opposé de *AtNRT1.5*, *AtNRT1.8* aurait pour fonction de décharger le nitrate du xylème (Li *et al.*, 2010). En effet, ce gène est exprimé dans le parenchyme xylémique et le mutant présente un phénotype d'accumulation de nitrate dans le xylème. Ce transporteur iLANT est induit par le nitrate et présente un profil de régulation opposé à *AtNrt1.5* lors de nombreux stress environnementaux, ce qui suggère que ces deux transporteurs auraient un rôle opposé (Li *et al.*, 2010).

*AtNrt1.6* est exprimé uniquement dans les fleurs et les siliques, et plus fortement après pollinisation (Almagro *et al.*, 2008). Plus précisément, le gène s'exprime dans les tissus vasculaires et les funicules, ce qui suggère qu'*AtNRT1.6* serait impliqué dans le transport du nitrate du tissu maternel vers l'embryon en développement. Cette hypothèse est renforcée par l'analyse du mutant qui présente un fort taux de graines avortées: les graines produites ont une teneur réduite en nitrate et le développement de l'embryon est altéré (Almagro *et al.*, 2008). L'étude d'*AtNrt1.7* a montré que ce transporteur est exprimé dans le phloème surtout des vieilles feuilles et serait impliqué dans la remobilisation du nitrate des feuilles âgées vers les jeunes feuilles, en facilitant le chargement du nitrate dans le phloème (Fan *et al.*, 2009). Cette hypothèse est soutenue par l'analyse phénotypique du mutant qui accumule le nitrate dans ces feuilles âgées, incapable de remobiliser le nitrate vers jeune feuilles (Fan *et al.*, 2009).



**Figure 21 :** Représentation schématique de la circulation du nitrate dans la plante *Arabidopsis*. NRT1.1 et NRT1.2 sont responsables de l'import de faible affinité du nitrate du sol. NRT1.4 a un rôle de stockage du nitrate dans les pétioles. NRT1.5 permet de charger le nitrate dans le xylème pour alimenter ainsi les parties aériennes tandis que NRT1.8 a pour fonction de décharger le nitrate du xylème. NRT1.6 est impliqué dans le transport du nitrate du tissu maternel vers l'embryon en développement. NRT1.7 permet le chargement du nitrate dans le phloème facilitant ainsi la remobilisation du nitrate des feuilles âgées vers les jeunes feuilles. NAXT1 facilite l'efflux de nitrate vers l'extérieur. Adapté de Dechornat *et al.*, 2011.

Ces données montrent l'importance des transporteurs de nitrate pour alimenter en azote les différents tissus de la plante : les transporteurs AtNRT1.1 et 1.2 sont particulièrement impliqués dans l'import du nitrate présent dans le sol, AtNRT1.5 et AtNRT1.8 sont impliqués, respectivement, dans l'import et l'export du nitrate de la sève, ce qui permet sa redistribution dans les parties aériennes (implication de AtNRT1.4), sa remobilisation à partir de vieilles feuilles (implication de AtNRT1.7), ou encore sa fourniture aux graines (rôle de AtNRT1.6) (Figure 21, Dechorgnat *et al.*, 2011).

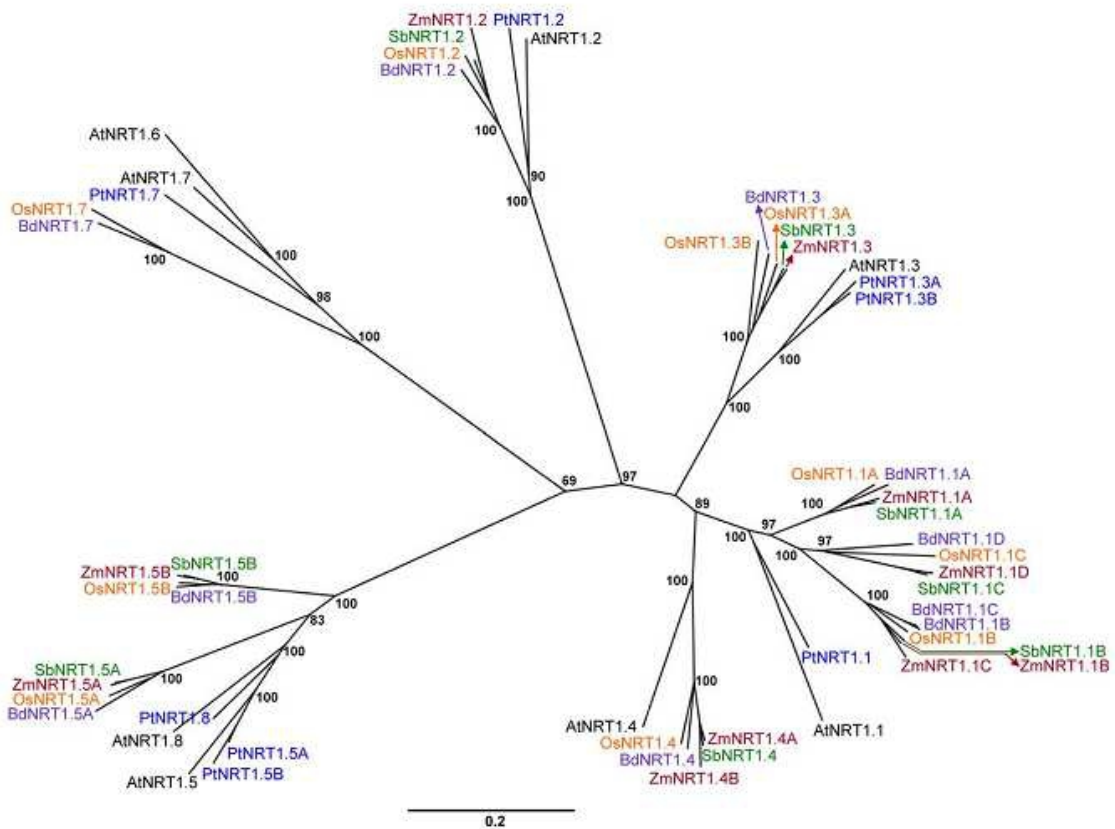
Chez les autres plantes, quelques transporteurs de type NRT1 ont été caractérisés. *BnNrt1.2* chez le colza (*Brassica napus*) a été identifié par homologie de séquence avec *AtNrt1.1* et est, de la même manière, positivement régulé par le nitrate dans les racines (Zhou *et al.*, 1998). Les tests fonctionnels ont révélé son activité de LANT pour le transport du nitrate, l'histidine et, dans une moindre mesure, les acides aminés basiques (arginine et lysine) (Zhou *et al.*, 1998).

Toujours sur la base de l'homologie avec *AtNrt1.1*, *OsNrt1.1* chez le riz (*O. sativa*) a été cloné, puis exprimé en œufs de Xénope, ce qui a révélé son activité de transporteur de faible affinité pour le nitrate (Lin *et al.*, 2000). En revanche, *OsNRT1.1* n'est pas capable de transporter des peptides, ni l'histidine. L'étude de l'expression tissulaire de ce gène a montré une localisation dans les cellules épidermiques racinaires et les poils absorbants, ce qui indique un rôle dans l'import à faible affinité du nitrate du sol (Lin *et al.*, 2000).

*AtNRT1.1* d'*Arabidopsis* est resté longtemps le seul transporteur à double affinité identifié jusqu'à la caractérisation de *MtNRT1.3* chez *M. truncatula* (Morère-Le Paven *et al.*, 2011). En plus de présenter une activité de transport de faible et forte affinité pour le nitrate, ce dernier possède également deux sites de phosphorylation. L'alignement de séquence montre que l'un de ces sites est identique au site de phosphorylation d'*AtNRT1.1* qui est phosphorylable. Contrairement aux autres transporteurs qui peuvent être induits par le nitrate, l'expression racinaire de *MtNRT1.3* est stimulée par son absence, ce qui suggère que ce transporteur est impliqué dans la réponse à la carence en azote (Morère-Le Paven *et al.*, 2011).

*BcNRT1* de *Brassica campestris ssp. chinensis* Makino (choux chinois) est un transporteur fonctionnel de nitrate/chlorate de type LANT (Yang *et al.*, 2012). Le gène, induit par le nitrate, s'exprime préférentiellement dans les zones d'élongation des racines et des feuilles.





**Figure 22 :** Arbre phylogénétique de la famille NRT1. Relations entre les 8 membres caractérisés d'*Arabidopsis* (noir), les séquences dans le génome du peuplier (bleu) et 4 espèces de céréales : le riz (orange), le sorgho (green), le maïs (rouge) et *Brachypodium* (violet). L'échelle représente une estimation de substitution de 0,2 acide aminé par résidu. Tiré de Plett *et al.*, 2010.

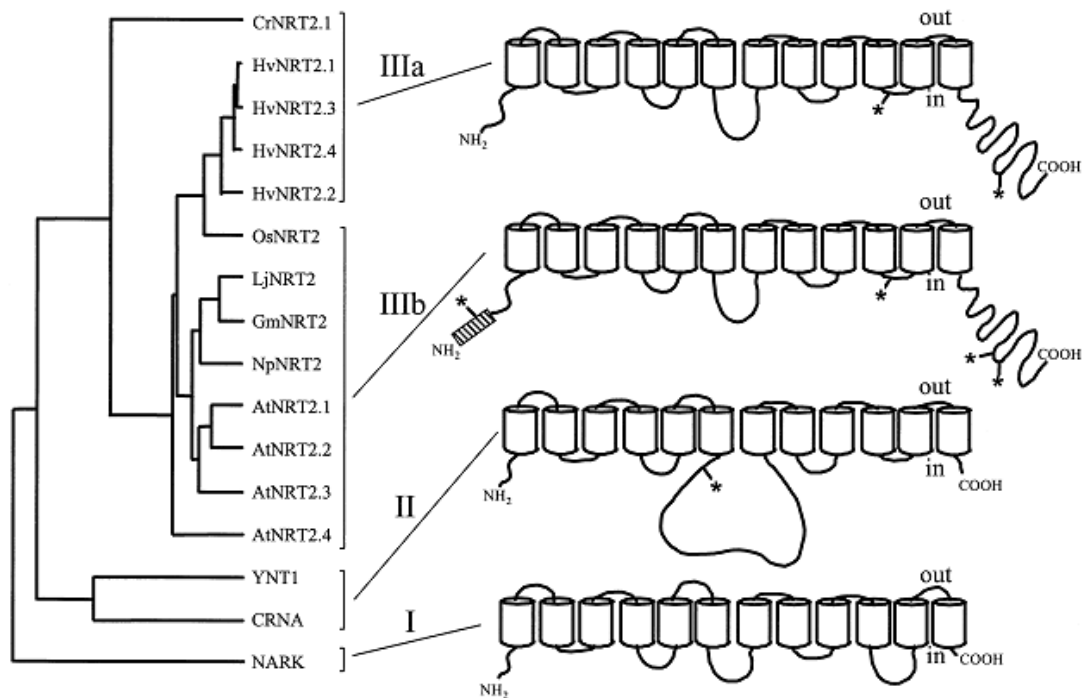
Chez *M. truncatula*, *MtNip/Latd* code pour un transporteur NRT1, mais il présente une activité de type HANT lors des tests fonctionnels (Bagchi *et al.*, 2012). Les mutants du gène *AtNrt1.1* d'*Arabidopsis* complémentés avec *MtNip/Latd* retrouvent leur sensibilité au chlorate. Il est donc possible que MtNIP/LATD transporte aussi le chlorate. L'étude du phénotype de plusieurs mutants alléliques du gène *MtNip/Latd* a montré qu'un des mutants capable de transporter le nitrate était fortement affecté dans son architecture racinaire, ainsi que dans sa capacité à noduler et à fixer l'azote, ce qui laisse penser que ce gène a une autre fonction en plus du transport du nitrate (Bagchi *et al.*, 2012).

Grâce à la disponibilité croissante des génomes, ou seulement par homologie de séquence avec les transporteurs connus, beaucoup d'autres transporteurs ont été identifiés mais sans être validés pour leur fonctionnalité. Chez la tomate (*Lycopersicon esculentum*), une étude a permis d'identifier 2 gènes de type *Nrt1* sur la base d'homologies avec *AtNrt1.1*. La localisation tissulaire des deux transporteurs correspondants est racinaire, mais ils présentent une régulation différente : *LeNrt1.1* est constitutif, tandis que *LeNrt1.2* est induit après l'exposition au nitrate (Lauter *et al.*, 1996).

Le même type d'étude a été conduit chez *Nicotiana plumbaginifolia* en utilisant l'homologie avec *LeNrt1.1* et *.2* (Fraisier *et al.*, 2001). Comme chez la tomate, l'expression racinaire de *NpNRT1.1* est constitutive, tandis que *NpNrt1.2* est induite par le nitrate (Fraisier *et al.*, 2001).

Chez le soja (*G. max*), il existe au moins 5 gènes de type *Nrt1* (*GmNrt1.1* à *1.5*). Le profil d'expression a pu être évalué pour *GmNrt1.3* qui est constitutif (racines et feuilles) à l'opposé de *GmNrt1.2* qui est nitrate-induit. *GmNrt1.4* est faiblement exprimé dans les racines lorsque l'ammoniaque est utilisé comme source d'azote (Yokoyama *et al.*, 2001).

En ce qui concerne les organismes séquencés, 80 *NRT1* sont recensés chez le riz (Tsay *et al.*, 2007). Chez *M. truncatula*, 111 séquences non redondantes correspondant à des gènes de type *Nrt1* ont été identifiées dans le génome (Benedito *et al.*, 2010). Sur la base d'homologies avec les 8 membres caractérisés d'*Arabidopsis AtNrt1.1* à *1.8*, les orthologues putatifs ont été recherchés chez les céréales dont le génome est complètement séquencé comme le maïs (*Z. mays*), le riz (*Oryza sativa*), le sorgho (*Sorghum bicolor*) et *Brachypodium*, et également chez le peuplier qui sert ici de modèle de dicotylédone et dont le génome est presque totalement séquencé (Figure 22, Plett *et al.*, 2010). Cette analyse a permis de redéfinir la nomenclature des gènes en fonction de leur ressemblance avec les membres *Nrt* d'*Arabidopsis*. Enfin, chez le lotier (*L. japonicus*), 37 gènes potentiellement de type *Nrt1(Ptr)* ont été identifiés (Criscuolo *et al.*, 2012). Parmi ceux qui présentent le plus



**Figure 23** : Relations phylogénétiques des séquences et comparaison des structures 2D des membres de la famille NNP des transporteurs nitrate/nitrite chez différents organismes. Les séquences (de GenBank) utilisées sont celles de NARK (X15996) d'*Escherichia coli*, CRNA (U34382) d'*Aspergillus nidulans*, YNT1 (Z69783) de *Hansenula polymorpha*, AtNRT2.1 (Z97058), AtNRT2.2 (AF019749), AtNRT2.3 (AB015472) et AtNRT2.4 (AB015472) d'*Arabidopsis thaliana*, NpNRT2 (Y08210) de *Nicotiana plumbaginifolia*, GmNRT2 (AF047718) de *Glycine max*, LjNRT2 (cloné et séquencé de Leggewie G, Onyeocha I et Forde BG, non publié) de *Lotus japonicus*, OsNRT2 (AB008519) d'*Oryza sativa*, HvNRT2.1 (U34198), HvNRT2.2 (U34290), HvNRT2.3 (AF091115) et HvNRT2.4 (AF091116) d'*Hordeum vulgare* et CrNRT2.1 (Z25438) de *Chlamydomonas reinhardtii*. Le domaine indiqué par le rectangle rayé représente la séquence N-terminale conservée, spécifique du type IIIb. L'astérisque indique la position d'un motif conservé de reconnaissance de protéine kinase C (S/T-x-R/K). Tiré de Forde, 2000.

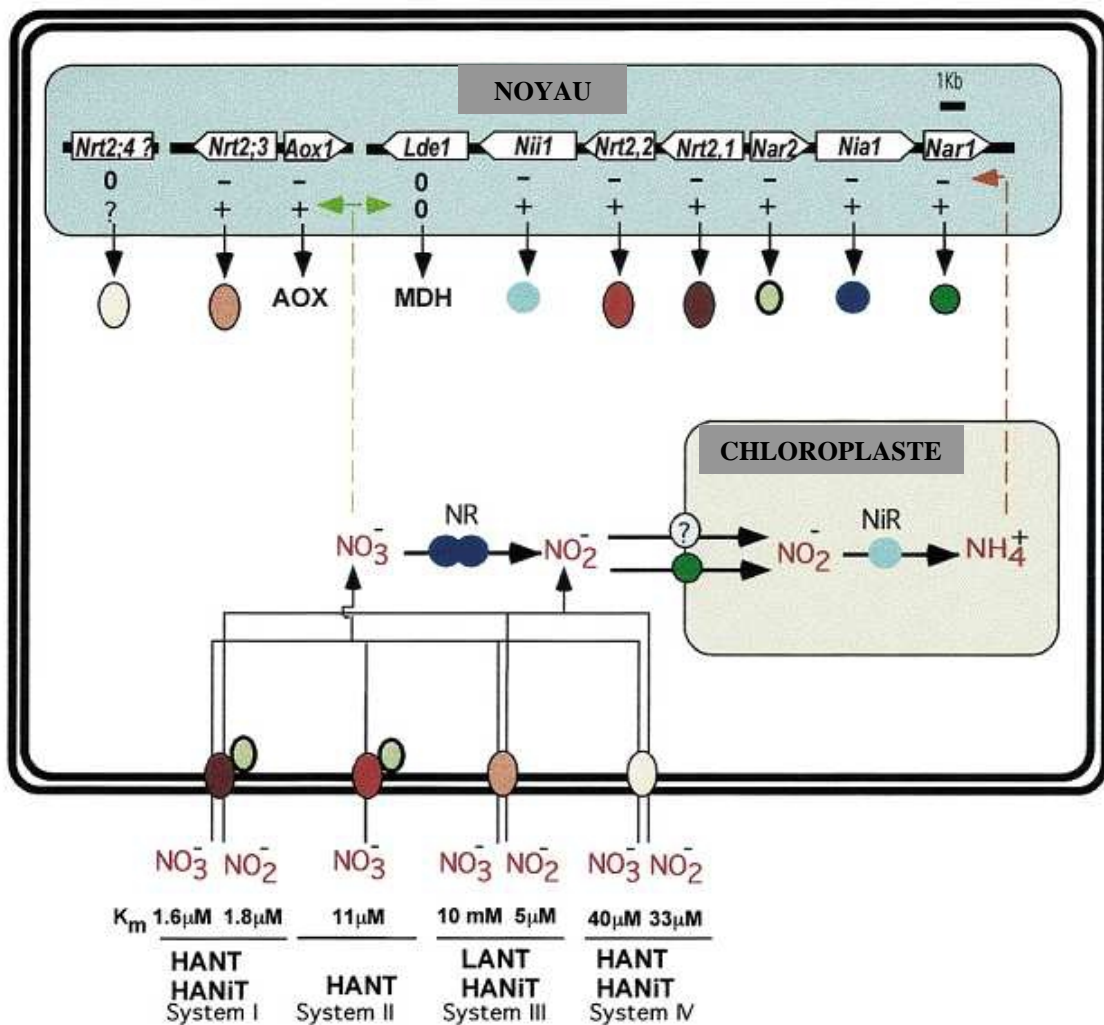
d'homologie de séquence avec les membres *NrtI* caractérisés, 9 *NrtI* sont étudiés pour leur profil d'expression. Sept gènes sont constitutifs, un est induit fortement par la présence de nitrate et le dernier est réprimé par le nitrate.

## 2- Les transporteurs de nitrate de type NRT2

Les transporteurs de type NRT2 appartiennent à la famille des perméases nitrate/nitrite (nitrate/nitrite porteurs, NNP) qui est la famille 8 de la superfamille "Major Facilitator Superfamily" (MFS), (Pao *et al.*, 1998). Ces protéines ont une structure typique en 12 hélices TM avec une boucle cytosolique qui sépare les 6 premières hélices des autres. Plusieurs motifs sont conservés entre les membres de cette famille notamment le motif [D/N-R-X-G-R-R/K] entre les domaines TM2 et TM3 et le motif [I-X<sub>2</sub>-R- X<sub>3</sub>-G-X<sub>3</sub>-G] situé avant et dans le TM4. Mais c'est le motif consensus du domaine TM5 qui constitue la signature de cette famille (chez les Eucaryotes): [FYK]-X<sub>3</sub>-[ILQRK]-X-[GA]-X-[VASK]-X-[GASN]-[LIVFQ]-X<sub>1,2</sub>-G-X-G-[NIM]-X-G-[GTA] (Figure 23, Galván et Fernández, 2001 ; Forde, 2000).

Le premier membre de cette famille à avoir été identifié est *CrnA*, chez le champignon filamenteux *Aspergillus nidulans*. Le mutant de ce gène est résistant au chlorate, ce qui a permis de l'isoler et de remarquer qu'il est aussi affecté dans le transport du nitrate. Ce gène code pour un transporteur nitrate/nitrite dont l'expression est induite par le nitrate et réprimée par l'ammonium (Unkles *et al.*, 1991).

Les travaux menés sur les organismes modèles, tels que *Chlamydomonas reinhardtii*, ont permis de caractériser un certain nombre de transporteurs de type NRT2. Quatre systèmes ont été ainsi caractérisés chez *C. reinhardtii* au niveau de la PM pour faciliter le passage du nitrate/nitrite (Figure 24, Galván et Fernández, 2001). Le système I est bispécifique pour le transport à forte affinité du nitrate/nitrite (Galván *et al.*, 1996). Il est codé par le gène *CrNrt2.1* (*Nar3*), et la présence du composant codé par *CrNar2* ("Nitrate Assimilation Related") est nécessaire pour que le transport soit fonctionnel (Zhou *et al.*, 2000). Le système II, codé par *CrNrt2.2* (*Nar4*)/*CrNar2*, est spécifique du transport du nitrate à haute affinité (Galván *et al.*, 1996). Les systèmes III et IV, codés respectivement par *CrNrt2.3* et probablement *CrNrt2.4*, transportent le nitrite avec haute affinité (Rexach *et al.*, 1999). Les deux systèmes sont bispécifiques nitrate/nitrite mais avec une affinité différente : le système III est un LANT alors que le IV est un HANT (Navarro *et al.*, 2000). En termes de régulation,



**Figure 24** : Schéma des systèmes de transport du nitrate/nitrite chez *Chlamydomonas reinhardtii*. Les gènes codants pour les transporteurs sont sur deux clusters avec d'autres gènes d'assimilation du nitrate (NR : nitrate réductase et NiR : nitrite réductase). Pour chaque gène l'effet positif (+) de la régulation par le nitrate ou négatif (-) de l'ammonium est montré ; (0) pas d'effet. Tiré de Galván et Fernández, 2001.

les trois premiers systèmes sont induits en présence de nitrate et de fortes concentrations en CO<sub>2</sub>, et leur activité est réprimée par l'ammonium. A l'opposé, le système IV est induit par de faibles teneurs en CO<sub>2</sub>, et ne réagit pas au nitrate et à l'ammonium (Quesada *et al.*, 1994, Rexach *et al.*, 1999).

Chez la plante modèle *A. thaliana*, 7 gènes appartenant à la famille *Nrt2* ont été identifiés dans le génome. Il existe une autre famille, appelée *Nrt3*, dont les membres ne codent pas eux-mêmes des transporteurs mais dont la protéine a un rôle dans la régulation de l'activité de transport de haute affinité des NRT2 (Okamoto *et al.*, 2006). Les gènes *Nrt3* sont similaires à *CrNar2* de *C. reinhardtii*. Chez *A. thaliana*, il existe deux gènes de ce type : *AtNrt3.1* et *AtNrt3.2*. Le premier représente 99% de l'ARN messager (ARNm) des *Nrt3* et est induit par le nitrate, tandis que le second est peu exprimé (Okamoto *et al.*, 2006). Des expériences d'interactions en double hybride ont permis de démontrer que NRT3.1 interagit fortement avec tous les membres NRT2 d'*Arabidopsis*, à l'exception de NRT2.7 (Kotur *et al.*, 2012). Par ailleurs, la co-injection en œufs de Xénope de chaque *Nrt2* d'*Arabidopsis* avec *AtNrt3.1* permet d'améliorer significativement l'influx de nitrate en comparaison de chaque *Nrt2* seul (Kotur *et al.*, 2012).

Le complexe que forme AtNRT3.1 avec les membres NRT2 d'*Arabidopsis* a été caractérisé avec AtNRT2.1. Le complexe est localisé au niveau de la PM (Yong *et al.*, 2010). Si pour certains transporteurs NRT2 la protéine AtNRT3.1 permet d'améliorer l'import de nitrate, dans le cas de AtNRT2.1 elle est indispensable au HANT. Le profil d'expression tissulaire préférentielle de *AtNrt2.1* dans les racines (au niveau des cellules corticales, de l'épiderme et l'endoderme des racines matures) et son induction par le nitrate lui confèrent un rôle probable dans l'import du nitrate du sol (Nazon *et al.*, 2003). Néanmoins, la disruption d'*AtNrt2.1* n'abolit pas totalement l'activité iHANT dans les racines. De plus le gène n'est pas exprimé dans la partie jeune des racines, alors que l'import de nitrate a été observé à la fois dans les racines jeunes et vieilles. AtNRT2.2 contribuerait également, dans une moindre proportion, à l'import de nitrate racinaire de type iHANT (Li *et al.*, 2007).

Peu de choses sont connues sur *AtNrt2.3*, mis à part son expression. Il est induit par le nitrate uniquement dans les tiges et présente un profil constitutif dans les racines (Okamoto *et al.*, 2003).

*AtNrt2.4* semble jouer un rôle lors de la carence en azote car son expression est induite dans ce contexte (Kiba *et al.*, 2012). Son expression est prédominante dans les cellules épidermiques racinaires, mais il est retrouvé dans les vaisseaux conducteurs des tiges. Il est localisé sur la PM. AtNRT2.4 possède une activité de type HANT. L'analyse fonctionnelle

**Tableau 6 :** La famille NRT2 chez les plantes et les algues. La recherche de *Nrt2* chez les Angiospermes a été conduite en compilant les séquences annotées comme *Nrt2-like*. Les gènes *Nrt2* chez les Gymnospermes ont été recherchés par TBLASTX en utilisant les séquences des 7 membres *Nrt2* d'*Arabidopsis*. Tiré de Chopin *et al.*, 2007.

Espèce	Gene	Numéro d'accession (Genbank ou TIGR)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Nrt2.1</i>	At1g08090
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Nrt2.2</i>	At1g08100
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Nrt2.4</i>	At5g60770
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Nrt2.3</i>	At5g60780
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Nrt2.6</i>	At3g45060
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Nrt2.5</i>	At1g12940
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Nrt2.7</i>	At5g14570
<i>Brassica napus</i>	-	AJ293028
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	<i>Nrt2.3</i>	CRAJ3296
<i>Chlorella sorokiniana</i>	-	AY026523
<i>Daucus carota</i>	-	AY081213
<i>Fagus sylvatica</i>	-	AY254165
<i>Glycine max</i>	-	AF047718
<i>Hordeum vulgare</i>	<i>Bch3</i>	AF091115
<i>Hordeum vulgare</i>	<i>Bch1</i>	HVU34198
<i>Hordeum vulgare</i>	<i>Bch4</i>	AF091116
<i>Hordeum vulgare</i>	<i>Bch2</i>	HVU34290
<i>Lotus japonicus</i>	-	AJ292342
<i>Lycopersicon esculentum</i>	<i>Nrt2.1</i>	AF092655
<i>Lycopersicon esculentum</i>	<i>Nrt2.2</i>	AF092654
<i>Lycopersicon esculentum</i>	<i>Nrt2.3</i>	AY038800
<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>	-	Y08210
<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>Nrt2.1</i>	AJ557583
<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>Nrt2.2</i>	AJ557584
<i>Oryza sativa</i>	<i>Nrt2</i>	AB008519
<i>Oryza sativa</i>	-	NM192236
<i>Oryza sativa</i>	-	AK072215
<i>Phragmites australis</i>	<i>Nrt2</i>	AB096061
<i>Physcomitrella patens</i>	<i>Nrt2.1</i>	AB231676
<i>Physcomitrella patens</i>	<i>Nrt2.2</i>	AB231677
<i>Physcomitrella patens</i>	<i>Nrt2.4</i>	AB231679
<i>Physcomitrella patens</i>	<i>Nrt2.3</i>	AB231678
<i>Physcomitrella patens</i>	<i>Nrt2.5</i>	AB231680
<i>Picea glauca</i>	-	TC5382
<i>Pinus taeda</i>	-	TC79192
<i>Pinus taeda</i>	-	DR181749
<i>Pinus taeda</i>	-	TC77358
<i>Populus tremula</i>	-	AJ557585
<i>Populus tremula</i>	<i>tNit2.1</i>	AJ646890
<i>Populus tremula</i>	<i>tNit2.2</i>	AJ646891
<i>Prunus persica</i>	<i>Nrt2.1</i>	AB097402
<i>Prunus persica</i>	<i>Nrt2.2</i>	AB128927
<i>Triticum aestivum</i>	<i>TaNrt2.3</i>	AY053452
<i>Triticum aestivum</i>	<i>TaNrt2</i>	AF288688
<i>Zea mays</i>	<i>Nrt2.1</i>	AY129953
<i>Zea mays</i>	<i>Nrt2</i>	ZMA344451
<i>Zea mays</i>	<i>Nrt2.2</i>	AY559405

d'AtNRT2.4 tend à montrer que ce transporteur serait impliqué dans l'import du nitrate du sol par les racines, en présence de faibles concentrations de nitrate (Kiba *et al.*, 2012). Les mutants d'*Atnrt2.4* contiennent moins de nitrate dans les exsudats foliaires. Ce transporteur pourrait donc être impliqué dans le chargement du nitrate dans le phloème des tiges (Kiba *et al.*, 2012).

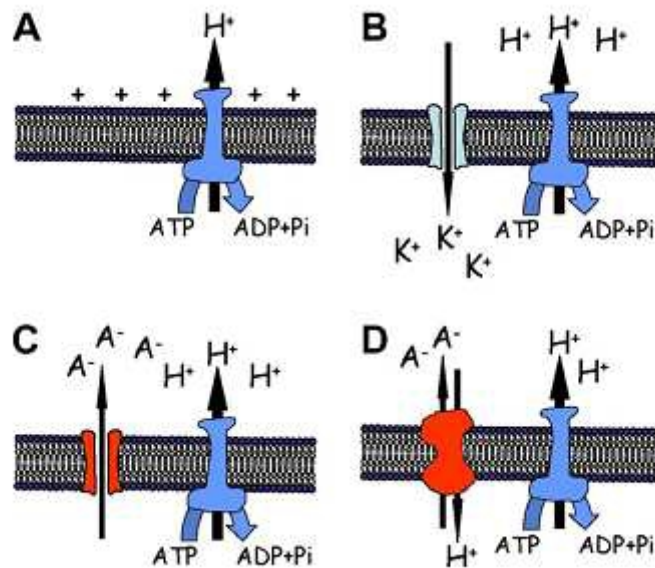
Les seules des données disponibles sur *AtNrt2.5* sont que son expression est réprimée par le nitrate dans les racines et les tiges (Okamoto *et al.*, 2003).

*AtNrt2.6* est faiblement exprimé dans les organes végétatifs et n'est pas induit par le nitrate (Dechorgnat *et al.*, 2012). En revanche, il est induit après inoculation avec la bactérie pathogène *Erwinia amylovora*, et le mutant du gène *Atnrt2.6* présente une sensibilité accrue envers cette bactérie. Bien que l'expression des gènes de défense ne soit pas modifiée, le mutant d'*Atnrt2.6* accumule moins d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ces résultats suggèrent un lien entre l'activité de AtNRT2.6 et la production de ROS dans la réponse aux stress biotiques et abiotiques (Dechorgnat *et al.*, 2012).

*AtNrt2.7* a une expression constitutive préférentielle dans les organes reproducteurs et les graines sèches. Le mutant de ce gène a une teneur réduite en nitrate dans les graines. Dans les graines, la localisation tonoplastique de AtNRT2.7 suggère que ce transporteur est impliqué dans l'accumulation du nitrate dans la vacuole (Chopin *et al.*, 2007).

Les fortes conservations de séquence entre les membres Nrt2 a permis la génération d'oligonucléotides dégénérés pour l'identification de nouveaux membres. De nombreux membres ont ainsi été identifiés par homologie de séquence chez des organismes aussi divers que *N. plumbaginifolia* (Quesada *et al.*, 1997), l'orge (*H. vulgare*), (Trueman *et al.*, 1996, Vidmar *et al.*, 2000), le soja (*G. max*), (Amarasinghe *et al.*, 1998), la tomate (*L. esculentum*), (Ono *et al.*, 2000), le blé (*Triticum aestivum*), (Yin *et al.*, 2007), le colza (*B. napus*) (Faure-Rabasse *et al.*, 2002), le maïs (*Z. mays*), (Quaggiotti *et al.*, 2003), l'algue *Chlorella sorokiniana* (Kolterman *et al.*, 2003), la mousse *Physcomitrella patens* (Tsujimoto *et al.*, 2007), le pêcher (*Prunus persica*), (Nakamura *et al.*, 2007), le riz (*O. sativa*), (Cai *et al.*, 2008), ou le lotier (*L. japonicus*), (Criscuolo *et al.*, 2012)...(Tableau 6). Le plus souvent, l'expression de ces gènes et leur réponse au nitrate ont été analysées. Parfois, l'activité fonctionnelle a été étudiée, soit par surexpression en suivant le nitrate marqué au <sup>15</sup>N -comme c'est le cas de NpNRT2.1 chez *N. plumbaginifolia* (Fraisier *et al.*, 2000), soit par expression hétérologue en œufs de Xénope dans le cas de ChNRT2.1 de *C. sorokiniana* (Kolterman *et al.*, 2003). Chez l'orge (*H. vulgare*), HvNRT2.1 ne présente pas d'activité de transport en œufs de Xénope, sauf lorsqu'il est associé à HvNAR2.3 (Tong *et al.*, 2005). De la même





**Figure 25 :** Fonctionnement d'un canal à anion de type ClC : le couplage entre le flux d'anions et la régulation du pH en court-circuitant la pompe à protons. (A) Lorsque la pompe à protons est utilisée, la membrane est hyperpolarisée et le gradient de proton n'est pas généré. (B) Le flux inverse d'ions potassium court-circuite le courant de la pompe à protons et permet la génération d'un gradient de protons. (C) Le flux parallèle des anions par des canaux à anions permet également la génération d'un gradient de protons. (D) Un mécanisme d'antiport 2anions/1proton permet encore de fournir une dérivation de pompage de protons. Tiré de De Angeli *et al.*, 2007.

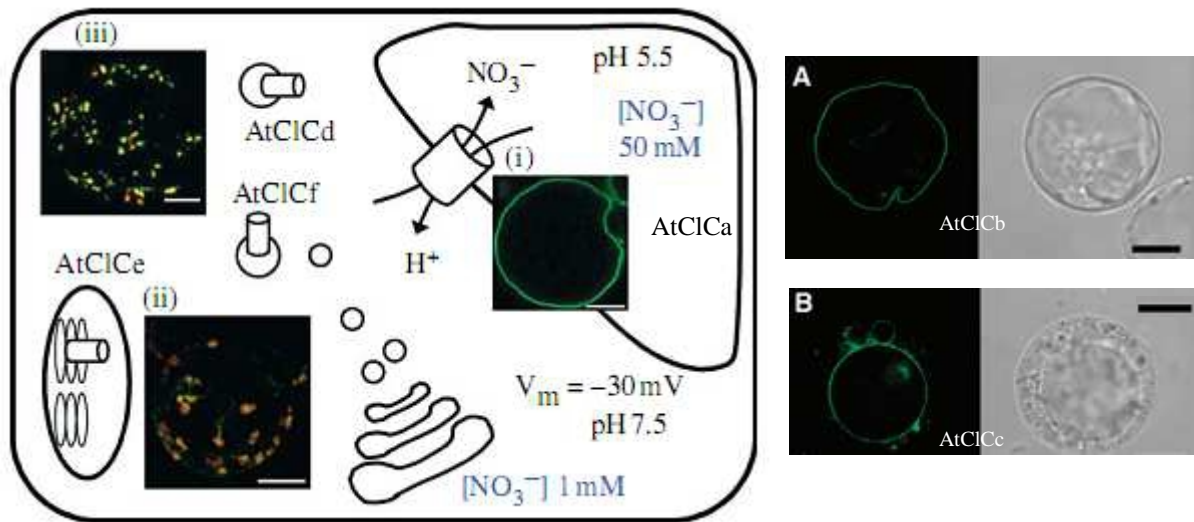
manière, la co-injection d'*OsNAR2.1* avec *OsNRT2.1/2.2* et *2.3a* chez le riz (*O. sativa*) est nécessaire pour le transport du nitrate (Feng *et al.*, 2011).

### 3-Les canaux à chlorure (CIC)

Chez les plantes supérieures, le rôle des canaux à ions est de faciliter le flux passif d'ions. Les besoins de la plante en de nombreux anions comme le nitrate, le sulfate, le phosphate et les acides organiques montrent l'importance des canaux à anions (Barbier-Brygoo *et al.*, 2000). Les CIC sont les principaux candidats pour le transport d'anions chez les végétaux (De Angeli *et al.*, 2009). Ils sont présents sur tous les types de membrane de la cellule (PM, tonoplaste, membranes mitochondriales, chloroplastiques, réticulum endoplasmique). Ils ont un rôle clé dans de nombreux processus physiologiques comme le mouvement des stomates, le chargement de solutés dans le xylème ou la compartimentation des métabolites (De Angeli *et al.*, 2007).

Le transport d'anions s'effectue principalement en co-transport avec un cation de type proton ou ion potassium (Figure 25, Barbier-Brygoo *et al.*, 2000). Chez les végétaux, l'efflux d'anion avec un proton présente un intérêt majeur puisque il permet de réduire le potentiel de membrane, qui est généré par la pompe à proton membranaire pour permettre la formation d'un gradient de proton. Cependant, la mise en évidence de l'activité de transport d'une protéine comme AtCICa, qui fonctionne comme un antiporteur anion/proton, suggère une relation plus complexe entre les CIC et le gradient de proton (DeAngeli *et al.*, 2007). Néanmoins, la stœchiométrie de 2 anions pour 1 proton permet de maintenir le gradient de pH nécessaire au fonctionnement de la pompe à proton (Figure 25).

La protéine du tonoplaste AtCICa d'*A.thaliana* est le premier transporteur de nitrate de type CIC identifié. Il participe au stockage du nitrate dans la vacuole (De Angeli *et al.*, 2006). AtCICa se comporte comme un échangeur d'anion de type " $2\text{NO}_3^-/\text{H}^+$ ", avec une sélectivité pour  $\text{NO}_3^- \sim \text{I}^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{SO}_4^{2-} > \text{glutamate}^-$  (Figure 26). La sélectivité d'AtCICa pour le  $\text{NO}_3^-$  au lieu du  $\text{Cl}^-$  est apportée par la présence d'une proline au lieu d'une sérine à la position 160 (Wege *et al.*, 2010). AtCICb, proche en séquence de AtCICa, présente aussi une activité d'antiporteur de type " $\text{NO}_3^-/\text{H}^+$ " (l'exact ratio n'est pas établi précisément), avec une sélectivité différente de AtCICa :  $\text{NO}_3^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{malate}^{2-} = \text{I}^-$  (von der Fecht-Bartenbach *et al.*, 2010). AtCICb est localisé sur le tonoplaste (Figure 26). En revanche, l'absence d'AtCICb ne provoque pas de phénotype, ni en croissance, ni en accumulation du nitrate. De plus, le



**Figure 26** : Représentation schématique de la localisation subcellulaire des protéines ClC d'*A. thaliana*. AtClCa, AtClCb et AtClCc sont localisées au tonoplaste, AtClCe est sur la membrane des thylacoïdes, AtClCf est principalement sur les vésicules *cis*-Golgi alors que AtClCd est plutôt sur le réseau *trans*-Golgi, la localisation sub-cellulaire de AtClCg n'est pas connue. (i) AtClCa-GFP (fluorescence verte), la barre blanche représente 16  $\mu\text{m}$  ; (ii) AtClCe-GFP (fluorescence verte) co-localise partiellement avec la fluorescence de la chlorophylle, la barre blanche représente 16  $\mu\text{m}$  ; (iii) AtClCf-DsRed2 (fluorescence rouge) co-localise partiellement avec la fluorescence de  $\beta$ -1,4 FucT-GFP (fluorescence verte), la barre blanche représente 8  $\mu\text{m}$ . Tiré de De Angeli *et al.*, 2009. (A) et (B) AtClCb-GFP et AtClCb-GFP respectivement (fluorescences verte), les barres noires représentent 10  $\mu\text{m}$ . Tiré de von der Fecht-Bartenbach *et al.*, 2010.

niveau d'expression de *AtClca* est plus élevé chez les mutants *Atclcb*, ce qui suggère qu'il y a une compensation de la perte de AtClCb par la mise en place d'autres transporteurs, comme AtClCa (von der Fecht-Bartenbach *et al.*, 2010).

Trois "Quantitative Trait Loci" (QTL) contrôlant les variations de concentration en nitrate dans la plante ont été identifiés chez d'*A. thaliana*, dont un majeur et deux mineurs (Harada *et al.*, 2004). Le QTL majeur englobe le gène *AtClcc*, dont le mutant présente des teneurs réduites en nitrate en comparaison à la plante sauvage. Les deux autres QTLs mineurs contiennent aussi des CLC : *AtClce* et *AtClcf*, ce qui en fait des candidats potentiels dans le contrôle de la concentration en nitrate accumulé dans la plante (Harada *et al.*, 2004). Le rôle émergent des CLC dans le contrôle intracellulaire du nitrate est soutenu par l'étude des mutants *Atclca* et *Atclce* d'*A. thaliana* (Monachello *et al.*, 2009). Les plantes mutantes présentent des phénotypes identiques, avec des teneurs endogènes en nitrate plus faibles, et en nitrite plus élevées, par comparaison avec les plantes sauvages. L'import de nitrate au niveau des racines est réduit et l'expression de certains NRT est inhibée chez les mutants (Monachello *et al.*, 2009). Ces deux transporteurs sont impliqués dans l'homéostasie intracellulaire du nitrate à des niveaux différents, puisque leur localisation sub-cellulaire est différente : AtClCa est adressé au tonoplaste, alors que AtClCe est localisé au niveau de la membrane des chloroplastes (Figure 26, Marmagne *et al.*, 2007).

#### 4-Les autres protéines transportant du nitrate

Une noduline tardive de *L. japonicus* LjNOD70 (ou LjN70) présente des caractéristiques d'un transporteur (Szczyglowski *et al.*, 1998). En effet la protéine possède des points communs avec les membres de la famille MFS : taille, poids moléculaire, présence de 12 domaines TM et d'une région hydrophile. De plus, LjN70 présente une homologie avec un transporteur échangeur oxalate/formate d'*Oxalobacter formigenes* (55 % de similarité) (Szczyglowski *et al.*, 1998). L'activité de transport de cette protéine a été démontrée sur œufs de Xénope en même temps que pour son orthologue chez *G. max* (Vincill *et al.*, 2005). GmN70 présente une sélectivité nitrate > nitrite >> chlorure. La protéine est localisée au niveau de la membrane du symbiosome.



## b) Le transport du nitrite chez les Eucaryotes

Le transport du nitrite a été peu étudié du fait de qu'il était considéré que le nitrite pouvait traverser les membranes sous sa forme acide  $\text{HNO}_2$ . Mais cette idée a été remise en question par l'étude de l'import et de l'assimilation du nitrite chez *C. reinhardtii*. (Córdoba *et al.*, 1986). Les cinétiques de l'import et de l'assimilation du nitrite présentent un profil de type Michaelis-Menten, avec un phénomène de saturation caractéristique de l'intervention d'une protéine dans le transport du nitrite. L'étude du transport du nitrite a principalement été conduite sur les chloroplastes purifiés (Brunswick et Cresswell, 1988-I). En effet, le nitrite cytoplasmique doit être transporté dans le stroma pour y être réduit en ammonium par la NiR. L'effet inhibiteur du nitrite et du pH acide sur la photosynthèse va à l'encontre d'une diffusion passive de la forme acide du nitrite, mais tend plutôt vers l'hypothèse d'un mécanisme d'import du nitrite de type enzymatique vers les chloroplastes. Cette hypothèse est confirmée par les travaux de Brunswick et Cresswell (1988-I). De même que chez *C. reinhardtii*, les cinétiques de l'import et de l'assimilation du nitrite dans les chloroplastes présentent un profil de type Michaelis-Menten, avec un phénomène de saturation caractéristique de l'intervention d'une protéine dans le transport du nitrite. La vitesse de transport maximum est obtenue à pH alcalin, comme celui du stroma, ce qui indique que la forme de nitrite transporté ne peut pas être la forme protonée.

Le premier transporteur de nitrite chloroplastique identifié a été CrNAR1.1 chez *C. reinhardtii*. (Rexach *et al.*, 2000). Plusieurs éléments permettent de définir le rôle de CrNAR1.1 dans le transport du nitrite vers le chloroplaste. Premièrement, le gène est présent sur un cluster contenant des gènes impliqués dans le transport du nitrate/nitrite ou l'assimilation de l'azote (NR, NiR). Ensuite, l'expression du gène *CrNar1.1* est régulée positivement par le nitrate ce qui suggère un rôle dans l'assimilation du nitrate. La protéine CrNAR1.1 peut correspondre à un transporteur car cette protéine membranaire présente 6 domaines TM et une homologie significative avec la famille des transporteurs de type formate/nitrite (FNT) bactériens. La protéine CrNAR1.1 est localisée sur la membrane chloroplastique. La caractérisation des mutants a montré que (i) CrNAR1.1 est nécessaire pour la croissance lorsque le nitrate est limitant et (ii) l'activité de transport du nitrite sur chloroplaste isolés est plus faible en absence de CrNAR1.1 (Rexach *et al.*, 2000). La recherche de séquences homologue de *CrNar1.1* dans le génome de *C. reinhardtii* a conduit à l'identification d'au moins trois séquences pouvant correspondre à des homologues *CrNar1.1*



prédites au chloroplaste et appartenant à la famille FNT. La présence d'un transport de nitrite résiduel vers le chloroplaste chez le mutant *Cmar1.1* pourrait être due à l'activité d'un (ou plusieurs) de ces homologues (Galván *et al.*, 2002). La recherche d'équivalent de NAR1 chez les plantes supérieures a été infructueuse, vraisemblablement pour plusieurs raisons (Galván *et al.*, 2002). D'une part, la divergence entre les membres FNT est assez forte ce qui rend l'identification d'orthologues difficile. D'autre part, la conservation de la protéine NAR1 entre les plantes et les algues est trop faible. Enfin, le transport du nitrite dans le chloroplaste chez les plantes est peut être réalisé par une autre famille que les FNT.

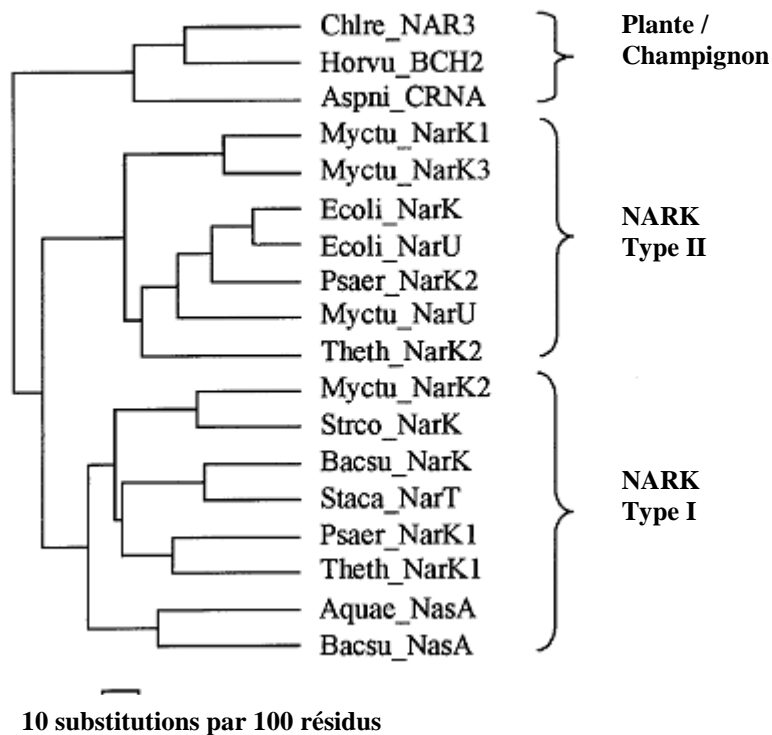
Cette dernière hypothèse a été supportée par l'identification, chez le concombre (*Cucumis sativus*), d'un transporteur de nitrite chloroplastique, CsNiTR1-L de type NRT1 (Sugiura *et al.*, 2007). Ce transporteur possède 11 domaines TM et une boucle cytosolique (entre les domaines 5 et 6) caractéristiques des transporteurs de type POT. CsNiTR1-L a été localisée sur la membrane interne des chloroplastes. Le mutant du gène correspondant chez *A. thaliana* présente une accumulation de nitrite dans les feuilles de la même manière qu'un mutant de la NiR. Ceci s'explique par la réduction du transport du nitrite vers le chloroplaste d'où une assimilation de l'azote réduite et donc un phénotype similaire à un mutant de l'assimilation de l'azote dans le chloroplaste. CsNiTR1 possède une isoforme S chez qui l'extension N-terminal manque et présage un adressage différent du chloroplaste, plutôt à la PM. C'est le cas puisque l'expression hétérologue de CsNiTR1-S dans la levure (*Saccharomyces cerevisiae*) facilite d'export de nitrite hors de la cellule (Sugiura *et al.*, 2007).

Aucun transporteur de nitrite n'a été identifié à ce jour au niveau de la membrane interne des mitochondries.

### c) Le transport nitrate/nitrite chez les procaryotes

Les bactéries ont besoin d'importer le nitrate du milieu pour leur croissance. Celui-ci est réduit par les NR en nitrite qui peut être à son tour réduit par les NiR en NO ou en  $\text{NH}_4^+$ . Il arrive cependant, qu'au lieu d'être réduit, le nitrite est exporté hors de la cellule (Moir et Wood, 2001). Comme chez les végétaux, l'import et l'export de nitrate et de nitrite sont assurés par des transporteurs. Le type de transporteur NRT2 est retrouvé chez les bactéries mais il porte alors le nom de NARK. Il existe également des catégories de transporteurs de type ABC ("ATP-binding cassette") qui fonctionnent de manière ATP-dépendante et sont retrouvés plutôt chez les cyanobactéries (Moir et Wood, 2001).





**Figure 27 :** Arbre phylogénétique des membres NARK (NRT2). Les transporteurs membres du groupe NRT2 appartenant à des végétaux ou des champignons sont : NAR3 de *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlre), BCH2 de *Hordeum vulgare* (orge) (Horvu) et CRNA d'*Aspergillus nidulans* (Aspni). Les homologues de NARK proviennent de *Mycobacterium tuberculosis* (Myctu), *Escherichia coli* (Ecoli), *Pseudomonas aeruginosa* (Psaer), *Thermus thermophilus* (Theth), *Streptomyces coelicolor* (Strco), *Staphylococcus carnosus* (Staca), *Bacillus subtilis* (Bacsu) et *Aquifex aeolicus* (Aquae). Tiré de Moir et Wood, 2001.

## 1-Les transporteurs de type NARK

Le premier transporteur de type NRT2 qui a été identifié chez les bactéries est *NarK* d'*Escherichia coli*, qui fonctionne comme un antiporteur nitrate/nitrite (Noji *et al.*, 1989). D'autres homologues de NARK sont présents chez les bactéries capables de réduire le nitrate. Quelques exemples non exhaustifs sont cités ci-après. NARSA de *Bacillus subtilis* (Ogawa *et al.*, 1995) et NART de *Staphylococcus carnosus* (Fast *et al.*, 1996) sont responsables de l'import de nitrate. Deux protéines NARK1 et NARK2 co-existent chez *Thermus thermophilus* toutes les deux nécessaires pour le transport nitrate/nitrite probablement comme antiporteur nitrate/nitrite (Ramirez *et al.*, 2000). Deux exemplaires de NARK existent également chez *Pseudomonas aeruginosa* : NARK1 et NARK2 ; NARK2 se comporte comme un antiporteur nitrate/nitrite et NARK1 semble avoir une implication dans l'import de nitrate bien que ce rôle soit masqué par l'action de NARK2 (Sharma *et al.*, 2006). En ce qui concerne *Mycobacterium tuberculosis*, quatre transporteurs de la famille NARK sont identifiés : NARK1 et NARK3 et NARU sont impliqués dans le transport du nitrate et NARK2 est un antiporteur nitrate/nitrite (Sohaskey et Wayne, 2003). Un exemple original de transporteur est donné chez *Paracoccus pantotrophus* qui possède un exemplaire de NARK contenant lui-même deux domaines NARK1 et NARK2 ; le premier fonctionnant comme symporteur nitrate/proton et le second comme antiporteur nitrate/nitrite (Wood *et al.*, 2002). Un exemple similaire existe chez *Paracoccus denitrificans* où deux domaines NARK1 et NARK2 de la protéine NARK sont fusionnés ; le premier fonctionnant comme symporteur nitrate/proton de forte affinité, et le second comme antiporteur nitrate/nitrite de faible affinité (Goddard *et al.*, 2008).

L'identification des membres de la famille NARK chez différentes espèces de bactéries a permis d'établir un classement phylogénétique des gènes et de mettre en évidence deux classes de NARK, I et II (Figure 27). De manière générale, les NARK de classe I possèdent une activité transport de type "nitrate/proton", alors que NARK de classe II possèdent le plus souvent une activité d'antiporteur "nitrate/nitrite" (Moir et Wood, 2001). Sur le plan génétique, les gènes liés à l'assimilation de l'azote sont regroupés en clusters qui renferment aussi les transporteurs *NarK*. Ainsi, les gènes codant pour les NARK de classe I sont en général proches des gènes de la NR et des enzymes impliquées dans l'assimilation du nitrate, ce qui conforte l'hypothèse que les NARK de classe I sont impliqués dans le transport du nitrate. De manière symétrique, les gènes codant pour les NARK de classe II sont plutôt



proches des gènes de la NiR et des enzymes impliquées dans l'assimilation du nitrite, ce qui conforte l'hypothèse de leur implication dans le transport de nitrite (Moir et Wood, 2001).

## 2-Les transporteurs ABC

Les transporteurs de type ABC sont organisés en quatre domaines. Deux domaines TM contenant chacun 6 hélices  $\alpha$ , soit un total de 12 par transporteur (comme les NRTs). Les deux autres domaines sont cytosoliques ; un est le domaine d'hydrolyse de l'ATP et l'autre est un domaine de liaison à l'ADN (Higgins, 2001). D'autres domaines auxiliaires peuvent être recrutés ; ils se lient au substrat pour l'apporter au niveau du complexe de transport. La liaison au substrat de ces protéines auxiliaires confère la spécificité, l'affinité pour le substrat, ainsi que la direction du transport. Le substrat est relâché au niveau des domaines TM du transporteur qui transmettent à leur tour un signal d'hydrolyse de l'ATP, via un changement conformationnel, nécessaire pour le transport du soluté (Higgins, 2001).

Les transporteurs de type ABC sont retrouvés chez les cyanobactéries et quelques bactéries hétérotrophes. Ce type de système a été décrit chez la cyanobactérie *Synechococcus* sp. PCC7942 où le système de transport du nitrate est codé par quatre gènes *NrtA*, *NrtB*, *NrtC* et *NrtD* (Lee *et al.*, 2000). Les 3 derniers codent pour une protéine appartenant à la famille des transporteurs ABC. Ce type de transporteur est impliqué dans le transport ATP-dépendant de nitrate et de nitrite. Chez l'entérobactérie *Klebsiella oxytoca*, un système similaire existe avec *nasF* comme équivalent de *NrtA*, alors que *NasE* et *NasD* sont des transporteurs ABC bispécifiques nitrate/nitrite (Wu et Stewart, 1998).

# Les objectifs de la thèse

Lorsque je suis arrivée en thèse, l'équipe Symbiose venait de commencer le travail de mise en évidence d'une respiration nitrate-NO dans les nodosités fixatrice d'azote de *M. truncatula* – *S. meliloti*. En collaboration avec Faouzi Horchani, un post-doctorant déjà présent dans l'équipe, le premier objectif de mon travail de thèse a été de mettre en évidence l'implication des NR et des chaînes de transfert d'électron des deux partenaires, végétal et bactérien, dans la production de NO.

Le second objectif de mon travail de thèse était de caractériser le transport de nitrite dans les mitochondries de nodosités et, si possible, d'identifier un ou plusieurs transporteurs de nitrite. Aucun transporteur de nitrite ou de nitrate mitochondrial n'ayant été caractérisé, nous avons choisi d'aborder la question par deux approches parallèles: génétique et protéomique. Pour la première approche, l'objectif était de partir des données de la littérature et des données *in silico* présentes dans les bases de données pour identifier un ou plusieurs gènes candidats de transporteurs de nitrite mitochondriaux en vue d'entreprendre leur analyse fonctionnelle. Pour la seconde approche, nous avons choisi de mettre au point un protocole de purification de mitochondries de racines et de nodosités de *M. truncatula*, en vue de mettre en évidence un transport de nitrite *in organello*, de purifier l'enveloppe mitochondriale et de rechercher, par analyse en spectrométrie de masse, des protéines candidates pour le transport du nitrite.

Le manuscrit qui suit présente l'ensemble des résultats obtenus au cours de ce travail de thèse. Le premier chapitre est consacré à la mise en évidence de la "respiration nitrate-NO" dans les nodosités de *M. truncatula*, en normoxie et en hypoxie. Ce chapitre présente la publication qui en a été tirée, ainsi que par quelques résultats complémentaires. Le second chapitre est consacré à la mise au point du protocole de purification de mitochondries de racines de *M. truncatula* et à la caractérisation de leur capacité à produire du NO en présence de nitrite. Le dernier chapitre est consacré à la recherche de systèmes de transport du nitrite aux mitochondries, et aux premiers résultats obtenus pour caractériser les candidats identifiés. Le manuscrit se termine par une conclusion générale et par l'identification de quelques pistes pour poursuivre de travail en cours.

# Matériels et Méthodes



## A-Matériel biologique

### a) Culture de *M. truncatula*

Les graines de *M. truncatula* écotype Jemalong A17 sont plongées dans l'acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) pendant 6 min afin de lever la dormance tégumentaire, puis rincées 5 à 10 fois à l'eau distillée froide. Dans le cas de culture *in vitro*, les graines sont stérilisées par un bain d'hypochlorite de sodium 12 % (v/v) de 3 min puis rincées 5 à 10 fois avec de l'eau distillée stérile. Les graines sont ensuite mises à germer sur de l'agar 0,4 % (p/v) en boîtes de Pétri à l'obscurité. Dans le cas de culture en jardinières, les plantules sont mises à germer trois jours à 16 °C puis repiquées en jardinières dont le substrat est composé de 2/3 vermiculite et de 1/3 perlite. Dans le cas de culture hydroponique, les graines sont synchronisées par un passage à 4 °C sur une nuit, puis mises à germer pendant trois jours à 23 °C. Les plantules sont repiquées en bassines hydroponiques contenant 9 L de milieu de culture: 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 25 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,51 mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,05 mM FeEDTA, 5,5 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> et les micro-éléments (3 g/L H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 2,23 g/L MnSO<sub>4</sub>, 0,287 g/L ZnSO<sub>4</sub>, 0,125 g/L CuSO<sub>4</sub>, 0,065 g/L CoCl<sub>2</sub>, 0,12 g/L NaMoO<sub>4</sub>). Lorsque les plantes ne sont pas inoculées avec *S. meliloti* la source d'azote est 5 mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>. Les plantes sont cultivées en chambre de culture dans les conditions suivantes: 23 °C jour/20 °C nuit, 75 % d'humidité, 16 h jour/8 h nuit, jusqu'à la fin de l'expérience.

### b) Inoculation par *S. meliloti*

La souche 2011 de *S. meliloti* est cultivée à 30 °C sur milieu riche LB supplémenté en MgSO<sub>4</sub> 2,5 mM et CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM, d'abord sur boîte de Pétri, puis en milieu liquide (pendant 8 à 24 h). La culture liquide est centrifugée pendant 5 min à 6 000 g, puis rincée deux fois avec de l'eau osmosée et resuspendue dans de l'eau. Chaque jardinière de *M. truncatula* est inoculée avec 100 mL de solution bactérienne à une DO<sub>600 nm</sub> de 0,1. En culture hydroponique, les bassines sont inoculées de manière à contenir une DO<sub>600 nm</sub> de 0,01 finale de solution bactérienne dans le milieu de culture.





## c) Extraction et purification des mitochondries

### 1-Mitochondries de racines de *M. truncatula*:

Le protocole de purification des mitochondries a été adapté à partir du protocole décrit par Douce *et al.* (1987). Les étapes sont réalisées à 4 °C. De 15 à 40 g de racines âgées de 4 à 6 semaines sont broyées au mixer trois fois 5 s dans 50 mL de milieu de broyage (100 mM Hepes, pH 7,6, 0,3 M saccharose, 1 mM EDTA, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM KCl, 1 % BSA, 0,5 % (p/v) PVP soluble et 4 mM cystéine). Le broyat est filtré deux fois sur 4 couches d'étamines et 2 couches de nylon, puis centrifugé à 1 000 g pendant 15 min pour éliminer les gros débris. Le surnageant est centrifugé à 15 000 g pendant 20 min pour sédimenter les organelles. Le culot est resuspendu délicatement au pinceau dans du milieu de lavage SM (20 mM Hepes, 0,3 M saccharose, 1 mM EDTA, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) à raison de 500 µL/culot. L'échantillon est ensuite déposé sur un coussin continu de 10 mL de Percoll 30 % (v/v), H<sub>2</sub>O 20 % (v/v) et SM 4X 50 % (v/v). Les organelles sont séparées grâce à une centrifugation à 40 000 g pendant 40 min. La fraction du bas (de 2 à 4 mL) est récupérée, puis débarrassée du Percoll par dilution 10 fois dans du milieu SM et centrifugation à 15 000 g pendant 10 min, et ce 2 fois de suite. Le culot obtenu est resuspendu délicatement au pinceau dans du milieu SM. A cette étape les mitochondries sont considérées comme purifiées. Le degré de purification des mitochondries a été évalué par microscopie électronique à transmission (collaboration avec Sophie Pagnotta, Centre Commun de Microscopie Appliquée – CCMA – de Université de Nice). Leur état fonctionnel a été analysé à l'aide du Mitotracker Red CM-H2XRos (Life technologies).

### 2-Mitochondries de nodosités :

Le protocole est le même que pour les racines avec les modifications suivantes: les nodosités sont broyées au mortier et pilon. Le gradient de Percoll utilisé est un gradient discontinu : 45-21-13 % (v/v). Les mitochondries sont retrouvées à l'interphase 45-21 % (v/v) Percoll.



## d) Transgénèse de *M. truncatula*

### 1-Méthode de Boisson-Dernier *et al.* (2001) :

Cette technique est utilisée pour l'analyse de constructions en vecteur d'expression de fusion *gène::Gfp* en C-terminal. Les racines de *M. truncatula* (A17) sont transformées avec *Agrobacterium rhizogenes* contenant la construction à étudier selon le protocole décrit par Boisson-Dernier *et al.*, (2001). Les racines transformées sont sélectionnées par leur résistance à la kanamycine et leur expression de la GFP. Pour ce protocole de transformation, les graines sont scarifiées, désinfectées puis mises à germer pendant deux jours à 16 °C, puis les plantules sont transformées par *A. rhizogenes*. La technique de transformation consiste à exciser la pointe racinaire de quelques millimètres et à tremper le reste de la plantule dans les bactéries sur boîtes. Les plantes sont repiquées sur boîtes de Pétri carrées contenant du milieu Farhaeus avec de l'azote. Après 14 jours d'infection (une semaine à 20 °C puis une semaine à 25 °C), les racines transgéniques sont placées sur lames et observées au stéréo-microscope sous épifluorescence (MZFLIII Leica, Leica Microsystems, Wetzlar, Allemagne, filtre GFP2) pour caractériser l'expression de la construction.

### 2-Méthode piqûres :

Cette technique est utilisée pour l'analyse de constructions en vecteur d'expression de fusion *promoteur- Gfp::Gus*, ou pour l'analyse des plantes RNAi de nitrate réductase (NR). Les racines de *M. truncatula* (A17) sont transformées avec *A. rhizogenes* contenant la construction à étudier selon le protocole décrit par Quandt *et al.*, (1993). Pour ce protocole de transformation, les graines scarifiées sont mises à germer pendant 24 h à 23 °C puis sont placées cinq jours à 4 °C pour épaissir la racine avant d'être transformées par *A. rhizogenes*. La technique de transformation consiste à piquer trois ou quatre fois les racines avec une seringue contenant les bactéries en suspension dans une solution de peptone 1 % (p/v) - saccharose 1 % (p/v) dans de l'eau. Les plantules sont ensuite repiquées dans des pots de sable. Après une semaine à 20 °C, les plantes sont placées à 23 °C jusqu'à la fin de l'expérience. Au bout de trois semaines, les racines transgéniques sont sélectionnées par épifluorescence sous stéréo-microscope (MZFLIII Leica, Leica Microsystems, Wetzlar, Allemagne, filtre GFP2) grâce à l'expression de la GFP ; les parties non transgéniques sont élaguées. A partir de ce moment, les plantes sont carencées en azote pendant une semaine avant l'inoculation avec *S. meliloti*.



# B-Méthodes de biologie moléculaire et d'analyse *in silico*

## a) Outils bio-informatiques

Les séquences des protéines prédites de *M. truncatula* IMGAG v.2 proviennent de :  
[ftp://ftpmips.gsf.de/plants/medicago/MT\\_2\\_0/](ftp://ftpmips.gsf.de/plants/medicago/MT_2_0/)

Les termes de classification en Gene Ontology sont récupérés avec le sous terme GO: 0022857 (transmembrane transporter activity) :

<http://www.geneontology.org/>

La banque d'EST est issue de EST Gene Index v.8, MTGI :

<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=medicago>

La banque de puces d'expression provient de Medicago Gene Expression Atlas :

<http://bioinfo.noble.org/gene-atlas/v2>

Les banques de données protéiques sont SwissProt :

<http://expasy.org/sprot/>

NR-NCBI GenBank (Viridiplantae) :

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

et la banque de TCDB pour les transporteurs :

<http://www.tcdb.org/index.php>

Tous les programmes de définition de domaines protéiques sont répertoriés dans InterProScan :

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan/>

dont Pfam :

<http://pfam.sanger.ac.uk/>

Les domaines transmembranaires sont trouvés avec les serveurs de HMMTOP :

<http://www.enzim.hu/hmmtop/>,

TMPred :

[http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html)

et SOSUI :

<http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/> .



Les logiciels de prédiction d'adressage sub-cellulaire sont TargetP :

<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>

Wolf PSort :

<http://wolfsort.org/>

SLP Local :

<http://sunflower.kuicr.kyoto-u.ac.jp/~smatsuda/slplocal.html>

MITOPRED :

<http://bioinformatics.albany.edu/~mitopred/>

MitoProt\_v2 :

<http://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html>

et Predotar :

<http://urgi.versailles.inra.fr/predotar/predotar.html>

Pour le dessin d'amorces PCR et QPCR le logiciel Pearl Primer est utilisé :

<http://perlprimer.sourceforge.net/download.html>

avec vérification par Blast des amorces sur le génome de *M. truncatula* :

[http://www.medicagohapmap.org/advanced\\_search\\_page.php?seq](http://www.medicagohapmap.org/advanced_search_page.php?seq)

et reverse complémentation du primer anti-sens :

[http://www.bioinformatics.org/sms/rev\\_comp.html](http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html)

## b) Extraction d'ARNs

Les ARN totaux des différents échantillons sont extraits avec du "Trizol" (Invitrogen Life Technologies), puis précipités à l'isopropanol, suivant le protocole du fournisseur. Les ARN sont ensuite quantifiés par mesure de l'absorption à 260 nm (nanodrop2000, Thermo Fisher), et leur intégrité est vérifiée sous UV, après électrophorèse sur gel d'agarose à 2 % (p/v), dans du TAE (Tris 4 mM, acide acétique 0,1 % (v/v), EDTA 1 mM), en présence de bromure d'éthidium (BEt).

## c) Transcription reverse

Les réactions de transcription inverse sont réalisées à partir 1 µg d'ARN totaux suivant le protocole du kit "Omniscript RT" (Qiagen). Les ARNm (messagers) sont alors convertit en ADN complémentaire (ADNc).



**Tableau 7 : Amorces utilisées en QPCR.**

Nom de l'amorce	Sequence	Tm	Taille		Gène IMGAG v2	Abbréviation
				amplicon		
AC173291F	ATTGGCTTCCTGATAGAAACC	60,12	138		AC173291_13.5	NRT1
AC173291R	AAACTTCACCCATTGGCT	59,32	138		AC173291_13.5	NRT1
AC173291F2	AGTGGTTGTGGCTGCTGTAA	64,52	81		AC173291_13.5	NRT1
AC173291R2	TCAAGCTCCCTGTTGTGGTA	63,31	81		AC173291_13.5	NRT1
CU302332F	AACATGAACAGACACCTAACC	59,77	121		CU302332_3.3	NRT2
CU302332R	GGCTACTCGGATTAAGACAC	59,91	121		CU302332_3.3	NRT2
CU302332F2	TTCAAGACAATGTTGGATGGG	60,88	139		CU302332_3.3	NRT2
CU302332R2	TTCACAAGTCGGGTAACCGG	62,7	139		CU302332_3.3	NRT2
AC141109F	AGATGGTAAATAGTTGGGTTGG	60,11	105		AC141109_43.5	NRT3
AC141109R	AAGATGAGGACATTATGGTGGA	60,99	105		AC141109_43.5	NRT3
AC141109F2	TTGGGTTGGATTCACCTTCCA	61,69	132		AC141109_43.5	NRT3
AC141109R2	GCTGTTGTTGTCATGCTGC	63,35	132		AC141109_43.5	NRT3
AC148406F	ACATCTCTTAATGGTTGGTGG	60,05	87		AC148406_22.5	NRT4
AC148406R	CCCTCAGTATTGGCTTCAC	60,06	87		AC148406_22.5	NRT4
AC148406F2	AGCACAGCTTCAAACATTCTCA	63,09	98		AC148406_22.5	NRT4
AC148406R2	GTGGGATAACAGGAATGGATG	60,53	98		AC148406_22.5	NRT4
AC148406F3	ATCAAGTTGTGTGGAAGGAGG	62,36	105		AC148406_22.5	NRT4
AC148406R3	GCACCAAATGCTGTCAATGA	61,85	105		AC148406_22.5	NRT4
AC175049F	AAGTCCCTCCAGCAAGTC	61,21	81		AC175049_11.4	
AC175049R	GAAACACAACGCCAATTCC	60,29	81		AC175049_11.4	
CT963133F	GTTGCACTATAAGGAAGAG	58,04	84		CT963133_12.4	
CT963133R	TTGGGACTTATCTGACTTTGG	59,69	84		CT963133_12.4	
CT967314F	AAGCGACAATTCACAATCC	59,41	133		CT967314_27.4	
CT967314R	GATGCCTCTTTCATTACCAG	58,32	133		CT967314_27.4	
AC202380F	GATGATGGGAATGGGAGGA	60,76	149		AC202380_10.3	
AC202380R	ATTAGCACGGCAGGTACTC	61,73	149		AC202380_10.3	
MtN70F	TGTAGTCACCAGTGAAGGA	59,83	81		AC146719_19.4	MtN70
MtN70R	CCACTCAAACCAAGATAAACC	58,46	81		AC146719_19.4	MtN70
MtN70F2	GGTTAATAGCAAGTCCAATAGG	58,58	108		AC146719_19.4	MtN70
MtN70R2	TCCTCATTAACCCTAATGCTG	59,55	108		AC146719_19.4	MtN70
CT025842_F	TTTCATCCATCACCATGCTC	60,42	106		CT025842_41.4	
CT025842_R	TGGCTAACCGAAGAAACC	59,52	106		CT025842_41.4	
Nrt5F	TCTATTGCTTCCCATTCTTACC	59,91	131		Medtr3g092030.1	NRT5
Nrt5R	GCCAGAATATGCCAACAC	58,72	131		Medtr3g092030.1	NRT5
Nrt6F	GACTCTAGTGAACAATGTGACC	60,7	103		Medtr5g012290.1	NRT6
Nrt6R	ACTTAGCATAGCCAATAGCCA	61,39	103		Medtr5g012290.1	NRT6
Nrt7F	CTGCTCCGTTGTCTTCAG	60,3	88		contig_21690_1.1	NRT7
Nrt7R	CTGCTTTGGTGACTTTCCC	61,2	88		contig_21690_1.1	NRT7
CT009656F	GAATTGACACAAGACTATCCG	58,76	108		CT009656_10.5	CLC1
CT009656R	TTCTCTATCCCTTTCATCACC	58,91	108		CT009656_10.5	CLC1
CLC1F_2	GAGAGTTCAAGTAGTGTAGAGG	59,32	133		CT009656_10.5	CLC1
CLC1R_2	GATCTATTACTTTAGTGAGCGG	58,15	133		CT009656_10.5	CLC1
CT025837F	TTCCCGTGATTGATGATAACTG	60,5	82		CT025837_26.4	CLC2
CT025837R	TGACCTGAAATAGAGTCCAGAG	60,98	82		CT025837_26.4	CLC2
AC136449F	CATTTGATTAACACTTCTCCAC	59,32	88		AC136449_14.5	CLC3
AC136449R	TTGGTAGGACGGAAGAAGG	60,91	88		AC136449_14.5	CLC3
CLC3F_2	TTGATGACTCCAAGTCCAC	59,21	115		AC136449_14.5	CLC3
CLC3R_2	GCTTTCCATCTTTGTCTACC	58,54	115		AC136449_14.5	CLC3
AC144657F	ATGCTTCGCCTTACACTG	59,99	105		AC144657_5.5	CLC4
AC144657R	CGGGTATCTTGGGTATCAC	59,22	105		AC144657_5.5	CLC4
AC148757F	GACAGACAACGCAACAGG	61,24	121		AC148757_8.4	CLC5
AC148757R	CCGAAAGCATCTTCCGAC	60,77	121		AC148757_8.4	CLC5
CLC5F_2	GTCCTGTTTCACTTAAAGCAGG	60,04	97		AC148757_8.4	CLC5
CLC5R_2	TCTTCATCAGCATACAAGTCC	59,84	97		AC148757_8.4	CLC5
CLC5F_3	GACTCAAGAGACATCAACATTGG	61,54	89		AC148757_8.4	CLC5
CLC5R_3	CCACTTCAAGAGACATTACAACC	61,48	89		AC148757_8.4	CLC5
AC140549_F	GATTTCCAGTAGTTGATGAGCC	61,09	82		AC140549_27.5	
AC140549_R	AGCACCAAAGATGAGAC	59,17	82		AC140549_27.5	
Mtc27F	TGAGGGAGCAACCAAATACC	78			TC 85211	gene constitutif
Mtc27R	CGAAAACCAAGCTACCATC	78			TC 85211	gene constitutif
a39F	CGGCCACTAGATCTTTGACA	74				Gène de référence
a39R	CATTTGCTGTTGGTGTGTACG	74				Gène de référence
a38F	TCGTGGTGGTGGTTATCAAA	74,5				Gène de référence
a38R	TTCAGACCTTCCCATTGACA	74,5				Gène de référence
40s2F	AAGAAGGGAAAGAGTGCTGCT	74,5				Gène de référence
40s2R	GGTGTCCAATTAACACTCAACC	74,5				Gène de référence
a40F	TGGAAAGTTGACTGGAATGG	79			Medtr8g109660.1	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, type I
a40R	GCCCTCAGACTCCTCCTTGA	79			Medtr8g109660.1	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, type I
a45F	TGTGTACCCTCCTGTTTGC	76,5			Medtr4g011930.1	Ferritin-like
a45R	TGAGTCTCTCAGCATGCTCTC	76,5			Medtr4g011930.1	Ferritin-like

## d) Amplification d'ADN par PCR

Les réactions de PCR sont réalisées dans un volume de 20 µl comprenant 2 µl de matrice ADN, 2 µl de tampon Taq 10 X (contenant 500 mM KCl, 100 mM Tris pH 9,0, 1 % (v/v) Triton X-100), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM dNTP, 0,5 µM de chaque amorce spécifique, 2 µl de tampon de charge (1 mM rouge de Crésol, 60 % (v/v) saccharose) et de 1 µl de Taq polymérase. La réaction est menée comme suit : 5 min à 95 °C pour dénaturer l'ADN, puis 25 à 30 cycles comprenant 45 s de dénaturation à 94 °C, 45 s à la température d'hybridation des amorces, et 1 min d'élongation par kb d'amplicon à 72 °C. Pour terminer la réaction, une élongation finale de 7 à 10 min à 72 °C est effectuée.

## e) Analyse d'expression par PCR en temps réel

Les PCR quantitatives sont réalisées avec le kit "qPCR MasterMix Plus for SYBR® green I" (Eurogentec), à l'aide du "DNA Engine Opticon 2 Continuous Fluorescence Detection system" (MJ Research, Cambridge). La réaction est réalisée dans un volume de 15 µl contenant 5 µl de produit de transcription inverse dilué 30 fois et 0,45 µM de chaque amorce spécifique. La réaction est menée comme suit : 2 min à 50 °C, 10 min de dénaturation à 95 °C, suivie de 40 cycles comprenant 15 s de dénaturation à 95 °C et 1 min d'hybridation des amorces et d'élongation à 60 °C. La spécificité de l'amplification est vérifiée par la présence d'un seul pic sur la courbe de dissociation réalisée à la fin de la réaction de PCR. Les gènes *Mtc27* (TC 85211), *a39* et *a38* exprimés de manière constitutive chez les racines de *M. truncatula* sont utilisés comme gènes de référence en fonction de leur stabilité d'expression dans les différentes conditions de chaque étude. Les séquences des amorces utilisées sont présentées dans le Tableau 7. Les données sont quantifiées grâce au logiciel "Opticon Monitor 2" (MJ Research) et le niveau d'expression relative des gènes est calculé selon la méthode des  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . La significativité des résultats est analysée par test statistique sous R (Hillou et Tran, communication personnelle).

**Tableau 8 : Amorce utilisées pour les clonages Gateway.**

Nom de l'amorce	Sequence (adaptateur + spécifique)	Tm	Taille amplicon	Gène IMGAG v2 ou V3.5	Abbréviation
AC173291attB1	AAAAAGCAGGCTTCACCATGCCATTGGTAGCTGCTTC	63,25	1641	AC173291_13.5	CDS NRT1 ou G1
AC173291attB2	AGAAAGCTGGGTTCATCTTTAGTAAACCCTTTCTT	58,16	1641	AC173291_13.5	CDS NRT1 ou G1
CU302332attB1	AAAAAGCAGGCTTCACCATGGAGAAGAATGGTAATCT	55,53	1731	CU302332_3.3	NRT2
CU302332 attB2	AGAAAGCTGGGTGAAGTGTAGTACTAGCAAGCTC	59,22	1731	CU302332_3.3	NRT2
AC141109attB1	AAAAAGCAGGCTTCACCATGGCTGGTGACAGAAAAC	63,05	1614	AC141109_43.5	NRT3
AC141109attB2	AGAAAGCTGGGTGACTATCTGATTCACCTTTATTAT	54,16	1614	AC141109_43.5	NRT3
AC148406attB1	AAAAAGCAGGCTTCACCATGGGAGACAAAGAAGTAAA	56,32	1809	AC148406_22.5	NRT4
AC148406attB2	AGAAAGCTGGGTGTCTATGCCTCTCTTTCTCT	56,59	1809	AC148406_22.5	NRT4
Nrt5attB1	AAAAAGCAGGCTTCACCATGGAGTTGTTCTTCTACC	59,27	1377	Medtr3g092030.1	CDS NRT5
Nrt5attB2	AGAAAGCTGGGTGCAGGTTCAATGGCTCTGAC	60,67	1377	Medtr3g092030.1	CDS NRT5
Nrt6attB1	AAAAAGCAGGCTTCACCATGAGCACCCCTCCACACA	61,98	1773	Medtr5g012290.1	CDS NRT6
Nrt6utrB1	AAAAAGCAGGCTTCACCCACATTTACATACCTCTC	55	1804	Medtr5g012290.1	CDS NRT6 + 5'utr
Nrt6attB2	AGAAAGCTGGGTGTGCATGGAATGTAGAGGC	59,34	1773	Medtr5g012290.1	CDS NRT6
Nrt7attB1	AAAAAGCAGGCTTCACCATGTTAGCCATGCCATAC	56,98	306	contig_21690_1.1	CDS NRT7
Nrt7attB2	AGAAAGCTGGGTGTGCTTTGGTGACTTTCC	58,48	306	contig_21690_1.1	CDS NRT7
Pnrt1F	AAAAAGCAGGCTTCGATGAAACAGAGGGTATTGGTG	61,56	1562	mth2-63m2	P NRT1 ou P1
Pnrt1R	AGAAAGCTGGGTGTCTCAATCATGGATACCTTGACA	61,27	1562	mth2-63m2	P NRT1 ou P1
CLC1attB1	AAAAAGCAGGCTTCACCATGGGTGGCTTAGGATGTGC	64,83	2139	CT009656_10.5	CDS CLC1 ou G2
CLC1attB2	AGAAAGCTGGGTGGCTGAGGGACTGTCTTGTG	62,55	2139	CT009656_10.5	CDS CLC1 ou G2
CLC3attB1	AAAAAGCAGGCTTCACCATGAGTTCGATTCATTTGATTAAC	57,98	663	AC136449_14.5	CLC3
CLC3attB2	AGAAAGCTGGGTGTGTGAGCCTCTCACCAGA	62,2	663	AC136449_14.5	CLC3
CLC4attB1	AAAAAGCAGGCTTCACCATGTCCAATAACCATCTTTC	55,34	2331	AC144657_5.5	CDS CLC4 ou G3
CLC4attB2	AGAAAGCTGGGTGGATGCCAGAAAAGAATTTTT	54,96	2331	AC144657_5.5	CDS CLC4 ou G3
CLC5attB1	AAAAAGCAGGCTTCACCATGGGAAGTAAATGGAAGAAAAG	58,35	2184	AC148757_8.4	CLC5
CLC5attB2	AGAAAGCTGGGTGCCTTGGGCTTGGTTGTGATC	63,74	2184	AC148757_8.4	CLC5
Pclc1F	AAAAAGCAGGCTTCAGACGGAATTGGGTTCTTGA	61,45	1474	mth2-154o18	P CLC1 ou P2
Pclc1R	AGAAAGCTGGGTGCCCTGCCATTCCACTATAA	61,39	1474	mth2-154o18	P CLC1 ou P2
Pclc3F	AAAAAGCAGGCTTCGAGAATGAATGATTACTGACCA	59,58	1548	mth2-11k13	P CLC3
Pclc3R	AGAAAGCTGGGTGCGGTGGTGGGAATAAGAATG	61,41	1548	mth2-11k13	P CLC3
Pclc4F	AAAAAGCAGGCTTCACATTGCTTGTCTCCAAAA	60,2	1458	mth2-16a6	P CLC4 ou P3
Pclc4R	AGAAAGCTGGGTGCGAGTTGCTTTGTGAGTGTG	63,14	1458	mth2-16a6	P CLC4 ou P3
Pclc5F	AAAAAGCAGGCTTCCTACGGCTGACTGTTTTG	63,41	1617	mth2-73h18	P CLC5
Pclc5R	AGAAAGCTGGGTGATCTCAACGACCCAGAAAAGC	62,51	1617	mth2-73h18	P CLC5
NP007	GGGGACAAGTTGTACAAAAAGCAGGCT	55	x	amorce adaptatrice AttB1	
NP008	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT	55	x	amorce adaptatrice AttB2	

## f) Analyse d'une séquence par clonage

La construction de vecteurs d'expression en plante est réalisée par une stratégie Gateway® (Invitrogen). Des fragments de 1 500 pb pour les promoteurs et l'ADNc pleine taille pour le gène (CDS) sont amplifiés par PCR (Phusion® Finnzymes) en utilisant les amorces présentés au Tableau 8. Les fragments PCR sont insérés dans le vecteur donneur pDON207 puis dans le vecteur pKGWFS7 (construction promoteur) ou pK7FWG2 (construction CDS), (Karimi *et al.*, 2002). Les bactéries compétentes utilisées sont les souches DH10β d'*Escherichia coli* et Arqual d'*A. rhizogenes*.

## C-Méthodes de biochimie

### a) Dosages d'activités enzymatiques

Lors de la séparation des organelles sur gradient de Percoll (voir paragraphe A-c) Extraction de mitochondries), certaines activités enzymatiques sont utilisées comme marqueurs de compartiments cellulaires. La fumarase est spécifique des mitochondries, la catalase permet de suivre les peroxysomes, la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) est un marqueur des plastes et du cytosol, la phosphoénolpyruvate carboxylase (PEPC) est spécifique du cytoplasme. L'activité nitrate réductase (NR) permet de suivre les bactéroïdes lors de l'extraction de mitochondries de nodosités. L'activité NR est également mesurée lors d'expériences sur les mutants NR et lors des approches avec inhibiteurs pharmacologiques (voir partie 1 des résultats). Enfin, l'activité de réduction de l'acétylène (ARA) permet de mesurer l'activité de la nitrogénase.

#### 1-Fumarase :

L'activité de cette enzyme est suivie grâce à la formation du fumarate à partir de malate à 250 nm (Hill and Bradshaw 1969) : Malate  $\rightarrow$  fumarate + H<sub>2</sub>O. Le milieu réactionnel (1 mL) contient l'extrait enzymatique, du milieu SM, 50 mM malate pH 7,6, 0,025 % triton (v/v). L'activité fumarase est calculée à l'aide du coefficient d'extinction molaire du fumarate à 250 nm ( $\epsilon_{\text{fumarate}} = 4,88 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).



## 2-Catalase :

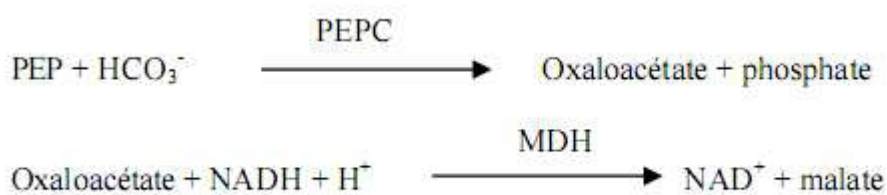
L'activité de la catalase est suivie grâce à la consommation du peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) à 240 nm (Beers and Sizer 1952) :  $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$ . Le milieu réactionnel (1 mL) contient l'extrait enzymatique, 50 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 7, 10 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ . L'activité catalase est calculée à l'aide du coefficient d'extinction molaire du  $\text{H}_2\text{O}_2$  à 240 nm ( $\epsilon_{\text{H}_2\text{O}_2} = 43,6 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ).

## 3-Glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) :

L'activité de la G6PDH est suivie grâce à la réduction du  $\text{NADP}^+$  en NADPH à 340 nm à partir de  $\text{NADP}^+$  qui est le co-facteur de l'enzyme. La G6PDH convertit le glucose 6-phosphate (G6P) en 6-Phosphogluconate (Lamed and Zeikus 1980) :  $\text{G6P} + \text{NADP}^+ \rightarrow 6\text{-Phosphogluconate} + \text{NADPH} + \text{H}^+$ . Le milieu réactionnel (1 mL) contient l'extrait enzymatique, 50 mM Tricine pH 8,2, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM G6P, 5 mM NADP, 0,025 % triton (v/v). L'activité G6PDH est calculée à l'aide du coefficient d'extinction molaire du NADPH à 340 nm ( $\epsilon_{\text{NADPH}} = 6\,220 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ).

## 4-Phosphoénolpyruvate carboxylase (PEPC) :

L'activité de cette enzyme peut être suivie grâce à deux réactions enzymatiques successives. La première réaction est la formation d'oxaloacétate à partir de phosphoénol pyruvate (PEP) par la PEPC. L'oxaloacétate est ensuite convertit en malate par la malate déshydrogénase (MDH) qui utilise le  $\text{NAD}^+$  comme co-facteur et forme du NADH à 340 nm (Huber *et al.* 1986).



Le milieu réactionnel (1 mL) contient l'extrait enzymatique, 50 mM Tricine pH 8,3, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 200  $\mu\text{M}$  NADH, 2 unités de MDH, 5 mM PEP. La consommation de NADH est suivie à 340 nm. L'activité PEPC est calculée à l'aide du coefficient d'extinction molaire du NADH à 340 nm ( $\epsilon_{\text{NADH}} = 6\,220 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ).



### 5-Nitrate réductase (NR) :

L'activité de la NR est mesurée par dosage du nitrite formé à partir du nitrate à 28 °C (Horchani *et al.*, 2011). Le milieu réactionnel (1 mL) contient l'extrait enzymatique, 0,2 M d'Hepes pH7, 15 mM KNO<sub>3</sub>, 250 μM NADH. Après 30 min d'incubation à 28 °C, la réaction est stoppée par passage à 100 °C pendant 3 min. Le nitrite formé est mesuré par l'addition de 250 μL de sulfanilamide 1% (v/v) dans 1 N HCl et de 250 μL de N-1-naphthylènediamine dihydrochloride 0,01 % (v/v) dans de l'eau. Après 30 min d'incubation à température ambiante, les échantillons sont centrifugés pendant 10 min 13 000 g et l'absorbance du surnageant est lue à 540 nm. La concentration en nitrite est déterminée grâce à la réalisation d'une courbe étalon.

Les protéines solubles sont dosées par la méthode de Bradford (1976), avec pour référence une gamme étalon d'albumine sérique de bœuf (BSA).

### 6-Mesure de l'activité réductrice d'acétylène :

La capacité fixatrice d'azote de racines nodulées de luzerne est déterminée par une méthode indirecte, qui exploite l'aptitude de la nitrogénase à réduire l'acétylène (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>) en éthylène (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>) (Hardy *et al.*, 1968). L'activité réductrice de l'acétylène (ARA) est estimée en dosant l'éthylène produit par chromatographie en phase gazeuse (Agilent Technologie, model 6890N) à 70 °C (Trinchant et Rigaud, 1987). Le gaz-vecteur est l'azote et la détection est assurée par un détecteur à ionisation de flamme relié au logiciel "Agilent ChemStation for GC Systems". Les mesures sont réalisées sur la partie racinaire. Au temps t<sub>0</sub>, les tubes sont hermétiquement bouchés et les racines maintenues sous un mélange gazeux composé de 10 % d'acétylène et 90 % d'air ; des prélèvements de 200 μl sont analysés après 30 min d'incubation.

## b) Mesures de production de NO

### 1-Par chimiluminescence :

Pour cette technique un appareil Eco Physics CLD62 (collaboration avec Massimo Delledonne, Diana Bellin, Jian Chen, Université de Vérone, Italie) est utilisé. L'échantillon de 2 ml finaux contenant les mitochondries purifiées (1 à 2 mg de protéines) est déposé sur un disque à la base de la chambre de réaction sous forme de colonne. L'anoxie est créée par





bullage de la chambre avec de l'azote (débarrassée du NO), la normoxie est faite par bullage d'air (débarrassé du NO).

## 2-Par fluorescence :

Pour cette méthode, le spectrofluorimètre Xenius spectrofluorimeter (Safas) est utilisé. Les mitochondries (environ 100 µg de protéines) sont diluées dans du tampon SM dans une cuve de 1 mL en présence de 1-5 µM de sonde CuFL solubilisée dans du DMSO (diméthylsulfoxyde), (Strem Chemicals), excitation 488 nm émission 516 nm. L'échantillon est bullé soit avec de l'argon (anoxie), soit avec de l'air (normoxie), soit avec un mélange gazeux 0,1 % O<sub>2</sub> – 99,9 % N<sub>2</sub> (hypoxie).

Les substrats et les effecteurs utilisés sont les suivants: NADH, ADP, nitrite, nitrate, NaSO<sub>4</sub>, NaCl chacun à une concentration finale de 0,5 mM, 0,1 mM ATP, 2 à 15 mM KCN, 3 mM tungstate, 0,1 mM allopurinol, 1 mM L-NAME (N(G)-nitro-L-arginine-méthyl ester), 25 µM myxothiazol et antimycine, 1 mM propylgallate, 10 µM FCCP (Trifluorocarbonylcyanide Phenylhydrazone). Les solutions stock de NADH, ADP, ATP nitrite, nitrate, NaSO<sub>4</sub>, NaCl, KCN, tungstate et L-NAME sont préparées dans l'eau. Les solutions stock d'allopurinol myxothiazol, antimycine, propylgallate et FCCP sont faites dans du DMSO.

## c) Préparation des échantillons membranaires pour la spectrométrie de masse (MS)

La première étape de la préparation des échantillons consiste à récupérer les membranes des mitochondries et les décaper pour éliminer au mieux les protéines adsorbées. Les MP sont éclatées par sonication aux ultrasons 2 fois 20 s à puissance 4 (Vibra Cell, Sonics and Materials, Danbury Connecticut, USA). L'enveloppe est séparée de la matrice par ultracentrifugation à 100 000 g, pendant 30 min à 4 °C. L'enveloppe des mitochondries contenue dans le culot est ensuite décapée selon le protocole décrit par Santoni *et al.* (2003). Le culot est resuspendu dans la première solution de décapage (5 mM Tris HCl pH 9,5, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 4 M urée) à raison de 1,6 mL de solution pour 1 mg de protéines puis laissé 5 min dans la glace. Les membranes sont sédimentées 10 min à 150 000 g pendant 10 min



à 4 °C. De la même manière, le culot obtenu est re-suspendu dans la solution 2 (20 mM NaOH) puis centrifugé à nouveau. Le culot obtenu est re-suspendu dans la solution 3 (5 mM Tris HCl pH 8, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 100 mM NaCl), puis centrifugé.

L'étape suivante consiste à solubiliser les protéines membranaires dans le SDS (sodium dodecyl sulfate) puis à substituer le SDS par de l'urée grâce à un filtre. Le dernier culot est resuspendu dans du tampon Laemmli (4 % (p/v) SDS, 10 % (v/v) 2-mercaptoethanol, 0,004 % (p/v) bleu de bromophenol, 0,125 M Tris HCl et 20 % (v/v) glycerol, pH 6,8) puis est incubé pendant 3 h à température ambiante avant d'être centrifugé à 8 000 g pendant 5 min. Le surnageant contenant les protéines membranaires solubilisées est préparé pour la spectrométrie de masse (MS) selon la méthode "Filter Aided Sample Preparation" (FASP) décrite par Wisniewski *et al.* (2009). Les colonnes Amicon (filtres 30k, Millipore) sont rincées avec 500 µL d'eau ultrapure et centrifugées 3 min à 14 000 g (cette centrifugation est utilisée tout au long de la préparation ; le temps peut être augmenté pour diminuer le volume dans la colonne). Cette étape est répétée trois fois, puis réalisée avec 250 µL de tampon UA (8 M d'urée dans 0,1 M Tris/HCl pH 8,5). L'échantillon (resuspendu dans le tampon Laemmli) est mélangé avec le tampon UA à raison de 333 µL d'UA pour 50 µL d'échantillon puis vortexé pendant 10 min. L'échantillon ainsi conditionné est chargé sur la colonne Amicon (2 dépôts de 300 µL avec un lavage avec 250 µL d'UA entre chaque), puis centrifugé. Les colonnes Amicon sont rincées/centrifugées 4 fois avec 250 µL d'UA.

Les protéines sont ensuite réduites puis alkylées avant d'être clivées en peptides à l'aide de la trypsine. Les ponts disulfures des protéines sont réduits avec 250 µL de dithiothréitol (DTT) 10 mM, pendant 1 h à 37 °C puis les colonnes sont rincées/centrifugées trois fois de suite avec 250 µL d'UA. Les protéines de l'échantillon sont alkylées avec 250 µL d'acide iodoacétamide (IAA) 50 mM, pendant 30 min à 37 °C puis les colonnes sont de nouveau rincées/centrifugées trois fois avec 250 µL d'UA. Les colonnes sont ensuite lavées/centrifugées trois fois avec 250 µL de tampon ABC (Ammonium Bicarbonate) à 50 mM. Les colonnes sont alors placées dans de nouveaux tubes collecteurs. Les protéines sont digérées avec la trypsine (Sequencing Grade Modified Trypsin, Promega), (ratio protéine/enzyme 1/100) solubilisée dans ABC pendant 2 h à 4 h à 37 °C. Une deuxième digestion tryptique est réalisée à la suite (ratio 1/50) avec 10 mM CaCl<sub>2</sub>, à 37 °C sur la nuit. Les peptides sont élués par centrifugation et la colonne est rincée/centrifugée trois fois avec 250 µL d'ABC. L'éluat ABC est réservé à 4 °C en attendant l'étape de dessalage. Les colonnes sont placées dans de nouveaux tubes collecteurs et lavées/centrifugées avec 250 µL



d'acétonitrile (ACN) 50 % (dans de l'eau). Les colonnes sont lavées/centrifugées avec 250 µL 0,5 M NaCl puis les tubes sont mis à évaporer sous vide pour enlever la moitié du volume (qui correspond à l'ACN). Le contenu de chaque tube est mélangé à chaque éluat ABC puis acidifié avec 25 µL d'acide trifluoroacétique (TFA) 10 % (v/v) dans l'eau.

Enfin, les peptides générés sont dessalés puis séchés pour être envoyés pour l'analyse MS. Les échantillons sont ensuite dessalés sur colonne C18 Seppak 20 cc (Waters). La colonne C18 est d'abord conditionnée avec deux fois 10 mL de tampon d'éluion "elution buffer" (EB, 0,1 % TFA dans de l'eau) puis deux fois 15 mL de tampon de charge "loading buffer" (LB, 0,1 % TFA dans 70 % ACN). Les échantillons sont chargés sur la colonne C18 (équivalent 5 mg de protéines par colonne), puis les tubes sont rincées avec du LB. La colonne C18 est lavée quatre fois avec 10 mL de LB. Les peptides dessalés sont élués avec 8 mL de EB et récoltés dans des tubes qui sont ensuite complètement séchés, puis envoyés à nos collaborateurs pour l'analyse MS.

L'analyse MS a été réalisée soit au Laboratoire de Protéomique Fonctionnelle (LPF – INRA – Sup-Agro, Montpellier) en collaboration avec Sonia Hem, Valérie Rofidal et Michel Rossignol, soit à la Plateforme de Protéomique et de Métabolomique Bernard Rossi, (PPMBR – IFR 50 Nice) en collaboration avec Jean-Marie Guigonis. La banque de protéines utilisée pour l'identification de protéines est l'annotation automatique de protéines de la version 3.5 du consortium d'annotation du génome de *Medicago truncatula* au lien suivant : <http://medicago.jcvi.org/cgi-bin/medicago/download.cgi>. Les protéines sont assignées à une fonction avec le logiciel Mapman : [mapman.gabipd.org/](http://mapman.gabipd.org/). Les diagrammes de Venny sont obtenus grâce à l'outil développé par Oliveros (2007).

## D-Méthodes de microscopie

### a) Préparation des échantillons pour la microscopie électronique à transmission (MET)

Les mitochondries purifiées extemporanément sont fixées avec 2 % (v/v) glutaraldéhyde (dans de l'eau), pendant 30 min, à température ambiante. Les échantillons de mitochondries ont ensuite été analysés à la Plateforme Commune de Microscopie Appliquée de Nice (PCMA, UNS, Nice) en collaboration avec Sophie Pagnotta.



## b) Localisation de l'expression d'un gène par fusion *promoteur-Gus* en microscopie optique

Les racines transgéniques contenant le vecteur d'expression avec la fusion *promoteur-Gfp::Gus*, sont fixées pendant 1 h dans l'acétone 90 % (v/v) dans de l'eau à -20 °C. L'activité GUS est révélée pendant quelques heures dans un tampon 0.1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,4, contenant 0,5 mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 0,5 mM K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> et 0,5 mM X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indoxyl-fl-D-acide glucuronique). Les racines ou les coupes vibratome (racine incluse dans de l'agar 4 % (p/v) puis coupée à 100 µm d'épaisseur) sont montées entre lame et lamelle, puis analysées (en lumière visible) avec un microscope Zeiss Axioplan 2. Les images acquises sont traitées avec le logiciel Axiocam.

## c) Localisation de l'adressage protéique par fusion *gène::Gfp* et visualisation des mitochondries colorées au Mitotracker Red en microscopie optique

Les mitochondries purifiées extraites de racines ou de nodosités et les racines transgéniques exprimant les constructions *gène::Gfp* en C-terminal sont analysées par microscopie confocale. Les racines sont montées directement entre lame et lamelle. Les mitochondries purifiées sont colorées au Mitotracker Red CM-H2XROS (Life technologies) pendant 30 min à 25 °C, en présence de 0,5 mM NADH, 0,5 mM ADP et 0,1 mM ATP dans du tampon SM. Pour la révélation GFP, les échantillons sont excités par un laser Argon à longueur d'onde de 488 nm puis observés avec un objectif Plan Achromat 20 X/0,75 avec un filtre d'émission BP 505-530 spécifique de l'émission de la GFP. Pour la révélation de la fluorescence Mitotracker Red, les échantillons sont excités par un laser Hélium Néon à longueur d'onde de 543 nm puis observés avec un objectif C-Achromat 63X/1,2W avec un filtre d'émission LP 560. L'émission de fluorescence a été détectée par un détecteur spectral équipant le microscope confocal Zeiss LSM 510 Meta (CARL ZEISS S.A.S., Le Pecq, France). Le signal produit est analysé à l'aide du logiciel (Zeiss LSM 510 Meta) par l'option "lambda mode". Le travail de microscopie a été réalisé au sein de l'UMR – ISA, à l'INRA de Sophia Antipolis, en collaboration avec Gilbert Engler.



## Résultats

### **Partie 1 : Mise en évidence de l'existence d'une respiration Nitrate-NO dans les nodosités de *Medicago truncatula*.**



## A-Introduction

Chez les légumineuses, la réduction de l'azote atmosphérique ( $N_2$ ) en ammoniac ( $NH_4^+$ ) par la nitrogénase bactérienne constitue la fonction centrale des nodosités symbiotiques. Ce processus, très coûteux en énergie, sous-tend un métabolisme énergétique et carboné très actif : régénération de l'ATP et du pouvoir réducteur, fourniture en substrats carbonés aux bactéroïdes (Udvardy et Day, 1997). Dans le même temps, la pression partielle en oxygène dans les nodosités est très faible, de l'ordre de quelques dizaines de nanomolaires (Hunt *et al.*, 1988), car la nitrogénase est irréversiblement inactivée par l'oxygène (Trinchant et Rigaud, 1982 ; Kato *et al.*, 2010). Depuis plus de 30 ans, la question se posait donc de savoir par quels mécanismes l'ATP est régénéré au sein de la nodosité dans un contexte où la respiration mitochondriale dépendante de l'oxygène est très probablement amoindrie (Udvardi et Day, 1997 ; White *et al.*, 2007).

La découverte des hémoglobines non symbiotiques dans les années 90 (Taylor *et al.*, 1994 ; Sowa *et al.*, 1998), puis les travaux menés par les équipes de R.D. Hill (Dordas *et al.*, 2003, 2004 ; Igamberdiev *et al.*, 2005) et de W.M. Kaiser (Tischner *et al.*, 2004 ; Planchet *et al.*, 2005 ; Gupta *et al.*, 2005) sur les racines en situation d'hypoxie, ont fait émerger l'idée d'une respiration modifiée, la "respiration nitrate-NO", dans laquelle le nitrite se substitue à l'oxygène en situation d'hypoxie (Igamberdiev et Hill, 2009). Dans ce processus respiratoire, le nitrate ( $NO_3^-$ ) est réduit dans le cytosol par la nitrate réductase (NR) en nitrite ( $NO_2^-$ ). Celui-ci est transporté du cytosol dans les mitochondries, où il sert d'accepteur terminal pour les électrons de la chaîne respiratoire mitochondriale qui le réduisent en oxyde nitrique (NO). Ce processus est couplé à une production d'ATP (Stoimenova *et al.*, 2007). Le NO diffuse ensuite des mitochondries vers le cytosol où il est oxydé en nitrate par l'hémoglobine. Cette respiration nitrate-NO est donc un cycle : nitrate => nitrite => NO => nitrate, qui permettrait de faire fonctionner les chaînes de transfert d'électron mitochondriale et de régénérer l'ATP nécessaire au métabolisme cellulaire.

Sur la base du fait que les nodosités fixatrices d'azote sont des organes fortement hypoxiés (Hunt *et al.*, 1988), et que la zone de fixation de l'azote des nodosités est le siège d'une forte production de NO (Baudouin *et al.*, 2006), nous avons posé l'hypothèse selon laquelle, dans les nodosités, l'ATP serait en partie régénéré par le biais d'une respiration nitrate-NO. La première partie de ce travail de thèse a donc eu pour objectif: (i) de démontrer l'existence et le fonctionnement de la respiration nitrate-NO dans les nodosités fixatrices



d'azote, et (ii) de mettre en évidence l'importance de cette respiration dans la régénération de l'énergie nécessaire aux processus de réduction et d'assimilation de l'azote.

## **B-Publication**

### **Both Plant and Bacterial Nitrate Reductases Contribute to Nitric Oxide Production in *Medicago truncatula* Nitrogen-Fixing Nodules<sup>1[W][OA]</sup>**

Faouzi Horchani<sup>2</sup>, Marianne Prévot<sup>2</sup>, Alexandre Boscari, Edouard Evangelisti, Eliane Meilhoc, Claude Bruand, Philippe Raymond<sup>3</sup>, Eric Boncompagni, Samira Aschi-Smiti, Alain Puppo, and Renaud Brouquisse\*

UMR INRA 1301, CNRS 6243, Université Nice Sophia Antipolis, Interactions Biotiques et Santé Végétale, Institut Agrobiotech, 06903 Sophia Antipolis cedex, France (F.H., M.P., A.B., E.E., E.B., A.P., R.B.); Laboratoire des Interactions Plantes Microorganismes, UMR INRA 441, CNRS 2594, 31326 Castanet Tolosan, France (E.M., C.B.); UR d'Ecologie Végétale, Département des Sciences Biologiques, Faculté des Sciences de Tunis, 1060 Tunis, Tunisia (F.H., S.A.-S.); and UMR INRA 619, Biologie du Fruit, F-33883 Villenave d'Ornon cedex, France (P.R.)

Nitric oxide (NO) is a signaling and defense molecule of major importance in living organisms. In the model legume *Medicago truncatula*, NO production has been detected in the nitrogen fixation zone of the nodule, but the systems responsible for its synthesis are yet unknown and its role in symbiosis is far from being elucidated. In this work, using pharmacological and genetic approaches, we explored the enzymatic source of NO production in *M. truncatula-Sinorhizobium meliloti* nodules under normoxic and hypoxic conditions. When transferred from normoxia to hypoxia, nodule NO production was rapidly increased, indicating that NO production capacity is present in functioning nodules and may be promptly up-regulated in response to decreased oxygen availability. Contrary to roots and leaves, nodule NO production was stimulated by nitrate and nitrite and inhibited by tungstate, a nitrate reductase inhibitor. Nodules obtained with either plant nitrate reductase RNA interference double knockdown (*MtNR1/2*) or bacterial nitrate reductase-deficient (*napA*) and nitrite reductase-deficient (*nirK*) mutants, or both, exhibited reduced nitrate or nitrite reductase activities and NO production levels. Moreover, NO production in nodules was found to be inhibited by electron transfer chain inhibitors, and nodule energy state (ATP-ADP ratio) was significantly reduced when nodules were incubated in the presence of tungstate. Our data indicate that both plant and bacterial nitrate reductase and electron transfer chains are involved in NO synthesis. We propose the existence of a nitrate-NO respiration process in nodules that could play a role in the maintenance of the energy status required for nitrogen fixation under oxygen-limiting conditions.

<sup>1</sup> This work was supported by the Institut National de la Recherche Agronomique, the Université de Nice-Sophia Antipolis, the Centre National de la Recherche Scientifique, and the Agence Nationale pour la Recherche (grant no. ANR-07-BLAN-0117-02). F.H. was supported by postdoctoral grants from the Erasmus Mundus program (IMAGEEN) and from the Université de Nice-Sophia Antipolis. S.A.-S. was supported by a senior fellowship from the Erasmus Mundus program (IMAGEEN). M.P. was supported by a doctoral fellowship from the Institut National de la Recherche Agronomique and the Conseil Régional de Provence Alpes Côte d'Azur. E.M. was supported by the National Institute for Applied Sciences.

<sup>2</sup> These authors contributed equally to the article.

<sup>3</sup> Deceased 2009.

\* Corresponding author; e-mail [renaud.brouquisse@sophia.inra.fr](mailto:renaud.brouquisse@sophia.inra.fr).

The author responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors ([www.plantphysiol.org](http://www.plantphysiol.org)) is: Renaud Brouquisse ([renaud.brouquisse@sophia.inra.fr](mailto:renaud.brouquisse@sophia.inra.fr)).

<sup>[W]</sup> The online version of this article contains Web-only data.

<sup>[OA]</sup> Open Access articles can be viewed online without a subscription.

[www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.110.166140](http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.110.166140)

Nitric oxide (NO) is a gaseous intracellular and intercellular signaling molecule in mammals with a broad spectrum of regulatory functions in various physiological processes (Ignarro, 1999). There is increasing evidence of a role for this molecule in plant growth and development (del Río et al., 2004; Delledonne, 2005). NO appears to have signaling functions in the induction of cell death, defense genes, and interaction with reactive oxygen species during plant defense against pathogen attack (Wendehenne et al., 2001; Delledonne, 2005). Similarly, there is evidence of a role for NO in plants exposed to abiotic stress such as osmotic stress, salinity, or high temperature (Gould et al., 2003). However, NO synthesis in plants is still a matter of debate (Besson-Bard et al., 2008; Corpas et al., 2009; Moreau et al., 2010). Possible generating systems have been proposed, such as NO synthase-like proteins (Corpas et al., 2009), nitrate reductase (NR; Dean and Harper, 1988; Rockel et al., 2002), polyamine oxidase (Yamasaki and Cohen, 2006), and nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)-NO reductase (Stöhr and Stremelau, 2006), but convincing evidence of

their involvement in the purposeful generation of NO in vivo is still lacking (Zemojtel et al., 2006; Moreau et al., 2010).

Contrary to that in pathogenic situations, the interaction between legumes and soil bacteria of the Rhizobiaceae family leads, after extensive recognition of both partners, to the establishment of a symbiotic relationship characterized by the formation of new differentiated organs called nodules, which provide a niche for bacterial nitrogen fixation. Functional nodules result from the combination of developmental and infectious processes: bacteria released in plant cells differentiate into bacteroids with the unique ability to fix atmospheric nitrogen via nitrogenase activity (Oldroyd and Downie, 2008). As nitrogenase is strongly inhibited by oxygen, nitrogen fixation is made possible by the microaerophilic conditions prevailing in the nodule (Millar et al., 1995).

Several lines of evidence have demonstrated the occurrence of NO production during the legume-rhizobium symbiosis. NO was transiently observed in *Lotus japonicus* and *Medicago sativa* roots within a few hours after infection with *Mesorhizobium loti* and *Sinorhizobium meliloti* strains, respectively (Shimoda et al., 2005; Nagata et al., 2008). NO has also been involved in the auxin-controlled formation of *M. sativa* and *Medicago truncatula* nodules (Pii et al., 2007). NO formation has also been detected in functional *M. truncatula*-*S. meliloti* nodules: NO detection was restricted to the fixing zone of the nodule (Baudouin et al., 2006). Finally, NO has been shown to be produced by mature *Glycine max*-*Bradyrhizobium japonicum* nodules in response to flooding conditions (Meakin et al., 2007; Sánchez et al., 2010). A wide modulation of NO-responsive genes has also been detected during the establishment of a functioning nodule, pointing to a possible contribution of NO in nodule metabolism (Ferrarini et al., 2008). Moreover, it has been shown that leghemoglobin (Lb), the hemoprotein ensuring an oxygen flux to the bacteroids in the microaerophilic conditions of the nodule, has the capacity to scavenge NO (Herold and Puppo, 2005), which suggests that it participates in the protection of bacteroids against the inhibition of nitrogenase by NO (Trinchant and Rigaud, 1982; Shimoda et al., 2009; Kato et al., 2010). In the same way, NO has been shown to induce the expression of nonsymbiotic hemoglobin genes in *L. japonicus* (Shimoda et al., 2005), and overexpression of a class 1 plant hemoglobin gene appeared to enhance symbiotic nitrogen fixation activity between *L. japonicus* and *M. loti* (Shimoda et al., 2009). Similarly, *M. truncatula* or *M. sativa* nodules induced by a *S. meliloti* mutant strain deficient in the flavohemoglobin Hmp, a well-known NO-degrading enzyme, showed a decreased nitrogen fixation efficiency (Meilhoc et al., 2010). The sources of NO in symbiotic nodules are still unclear. In bacteria, the denitrification pathway is the main route for NO production identified to date (Zumft, 1997), and it was assumed that it could be a source of NO in

symbiotic nodules. This was recently demonstrated by Delgado's team, which found that *B. japonicum* periplasmic nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) and  $\text{NO}_2^-$  reductase are the main source of NO production in soybean (*Glycine max*) nodules in response to flooding (Sánchez et al., 2010). On the plant partner side, a NO synthase-like activity has been measured in lupine (*Lupinus albus*) nodules (Cueto et al., 1996), and it was suggested that such an enzyme could be responsible for NO production in nodule infected cells (Baudouin et al., 2006). On the other hand, it has been known for a long time that nodules, grown aseptically in the absence of a source of combined nitrogen, exhibit high NR activity (Cheniae and Evans, 1960), and it was asked whether nodule NR activity could be involved in functioning nodules (Kato et al., 2010). However, no evidence for the contribution of either a nitric oxide synthase (NOS)-like enzyme or the NR to NO production in the plant partner was provided to date.

As underground organs, nodules may be subjected to flooding or drought episodes. Hypoxia is a major determinant in the adverse effects of waterlogging on plants (Mommer et al., 2004). Hypoxic stress has pronounced effects on mitochondrial function, both from the perspective of oxygen limitation and from increased production of compounds that compete at the oxygen-binding site. Among these compounds, NO has been demonstrated to be produced in hypoxic roots through a mechanism called "nitrate-NO respiration," which involves the nonsymbiotic hemoglobin, the NR, and the electron transfer chain (ETC; Gupta et al., 2005; Igamberdiev and Hill, 2009). Under these conditions,  $\text{NO}_2^-$  acts as a final electron acceptor instead of oxygen. In the ETC,  $\text{NO}_2^-$  is reduced to NO, which diffuses to the cytosol, where it is oxidized by the nonsymbiotic hemoglobin to  $\text{NO}_3^-$ .  $\text{NO}_3^-$  is then reduced to  $\text{NO}_2^-$  by cytosolic NR.

In this work, using pharmacological and genetic approaches, we explored the enzymatic source of NO production in *M. truncatula*-*S. meliloti* nodules under normoxic and hypoxic conditions. We report that both plant and bacterial NR and ETC are involved in NO synthesis, and we propose the existence of a  $\text{NO}_3^-$ -NO respiration process in nodules.

## RESULTS

### Hypoxia Triggers Overproduction of NO by Nodules

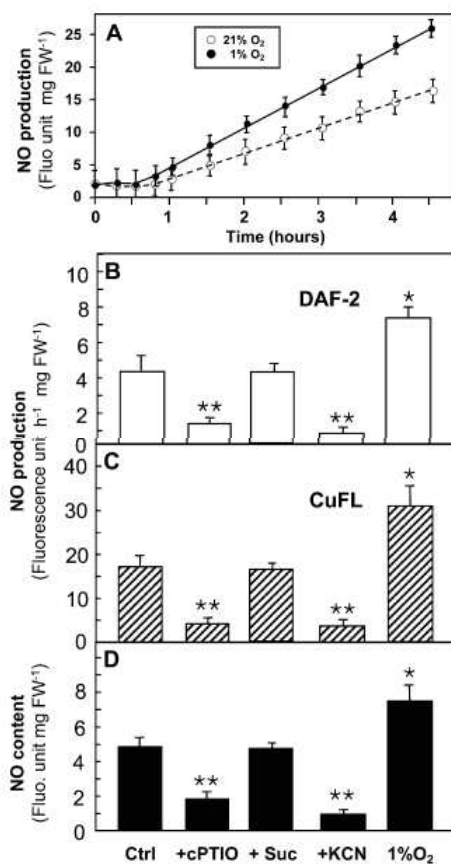
To investigate the production of NO by symbiotic nodules, *M. truncatula* plants were inoculated with *S. meliloti* and grown in normoxic conditions for 4 to 5 weeks. NO production by *M. truncatula*-*S. meliloti* nodules was analyzed using the 4,5-diaminofluorescein (DAF-2) probe. In the presence of oxygen, NO autooxidizes to nitrous anhydride, which reacts with DAF-2 to form a highly fluorescent triazolofluorescein (DAF-2T; Kojima et al., 1998). In previous reports, the production of NO in root nodules was investigated using sliced nodules (Baudouin et al., 2006; Shimoda

et al., 2009; Kato et al., 2010). However, as NO was shown to be produced in response to excision and mechanical stress (Arasimowicz and Floryszak-Wieczorek, 2007), we decided to measure the NO produced and released from entire nodules with a less invasive method to keep the nodule structures intact and maintain the microaerophilic conditions inside the nodule. Entire nodules were taken from the roots and incubated in a detection medium containing the DAF probe. In these conditions, after a 45- to 60-min transient equilibration period, the production of NO, when measured under either 21% or 1% oxygen, was found to be linear for at least 4 h (Fig. 1A). Consequently, NO

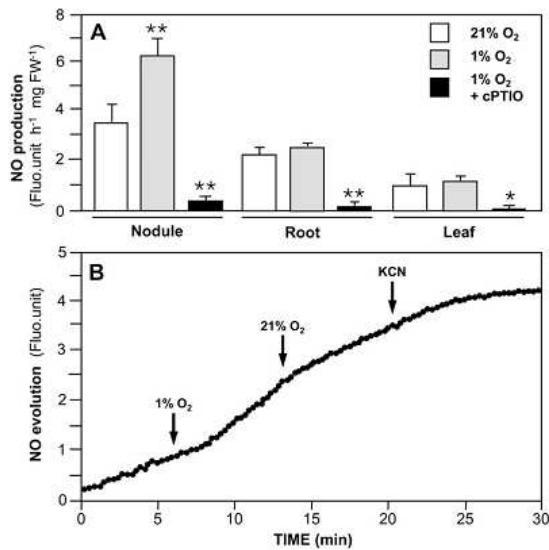
production was routinely measured between 2 and 4 h of incubation.

To test the experimental protocol of NO measurement and the specificity of DAF for NO, nodule NO production was analyzed in various conditions (Fig. 1B). When measured in the presence of 2-[4-carboxyphenyl]-4,4,5,5-tetramethylimidazole-1-oxyl-3-oxide (cPTIO; a NO scavenger), DAF fluorescence was 73% inhibited compared with the control, showing that the major part of the DAF fluorescence was due to the production of NO itself and not to products interacting with DAF-2 (Planchet and Kaiser, 2006). The presence of 50 mM Suc in the incubation medium did not modify NO production, indicating that nodules were not sugar starved during the experiments. In the presence of KCN, a lethal and potent inhibitor of many heme-containing enzymes, NO production was 83% inhibited (Fig. 1B). The remaining NO production measured with KCN treatment (about 1 fluorescence unit  $h^{-1} mg^{-1}$  fresh weight) was considered as the background in our experimental system and was subtracted in the following experiments. Under 1% oxygen (12  $\mu M$  oxygen), NO production was 1.7-fold increased compared with the control (Fig. 1, A and B), indicating that DAF fluorescence may be used for NO measurement in hypoxic conditions. Moreover, measurement of NO production by samples containing 5 to 120 mg of fresh nodules showed that neither oxygen nor DAF-2 was limiting in our experimental conditions (data not shown). In addition, to further test our experimental system, NO production was also analyzed with the Cu(II) fluorescein (CuFL) fluorescent probe, which is known to react rapidly and specifically with NO itself (Lim et al., 2006). The absence of CuFL toxicity for nodules was first verified (see "Materials and Methods"), and NO production was then measured in the conditions tested above. The results were similar to those obtained with the DAF probe (Fig. 1C). Finally, NO production was compared with the amount of NO measured in the extracts of nodules crushed immediately after a 4-h incubation period with the above-tested effectors. NO measured in tissue extracts (Fig. 1D) was found to correlate NO production (Fig. 1, B and C), which confirmed whole organ assays. Taken together, these data show that DAF fluorescence may be considered as a good indicator of NO produced and released from nodules and that the protocol used in this study is efficient to assess NO production by symbiotic nodules. A similar protocol was recently used to estimate nodular NO accumulation in soybean nodules (Sánchez et al., 2010). All the experiments of NO production reported in this work were first carried out with DAF-2 and then repeated with CuFL with similar results. For simplicity, only the data obtained with DAF-2 are presented below.

The production of NO in normoxic and hypoxic conditions was tested also in root segments (without nodule) and leaf discs. In normoxia, NO production of roots and leaves was 35% and 70% lower, respectively, than that found with nodules, and this production was



**Figure 1.** NO production and content in *M. truncatula* nodules. A, Time course of NO production measured using DAF-2 under either 21% or 1% oxygen. B and C, Nodule NO production measured using either DAF-2 (B) or CuFL (C) probes. D, Nodule NO content. NO production and content are expressed as relative fluorescence units. Nodules were incubated under 21% oxygen (control [Ctrl]), in the presence of either 100  $\mu M$  cPTIO, 50 mM Suc (Suc), or 300  $\mu M$  KCN, or under 1% oxygen. FW, Fresh weight. Data are means  $\pm$  SD of five (A and B), four (C), and three (D) independent experiments assayed in duplicate. Asterisks indicate significant difference (\*  $P = 0.05$ , \*\*  $P = 0.01$ ) when compared with the control according to Student's *t* test.



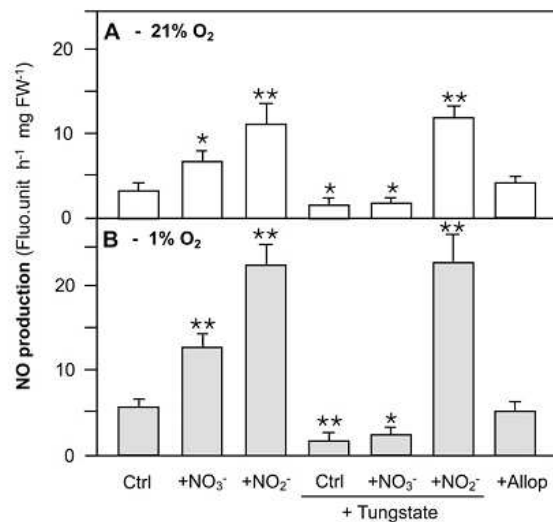
**Figure 2.** NO production by *M. truncatula* nodule, root, and leaf. A, Nodules, root segments, or leaf discs were incubated under 21% oxygen, 1% oxygen, or 1% oxygen plus 100  $\mu\text{M}$  cPTIO. NO production was expressed as relative fluorescence units. FW, Fresh weight. Data are means  $\pm$  SD of six (nodule) or three (root and leaf) independent experiments assayed in duplicate. Asterisks indicate significant difference (\*  $P = 0.05$ , \*\*  $P = 0.01$ ) when compared with the control according to Student's *t* test. B, Six nodules were fixed in a fluorescence cuvette, and the time course of NO evolution was recorded using DAF-2 under different oxygen conditions. Starting  $p\text{O}_2$  was 21% oxygen; KCN was 300  $\mu\text{M}$ . This experiment was reproduced four times with similar results.

not increased in hypoxic conditions (Fig. 2A). It may be noted that, whatever the organ, fluorescence was 90% to 95% reduced when measured at 1% oxygen in the presence of 100  $\mu\text{M}$  cPTIO, which indicates that most of the fluorescence was related to NO production. These data show that, contrary to roots and leaves, nodules are able to overproduce NO within hours following the transition from normoxia to hypoxia. To assess the sensitivity of the nodules to changing partial oxygen pressure ( $p\text{O}_2$ ) conditions, nodule NO production was measured during rapid normoxic (21% oxygen) to hypoxic (1% oxygen) transition, and vice versa. As reported in Figure 2B, NO production rate exhibited a 2-fold increase within 2 to 4 min after 21% to 1% oxygen transition and decreased within 5 min upon return to 21% oxygen conditions. As observed previously (Fig. 1), the addition of 300  $\mu\text{M}$  KCN to the incubation medium almost totally abolished the production of NO (Fig. 2B). These results underline the flexibility and the reversibility of nodule NO production regarding the oxygen environment and indicate that nodules are able to quickly respond to changes in  $p\text{O}_2$ .

1026

### NR Activity Is Involved in Nodule NO Production

DAF fluorescence was analyzed with nodules incubated in the presence of NR effectors under either 21% or 1% oxygen. As shown in Figure 3, in the presence of 10 mM  $\text{NO}_3^-$ , the substrate of NR, NO production was 2.2-fold increased both in normoxia and hypoxia, suggesting that NR is possibly involved in NO production. To further test this hypothesis, NR activity was inhibited with the use of tungstate (Tg), an inhibitor of NR (Harper and Nicholas, 1978). In these conditions, Tg significantly reduced NO production both in the control and in the presence of  $\text{NO}_3^-$  (Fig. 3). This means that NR is involved in the production of NO either directly or indirectly via the production of  $\text{NO}_2^-$ , the product of NR. Moreover, on the basis of Tg inhibition results, it may be concluded that the increase in NO production observed under hypoxia was due to NR activity, since NO production was inhibited to similar values (1.5 fluorescence units  $\text{h}^{-1} \text{mg}^{-1}$  fresh weight) both in normoxia and hypoxia (Fig. 3). This indicates that NR activity contributes more importantly to NO production under hypoxia than under normoxia. In the presence of 1 mM  $\text{NO}_2^-$ , nodule NO production increased 3.6- and 4.0-fold under normoxic and hypoxic conditions, respectively (Fig. 3). However, it was not inhibited by Tg in the presence of  $\text{NO}_2^-$ , which indicates that NR is involved in NO production through the reduction of  $\text{NO}_3^-$  in  $\text{NO}_2^-$



**Figure 3.** Effects of NR effectors on nodule NO production. NO production, expressed as relative fluorescence units, was measured under either 21% (A) or 1% (B) oxygen. Effector concentrations were 10 mM  $\text{NaNO}_3$  ( $\text{NO}_3^-$ ), 1 mM  $\text{NaNO}_2$  ( $\text{NO}_2^-$ ), and 1 mM  $\text{NaTg}$ . FW, Fresh weight. Data are means  $\pm$  SD of five independent experiments assayed in duplicate. Asterisks indicate significant difference (\*  $P = 0.05$ , \*\*  $P = 0.01$ ) when compared with the control (Ctrl) according to Student's *t* test.

Plant Physiol. Vol. 155, 2011



but does not produce NO directly. In addition to NR, xanthine oxidase (a MoCo enzyme like NR) has been reported to reduce  $\text{NO}_2^-$  into NO (Millar et al., 1998; Li et al., 2001). As xanthine oxidase is also inhibited by Tg, the question arose whether the production of NO, and its inhibition in the presence of Tg, could be due to xanthine oxidase activity rather than that of NR. To answer this question, we analyzed the effect of allopurinol, an inhibitor of xanthine oxidase (Atkins et al., 1988), on NO production. As reported in Figure 3, allopurinol did not modify NO production under either 21% or 1% oxygen, which excludes the contribution of xanthine oxidase in the synthesis of NO.

The involvement of NR activity in the generation of NO has already been investigated in various plant organs and tissues, and it was concluded that it contributes, directly or indirectly, to NO production in roots and leaves (Dean and Harper, 1988; Rockel et al., 2002; Gupta et al., 2005; Planchet et al., 2005). Thus, to assess the possible contribution of NR in NO production in other *M. truncatula* organs than nodules, root segments and leaf discs were also analyzed for NO production in the presence or absence of NR effectors. It resulted that, under either 21% or 1% oxygen, the production of NO was not affected by the addition of  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ , or Tg in the incubation medium (Supplemental Fig. S1). This means that, contrary to what happens in nodules, NR is not involved in the production of NO in the roots and leaves of *M. truncatula* plants.

To further investigate the differences between nodules, roots, and leaves with regard to NR-dependent NO production, we analyzed NR and nitrite reductase (NiR) activities in these organs. When expressed as a function of fresh weight, NR activity was found to be 3- and 6-fold higher in nodules than in roots and leaves, respectively (Table I). These activities are of the same order of magnitude than those measured in the nodules of other legumes such as yellow lupine (Polcyn and Lucinski, 2001), faba bean (*Vicia faba*) and pea (*Pisum sativum*; Chalifour and Nelson, 1987), or soybean (Arrese-Igor et al., 1998). In the three organs, NiR activity was higher than that of NR (Table I). It has long been known that  $\text{NO}_2^-$  is cytotoxic for plants, although the molecular mechanism is still obscure, and a higher NiR versus NR activity, which avoids  $\text{NO}_2^-$  accumulation in the tissues, was classically observed in plants (Luciński et al., 2002). Interestingly, the NiR-to-NR activity ratio was found to be about 2 in nodules and 8 in roots and leaves (Table I). This indicates that the  $\text{NO}_2^-$  production versus  $\text{NO}_2^-$

utilization capacity is significantly higher in nodules than in roots and leaves and underlines a possible specific function of NR in the nodules.

#### Both Plant and Bacteroid NRs Contribute to NO Production in Nodules

In symbiotic nodules, NR activity has generally been found, with some exceptions, in both the plant and the bacteroid partners (Luciński et al., 2002). In this work, to determine if the NR-dependent production of NO observed in the nodules was due to either one or both of the partners, we used a mutant approach.

Two NR genes have been identified in *M. truncatula*, NR1 (TC137636; Mtr.10604.1.S1\_at) and NR2 (TC130773; Mtr.42446.1.S1\_at), which are both expressed at detectable levels in  $\text{N}_2$ -fixing nodules (data not shown). To date, the main function of NR identified in plants is its key role in the  $\text{NO}_3^-$ -to- $\text{NH}_4^+$  reduction pathway, which controls nitrogen metabolism (Campbell, 1999). Thus, to assess the involvement of NR in the production of NO by the nodules, without affecting the nitrogen metabolism in the whole plant, we used a nodule-targeted RNA interference (RNAi) strategy. An RNAi *M. truncatula* *MtNR1/2* double knockdown was constructed under the control of the zone III-specific promoter MtNCR001 (Mergaert et al., 2003; Supplemental Fig. S2A). In this way, NR expression level was only affected in the  $\text{N}_2$ -fixing zone (zone III) of the nodule, avoiding any other effect that could affect plant and nodule growth at early stages of development. Four weeks after inoculation, *MtNR1/2* RNAi transgenic roots did not show significantly modified phenotypes compared with the GUS RNAi control for plant growth and nodulation events (data not shown), but nodule size was 30% to 40% reduced in the *MtNR1/2* RNAi roots (Supplemental Fig. S2, B and C). Measurement of the NR activity in this knockdown mutant line showed a 40% decrease compared with the GUS RNAi control nodules (Table II). In the *MtNR1/2* RNAi nodules, the production of NO was found to be 46% decreased compared with that of control nodules when measured under either 1% oxygen (Fig. 4; Table II) or 21% oxygen (Supplemental Fig. S3). In addition, for both *MtNR1/2* RNAi and GUS RNAi control nodules, the production of NO was found to be increased by  $\text{NO}_2^-$  and inhibited by Tg under 1% oxygen (Fig. 4) or 21% oxygen (Supplemental Fig. S3). These results clearly indicate that the decrease in NO production in knockdown nodules was related to the decrease in the plant NR activity and

**Table I.**  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NO}_2^-$  reductase activities in nodule, root, and leaf of *M. truncatula* plants  
Data are means  $\pm$  SD of six (nodule) or three (root and leaf) independent experiments.

NR or NiR	Nodule	Root	Leaf
NR (nmol min <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> fresh weight)	9.7 $\pm$ 1.2	3.3 $\pm$ 1.3	1.7 $\pm$ 0.6
NiR (nmol min <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> fresh weight)	18.5 $\pm$ 2.3	26.1 $\pm$ 8.3	13.2 $\pm$ 5.0
NiR:NR	1.9	7.9	7.8

**Table II.** NR activity and NO production in *M. truncatula*-*S. meliloti* control and mutant nodules

*M. truncatula* control (GUS) and *MtNR1/2* RNAi (*MtNR1/2*) plants were inoculated with *S. meliloti* 2011 or *napA* strains. NO production, expressed as relative fluorescence units, was measured under 1% oxygen. Data are means  $\pm$  SD of four independent measurements. Asterisks indicate significant difference (\* $P$  = 0.05, \*\* $P$  = 0.01) when compared with the control (GUS/2011) according to Student's *t* test.

Variable	GUS/2011	<i>MtNR1/2</i> /2011	GUS/ <i>napA</i>	<i>MtNR1/2 napA</i>
NR activity (nmol NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> min <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> fresh weight)	6.56 $\pm$ 0.87	3.94 $\pm$ 0.87*	4.69 $\pm$ 0.76*	3.08 $\pm$ 0.57**
Percent of control	100	60	71	47
NO production (fluorescence units h <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> fresh weight)	4.65 $\pm$ 0.84	2.54 $\pm$ 0.71*	2.81 $\pm$ 0.39*	1.33 $\pm$ 0.37**
Percent of control	100	54	60	29

that the remaining NO production was dependent on bacteroid and/or residual plant NR activities.

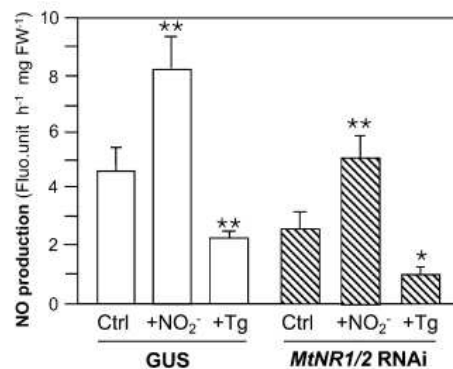
In bacteria such as *S. meliloti*, the denitrification process is known to generate NO as an intermediate of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> reduction to N<sub>2</sub>. NO<sub>3</sub><sup>-</sup> is first reduced to NO<sub>2</sub><sup>-</sup> by NR, and NO<sub>2</sub><sup>-</sup> is then reduced to NO by NiR. To investigate the involvement of the bacteroid denitrification pathway in the generation of NO, we analyzed NO production in nodules formed upon root infection with *S. meliloti napA* and *nirK* mutant strains, which are impaired in NR and NiR activity, respectively. As reported in Table III, NR and NiR activities were found to be 37% and 38% reduced, respectively, in *napA* and *nirK* nodules compared with wild-type ones. As a control, no NR or NiR activity was found in the bacteroid fractions extracted from *napA* and *nirK* mutant nodules, respectively (Table III), which confirms the absence of NR or NiR activity in the mutant strains. In both *napA* and *nirK* mutant nodules, the production of NO was decreased by about 35% compared with that of the wild-type control when measured under either 1% oxygen (Fig. 5) or 21% oxygen (Supplemental Fig. S3). Moreover, as observed in wild-type nodules, NO production was stimulated by NO<sub>2</sub><sup>-</sup> and inhibited by Tg when measured under either 1% oxygen (Fig. 5) or 21% oxygen (Supplemental Fig. S3). These results indicate that the decrease in NO production in *napA* and *nirK* mutant nodules was related to the absence of bacteroid NR and NiR activities, respectively, and that the remaining NO production was dependent on the plant partner NR and other potential plant or bacteroid NO-producing activities.

*MtNR1/2* and GUS RNAi transgenic roots were inoculated with *S. meliloti* wild type and *napA* mutant strains to test for a possible additive effect of plant and bacterial NR mutations on NO production. In agreement with the data presented above (Figs. 4 and 5), NR activity and NO production were decreased in both *MtNR1/2* RNAi and *napA* mutant nodules (Table II). The effects of the plant NR-silencing and bacteroid NR mutations were found to be partially additive in the *MtNR1/2* RNAi/*napA* nodules, where NR activity and NO production were decreased to 47% and 29% of their respective controls (Table II). Despite the absence of fully additive effects at NR activity and NO production levels, which probably can be explained by the up-regulation of complementary systems, these data confirm that NO production in nodules is essentially related to the activity of NR.

Taken together, our data showed that, in *M. truncatula*-*S. meliloti* nodules, (1) both the plant and the bacteroid partners produce NO through NR-dependent processes, (2) NO is mainly produced by the plant partner, and (3) around one-third of the NO generated by the nodule is produced by the bacteroid denitrification pathway.

#### Mitochondrial and Bacteroid ETCs Are Involved in Nodule NO Production

The maintenance of NO production, in the presence of both NO<sub>2</sub><sup>-</sup> and Tg (Fig. 3), indicated that NR does not produce NO directly but more likely produces NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, which in turn is reduced to NO. Beside NR, root mitochondria have been reported to be able to reduce NO<sub>2</sub><sup>-</sup> to NO at the expense of NADH under anoxic conditions but not in air (Gupta et al., 2005; Planchet et al., 2005; Gupta and Kaiser, 2010). Here, we investigated the involvement of the mitochondria in NO production through the use of various mitochondrial and denitrification pathway inhibitors. As reported in Figure 6A, under either 21% or 1% oxygen, NO production was 40% inhibited by rotenone, an inhibitor of



**Figure 4.** NO production by *M. truncatula* GUS and *MtNR1/2* RNAi nodules. *M. truncatula* control (GUS) and *MtNR1/2* RNAi plants were inoculated with *S. meliloti* 2011 strain. NO production, expressed as relative fluorescence units, was measured under 1% oxygen. Effector concentrations were 1 mM NaNO<sub>2</sub> (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) and 1 mM NaTg. FW, Fresh weight. Data are means  $\pm$  SD of three independent experiments assayed in duplicate. Asterisks indicate significant difference (\* $P$  = 0.05, \*\* $P$  = 0.01) when compared with the control (Ctrl) according to Student's *t* test.

**Table III.**  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NO}_2^-$  reductase activities in nodules and bacteroids of *M. truncatula* plants

*M. truncatula* wild-type plants were inoculated with *S. meliloti* 2011, *napA*, or *nirK* strains. The inhibition of NR activity by Tg in nodule and bacteroid preparations was checked after a 4-h incubation period in the presence of the inhibitor. nd, Not detected. Asterisks indicate significant difference (\* $P = 0.05$ ) when compared with the control (2011) according to Student's *t* test.

NR or NiR	Nodule			Bacteroid		
	2011	<i>napA</i>	<i>nirK</i>	2011	<i>napA</i>	<i>nirK</i>
	<i>nmol NO<sub>2</sub><sup>-</sup> min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> fresh wt</i>			<i>nmol NO<sub>2</sub><sup>-</sup> min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> protein</i>		
NR						
Control	9.7 ± 1.2	6.1 ± 1.2*	8.5 ± 0.8	0.13 ± 0.02	nd	0.11 ± 0.03
+1 mM NaTg	1.4 ± 0.3	-	-	0.01 ± 0.01	-	-
NiR	18.5 ± 2.3	16.0 ± 4.3	11.5 ± 2.7*	1.12 ± 0.07	1.25 ± 0.08	nd

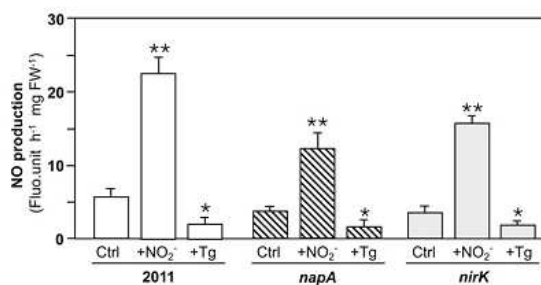
the mitochondrial complex I and of the bacteroid NADH-quinol oxidoreductase. In the presence of antimycin A and myxothiazol, two inhibitors of the complex III, NO production was 50% to 55% and 80% inhibited in normoxic and hypoxic conditions, respectively (Fig. 6A). The NO production insensitive to the inhibitors (approximately 2 fluorescence units  $\text{h}^{-1} \text{mg}^{-1}$  fresh weight in both conditions) accounted for the residual part of NO, the production of which does not depend on ETC functioning. This means that in normoxia, the production of NO largely depends on mitochondrial and bacteroid ETC functioning and that the increase in NO production observed in hypoxic versus normoxic conditions was essentially contributed by mitochondrial and bacteroid ETCs. Furthermore, NO production was found to be insensitive to the uncoupler carbonylcyanide-*p*-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP; Fig. 6A), indicating that it does not depend on the presence of the transmembrane electrochemical proton gradient. Similarly, NO production was found to be insensitive to propylgalate, an inhibitor of the mitochondrial alternative oxidase (AOX), which indicates that AOX probably does not contribute to NO production (data not shown). When nodules were incubated in the presence of  $\text{NO}_2^-$  in the incubation medium, NO production was increased in the control condition, as already shown in Figure 3, and was inhibited by the above-tested inhibitors to the same extent as in the absence of  $\text{NO}_2^-$  (Supplemental Fig. S4). Moreover, as these inhibitors are not specific for either mitochondria or bacteroid ETC, the production of NO was also analyzed in nodules issued from *M. truncatula* inoculated with *S. meliloti nirK* mutants, where bacteroid ETC presumably does not produce NO. As shown in Figure 6B, the effects of all the inhibitors tested on NO production were similar to that observed with wild-type nodules under 21% as well as 1% oxygen.

Taken together, these data show that nodule NO production is (1) strongly (80%) or partially (60%) inhibited by ETC inhibitors in hypoxia and normoxia, respectively, (2) independent of the transmembrane electrochemical proton gradient, (3) stimulated by  $\text{NO}_2^-$  supply, and (4) similarly inhibited by ETC inhibitors both in wild-type and *nirK* mutant nodules. This means, first, that mitochondrial and bacteroid

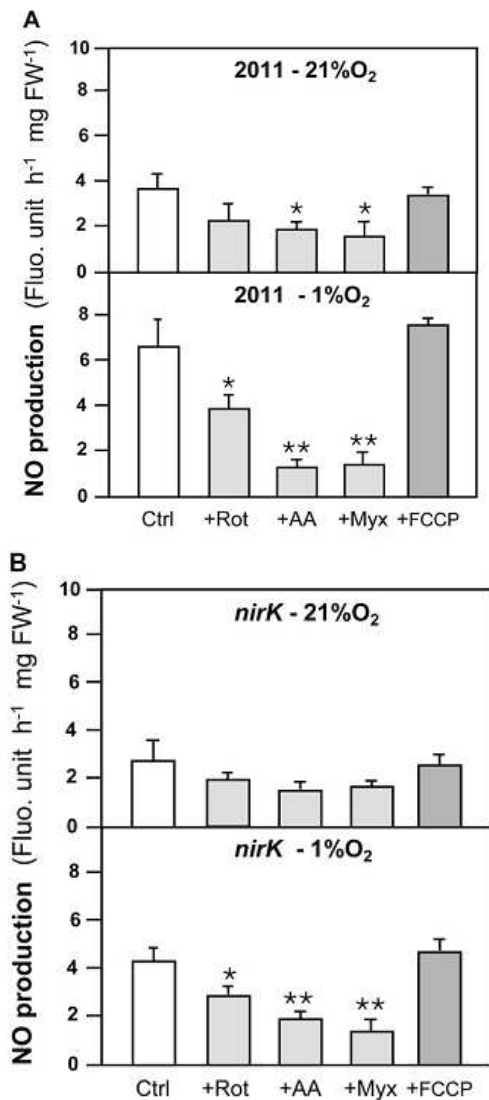
ETC are directly involved in the production of NO in functioning nodules, and second, that NO is essentially produced through both mitochondrial and bacteroid ETC in hypoxic conditions.

#### NR Activity Is Necessary to Maintain Nodule Energy Status

In the roots of plants subjected to hypoxia, a  $\text{NO}_3^-$ -NO respiration, involving the sequential reduction of  $\text{NO}_3^-$  into  $\text{NO}_2^-$  and then NO via NR and mitochondrial ETC, was proposed to contribute to energy supply under microaerobic conditions (Igamberdiev and Hill, 2009). The above data demonstrating the involvement of NR in the production of NO raised the hypothesis of a role of NR in the energy functioning of symbiotic nodules. To test this hypothesis, we analyzed the energy state (i.e. the ATP-ADP ratio) of nodules incubated in the presence of NR effectors (Fig. 7). Under 21% oxygen, ATP-ADP ratio was high (close to 6–7) in the control nodules, indicating that ATP-regenerating processes were not limited. In the pres-



**Figure 5.** NO production by *S. meliloti* 2011, *napA*, and *nirK* nodules. *M. truncatula* wild-type plants were inoculated with *S. meliloti* 2011, *napA*, or *nirK* strains. NO production, expressed as relative fluorescence units, was measured under 1% oxygen. Effector concentrations were 1 mM  $\text{NaNO}_2$  ( $\text{NO}_2^-$ ) and 1 mM NaTg. FW, Fresh weight. Data are means  $\pm$  SD of four independent experiments assayed in duplicate. Asterisks indicate significant difference (\* $P = 0.05$ , \*\* $P = 0.01$ ) when compared with the control (Ctrl) according to Student's *t* test.



**Figure 6.** Effects of ETC effectors on NO production of *M. truncatula*-*S. meliloti* nodules. *M. truncatula* wild-type plants were inoculated with *S. meliloti* 2011 (A) or *nirK* (B) strains. NO production, expressed as relative fluorescence units, was measured under either 21% or 1% oxygen. Effector concentrations were 10  $\mu$ M rotenone (Rot), 25  $\mu$ M antimycin A (AA), 25  $\mu$ M myxothiazol (Myx), and 10  $\mu$ M FCCP. FW, Fresh weight. Data are means  $\pm$  SD of four (2011) and two (*nirK*) independent experiments assayed in duplicate. Asterisks indicate significant difference (\*  $P = 0.05$ , \*\*  $P = 0.01$ ) when compared with the control (Ctrl) according to Student's *t* test.

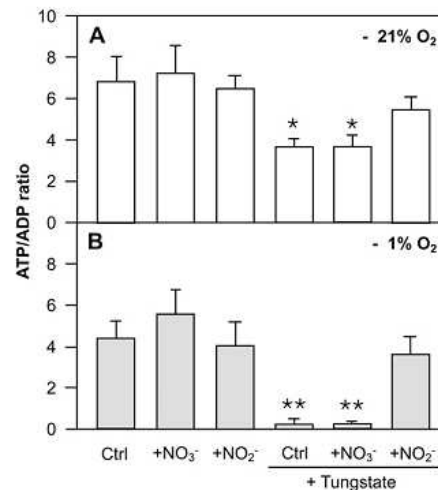
ence of NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, or Tg plus NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, the ATP-ADP ratio was not significantly modified, but it was 50% decreased when nodules were incubated with Tg only or Tg plus NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Fig. 7A). This means that the inhibition of NR partially affects the energy state of the nodule even in normoxic conditions. Under 1% oxygen, the ATP-ADP ratio of control nodules was

close to 4 (Fig. 7A), which indicates that the decrease in pO<sub>2</sub> from 21% to 1% significantly affects the energy status of the nodules but maintains it compatible with nodule functioning. In these conditions, the presence of NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, or Tg plus NO<sub>2</sub><sup>-</sup> did not significantly modify the energy status of the nodules, but Tg only or Tg plus NO<sub>3</sub><sup>-</sup> triggered a dramatic fall (95%) of the ATP-ADP ratio. These data clearly mean that, under 1% oxygen, ATP-regenerating processes almost entirely depend on the functioning of NR activity.

## DISCUSSION

### Plant and Bacteroid NR and ETC Contribute to NO Production

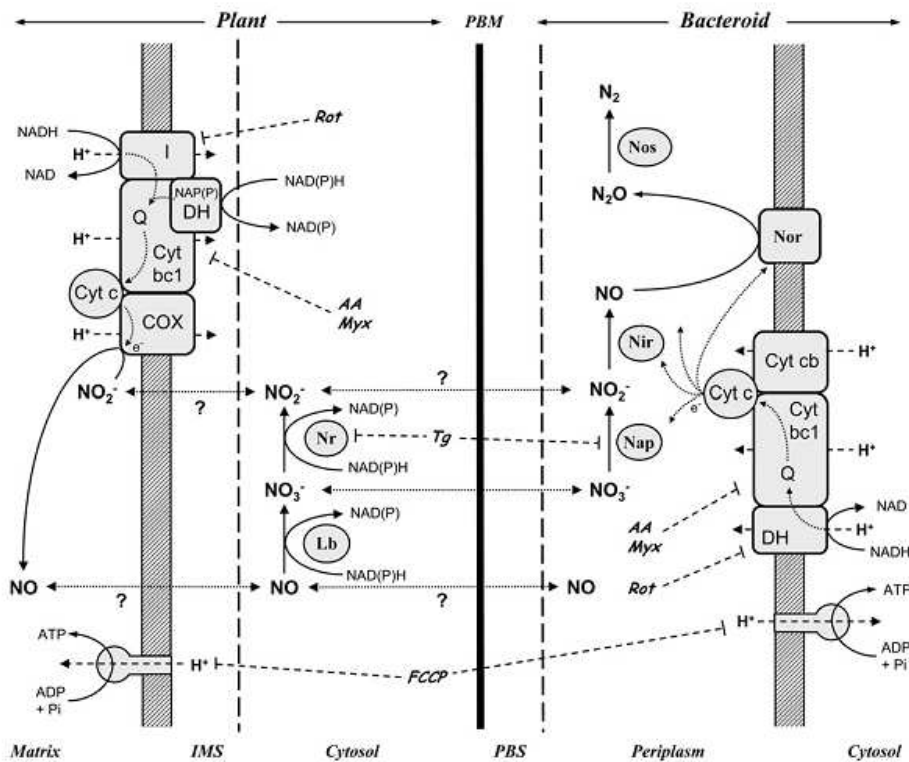
NO synthesis in plants has been reported to occur via different routes such as NR, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-NO reductase, mitochondrial ETC, NOS-like, nonenzymatic reduction, and potentially an as yet nonidentified polyamine oxidation pathway (Besson-Bard et al., 2008; Moreau et al., 2010). In bacteria, the main route for NO production identified to date is the denitrification pathway, which supplies energy to the cell under hypoxic conditions (Zumft, 1997), although NOS enzymes (Sudhamsu and Crane, 2009) or NOS-like activities (Pii et al., 2007) are also present. The specificity of the nodule is to gather plant and bacteroid partners into the same organ (Fig. 8), which complicates the analysis of the NO source. In this work, both pharmacological and genetic approaches were used to analyze the



**Figure 7.** Effects of NR effectors on nodule ATP-ADP ratio. Adenine nucleotides were measured under either 21% (A) or 1% (B) oxygen. Effector concentrations were 10 mM NaNO<sub>3</sub> (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), 1 mM NaNO<sub>2</sub> (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), and 1 mM NaTg. Data are means  $\pm$  SD of two (21% oxygen) or three (1% oxygen) independent experiments assayed in duplicate. Asterisks indicate significant difference (\*  $P = 0.05$ , \*\*  $P = 0.01$ ) when compared with the control (Ctrl) according to Student's *t* test.

potential role of NR in the production of NO. First, the increase in NO production upon nodule feeding with either  $\text{NO}_3^-$  or  $\text{NO}_2^-$ , and its inhibition by Tg (Fig. 3), and second, the lower level of NO production in *MtNR1/2* RNAi (Fig. 4) and *napA* and *nirK* (Fig. 5) mutant nodules, provide strong evidence for a  $\text{NO}_2^-$ -dependent NO synthesis via the activity of NR. However, the relief of the Tg-related inhibition of NO production by  $\text{NO}_2^-$  (Fig. 3) clearly indicates that NR does not produce NO by itself but  $\text{NO}_2^-$ , which is then reduced into NO. The inhibition of NO production by ETC inhibitors such as rotenone, antimycin A, and myxothiazol (Fig. 6), but not by FCCP or propylgalate, indicates that mitochondrial and bacteroid ETCs are directly involved in the reduction of  $\text{NO}_2^-$  into NO, probably at the cytochrome oxidase site. Thus, in *M. truncatula* nodules,  $\text{NO}_3^-$  may be reduced into NO in a two-step mechanism involving successively NR and ETC activities (Fig. 8).

The use of either plant *MtNR1/2* RNAi or bacteria *napA* and *nirK* mutants showed that both the plant and the bacteroid partners are involved in the production of NO in the nodule. Indeed, both plant and bacterial mutants exhibited decreased NO production (Figs. 4 and 5), and these effects were found to be additive in the *MtNR1/2* RNAi/*napA* nodules (Table II). The production of NO by the bacteroid partner was expected. Indeed, denitrification activity has been shown to occur in *S. meliloti* bacteroids (O'Hara et al., 1983), and NO is a well-known intermediate product of the denitrification pathway (Zumft, 1997). Moreover, it was recently described that bacteroid NR and NiR, products of the *nap* and *nir* genes, contribute to the major part of the NO formed in soybean nodules, particularly under hypoxic conditions (Meakin et al., 2007; Sánchez et al., 2010). However, evidence for the involvement of the plant partner in NO production by nodules was still lacking. The sensitivity of *nirK* mu-



**Figure 8.** Representation of putative mitochondrial  $\text{NO}_3^-$ -NO respiration and bacteroid denitrification pathway operation in hypoxic nodules. On the plant side, mitochondrial internal dehydrogenase (complex I [I]) and external dehydrogenases (NAD[P] DH) oxidize matricial and cytosolic NADH and NADPH, respectively. For simplicity, NADH and NADPH dehydrogenases are represented as only one complex. Electrons are successively transferred to ubiquinone (Q), cytochrome  $bc_1$  (Cyt  $bc_1$ ), cytochrome c (Cyt c), and COX.  $\text{NO}_2^-$  is reduced into NO at the COX site. NO diffuses into cytosol, where it is oxidized into  $\text{NO}_3^-$  by Lb. NR (Nr) reduces  $\text{NO}_3^-$  into  $\text{NO}_2^-$ , which is translocated into mitochondria. On the bacteroid side, reducing power, issued from NADH oxidation by NADH-quinol oxidoreductase (DH), is supplied to each denitrification step via cytochrome c.  $\text{NO}_3^-$  is successively reduced into  $\text{NO}_2^-$ , NO,  $\text{N}_2\text{O}$ , and  $\text{N}_2$  by NR (Nap), NiR (Nir), NO reductase (Nor), and nitrous oxide reductase (Nos). NO and  $\text{NO}_2^-$  exchange mechanisms between matrix, cytosol, and periplasm are still unidentified. In both plant and bacteroid partners, ATP is synthesized due to a transmembrane electrochemical gradient generated by proton ( $\text{H}^+$ ) pumping at the different sites of the ETCs. AA, Antimycin A; IMS, mitochondrial intermembrane space; Myx, myxothiazol; PBM, peribacteroid membrane; PBS, peribacteroid space; Rot, rotenone.

tant nodules to ETC inhibitors (Fig. 6) indicates that the mitochondrial ETC is significantly involved in NO production. This observation is consistent with the fact that root mitochondria of several species have been shown to be able to reduce  $\text{NO}_2^-$  into NO under anoxic or strongly hypoxic conditions (Gupta et al., 2005; Stoimenova et al., 2007; Gupta and Kaiser, 2010).

Taken together, our data show that in *M. truncatula* nodules,  $\text{NO}_3^-$  reduction into  $\text{NO}_2^-$ , and  $\text{NO}_2^-$  reduction into NO, via the mitochondrial and bacteroid NR and ETC pathways (Fig. 8), constitute the main route for NO synthesis under hypoxic conditions and contribute to this synthesis in normoxic ones (Figs. 3 and 6). They also point to the possible involvement of other systems in NO generation. On the plant side, a NOS-like activity (Cueto et al., 1996; Baudouin et al., 2006), a polyamine oxidase (Yamasaki and Cohen, 2006), or a plasma membrane-bound  $\text{NO}_2^-$ -NO reductase (Stöhr and Stremmler, 2006), which was recently hypothesized to be involved in physiological processes including anoxia and mycorrhizal symbiosis (Moche et al., 2010), could be good candidates. Other bacteroid systems, such as NOS (Pii et al., 2007; Sudhamsu and Crane, 2009), also cannot be excluded.

#### Is NO Production Part of an Alternative Respiratory Pathway?

NO production has been shown to be induced in the roots of plants subjected to hypoxia (Dordas et al., 2003, 2004), and this production was supposed to be linked with improved capacity of the plants to cope

with hypoxic stress and to maintain cell energy status (Igamberdiev and Hill, 2009). Functional nodules of *L. japonicus* (Shimoda et al., 2009), soybean (Meakin et al., 2007), and *M. truncatula* (Baudouin et al., 2006) have been shown to produce NO, and this production was increased in the soybean nodules when the roots were subjected to a 1-week hypoxia treatment in the presence of  $\text{NO}_3^-$  (Meakin et al., 2007; Sánchez et al., 2010). Because of nitrogenase sensitivity to oxygen, legume nodules are naturally hypoxic organs, with  $\text{pO}_2$  in the range of nanomolar concentrations in the infected region (Layzell and Hunt, 1990; Sung et al., 1991). Thus, the question was raised whether nodule NO production is related to hypoxic conditions prevailing in nodules. In this work, using two different NO probes (DAF and CuFL), we showed that *M. truncatula* nodules produced NO at a higher level than leaves or roots and that this production may be stimulated upon the transition from normoxic to hypoxic conditions, contrary to what was observed in leaves and roots (Fig. 2A; Supplemental Fig. S1). Considering the rapidity of the nodule response to hypoxia (within a few minutes; Fig. 2B), such an increase can hardly be explained by an up-regulation of gene expression but clearly indicates that NO production capacity is already present in functioning nodules and may be promptly up-regulated to face a sudden decrease in oxygen availability.

The data presented in this study raise the question of the role of such a NO production process in microoxic symbiotic nodules. The presence of a gaseous diffusion barrier in the inner cortex of the nodule and the respiration of bacteroids maintain naturally a low oxygen pressure (5–60 nM oxygen) within the infected cells of the nodules (Layzell and Hunt, 1990; Millar et al., 1995), and the  $\text{pO}_2$  value can even fall to the nanomolar level in the infected zone of nodules when the plants experience hypoxic environmental conditions. Under conditions that limit oxygen availability, oxygen-dependent respiration of root mitochondria declines below the oxygen level required to saturate AOX and cytochrome *c* oxidase (COX). The AOX  $K_m$  value for oxygen is in the micromolar range (Millar et al., 1994; Affourtit et al., 2001), precluding AOX function under low oxygen pressure, whereas that of COX is in the range of 80 to 160 nM (Hoshi et al., 1993; Millar et al., 1994), which makes respiration possible under moderate hypoxic conditions. In symbiotic nodules, Lb provides oxygen to bacteroids and host cell mitochondria, which contain a specific COX pathway with high apparent affinity for oxygen ( $K_m$  of 50 nM; Millar et al., 1995). However, considering the oxygen dissociation constant value of hemoglobin (2 nM; Duff et al., 1997) and the very low oxygen concentration (nanomolar range) prevailing in infected cells, the question arises whether oxygenic respiration can still fulfill the ATP requirements for metabolic and biosynthetic purposes in nodules subjected to hypoxia. It may be suggested that, under the microaerobic conditions prevailing in nodules, the  $\text{NO}_3^-$ -NO respiratory pathway

(Igamberdiev and Hill, 2009; Igamberdiev et al., 2010, and refs. therein) may contribute to energy supply in symbiotic  $\text{N}_2$ -fixing nodules. Several lines of evidence argue in favor of this hypothesis. In this work, we show that NRs and ETCs contribute to NO production, via  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NO}_2^-$  reduction, particularly under hypoxic conditions. Similarly, in soybean nodules, bacteroid NR and NiR have been involved in NO production in response to flooding conditions (Sánchez et al., 2010). Moreover, it has been shown that oxyLb, like plant and animal class 1 hemoglobin, has the capacity to efficiently react with NO to produce  $\text{NO}_3^-$  with an elevated rate constant (Herold and Puppo, 2005). The NO generated at either mitochondrial or bacteroid ETC level, therefore, may be oxidized by Lb into  $\text{NO}_3^-$ . It should be mentioned that, considering the complexity of NO chemistry (Stamler et al., 1992), the chemical forms and the mechanisms of NO diffusion or transport between the different compartments (matrix, cytosol, periplasm, etc.) are still unknown. In the plant partner particularly, the nature and the importance of the NO flux between its production (COX in the mitochondria) and oxidation (Lb in the cytosol) sites remained to be formally established and estimated. However, different experiments carried out with yeast, mammal, or plant mitochondria (Castello et al., 2006; Stoimenova et al., 2007; Gupta and Kaiser, 2010) showed that the NO produced by COX, in

hypoxia or anoxia, may be detected by conventional methods and partly quantified. The exchange of NO between mitochondrial matrix and cytosol, or between the plant and bacteroid partners, may be reasonably hypothesized. Thus, as summarized in Figure 8, in parallel to the bacteroidal denitrification process, a plant NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-NO respiration could be of importance in the microoxic nodules, particularly under hypoxic conditions such as flooding, to maintain cell energy status and N<sub>2</sub>-fixing metabolism when oxygen supply becomes limiting. The occurrence of such a mechanism is strongly supported by the data on ATP and ADP measurements (Fig. 7), which show that the energy status of the nodules depends either significantly, or almost entirely, on NR functioning under normoxic or hypoxic conditions, respectively.

The possible occurrence of the NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-NO respiration highlights potential new functions for Lb and NR in N<sub>2</sub>-fixing nodules. Thus, in addition to its role in nitrogenase protection against inhibition by NO (Herold and Puppo, 2005; Shimoda et al., 2009; Sánchez et al., 2010), Lb could not only scavenge NO but oxidize it into NO<sub>3</sub><sup>-</sup> to feed cytosolic NR and the denitrification pathway with NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Similarly, it is well established that many symbiotic associations between legumes and rhizobia are characterized by high NR activity (Cheniae and Evans, 1960; Luciński et al., 2002), and it was asked whether and how nodule NR activity could be involved in functioning nodules (Luciński et al., 2002; Kato et al., 2010). Considering that the main route for nitrogen reduction in nodules is the bacteroid nitrogenase and not the NR-NiR pathway (Vance, 1990), an important function of the plant NR in the nodule could be the reduction of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> into NO<sub>2</sub><sup>-</sup> in the cytosol to supply mitochondria and COX with NO<sub>2</sub><sup>-</sup>. The aim of future projects will be to demonstrate the functioning of NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-NO respiration in N<sub>2</sub>-fixing nodules and the role of Lb and NR in this process as well as to consider the interplay between oxygen-dependent and NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-NO respirations for energy regeneration processes in symbiotic nodules subjected to varying pO<sub>2</sub> conditions.

## MATERIALS AND METHODS

### Biological Material and Growth Conditions

*Medicago truncatula* 'Jemalong' seeds were scarified in 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (6 min), rinsed several times, and imbibed in sterile distilled water for 3 h. Germination was carried out for 3 d on 0.4% agar plates in the dark at 16°C. Seedlings were transplanted in planters containing a mixture of vermiculite and perlite (2:1, v/v) and watered for the first time with 500 mL of nutritive solution (Frendo et al., 1999) containing 4.4 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (as a nitrogen starter to initiate plant growth). Plants were then watered every 3 to 4 d, two times with water and one time with nitrogen-free nutritive solution. Plantlets were grown in a climatic chamber as described (Frendo et al., 1999) and inoculated 1 week after transplanting with either wild-type *Sinorhizobium meliloti* 2011 or different *S. meliloti* 2011 derivatives: 2011 Tn5-STM-1.13.B08 (*mirK::mTn5*) and 2011 Tn5-STM-3.02.F08 (*nupA::mTn5*; Pobigaylo et al., 2006). Locations of mTn5 insertions were verified by PCR.

Nodule, root, and leaf samples were collected 4 to 5 weeks after inoculation and either immediately processed for NO quantification or frozen into liquid

nitrogen and stored at -80°C for further analysis. Bacteroids were prepared as described previously (Trinchant et al., 2004).

### Construction of a Binary Vector for Hairy Root Transformation

For the RNAi construct, the cauliflower mosaic virus 35S promoter (P35S) in pK7GWIWG2D(II),0 vector was replaced by the MtNCR001 promoter (Mergaert et al., 2003). Following the nomenclature described for these binary vectors (<http://www.psb.ugent.be/gateway/index.php>), we named our construction pK7GWIWG5D(II), where 5 is assigned for the promoter PMtNCR001. *SacI* and *SpeI* restriction sites were added to PMtNCR001 by a PCR amplification with PMtNCR001*SacI*-F and PMtNCR001*SpeI*-R primers, using as a template pENTL4L1-PMtNCR001. The resulting 2,634-bp PCR product was subcloned in pGEM-T vector (Promega). The insertion of this promoter was done in three sequential subcloning steps. First, a 2,472-bp *SacI*-P35S:*ccdB*:intron-*MluI* from pK7GWIWG2D(II),0 vector was subcloned in a modified Δ*EagI* pGEM-T vector without the *SpeI* site. Second, P355 was replaced by PMtNCR001 into *SacI*-*SpeI* sites. Finally, pK7GWIWG5D(II) was obtained by insertion of the *SacI*-PMtNCR001:*ccdB*:intron-*MluI* cassette back into the original pK7GWIWG2D(II),0 vector. The primers used were PMtNCR001*SacI*-F (5'-GAGAGCTCGTGTTCCTATTAGAGCGCTA-3') and PMtNCR001*SpeI*-R (5'-GACTAGTCTAGACCTTTGAACGACTACTAAAGAGATT-3').

Using *M. truncatula* cDNA as template, 432- and 441-bp fragments of *MtNR1* (TC137636; Mtr.10604.1.S1\_at) and *MtNR2* (TC130773; Mtr.42446.1.S1\_at) genes, respectively, were obtained via PCR with specific primers: NR1F (5'-CGGGATCCCCACTGGCAGTACTCCTCAC-3'), NR1R (5'-GGGGTACCTTGAGCCAATAGGCATTGAA-3'), NR2F (5'-CGGAATTCCTCCGATTGCAATACCC-3'), and NR2R (5'-GGGGTACCTCCGGTTGCATAACAACA-3').

PCR products were independently ligated into pGEM-T Easy vector (Promega) and subsequently subcloned into pENTR4 vectors in *Bam*HI-*KpnI* restriction sites for *MtNR1* and in *Eco*RI and *KpnI* restriction sites for *MtNR2*. The pENTR4 vector carrying the *MtNR1* or the *MtNR2* fragment was recombined with pK7GWIWG5D(II) vector using the LR clonase enzyme mix (catalog no. 11791-019; Invitrogen) to create the RNAi expression vectors. Constructs were checked by sequencing.

### *Agrobacterium rhizogenes* Root Transformation and Inoculation

The constructs pK7GWIWG5b-MtNR1/2 (RNAi:*MtNR1/2*) were introduced into *A. rhizogenes* strain Arqual (Quandt et al., 1993). *M. truncatula* plants were transformed with *A. rhizogenes* according to Vieweg et al. (2004). Control plants were transformed with *A. rhizogenes* containing the pK7GWIWG5D empty vector. Selection of hairy roots based on the fluorescent marker took place 21 d after transformation. The roots were rapidly examined with a fluorescence stereomicroscope (Leica MZFL III), and the composite plants harboring transgenic roots were used for the inoculation with the appropriate rhizobial strain.

### Measurement of NO Production

Ten to 20 mg of detached nodules (about 15–30 nodules), 100 to 200 mg of root segments (1 cm long), or four to five leaf discs (5 mm diameter) were incubated in the dark at 23°C in Eppendorf tubes containing 500 μL of detection medium (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM KCl) in the presence of 10 μM DAF-2 (Coger) fluorescent probe. When using nodules obtained with RNAi:*MtNR1/2* plants, nodules issued from at least two transgenic roots were pooled and used in each assay. For NO measurement under hypoxic conditions, the detection buffer was first equilibrated, and mutant bacteria were then maintained throughout the experiments at 1% oxygen with a 1%:99% (v/v) oxygen:N<sub>2</sub> gas mixture. The mean value of 1% oxygen (1 kPa) for hypoxia treatment was chosen on the basis that pO<sub>2</sub> in most waterlogged soils ranged from 5 to 0 kPa (Gibbs and Greenway, 2003). The NO produced by the tissues and released into the detection medium was measured using the fluorescence of the DAF probe. At various times, aliquots of the incubation medium were sampled, and the fluorescence of DAF-2T, the reaction product formed from DAF-2 and NO, was measured using a microplate reader spectrofluorimeter (Cary Eclipse; Varian), with excitation at 495 nm and emission at 515 nm. In

these conditions, NO production and release were found to be linear between 1 h and at least 4 h of incubation. Assay blanks contained detection buffer and DAF, without nodules. Alternately, NO production was measured in the same experimental system through the use of the CuFL fluorescent probe (Strem Chemicals) instead of DAF-2 in the detection buffer. As CuFL is known to be a cell-permeant probe (Lim et al., 2006), its capacity to penetrate into nodule cells and its cytotoxicity were analyzed. After a 2 h-incubation period of entire nodules in the presence of 5  $\mu\text{M}$  CuFL, nodules were excised into 100- $\mu\text{m}$ -thick slices with a Vibratom 1000 Plus (Labonord) and analyzed with a LSM 500 confocal laser microscope (Carl Zeiss) as described (Baudouin et al., 2006). No fluorescence could be detected in nodule cells (Supplemental Fig. S6A), indicating that CuFL probe, or its *N*-nitrosamine FL-NO derivative, did not penetrate into the nodule and could be used to measure the NO in the incubation medium. To test CuFL toxicity, the effects of increasing concentrations (0, 2, 5, 10, and 20  $\mu\text{M}$ ) of CuFL were analyzed after 2 h of incubation on the nodule energy state (ATP-ADP ratio being used as a marker of cell viability). Adenine nucleotides were extracted and analyzed as described below. No effect was observed on ATP-ADP ratio (Supplemental Fig. S6B), which means that, in these conditions, CuFL was not toxic for nodule cells. Thus, when assayed with CuFL, NO production was routinely measured for 2 h with a probe concentration of 5  $\mu\text{M}$ .

For rapid  $\text{pO}_2$  transition (between 21% and 1% oxygen) experiments, four to six nodules were set in a fluorescence cuvette containing 1 mL of detection medium, and NO production was continuously measured on a kinetic mode using a Xenius spectrofluorimeter (SAFAS).  $\text{pO}_2$  in the incubation medium was imposed by a permanent bubbling of either ambient air or a 1%:99% oxygen: $\text{N}_2$  (v/v) gas stream. Incubation medium was continuously homogenized using noninvasive stirring equipment during the assay.

### Measurement of NO Content

Ten to 20 mg of nodules, either freshly detached or incubated for 4 h in the presence or absence of effectors, was crushed with mortar and pestle in 200 to 300  $\mu\text{L}$  of detection medium in the presence of 10  $\mu\text{M}$  DAF probe. The extract was centrifuged at 4°C for 10 min, and the fluorescence of the supernatant was immediately measured as described above.

### Effects of Effectors on NO Production

The effectors tested on NO production were routinely used at the following concentrations: 10 mM  $\text{NaNO}_3$ , 1 mM  $\text{NaNO}_2$ , 1 mM NaTg, 1 mM allopurinol, 50 mM Suc, 300  $\mu\text{M}$  KCN, 100  $\mu\text{M}$  cPTIO, 10  $\mu\text{M}$  rotenone, 25  $\mu\text{M}$  antimycin A, 25  $\mu\text{M}$  myxothiazol, 1 mM propylgalate, and 10  $\mu\text{M}$  FCCP. The effectors were added to the detection buffer at the same time as nodules, and their effects on NO production were measured after 2 to 4 h of incubation as described above.

### Enzymatic Activity Measurements

Tissue samples were crushed at 4°C using an extraction buffer containing 25 mM Tris-HCl, pH 8.5, 1 mM EDTA, 20  $\mu\text{M}$  FAD, 1 mM dithiothreitol, 20  $\mu\text{M}$  L-transepoxysuccinyl-leucylamido-[4-guanidino]butane, and 2 mM phenyl-methylsulfonyl fluoride. The extracts were centrifuged at 15,000g for 15 min and used for  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NO}_2^-$  reductase activities.

NR activity was assayed at 28°C by measuring  $\text{NO}_2^-$  production. The reaction medium (1 mL) contained enzymatic extract, 0.2 M HEPES, pH 7.0, 15 mM  $\text{KNO}_3$ , and 250  $\mu\text{M}$  NADH. Reaction was stopped after 30 min by boiling the sample at 100°C for 3 min. The  $\text{NO}_2^-$  produced was measured with the addition of the  $\text{NO}_2^-$  reagent (Miranda et al., 2001): 250  $\mu\text{L}$  of 1% (w/v) sulfanilamide in 1 N HCl plus 250  $\mu\text{L}$  of 0.01% (w/v) *N*-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride in water. After incubation for 30 min at ambient temperature, samples were centrifuged for 10 min at 13,000g, and the absorbance of the supernatant was read at 540 nm. Assay blanks contained enzymatic extracts boiled at 100°C for 3 min before the addition of  $\text{KNO}_3$  and NADH. To measure the inhibition of NR activity by Tg, enzymatic extracts were first preincubated with NaTg for 15 min at ambient temperature before activity measurement. On the basis of inhibition experiment data (Supplemental Fig. S5), a concentration of 1 mM NaTg was routinely used for in vivo and in vitro experiments. To assess the effectiveness of Tg in vivo, nodules or bacteroids were incubated for 4 h in the presence of 1 mM NaTg, proteins were extracted, and NR activity was measured as described above.

NR activity was assayed at 28°C by following  $\text{NO}_2^-$  consumption from the assay mixture using the dithionite-methyl viologen method. The reaction

medium (1 mL) consisted of 20 mM potassium phosphate (pH 7.3), 1 mM  $\text{NaNO}_3$ , 40  $\mu\text{M}$  methyl viologen, and the sample to be assayed. The reaction was started by the addition of 10  $\mu\text{L}$  of 100 mM sodium dithionite in 200 mM sodium bicarbonate. Samples were maintained under anaerobiosis. After 30 min of incubation, 20- $\mu\text{L}$  aliquot fractions were sampled, diluted in 480  $\mu\text{L}$  of water, and shaken energetically for 30 s. A 500- $\mu\text{L}$  aliquot of the  $\text{NO}_2^-$  reagent (Miranda et al., 2001) was then added, and the  $A_{540}$  was measured after 30 min. Assay blanks contained enzymatic extracts plus reagents except dithionite.

### Extraction and Measurement of Adenine Nucleotides

All extraction steps were carried out at 4°C. Frozen nodules (10–30 mg) were crushed in liquid nitrogen with 300  $\mu\text{L}$  of perchloric acid solution, containing 7% (v/v)  $\text{HClO}_4$  and 25 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , with a mortar and pestle. After thawing, the extract was taken and the mortar was rinsed with 200  $\mu\text{L}$  of perchloric acid solution, which was then pooled with the extract. The sample was centrifuged for 5 min at 13,000g. The supernatant was quickly and carefully neutralized at pH 5.6 to 6.0 using a 2 M KOH-0.3 M MOPS solution.  $\text{KClO}_4$  precipitate was discarded by centrifugation (5 min, 13,000g). Adenine nucleotides of the supernatant were measured in a luminometer (Bio-Orbit) using the ATPlite one-step assay system (ATPLT1STP-0509; Perkin-Elmer) according to the manufacturer's instructions.

### Protein Measurements

Soluble proteins were quantified on clarified extracts using  $\gamma$ -globulin as a standard (Bradford, 1976).

### Supplemental Data

The following materials are available in the online version of this article.

**Supplemental Figure S1.** Effects of NR effectors on *M. truncatula* leaf and root NO production.

**Supplemental Figure S2.** Histochemical analysis of *MnCR001* expression in nodules, and phenotype of *MnNR1/2* RNAi nodules.

**Supplemental Figure S3.** NO production by *M. truncatula* GUS and *MnNR1/2* RNAi and by *S. meliloti* 2011, *napA*, and *nirK* nodules under 21% oxygen.

**Supplemental Figure S4.** Effects of ETC effectors on NO production of *M. truncatula*-*S. meliloti* nodules in the presence of  $\text{NO}_2^-$ .

**Supplemental Figure S5.** Effects of NaTg on nodule NR activity.

**Supplemental Figure S6.** Histochemical analysis and toxicity test of CuFL-treated nodules.

### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Sarra Mselhi (University of Tunis) for her dedicated technical assistance in the construction of binary vectors. We are grateful to Julie Hopkins (Institut Agrobiotech, Sophia Antipolis) for critical reading of the manuscript and to Anke Becker (University of Freiburg) for providing *S. meliloti* mutant strains.

Received September 16, 2010; accepted November 29, 2010; published December 7, 2010.

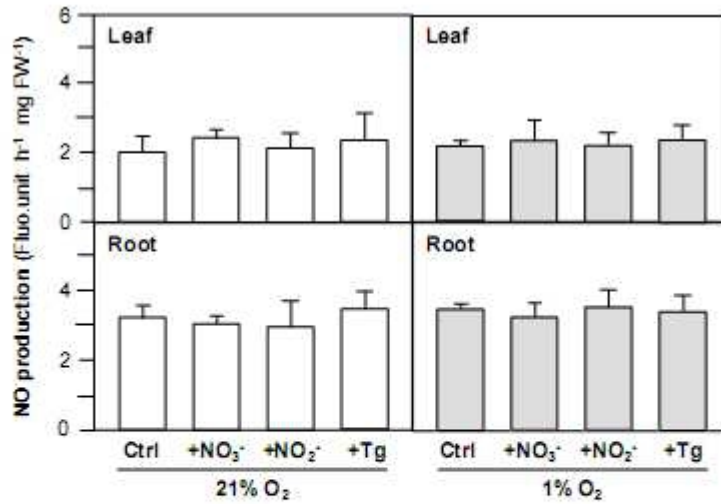
### LITERATURE CITED

- Affourtit C, Krab K, Moore AL (2001) Control of plant mitochondrial respiration. *Biochim Biophys Acta* 1504: 58–69
- Arasimowicz M, Floryszak-Wieczorek J (2007) Nitric oxide as a bioactive signalling molecule in plant stress responses. *Plant Sci* 172: 876–887
- Arrese-Igor C, Gordon AJ, Minchin FR, Denison RF (1998) Nitrate entry and nitrite formation in the infected region of soybean nodules. *J Exp Bot* 49: 41–48
- Atkins CA, Sanford PJ, Storer PJ, Pate JS (1988) Inhibition of nodule



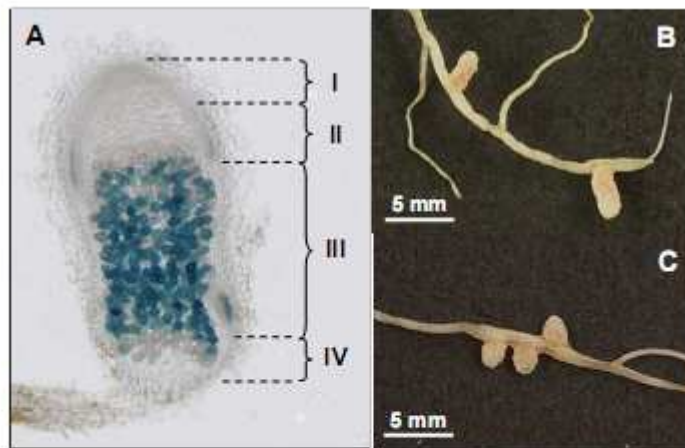
- functioning in cowpea by a xanthine oxidoreductase inhibitor, allopurinol. *Plant Physiol* **88**: 1229–1234
- Baudouin E, Pieuchot L, Engler G, Pauly N, Puppo A** (2006) Nitric oxide is formed in *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium meliloti* functional nodules. *Mol Plant Microbe Interact* **19**: 970–975
- Besson-Bard A, Pugin A, Wendehenne D** (2008) New insights into nitric oxide signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol* **59**: 21–39
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248–254
- Campbell WH** (1999) Nitrate reductase structure, function and regulation: bridging the gap between biochemistry and physiology. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**: 277–303
- Castello PR, David PS, McClure T, Crook Z, Poyton RO** (2006) Mitochondrial cytochrome oxidase produces nitric oxide under hypoxic conditions: implications for oxygen sensing and hypoxic signaling in eukaryotes. *Cell Metab* **3**: 277–287
- Chalifour FP, Nelson LM** (1987) Effects of continuous combined nitrogen supply on symbiotic dinitrogen fixation of faba bean and pea inoculated with different rhizobial isolates. *Can J Bot* **65**: 2542–2548
- Cheniae G, Evans HJ** (1960) Physiologic studies on nodule-nitrate reductase. *Plant Physiol* **35**: 454–462
- Corpas FJ, Palma JM, del Río LA, Barroso JB** (2009) Evidence supporting the existence of L-arginine-dependent nitric oxide synthase activity in plants. *New Phytol* **184**: 9–14
- Cueto M, Hernández-Perera O, Martín R, Bentura ML, Rodrigo J, Lamas S, Golvano MP** (1996) Presence of nitric oxide synthase activity in roots and nodules of *Lupinus albus*. *FEBS Lett* **398**: 159–164
- Dean JV, Harper JE** (1988) The conversion of nitrite to nitrogen oxide(s) by the constitutive NAD(P)H-nitrate reductase enzyme from soybean. *Plant Physiol* **88**: 389–395
- Delledonne M** (2005) NO news is good news for plants. *Curr Opin Plant Biol* **8**: 390–396
- del Río LA, Corpas FJ, Barroso JB** (2004) Nitric oxide and nitric oxide synthase activity in plants. *Phytochemistry* **65**: 783–792
- Dordas C, Hasinoff BB, Igamberdiev AU, Manac'h N, Rivoal J, Hill RD** (2003) Expression of a stress-induced hemoglobin affects NO levels produced by alfalfa root cultures under hypoxic stress. *Plant J* **35**: 763–770
- Dordas C, Hasinoff BB, Rivoal J, Hill RD** (2004) Class-1 hemoglobins, nitrate and NO levels in anoxic maize cell-suspension cultures. *Planta* **219**: 66–72
- Duff SM, Wittenberg JB, Hill RD** (1997) Expression, purification, and properties of recombinant barley (*Hordeum* sp.) hemoglobin: optical spectra and reactions with gaseous ligands. *J Biol Chem* **272**: 16746–16752
- Ferrarini A, De Stefano M, Baudouin E, Pucciariello C, Polverari A, Puppo A, Delledonne M** (2008) Expression of *Medicago truncatula* genes responsive to nitric oxide in pathogenic and symbiotic conditions. *Mol Plant Microbe Interact* **21**: 781–790
- Frendo P, Mathieu C, Van de Sype G, Hérouart D, Puppo A** (1999) Characterisation of a cDNA encoding gamma-glutamylcysteine synthetase in *Medicago truncatula*. *Free Radic Res (Suppl)* **31**: S213–S218
- Gibbs J, Greenway H** (2003) Mechanisms of anoxia tolerance in plants. I. Growth, survival and anaerobic catabolism. *Funct Plant Biol* **30**: 1–47
- Gould KS, Lamotte O, Klinguer A, Pugin A, Wendehenne D** (2003) Nitric oxide, calcium, and abiotic stress in tobacco cells. *Free Radic Res* **37**: 38
- Gupta KJ, Kaiser WM** (2010) Production and scavenging of nitric oxide by barley root mitochondria. *Plant Cell Physiol* **51**: 576–584
- Gupta KJ, Stoimenova M, Kaiser WM** (2005) In higher plants, only root mitochondria, but not leaf mitochondria reduce nitrite to NO, in vitro and in situ. *J Exp Bot* **56**: 2601–2609
- Harper JE, Nicholas JC** (1978) Nitrogen metabolism of soybeans. I. Effect of tungstate on nitrate utilization, nodulation, and growth. *Plant Physiol* **62**: 662–664
- Herold S, Puppo A** (2005) Oxyleghemoglobin scavenges nitrogen monoxide and peroxynitrite: a possible role in functioning nodules? *J Biol Inorg Chem* **10**: 935–945
- Hoshi Y, Hazeaki O, Tamura M** (1993) Oxygen dependence of redox state of copper in cytochrome oxidase in vitro. *J Appl Physiol* **74**: 1622–1627
- Igamberdiev AU, Bykova NV, Shah JK, Hill RD** (2010) Anoxic nitric oxide cycling in plants: participating reactions and possible mechanisms. *Physiol Plant* **138**: 393–404
- Igamberdiev AU, Hill RD** (2009) Plant mitochondrial function during anaerobiosis. *Ann Bot (Lond)* **103**: 259–268
- Ignarro LJ** (1999) Nitric oxide: a unique endogenous signaling molecule in vascular biology. *Biosci Rep* **19**: 51–71
- Kato K, Kanahama K, Kanayama Y** (2010) Involvement of nitric oxide in the inhibition of nitrogenase activity by nitrate in *Lotus* root nodules. *J Plant Physiol* **167**: 238–241
- Kojima H, Nakatsubo N, Kikuchi K, Kawahara S, Kirino Y, Nagoshi H, Hirata Y, Nagano T** (1998) Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. *Anal Chem* **70**: 2446–2453
- Layzell DB, Hunt S** (1990) Oxygen and the regulation of nitrogen-fixation in legume nodules. *Physiol Plant* **80**: 322–327
- Li H, Samouilov A, Liu X, Zweier JL** (2001) Characterization of the magnitude and kinetics of xanthine oxidase-catalyzed nitrite reduction: evaluation of its role in nitric oxide generation in anoxic tissues. *J Biol Chem* **276**: 24482–24489
- Lim MH, Xu D, Lippard SJ** (2006) Visualization of nitric oxide in living cells by a copper-based fluorescent probe. *Nat Chem Biol* **2**: 375–380
- Luciński R, Polcyn W, Ratajczak L** (2002) Nitrate reduction and nitrogen fixation in symbiotic association *Rhizobium-legumes*. *Acta Biochim Pol* **49**: 537–546
- Meakin GE, Bueno E, Jepson B, Bedmar EJ, Richardson DJ, Delgado MJ** (2007) The contribution of bacteroidal nitrate and nitrite reduction to the formation of nitrosylhaemoglobin complexes in soybean root nodules. *Microbiology* **153**: 411–419
- Meilhoc E, Cam Y, Skapski A, Bruand C** (2010) The response to nitric oxide of the nitrogen-fixing symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Mol Plant Microbe Interact* **23**: 748–759
- Mergaert P, Nikovics K, Kelemen Z, Maunoury N, Vaubert D, Kondorosi A, Kondorosi E** (2003) A novel family in *Medicago truncatula* consisting of more than 300 nodule-specific genes coding for small, secreted polypeptides with conserved cysteine motifs. *Plant Physiol* **132**: 161–173
- Millar AH, Bergersen FJ, Day DA** (1994) Oxygen-affinity of terminal oxidases in soybean mitochondria. *Plant Physiol Biochem* **32**: 847–852
- Millar AH, Day DA, Bergersen FJ** (1995) Microaerobic respiration and oxidative-phosphorylation by soybean nodule mitochondria: implications for nitrogen fixation. *Plant Cell Environ* **18**: 715–726
- Millar TM, Stevens CR, Benjamin N, Eisenthal R, Harrison R, Blake DR** (1998) Xanthine oxidoreductase catalyses the reduction of nitrates and nitrite to nitric oxide under hypoxic conditions. *FEBS Lett* **427**: 225–228
- Miranda KM, Espey MG, Wink DA** (2001) A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide* **5**: 62–71
- Moche M, Stremiau S, Hecht L, Göbel C, Feussner I, Stöhr C** (2010) Effect of nitrate supply and mycorrhizal inoculation on characteristics of tobacco root plasma membrane vesicles. *Planta* **231**: 425–436
- Mommer L, Pedersen O, Visser EJW** (2004) Acclimation of a terrestrial plant to submergence facilitates gas exchange under water. *Plant Cell Environ* **27**: 1281–1287
- Moreau M, Lindemayr C, Durner J, Klessig DF** (2010) NO synthesis and signaling in plants: where do we stand? *Physiol Plant* **138**: 372–383
- Nagata M, Murakami E, Shimoda Y, Shimoda-Sasakura F, Kucho K, Suzuki A, Abe M, Higashi S, Uchiyama T** (2008) Expression of a class I hemoglobin gene and production of nitric oxide in response to symbiotic and pathogenic bacteria in *Lotus japonicus*. *Mol Plant Microbe Interact* **21**: 1175–1183
- O'Hara GW, Daniel RM, Steele KW** (1983) Effects of oxygen on the synthesis, activity and breakdown of the *Rhizobium* denitrification system. *J Gen Microbiol* **129**: 2405–2412
- Oldroyd GE, Downie JA** (2008) Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu Rev Plant Biol* **59**: 519–546
- Pii Y, Crimi M, Cremonese G, Spena A, Pandolfini T** (2007) Auxin and nitric oxide control indeterminate nodule formation. *BMC Plant Biol* **7**: 21
- Planchet E, Jagadis Gupta K, Sonoda M, Kaiser WM** (2005) Nitric oxide emission from tobacco leaves and cell suspensions: rate limiting factors and evidence for the involvement of mitochondrial electron transport. *Plant J* **41**: 732–743
- Planchet E, Kaiser WM** (2006) Nitric oxide (NO) detection by DAF fluorescence and chemiluminescence: a comparison using abiotic and biotic NO sources. *J Exp Bot* **57**: 3043–3055
- Pobigaylo N, Wetter D, Szymczak S, Schiller U, Kurtz S, Meyer F,**

- Nattkemper TW, Becker A (2006) Construction of a large signature-tagged mini-Tn5 transposon library and its application to mutagenesis of *Sinorhizobium meliloti*. *Appl Environ Microbiol* **72**: 4329–4337
- Polcyn W, Lucinski R (2001) Functional similarities of nitrate reductase from yellow lupine bacteroids to bacterial denitrification systems. *J Plant Physiol* **158**: 829–834
- Quandt HJ, Puhler A, Broer I (1993) Transgenic root-nodules of *Vicia hirsuta*: a fast and efficient system for the study of gene expression in indeterminate-type nodules. *Mol Plant Microbe Interact* **6**: 699–706
- Rockel P, Strube F, Rockel A, Wildt J, Kaiser WM (2002) Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase in vivo and in vitro. *J Exp Bot* **53**: 103–110
- Sánchez C, Gates AJ, Meakin GE, Uchiumi T, Girard L, Richardson DJ, Bedmar EJ, Delgado MJ (2010) Production of nitric oxide and nitrosyl-hemoglobin complexes in soybean nodules in response to flooding. *Mol Plant Microbe Interact* **23**: 702–711
- Shimoda Y, Nagata M, Suzuki A, Abe M, Sato S, Kato T, Tabata S, Higashi S, Uchiumi T (2005) Symbiotic rhizobium and nitric oxide induce gene expression of non-symbiotic hemoglobin in *Lotus japonicus*. *Plant Cell Physiol* **46**: 99–107
- Shimoda Y, Shimoda-Sasakura F, Kucho K, Kanamori N, Nagata M, Suzuki A, Abe M, Higashi S, Uchiumi T (2009) Overexpression of class I plant hemoglobin genes enhances symbiotic nitrogen fixation activity between *Mesorhizobium loti* and *Lotus japonicus*. *Plant J* **57**: 254–263
- Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J (1992) Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* **258**: 1898–1902
- Stöhr C, Stremmlau S (2006) Formation and possible roles of nitric oxide in plant roots. *J Exp Bot* **57**: 463–470
- Stoimenova M, Igamberdiev AU, Gupta KJ, Hill RD (2007) Nitrite-driven anaerobic ATP synthesis in barley and rice root mitochondria. *Planta* **226**: 465–474
- Sudhamsu J, Crane BR (2009) Bacterial nitric oxide synthases: what are they good for? *Trends Microbiol* **17**: 212–218
- Sung L, Moloney AH, Hunt S, Layzell DB (1991) The effect of excision on O<sub>2</sub> diffusion and metabolism in soybean nodules. *Physiol Plant* **83**: 67–74
- Trinchant JC, Boscari A, Spennato G, Van de Sype G, Le Rudulier D (2004) Proline betaine accumulation and metabolism in alfalfa plants under sodium chloride stress: exploring its compartmentalization in nodules. *Plant Physiol* **135**: 1583–1594
- Trinchant JC, Rigaud J (1982) Nitrite and nitric oxide as inhibitors of nitrogenase from soybean bacteroids. *Appl Environ Microbiol* **44**: 1385–1388
- Vance CP (1990) Symbiotic nitrogen fixation: recent genetic advances. In: BJ Miflin, PJ Lea, eds, *The Biochemistry of Plants: Intermediary Nitrogen Metabolism*, Vol 16. Academic Press, San Diego, pp 48–88
- Vieweg ME, Frühling M, Quandt HJ, Heim U, Bäumlein H, Pühler A, Küster H, Andreas MP (2004) The promoter of the *Vicia faba* L. leghemoglobin gene Vflb29 is specifically activated in the infected cells of root nodules and in the arbuscule-containing cells of mycorrhizal roots from different legume and nonlegume plants. *Mol Plant Microbe Interact* **17**: 62–69
- Wendehenne D, Pugin A, Klessig DF, Durner J (2001) Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. *Trends Plant Sci* **6**: 177–183
- Yamasaki H, Cohen MF (2006) NO signal at the crossroads: polyamine-induced nitric oxide synthesis in plants? *Trends Plant Sci* **11**: 522–524
- Zemajtel T, Fröhlich A, Palmieri MC, Kolanzyk M, Mikula I, Wyrwicz LS, Wanker EE, Mundlos S, Vingron M, Martasek P, et al (2006) Plant nitric oxide synthase: a never-ending story? *Trends Plant Sci* **11**: 524–525; author reply 526–528
- Zumft WG (1997) Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**: 533–616



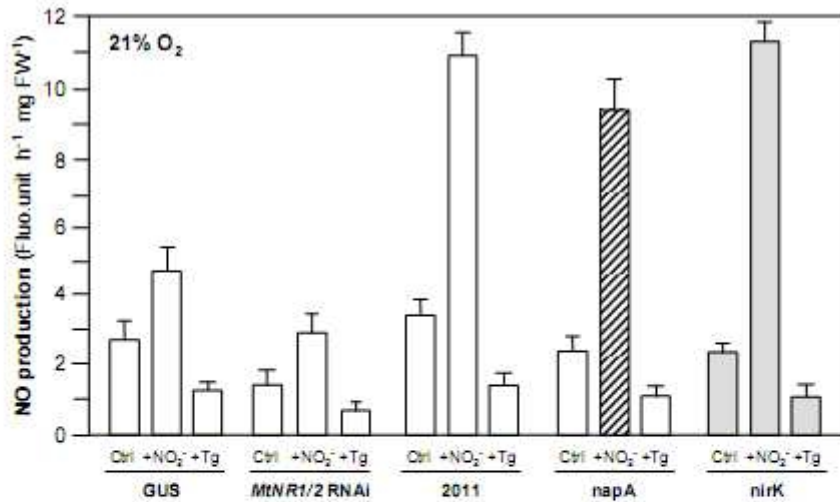
**Figure S1:** Effects of nitrate reductase effectors on *M. truncatula* leaf and root NO production. NO production, expressed as relative fluorescent units, was measured under either 21% or 1% O<sub>2</sub>. Effector concentrations were 10 mM NaNO<sub>3</sub> (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), 1 mM NaNO<sub>2</sub> (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), and 1 mM sodium tungstate (Tg). Data are the means ± SD of 2 independent experiments assayed in duplicates.

Figure S1



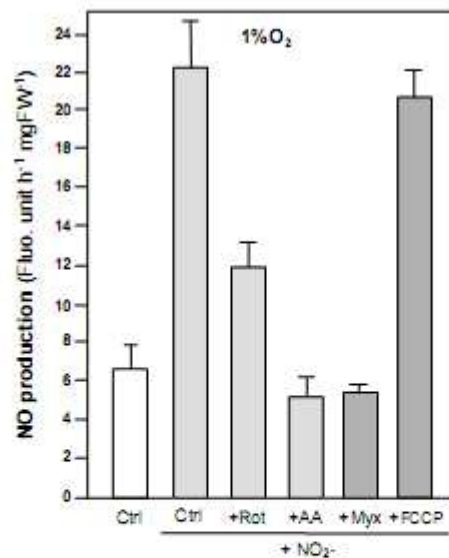
**Figure S2:** Histochemical analysis of *MtNCR001* expression in nodules and phenotype of *nrt1/hr2* mutant nodules. A, *ProMtNCR001:GUS* constructs were used to generate transgenic roots as described in material and methods section. GUS activity was only detected in the N<sub>2</sub>-fixing zone (zone III) of the nodule. I, meristematic zone; II, infection zone; III, N<sub>2</sub>-fixing zone; IV, senescence zone. *M. truncatula* nodules of *ProMtNCR001:GUS* (B), and *ProMtNCR001:nrt1/hr2* (C) four weeks after inoculation with 2011 *S. meliloti* strain.

Figure S2



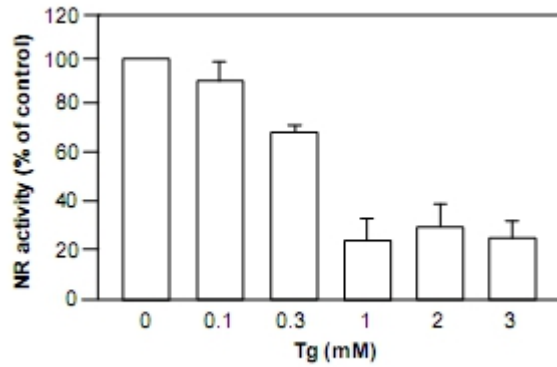
**Figure S3:** NO production by *M. truncatula* GUS and *nir1/nir2*, and by *S. meliloti* 2011, *napA* and *nirK* nodules under 21% O<sub>2</sub>. *M. truncatula* control (GUS) and MtNR1/2 RNAI plants were inoculated with *S. meliloti* 2011 strain. NO production is expressed as relative fluorescent units. Effector concentrations were 1 mM NaNO<sub>2</sub> (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), and 1 mM sodium tungstate (Tg). Data are the means ± SD of 2 independent experiments assayed in duplicates.

Figure S3



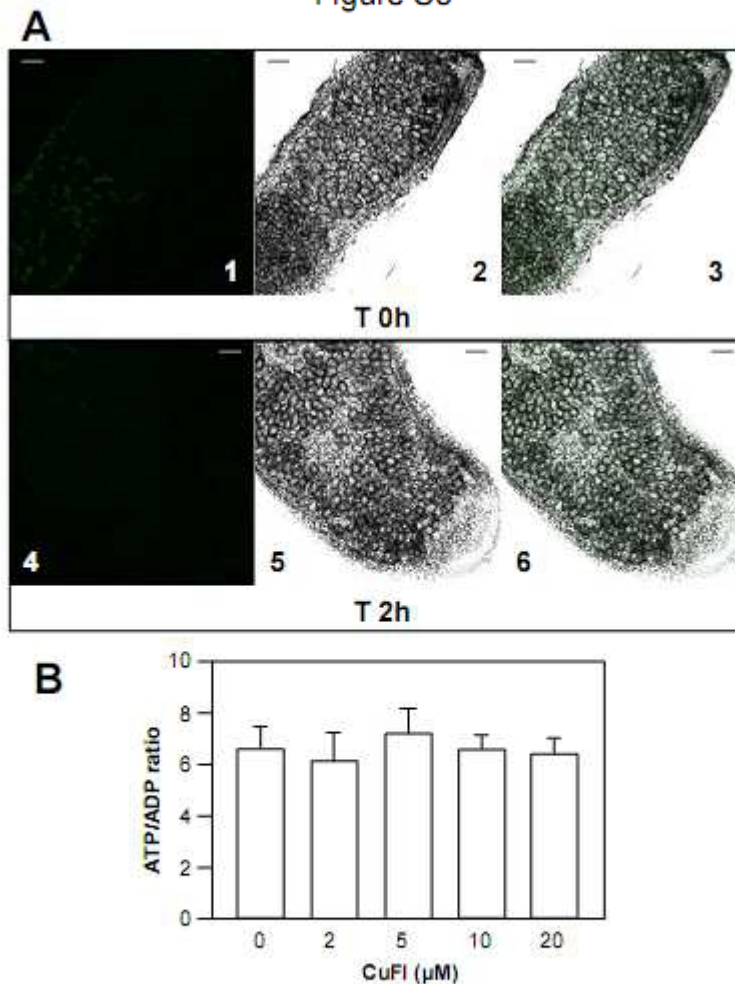
**Figure S4:** Effects of electron transfer chain effectors on NO production of *M. truncatula*/*S. meliloti* nodules in the presence of nitrite. *M. truncatula* wild type plants were inoculated with *S. meliloti* 2011 strain. NO production, expressed as relative fluorescent units, was measured under 1% O<sub>2</sub>. Effector concentrations were 1 mM NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, 10 μM rotenone (Rot), 25 μM antimycin A (AA), 25 μM myxothiazol (Myx), and 10 μM FCCP. Data are the means ± SD of 3 independent experiments assayed in duplicates.

Figure S4



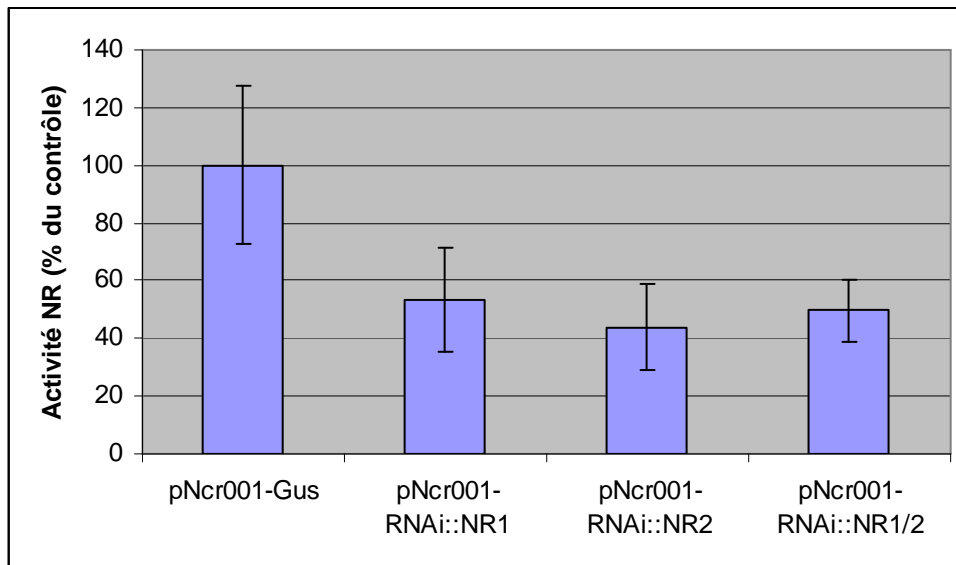
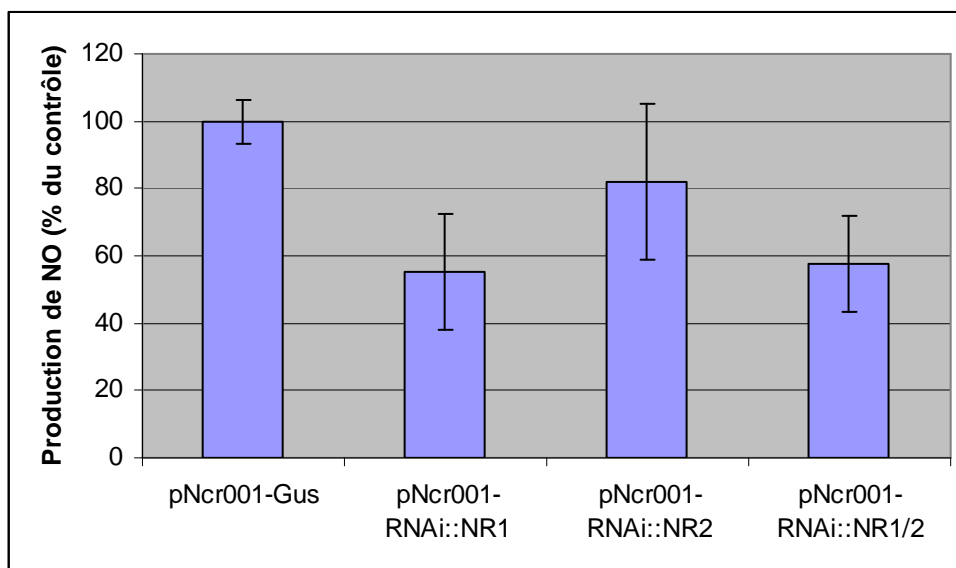
**Figure S5:** Effects of NaTg on nodule nitrate reductase activity. Nodule protein extracts were preincubated for 15 min at ambient temperature with NaTg before NR activity measurement. Data are the means  $\pm$  SD of 3 independent experiments.

**Figure S5**



**Figure S6:** Histochemical analysis and toxicity test of CuFI treated nodules. A, CuFL detection of NO after incubation (0 and 2 h) of entire nodules with 5  $\mu$ M CuFL. Nodules were then cut into 100  $\mu$ M thick slices and analyzed with a Zeiss LSM 500 confocal laser microscope; 1 and 4, fluorescence-field images; 2 and 5, bright-field images; 3 and 6, merged images. B, nodules were incubated for 2h in the presence of various CuFL concentrations. Adenine nucleotides were then extracted and measured with a luminometer (see Materials and methods).

**Figure S6**

**A****B**

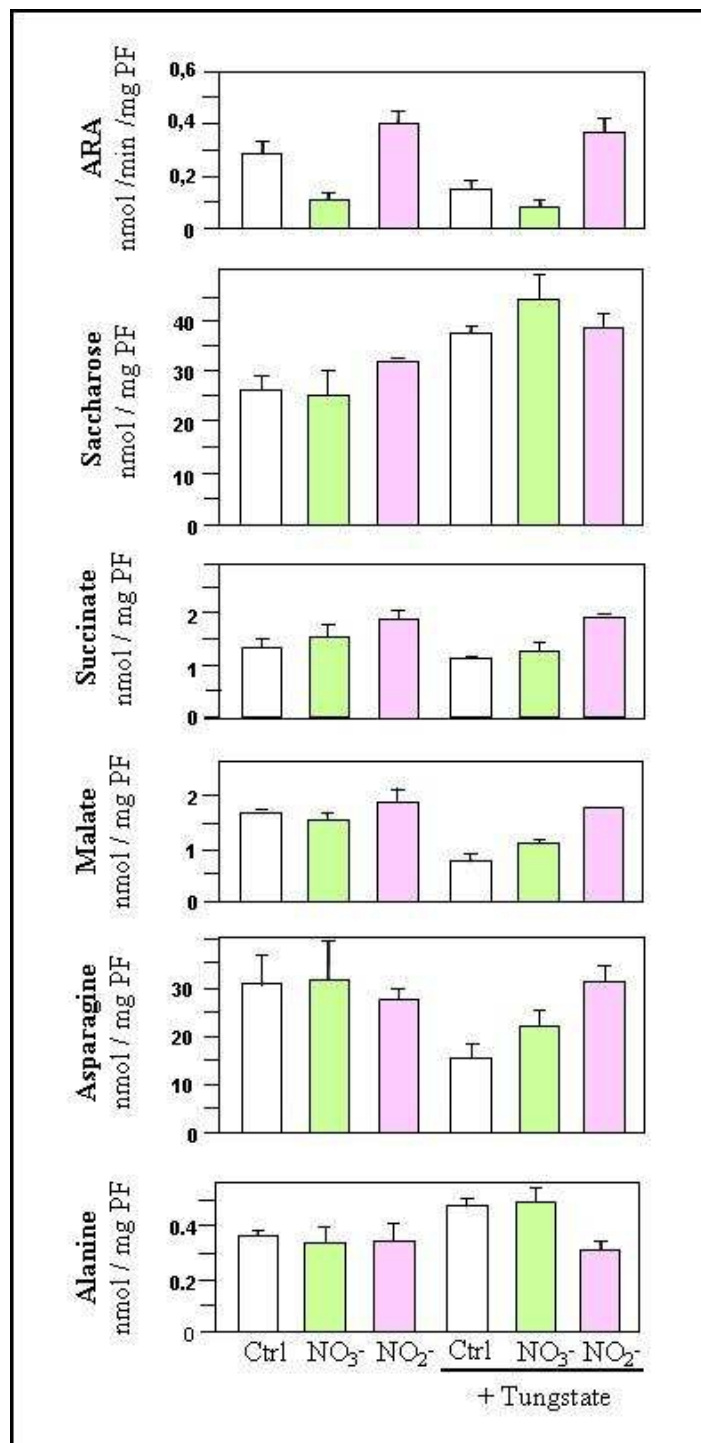
**Figure 28 :** Activité nitrate réductase (A) et production de NO (B) dans les nodosités matures de *Medicago truncatula* chez les plantes transgéniques contrôles *pNcr001-Gus*, *pNcr001-RNAi::Nr1*, *pNcr001-RNAi::Nr2* et *pNcr001-RNAi::Nr1/2*. (A) Le 100 % de l'activité NR du contrôle est de 5,72 nmoles  $\text{NO}_2 \text{ min}^{-1} \text{ gPF}^{-1}$  (poids frais) $^{-1}$ . (B) Le 100 % de la production de NO du contrôle est de 0,088 unité de fluorescence  $\text{min}^{-1} \text{ mgPF}^{-1}$ . Chaque mesure correspond à la moyenne,  $\pm$  écart-type, de 6 à 8 répétitions.

## C-Résultats complémentaires et discussion

Certaines données obtenues au cours de cette première partie de thèse ne sont pas présentés dans la publication à Plant Physiology. Cet *addendum* a pour objectif de présenter quelques résultats complémentaires relatifs, d'une part, à l'analyse des NR impliquées dans la production de NO, et d'autre part, aux effets d'une inhibition des NR sur le métabolisme de la fixation de l'azote.

### **a) Analyse de l'implication de NR1 et NR2 dans la production de NO chez des nodosités matures de *Medicago truncatula***

Nous avons montré que, dans les nodosités de *M. truncatula*, la production de NO dépend à environ 70 % des deux NR végétales (Horchani *et al.*, 2011). Aussi, pour essayer de distinguer laquelle des deux NR est particulièrement impliquée dans cette production de NO, nous avons généré, par stratégie RNAi, des simples mutants pour chacune des deux NR: *pNcr001-RNAi::Nr1* (*RNAi::Nr1*) et *pNcr001-RNAi::Nr2* (*RNAi::Nr2*). L'activité NR, ainsi que la production de NO ont ensuite été mesurées dans les nodosités du contrôle, du double mutant *pNcr001-RNAi::Nr1/2* (*RNAi::Nr1/2*) et des deux simples mutants (Figure 28A). L'activité NR totale chez les mutants *RNAi::Nr1* et *RNAi::Nr2* est diminuée de 47 et 56 %, respectivement, par comparaison au contrôle. En revanche, l'activité NR totale n'est pas plus fortement diminuée chez le double mutant *RNAi::Nr1/2*. La production de NO chute de 45 % dans les nodosités *RNAi::Nr1*, mais de seulement de 18 % et de façon non significative dans les nodosités *RNAi::Nr2* (Figure 28B). La baisse de production de NO dans les nodosités du double mutant *RNAi::Nr1/2* est du même ordre de grandeur que celle observée dans les nodosités *RNAi::Nr1*. Ces données montrent que la chute de la production de NO est corrélée à la baisse de l'activité NR dans les nodosités *RNAi::Nr1*, mais pas dans les nodosités *RNAi::Nr2*, ce qui permet d'affirmer que c'est NR1 plutôt que NR2 qui est impliqué dans la production de NO.



**Figure 29 :** Mesure de l'ARA (activité nitrogénase), et teneurs en différents métabolites (saccharose, succinate, malate, asparagine et alanine) dans les nodosités de *Medicago truncatula* incubées en hypoxie (1% O<sub>2</sub>) en présence de différents effecteurs et inhibiteurs de la nitrate reductase (10 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 1 mM NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, 1 mM Tungstate). Ctrl : contrôle, PF : poids frais. Chaque valeurs correspond à la moyenne, ± écart-type, de 2 (métabolites) ou 4 (ARA) expériences indépendantes.



## **b) Effets d'une inhibition des NR sur le métabolisme de la fixation de l'azote**

Dans la première partie de ce travail, nous avons montré que la NR a un rôle essentiel dans le maintien de l'état énergétique (rapport ATP/ADP) des nodosités en normoxie, mais surtout en situation d'hypoxie, (Horchani *et al.*, 2011). Cela suggère que la perturbation de l'activité NR au sein des nodosités est susceptible de modifier le métabolisme de fixation de l'azote. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons incubé, pendant 4 h, des nodosités de *M. truncatula* en présence d'effecteurs de la NR ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ , Tungstate – Tg) en situation d'hypoxie (1 %  $\text{O}_2$ ). Plusieurs paramètres ont alors été analysés. Tout d'abord, l'activité de la nitrogénase, via son activité de réduction de l'acétylène (ARA) est mesurée dans les différentes conditions. Le dosage de certains métabolites majeurs des nodosités est réalisé pour le saccharose, substrat carboné issu de la photosynthèse qui alimente les nodosités, le malate et le succinate, les principales sources de carbones fournies par la plante au bactéroïde. Enfin la teneur en certains acides aminés a été déterminée comme l'asparagine qui représente la forme majeure d'exportation de l'azote réduit et assimilé chez *M. truncatula* (Hopkins, 2003); et enfin l'alanine, qui est un acide aminé marqueur de l'hypoxie chez les végétaux (Gibbs et Greenway, 2003). Les résultats sont rapportés à la figure 29.

L'inhibition de 70 à 80 % de l'ARA par le nitrate confirme l'effet inhibiteur bien connu du nitrate sur la nitrogénase et la fixation de l'azote (Srivastava et Ormrod, 1986). En revanche, sur une période d'incubation de 4 h, celui-ci n'a aucun effet sur les teneurs en métabolites. De la même manière, la présence de nitrite ne modifie pas les teneurs en métabolites, mais stimule de 25 à 30 % l'ARA. Ces observations sont en apparente contradiction avec les effets inhibiteurs du nitrite rapportés chez le soja (*G. max*), (Stephens et Neyra, 1983). Ceci peut s'expliquer par le fait que dans cette étude, la concentration en nitrite utilisée (5 mM) est plus forte que dans nos conditions expérimentales (1 mM). Une autre étude a révélé des effets inhibiteurs du nitrite chez le soja (*G. max*), (Streeter, 1982). Cette différence peut s'expliquer par le fait dans nos conditions expérimentales (4 h d'incubation), les effets observés sont les effets métaboliques directs, à court terme, du nitrite, tandis que dans les études précédentes, les effets du nitrite ont été analysés après plusieurs jours, voir plusieurs semaines d'incubation (Streeter, 1982). Dans ces conditions, une inhibition de l'ARA traduit d'une part, la mise en place d'une régulation génique à plus long terme, et d'autre part, les effets toxiques intrinsèques du nitrite. Même s'il s'avère que le nitrite a un effet inhibiteur



sur la nitrogénase purifiée, cet effet est en partie dû au NO produit en conséquence de la réduction du nitrite chez les bactéroïdes (Trinchant et Rigaud, 1982). Dans les nodosités, le NO peut également provenir du partenaire végétal, en particulier du fonctionnement de la respiration nitrate-NO. Shimoda *et al.* (2009) ont également montré que le NO diminuait la réduction de l'azote par la nitrogénase dans les nodosités de soja. A l'opposé, la surexpression d'une Hb1, qui recycle le NO en nitrate, ou l'application exogène de piègeur de NO permet d'augmenter l'activité ARA. De plus, des études de mutants NR ont montré que l'effet inhibiteur du nitrate (à long terme, sur plusieurs semaines) sur la nitrogénase n'était pas lié à la présence de nitrite (Manhart et Wong, 1980).

En présence de Tg, l'ARA chute de 70 %, ce qui permet de penser que la chute de l'état énergétique des nodosités (publication Plant Physiol., Figure 7), résultant de l'inhibition de la NR, entraîne une baisse de la fixation de l'azote. Il est à noter que la présence de nitrite permet de maintenir l'ARA à un niveau comparable à celui observé en absence de Tg (Figure 29). La réversion de l'inhibition de l'ARA par le nitrite en présence de Tg, est cohérente avec les mêmes effets observés sur la production de NO (publication Plant Physiol., Figure 3) et sur l'état énergétique des nodosités (publication Plant Physiol., Figure 7). Ces données renforcent l'hypothèse de la respiration nitrate-NO selon laquelle c'est le nitrite qui est l'accepteur terminal de la chaîne de transfert des électrons (CTE).

L'inhibition de la NR par le Tg, en absence ou en présence de  $\text{NO}_3^-$ , se traduit par une accumulation de saccharose et une baisse des acides organiques, malate et succinate, ainsi que de l'asparagine (Figure 29). Ces modifications, qui traduisent un ralentissement du métabolisme de fixation de l'azote, peuvent s'expliquer par la chute du métabolisme énergétique des nodosités. Lorsque la disponibilité en ATP diminue, l'ensemble du métabolisme cellulaire est affecté (Pradet et Raymond, 1983). Là encore, pendant la durée de l'expérience, l'addition de nitrite en présence de Tg permet de maintenir les teneurs en métabolites équivalentes à celles observées dans le contrôle.

Une augmentation de la teneur en alanine est observée lorsque la NR est inhibée par le Tg et en absence de nitrite. Cette information est particulièrement intéressante dans la mesure où elle démontre que l'inhibition de la NR mime les effets de l'hypoxie dans les nodosités, ce qui renforce l'hypothèse du fonctionnement de la respiration nitrate-NO dans les nodosités hypoxiées. L'inhibition de la NR entraîne en cascade: une diminution de la fourniture en nitrite aux mitochondries, un ralentissement du fonctionnement de la CTE et du cycle des acides tricarboxyliques dans les mitochondries, une inhibition du transport du pyruvate issu de la



glycolyse du cytosol vers la mitochondrie, et par voie de conséquence une accumulation d'alanine (Gibbs et Greenway, 2003).

Ainsi, l'ensemble des résultats obtenus dans cette première partie sur la production du NO (publication Plant Physiol., figure 3), l'état énergétique (publication Plant Physiol., figure 7), l'ARA et les teneurs en métabolites (Figure 29), montrent que l'activité NR est indispensable au bon fonctionnement du métabolisme de la fixation de l'azote et renforcent l'hypothèse du fonctionnement d'une respiration nitrate-NO dans les nodosités.

Le bon fonctionnement de la respiration nitrate-NO dépend de quatre points. (i) La NR, impliquée dans la réduction du nitrate en nitrite, fournit l'accepteur terminal à la CTE lors de l'hypoxie ; ce point a été démontré dans le papier Plant Physiol. (ii) Le nitrite traverse les membranes mitochondriales pour servir d'accepteur terminal à la CTE. Le chapitre II des résultats est employé à démontrer l'existence de ce transport, via la production de NO à partir de nitrite par les mitochondries purifiées (MP). Le chapitre III des résultats est consacré à la recherche de protéines candidates au transport du nitrite. (iii) Le fonctionnement de la CTE en hypoxie produit du NO. La production de NO de manière dépendante de la CTE a été validée d'une part sur nodosités entières dans le papier Plant Physiol. et d'autre part sur les MP de *M. truncatula* dans le chapitre II des résultats. Enfin (iv), la dernière étape du cycle nitrate-NO est la ré-oxydation du NO en nitrate par Hb/Lb (Herold et Puppo, 2005 ; Igamberdiev *et al.*, 2011). Bien que ce phénomène ait été montré dans les racines *M. truncatula* (Igamberdiev *et al.*, 2004a), il reste à valider pour les nodosités *M. truncatula/S. meliloti* et en particulier pour le rôle le maintient du fonctionnement cellulaire et du statut énergétique en hypoxie.

## **Résultats**

### **Partie 2 : Caractérisation du transport du nitrite vers les mitochondries.**



## A-Introduction

Dans les organes ou tissus en situation d'hypoxie, la respiration mitochondriale dépendante de l'oxygène est très fortement ralentie (Gibbs et Greenway, 2003 ; Greenway et Gibbs, 2003). C'est le cas des nodosités fixatrices d'azote dans lesquelles la pression partielle en oxygène peut chuter jusqu'à des valeurs de l'ordre de 10 à 40 nM (Layzell et Hunt, 1990 ; Millar *et al.*, 1995). Il a été montré que, dans les organes hypoxiés, une respiration cyclique, appelée "respiration nitrate-NO", peut se mettre en place. Dans cette respiration alternative, le nitrite se substitue à l'oxygène comme accepteur terminal d'électrons de la chaîne respiratoire mitochondriale, pour permettre aux cellules de régénérer une partie de l'énergie (ATP) dont elles ont besoin (pour revue, voir Igamberdiev et Hill, 2009 ; Gupta et Igamberdiev, 2011). Dans la première partie de ce travail de thèse, nous avons posée l'hypothèse qu'une telle respiration nitrate-NO serait fonctionnelle dans les nodosités fixatrice d'azote. Nous avons montré que, dans les nodosités de *M. truncatula*, le nitrate est réduit en nitrite, puis en NO par l'intermédiaire de la nitrate réductase (NR) et de la chaîne de transfert d'électron (CTE) mitochondriale, (Horchani *et al.*, 2011).

Dans l'hypothèse du fonctionnement de la respiration nitrate-NO, le nitrite doit être transporté du cytosol vers la matrice mitochondriale. Dans la plupart des organismes où la respiration nitrate-NO a été étudiée, les auteurs ne se sont pas particulièrement intéressés aux propriétés de transport du nitrite dans les mitochondries. Seules quelques études ont été menées chez le tabac (*Nicotiana tabacum*), (Planchet *et al.*, 2005 ; Gupta *et al.*, 2005), le riz (*Oryza sativa*), (Stoimenova *et al.*, 2007), et l'orge (*Hordeum vulgare* L.), (Gupta *et al.*, 2010 ; Stoimenova *et al.*, 2007). Elles ont montré, en particulier que les mitochondries de racines, mais pas de feuilles, ont la capacité de produire du NO à partir de nitrite (Gupta *et al.*, 2005).

Dans la seconde partie de ce travail, notre objectif était de démontrer que les mitochondries de nodosités de *M. truncatula* possèdent la capacité de produire du NO en utilisant le nitrite. Pour cela, notre première étape a été de mettre au point un protocole de purification de mitochondries, avant d'analyser leur capacité de réduction du nitrite en NO. Compte tenu de la difficulté à obtenir des nodosités en grandes quantités, nous avons d'abord choisi de mettre au point un protocole de purification de mitochondries sur des racines de *M. truncatula* afin de l'adapter ensuite aux mitochondries de nodosités. Le chapitre qui suit présente la mise au point du protocole d'extraction des mitochondries de racines de



**Tableau 9** : Activités spécifiques des marqueurs subcellulaires de mitochondries, de peroxyosomes et de plastides dans l'extrait brut (EB) et les mitochondries purifiées (MP) de racines de *Medicago truncatula*. Le gradient de Percoll utilisé est un gradient discontinu (de bas en haut) : 60 – 45 – 28 – 5 % (v/v). Les mitochondries sont retrouvées dans la fraction 45 % (v/v) de Percoll. (a) fumarase (mitochondries) (b) catalase (peroxyosomes) et (c) G6PDH (plastides). AT : activité totale, AS : activité spécifique, prot : protéines, Vtot : volume total, Rdt : rendement, Enricht : enrichissement.

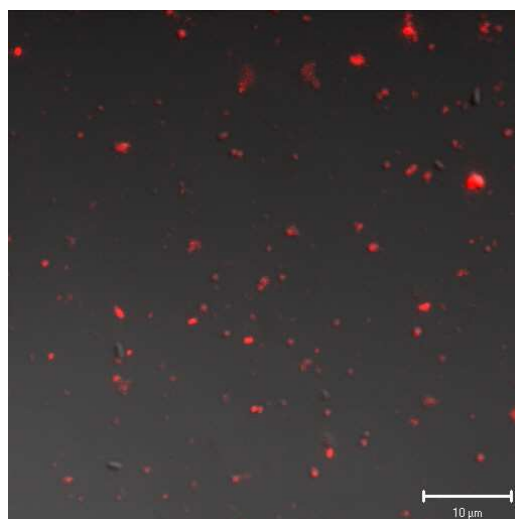
<b>(a) Activité fumarase (mitochondries)</b>				
Echantillon	AT: nmoles.min <sup>-1</sup>	Rdt (% MP vs EB)	AS: nmoles.min <sup>-1</sup> .mg prot <sup>-1</sup>	Enricht (% MP vs EB)
EB	653,69	1	1,77	1
MP	50,41	7,71	78,83	4461

<b>(b) Activité catalase (peroxyosomes)</b>				
Echantillon	AT: μmoles.min <sup>-1</sup>	Rdt (% MP vs EB)	AS: μmoles.min <sup>-1</sup> .mg prot <sup>-1</sup>	Enricht (% MP vs EB)
EB	215,50	1	0,58	1
MP	10,60	4,92	16,57	2844

<b>(c) Activité Glucose 6 Phosphate dehydrogenase (plastides)</b>				
Echantillon	AT: nmoles.min <sup>-1</sup>	Rdt (% MP vs EB)	AS: nmoles.min <sup>-1</sup> .mg prot <sup>-1</sup>	Enricht (% MP vs EB)
EB	2415,11	1	6,53	1
MP	6,11	0,25	9,55	146



**Figure 30** : Observation confocale de mitochondries purifiées de racines de *Medicago truncatula* obtenues après purification sur gradient discontinu de Percoll (60 – 45 – 28 – 5 % (v/v)). Les mitochondries sont visualisées en rouge à l'aide du Mitotracker Red CM-H2XRos qui est oxydé par le fonctionnement de la chaîne de transfert des électrons mitochondriale. Echelle : 10 μm.

*M. truncatula*, ainsi que leur caractérisation physiologique. Les résultats préliminaires obtenus sur la préparation des mitochondries de nodosités sont présentés et discutés.

## **B-Résultats et discussion**

### **a) Mise au point d'un protocole de purification des mitochondries de racines de *Medicago truncatula***

Dans le but d'étudier le transport du nitrite mitochondrial, la première étape consistait à mettre au point un protocole de purification des mitochondries. Nous avons commencé par mettre au point le protocole à partir de racines de *M. truncatula*. Pour cela, nous avons cherché à adapter un protocole classique décrit dans la littérature (Douce *et al.*, 1987) à notre matériel. Pour cela, après deux centrifugations classiques, à faible puis forte vitesse (voir la partie Matériel et Méthodes), nous avons cherché à purifier les mitochondries sur gradient de Percoll discontinu, puis continu.

Nous avons d'abord tenté de purifier les mitochondries sur un gradient de Percoll discontinu. Plusieurs concentrations ont été testées, mais les fractions de mitochondries étaient systématiquement contaminées par les peroxysomes. Un exemple de marqueurs enzymatiques mesurés sur l'extrait brut (EB) et la fraction de mitochondries purifiées (MP) est montré dans le Tableau 9. Pour cet exemple, le protocole utilisé est une extraction de mitochondries de racines (voir Matériel et Méthodes) sur un gradient discontinu de Percoll (de bas en haut) 60 – 45 – 28 – 5 % (v/v). Une contamination par les plastides est également retrouvée avec un enrichissement de 146 %. En revanche, le cytoplasme ne contamine pas la fraction mitochondriale comme cela a été vérifié par la mesure de la G6PDH sans ajout de triton et aussi par la mesure d'autres enzymes cytosoliques comme la PEP carboxylase. D'autres osmotocums comme le mannitol, le sorbitol ou encore le raffinose ont également été testés en remplacement du saccharose, mais cela n'a rien apporté du point de vue du rendement ou de l'enrichissement en mitochondries. Cela n'a pas permis non plus de diminuer les contaminations peroxysomales. Un point positif cependant, les mitochondries sont intactes et actives comme le montre l'observation microscopique de mitochondries marquées au Mitotracker Red qui n'est visualisable que sur les mitochondries actives (Figure 30). Compte tenu des contaminations importantes, ce protocole n'est pas retenu.

**Tableau 10 :** Activités spécifiques des marqueurs subcellulaires de mitochondries, peroxyosomes et plastes dans l'extrait brut (EB) et dans les mitochondries purifiées (MP) de racines de *Medicago truncatula*. Le gradient de Percoll utilisé est un gradient continu de 28 % (v/v). Les mitochondries sont retrouvées dans la fraction du bas du tube. (a) fumarase (mitochondries) (b) catalase (peroxyosomes) et (c) G6PDH (plastés). AT : activité totale, AS : activité spécifique, prot : protéines, Vtot : volume total, Rdt : rendement, Enricht : enrichissement.

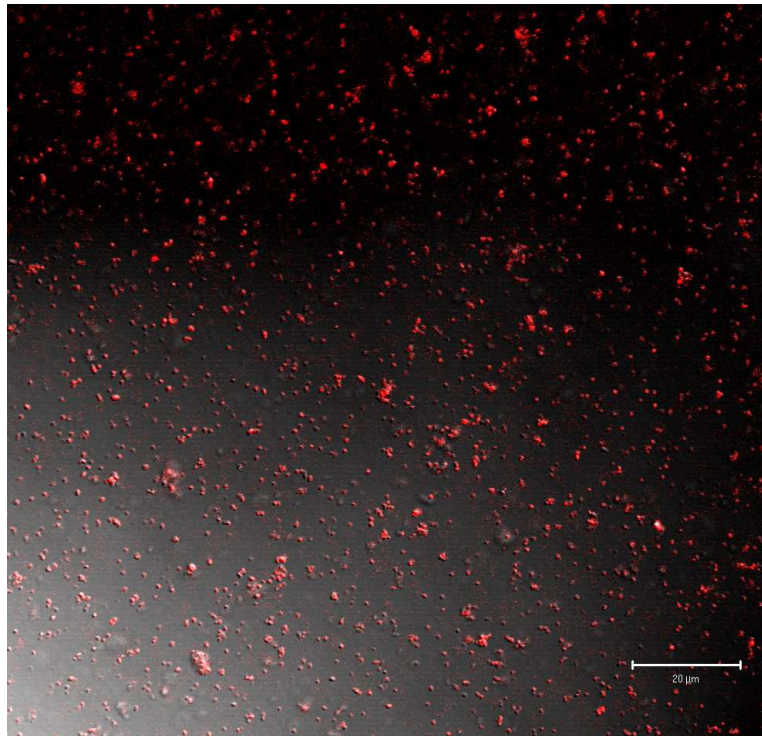
<b>(a) Activité fumarase (mitochondries)</b>				
Echantillon	AT: nmoles.min <sup>-1</sup>	Rdt (% MP vs EB)	AS: nmoles.min <sup>-1</sup> .mg prot <sup>-1</sup>	Enricht (% MP vs EB)
EB	1508,20	1	3,62	1
MP	31,56	2,09	114,70	3167

<b>(b) Activité catalase (peroxyosomes)</b>				
Echantillon	AT: μmoles.min <sup>-1</sup>	Rdt (% MP vs EB)	AS: μmoles.min <sup>-1</sup> .mg prot <sup>-1</sup>	Enricht (% MP vs EB)
EB	1233,03	1	2,96	1
MP	1,51	0,12	5,50	185,79

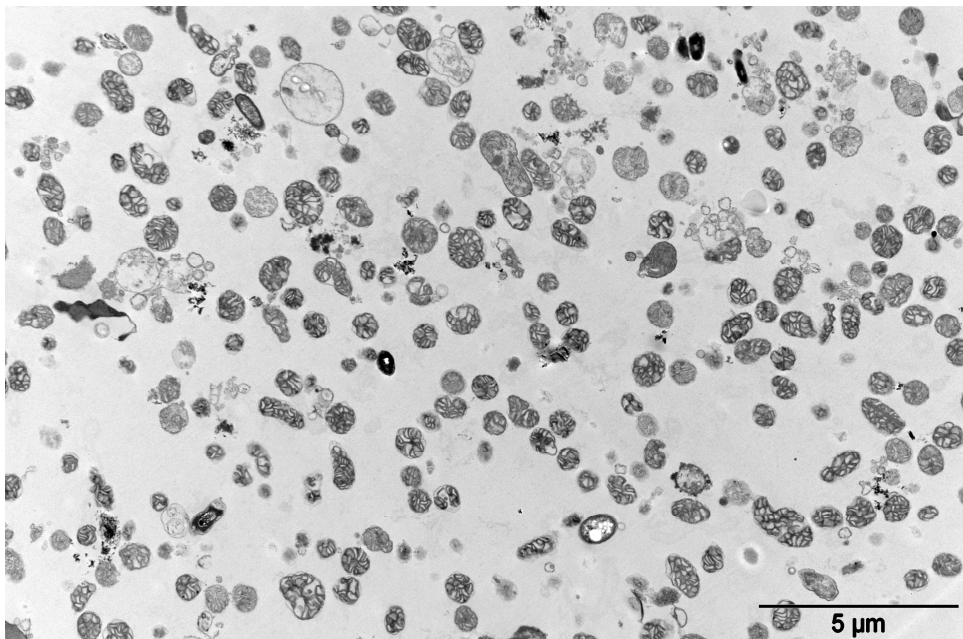
<b>(c) Activité Glucose 6 Phosphate dehydrogenase (plastés)</b>				
Echantillon	AT: nmoles.min <sup>-1</sup>	Rdt (% MP vs EB)	AS: nmoles.min <sup>-1</sup> .mg prot <sup>-1</sup>	Enricht (% MP vs EB)
EB	4617,36	1	11,09	1
MP	0,00	0,00	0,00	0,00

Compte tenu de la difficulté à séparer les mitochondries des peroxysomes, nous avons cherché à séparer ces deux types d'organites sur un gradient continu de Percoll. Notre objectif était de diminuer suffisamment la densité du gradient afin de concentrer les mitochondries dans le fond du tube sans qu'elles soient contaminées par d'autres organites (en particulier les peroxysomes). Un bon compromis a été trouvé pour une concentration de 28 % (v/v) de Percoll. Une autre amélioration a consisté à utiliser une concentration plus élevée en osmoticum (saccharose) lors de la séparation sur gradient de Percoll. En effet, la concentration utilisée classiquement est de 0,3 M (Douce *et al.*, 1987) mais d'autres études utilisent des concentrations plus élevées : pour extraire des mitochondries de cultures cellulaires d'*A. thaliana*, la concentration en osmoticum utilisée est de 0,5 M (Zancani *et al.*, 2004) ; un autre protocole utilise 0,4 M saccharose pour extraire des mitochondries de pommes de terre (*Solanum tuberosum* cv. *desiree*), (Ramírez-Aguilar *et al.*, 2011). Parfois la concentration varie entre les différentes étapes de la purification des organelles : 0,45 M pour le broyage, 0,3 M dans le gradient de Percoll, et 0,4 M avec changement d'osmoticum pour la re-suspension finale des mitochondries issues de suspensions cellulaires d'*Arabidopsis* (Werhahn *et al.*, 2001). Dans notre cas, lorsque 0,6 M de saccharose a été utilisée tout le long de l'extraction, les pertes de matériel étaient plus importantes qu'avec 0,3 M. En revanche, nous avons obtenu de meilleurs rendements en mitochondries lorsque l'extraction a été réalisée avec 0,3 M saccharose dans les tampons d'extraction et de lavage, avec un passage à 0,6 M saccharose (SM2X) dans le gradient de Percoll, l'enrichissement en mitochondries est le meilleur jusqu'alors obtenu (Tableau 10). L'évaluation des contaminants avec les marqueurs enzymatiques montre qu'avec ces modifications, les contaminations dues aux plastides et aux peroxysomes sont fortement diminuées: les plastides sont totalement éliminés et la contamination en peroxysomes est divisée par un facteur 15 par rapport au gradient discontinu (Tableau 10). L'enrichissement/appauvrissement pour les différentes organelles a été évalué entre une expérience d'extraction de mitochondrie sur 28 % (v/v) Percoll en présence de 0,6 M ou 0,3 M de saccharose. Pour les mitochondries, l'enrichissement est du même ordre de grandeur : 4,2 fois avec 0,6 M et 3,2 fois avec 0,3 M saccharose. Un appauvrissement en peroxysomes est observé dans les deux cas de 1,5 fois. Pour la contamination plastidiale, l'appauvrissement est total dans le cas du passage à 0,6 M de saccharose dans le gradient de Percoll alors qu'il n'est que de 10 fois lorsque la concentration 0,3 M est utilisée tout le long de l'extraction.

Le marquage des mitochondries au Mitotracker Red a permis d'affirmer que les mitochondries sont intactes et actives. L'aspect des MP a été également vérifié par



**Figure 31** : Observation de mitochondries de racines de *Medicago truncatula* par microscopie confocale, après purification sur gradient continu de 28 % (v/v) de Percoll. Les mitochondries sont visualisées en rouge grâce au Mitotracker Red CM-H2XROS (Life technologies) qui est oxydé par le fonctionnement de la chaîne de transfert des électrons mitochondriale. Echelle : 20  $\mu\text{m}$ .



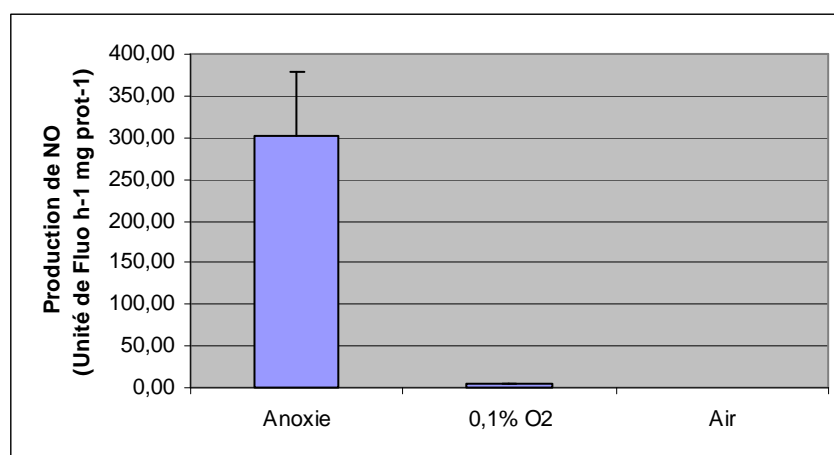
**Figure 32** : Observation en microscopie électronique à transmission (MET) des mitochondries purifiées extraites de racines de *Medicago truncatula* sur 28 % (v/v) de Percoll. Echelle : 5  $\mu\text{m}$ .

microscopie électronique à transmission (MET), (Figure 32). Les mitochondries présentent un aspect intact avec la présence des deux membranes et les crêtes formées par les plis de la membrane interne. Certaines ont une forme ronde et d'autres ont une forme allongée. Aucun cristal de catalase (caractéristique des peroxysomes) n'a été observé. Il semblerait que les peroxysomes ne soient pas intacts lors de l'extraction, mais l'enzyme catalase conserve son activité comme le montre le dosage enzymatique. Des contaminants extérieurs sont retrouvés comme des bactéries contaminantes, mais aussi des structures non identifiées. Sur la base des observations faites en MET et en microscopie confocale (fluorescence du Mitotracker Red) sur les MP, nous avons validé le dernier protocole de purification testé pour la suite des expériences.

Remarque: La purification d'organelles comme les mitochondries requière parfois un deuxième passage sur gradient de densité (Millar *et al.*, 2001, Douce *et al.*, 1987), voire un troisième sur gradient de Percoll (Dubinin *et al.*, 2011), qui permet d'augmenter la pureté de la fraction mitochondriale. Une seconde étape de purification sur Percoll n'a pas pu être utilisée pour extraire les mitochondries de racine en raison des trop grandes pertes de matériel à chaque étape du protocole. Lors d'une tentative de réaliser deux étapes de purification sur gradient de Percoll, l'activité fumarase n'était plus détectable à l'issue du deuxième gradient. De plus la méthode de purification des mitochondries sur plusieurs gradients de Percoll n'est pas suffisamment performante comme le soulignent Eubel *et al.* (2007). Leur résultats révèlent que des protéines identifiées comme mitochondriales dans les précédentes études étaient en fait des contaminants. Pour améliorer la pureté de l'extraction de mitochondries en vue d'analyse par spectrométrie de masse (MS), les auteurs ont développé une technique de séparation des organelles basée une séparation en mode électrophorèse selon la charge présente à la surface des organelles: "free-flow electrophoresis" (FFE). Grâce à l'utilisation de cette méthode, la pureté des mitochondries extraites est améliorée et les contaminations peroxysomales sont fortement diminuées. L'utilisation d'une telle technique serait susceptible d'améliorer significativement la qualité des mitochondries, en particulier pour la mise au point des extractions à partir de nodosités.

**Tableau 11** : Production de NO par les mitochondries purifiées (MP) de *Medicago truncatula* intactes (extraites ex-temporairement), ou éclatées (congelées, soniquées) en anoxie en présence de différents effecteurs. X : absence, V : présence.

Effecteurs:					
Matériel	NADH	ADP	ATP	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Emission de NO
MP intactes	X	X	X	X	non
MP intactes	V	V	X	V	non
MP intactes	V	V	V	V	oui
MP éclatées	X	X	X	X	non
MP éclatées	V	X	X	X	non
MP éclatées	V	X	X	V	oui
MP éclatées	V	V	V	V	oui



**Figure 33** : Production de NO à différentes pressions partielles d'oxygène : 21 % (normoxie), 0,1 % (hypoxie) et 0 % (anoxie), par les mitochondries purifiées de racines de *Medicago truncatula*. Les mesures ont été réalisées par fluorescence de la CuFL. La production de NO est exprimée en unité arbitraire de fluorescence rapportée à la quantité de protéine (mg). Ces mesures représentent la moyenne de 3 répétitions.

## b) Caractérisation du transport de nitrite

Pour étudier la production de NO par les mitochondries purifiées, nous avons eu recours à deux techniques d'analyse différentes: la chimiluminescence et la fluorescence de la CuFL. Dans un premier temps, nous avons cherché à mettre au point les conditions expérimentales pour une obtenir une production de NO par les mitochondries en présence de nitrite. Les expériences de production de NO en anoxie par des MP de racines ont montré que la présence de NADH (0,5 mM), nitrite (0,5 mM), ADP (0,5 mM) et d'ATP (0.1 mM) est nécessaire pour une production de NO par les MP intactes (Tableau 11). En revanche, sur MP éclatées en présence de NADH, seul le nitrite est nécessaire, pour observer une émission de NO (Tableau 11). La première conclusion de ces expériences est que les MP provenant des racines de *M. truncatula* sont capables de produire du NO en utilisant le nitrite comme substrat en présence de pouvoir réducteur.

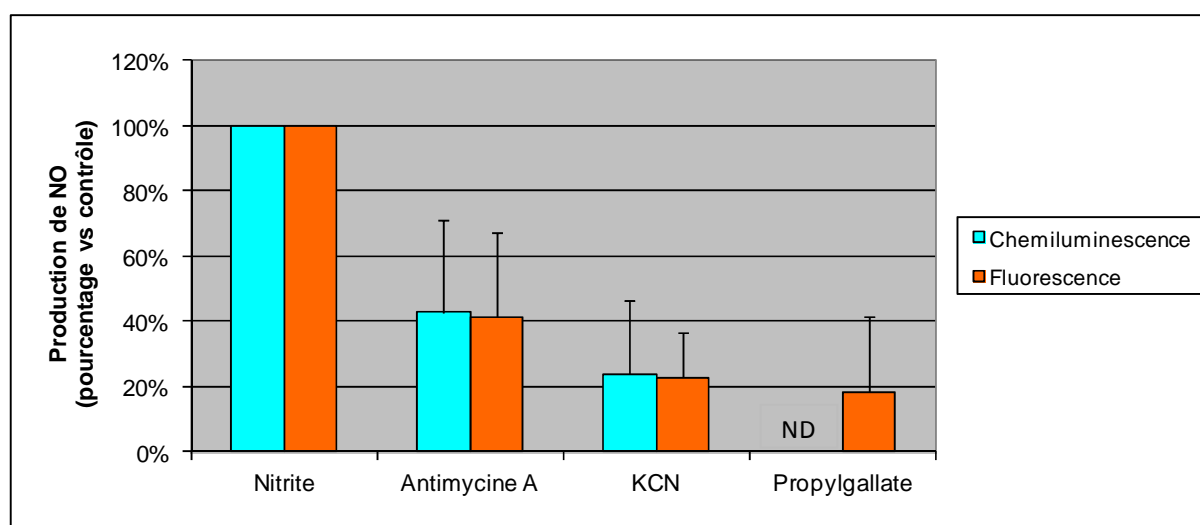
L'importance de l'ajout d'ATP peut s'expliquer soit par le fait que le transport de nitrite à l'intérieur des mitochondries est énergie-dépendant, soit que les mitochondries ont besoin d'être énergisées pour fonctionner après le processus d'extraction. Le fonctionnement de la CTE génère un gradient de proton, avec un potentiel matriciel électronégatif et un pH basique (Porcelli *et al.*, 2005). L'import de nitrite va donc à l'encontre du gradient électrochimique. Il est donc possible que l'import de nitrite requiert une protéine de transport qui fonctionne avec de l'ATP.

Gupta *et al.* (2005) ont montré que la production de NO par les mitochondries est plus importante en anoxie, mais qu'elle a lieu également à de faibles pressions partielles en oxygène. Nous avons donc testé la production de NO par des mitochondries purifiées de racines de *M. truncatula* en normoxie (21 % O<sub>2</sub>), en hypoxie (1 % O<sub>2</sub>) et en anoxie (0 % O<sub>2</sub>). Ces expériences préliminaires ont été réalisées uniquement en fluorescence. Aucune production de NO à partir de nitrite n'a été observée en normoxie (Figure 33). En hypoxie, une faible production de NO a été observée (< 10 Unités de fluorescence.h<sup>-1</sup>.mg protéines<sup>-1</sup>), alors qu'elle atteint environ 300 Unités de fluorescence.h<sup>-1</sup>.mg protéines<sup>-1</sup> en anoxie. Ces résultats confirment les observations rapportées par (Gupta *et al.*, 2005) et indiquent que la production de NO par les mitochondries est inhibée par la présence d'oxygène.



**Tableau 12 :** Pourcentage d'inhibition de la production de NO en anoxie par différents inhibiteurs des voies connues de biosynthèse du NO sur les mitochondries purifiées (MP) de racines de *Medicago truncatula*. Le pourcentage d'inhibition est calculé à partir du contrôle positif à 100 %, en présence de MP, 0,5 mM NADH, 0,5 mM ADP, 0,1 mM ATP et 0,5 mM NO<sub>2</sub><sup>-</sup>. CTE : chaîne de transfert des électrons mitochondriale, COX : cytochrome oxydase, AOX : alternative oxydase, NR : nitrate réductase, XOR : xanthine oxydoréductase, NOS : NO synthase.

Voie de biosynthèse du NO	Inhibiteur	% inhibition
CTE (Complexe III)	Antimycine A	57 à 58
CTE (découpleur CTE/ATPase)	FCCP	0
CTE (COX)	KCN	76 à 78
CTE (AOX)	Propylgallate	81
NR	Tungstate	0
XOR	Allopurinol	0
NOS like	L-NAME	0

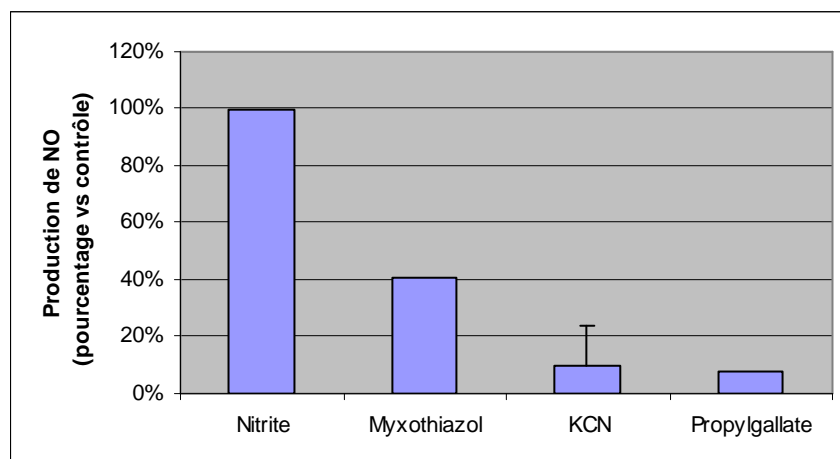


**Figure 34 :** Production de NO en anoxie, par les mitochondries purifiées de racines de *Medicago truncatula*, mesurée par chimiluminescence (bleu) ou fluorescence de la CuFL (orange) en présence de différents inhibiteurs. La valeur de 100 %, mesurée en présence de nitrite seul, est utilisée comme référence pour évaluer l'effet des inhibiteurs testés. Le nombre de répétitions est compris entre 3 et 10. ND : non déterminé.

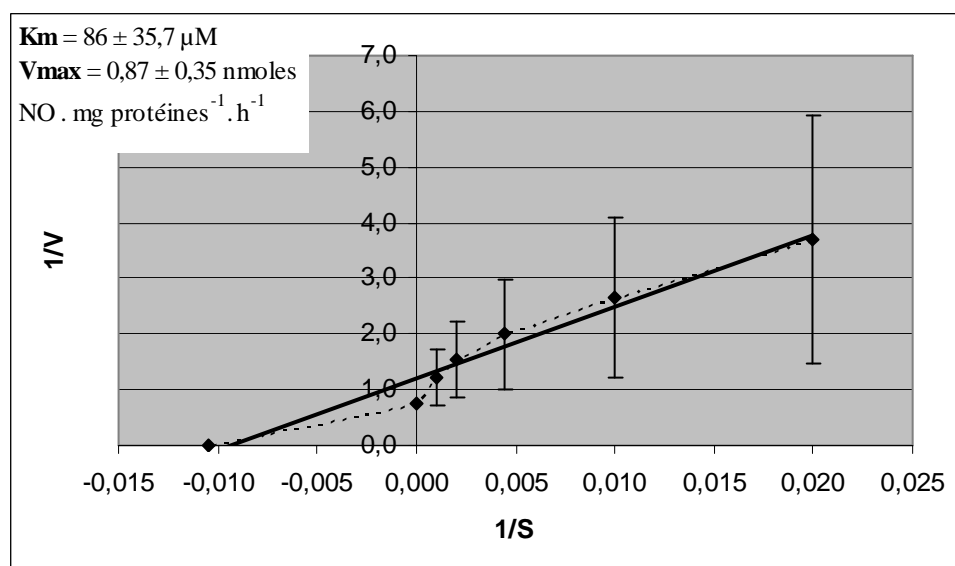
Nous avons ensuite cherché à identifier le(s) système(s) enzymatique(s) impliqué(s) dans la production de NO. Pour cela nous avons utilisé des inhibiteurs des principales voies de production de NO identifiées chez les plantes: CTE, NR, xanthine oxydoréductase (XOR) et NOS-like.

L'utilisation de différents inhibiteurs permet de déterminer l'origine du NO observé (Tableau 12). Ainsi, la production de NO est inhibée à 80 % en présence de KCN, un inhibiteur de la cytochrome oxydase (COX) (Figure 34). Ce résultat est reproductible et observé avec les deux techniques de mesure de NO. Le propylgallate, un inhibiteur de l'alternative oxydase (AOX), inhibe également de l'ordre de 80 % la production de NO en mesure par fluorescence (Figure 34), mais pas par chimiluminescence (où une seule mesure a été effectuée). Une inhibition plus faible, de l'ordre de 25 % à 60 % est observée en présence d'antimycine A et de myxothiazol, deux inhibiteurs du complexe III de la CTE. Le myxothiazol bloque le transfert des électrons au niveau de  $Q_o$  et l'antimycine A au niveau de  $Q_i$  (Starkov et Fiskum, 2001). Ces données indiquent que la CTE, et en particulier la COX sont impliquées dans la production de NO par les mitochondries. L'implication de l'AOX n'est pas claire dans la mesure où elle n'a pas observée avec les deux techniques. Ces données sont en accord avec les précédents rapports dans la littérature qui ont montré l'implication de la COX et de l'AOX dans la production de NO par les mitochondries (Gupta *et al.*, 2005, 2010 ; Stoimenova *et al.*, 2007). La rapidité des mitochondries de racines à produire du NO en anoxie suggère que celles-ci sont capables, de manière constitutive, de passer d'une respiration oxygène-dépendante à une respiration nitrate-NO lorsque que la pression partielle de l'oxygène diminue dans la cellule.

D'autres inhibiteurs de voies de biosynthèses connues du NO ont été testés (Tableau 12). Aucun effet du tungstate, un inhibiteur de la NR (Xiong *et al.*, 2012), n'a été observé, ce qui indique que la NR n'est pas impliquée dans la production du NO par les mitochondries. La XOR est une enzyme capable de produire du NO à partir de nitrite en anoxie chez les animaux et les végétaux (Millar *et al.*, 1998 ; Li *et al.*, 2001). L'allopurinol, un inhibiteur de la XOR, n'affecte pas non plus la production de NO, ce qui permet d'exclure l'implication de la XOR dans la production de NO. Le L-NAME, un inhibiteur de NOS (Griffith et Kilbourn, 1996), n'a pas d'effet non plus sur la production de NO, ce qui permet également d'exclure l'implication d'une NOS-like. Le FCCP, un découplant de la CTE et de l'ATPase, ne provoque pas non plus d'inhibition de la production de NO. Comme l'ATP est ajouté au milieu, il n'est pas possible de conclure sur la nécessité ou non de l'ATP pour le transport du nitrite, en revanche, cela signifie que le transport du nitrite ne dépend pas de la présence d'un gradient



**Figure 35** : Production de NO en hypoxie (0,1 % d'oxygène), par les mitochondries purifiées de racines de *Medicago truncatula*, mesurée par fluorescence de la CuFL (orange) en présence de différents inhibiteurs. La valeur de 100 %, mesurée en présence de nitrite seul, est utilisée comme référence pour évaluer l'effet des inhibiteurs testés. L'absence de barre d'erreur sur certaines données est due à l'absence de répétition. Pour les mesures de KCN, le nombre de répétitions est de 2.



**Figure 36** : Détermination des paramètres cinétiques apparents du transport de nitrite dans les mitochondries purifiées de racines de *M. truncatula*. Le  $K_m$  apparent moyen, calculé à partir de 4 répétitions indépendantes, est de  $86 \pm 35,7 \mu M$ . La  $V_{max}$  apparente moyenne est de  $0,87 \pm 0,35 \text{ nmoles de NO formé} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg protéines}^{-1}$ .

électro-chimique de part et d'autre de la membrane interne des mitochondries.

Une lacune dans la caractérisation du transport du nitrite a été de ne pas pouvoir déterminer si l'ATP est nécessaire au transport lui-même. La difficulté à évaluer l'importance de l'ATP réside dans le fait que l'ATP est indispensable pour faire fonctionner les MP après l'extraction. Pour contourner cette difficulté, il faudrait tester les effets d'un compétiteur non hydrolysable de l'ATP (comme le 5'-adenylylimidodiphosphate) en même temps que l'application du FCCP afin de savoir si l'ATP est directement impliqué ou non dans le transport du nitrite.

En hypoxie, les inhibiteurs de la CTE et de la COX ont le même effet inhibiteur sur la production de NO qu'en anoxie (Figure 35). Les effets inhibiteurs du KCN et du propylgallate sont encore plus marqués, de l'ordre de 90 %. Pour le myxothiazol, le pourcentage d'inhibition est le même que pour l'anoxie. Ces résultats montrent que la respiration nitrate-NO est capable de fonctionner en hypoxie, ce qui est le cas des nodosités de légumineuses en conditions physiologiques (Hunt *et al.*, 1988).

Pour commencer à caractériser le transport du nitrite dans les mitochondries, nous avons cherché à savoir si celui-ci est saturable et, si oui, à déterminer son  $K_m$  apparent. Pour cela nous avons mesuré la production de NO par des mitochondries incubées en présence de concentrations croissantes en nitrite (de 50  $\mu\text{M}$  à 1 mM). Le  $K_m$  apparent calculé sur une moyenne de plusieurs répétitions est de  $86 \pm 35,7 \mu\text{M}$  (Figure 36). Cette valeur est cohérente avec le  $K_m$  apparent de 175  $\mu\text{M}$  mesuré sur mitochondries de racines de tabac (Gupta *et al.*, 2005). La vitesse  $V_{\text{max}}$  apparente calculée sur une moyenne de plusieurs répétitions est de  $0,87 \pm 0,35 \text{ nmoles de NO formé. h}^{-1} \cdot \text{mg protéines}^{-1}$ . Cette valeur est comparable à la vitesse de production de NO observée en anoxie sur des mitochondries isolées de racines qui est de l'ordre de 1-20  $\text{nmoles. h}^{-1} \cdot \text{mg protéines}^{-1}$  (Gupta *et al.*, 2011). Une production de NO en hypoxie/anoxie par les mitochondries a été observée chez les mammifères (Kozlov *et al.*, 1999). La vitesse de production de NO à partir de nitrite par les MP de rat est d'environ 1  $\mu\text{mol. h}^{-1} \cdot \text{mg protéines}^{-1}$ . (Castello *et al.*, 2006). Cette valeur est identique pour les MP de levure (Castello *et al.*, 2006). Chez la levure, l'implication de la COX dans la production de NO à partir de nitrite par les mitochondries a été rapportée mais non calculée (Castello *et al.*, 2006, 2008).

La caractérisation des paramètres cinétiques du transport du nitrite a permis de déterminer un  $K_m$  apparent de l'ordre de  $86 \pm 35,7 \mu\text{M}$ . Cette valeur a été déterminée par la mesure de la réduction du nitrite en NO, catalysée par la COX. L'affinité de la COX pour l'oxygène est de 140 nM mais elle n'est pas connue pour le nitrite (Stoimenova *et al.*, 2007).

**Tableau 13** : Activités spécifiques des marqueurs subcellulaires de mitochondries, peroxyosomes et plastes dans l'extrait brut (EB) et dans les mitochondries purifiées (MP) de nodosités de *Medicago truncatula*. Le gradient de Percoll utilisé est un gradient continu de 28 % (v/v). Les mitochondries sont retrouvées dans la fraction du bas du tube. (a) fumarase (mitochondries) (b) catalase (peroxyosomes) et (c) G6PDH (plastes). AT : activité totale, AS : activité spécifique, prot : protéines, Vtot : volume total, Rdt : rendement, Enricht : enrichissement.

<b>(a) Activité fumarase (mitochondries)</b>				
Echantillon	AT: nmoles.min <sup>-1</sup>	Rdt (% MP vs EB)	AS: nmoles.min <sup>-1</sup> .mg prot <sup>-1</sup>	Enricht (% MP vs EB)
EB	1853,28	1	8,19	1
MP	52,46	2,83	7,67	94

<b>(b) Activité catalase (peroxyosomes)</b>				
Echantillon	AT: μmoles.min <sup>-1</sup>	Rdt (% MP vs EB)	AS: μmoles.min <sup>-1</sup> .mg prot <sup>-1</sup>	Enricht (% MP vs EB)
EB	906,42	1	4,00	1
MP	2,75	0,30	0,40	10,05

<b>(c) Activité Glucose 6 Phosphate dehydrogenase (plastes)</b>				
Echantillon	AT: nmoles.min <sup>-1</sup>	Rdt (% MP vs EB)	AS: nmoles.min <sup>-1</sup> .mg prot <sup>-1</sup>	Enricht (% MP vs EB)
EB	995,82	1	4,40	1
MP	0,00	0,00	0,00	0,00

En revanche, la vitesse de production de NO partir de nitrite par la COX purifiée de levure est de  $16 \mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg protéines}^{-1}$  ce qui est supérieur à la valeur observée pour les MP de levures (Castello *et al.*, 2006). Il est donc probable que la vitesse de conversion du nitrite en NO par la COX ne soit pas le facteur limitant et que le transport du nitrite à l'intérieur des mitochondries est le principal facteur limitant de la vitesse de production du NO. On peut donc penser que la valeur du  $K_m$  apparent des mitochondries de racines pour le transport du nitrite est proche de la valeur du  $K_m$  réel. Ceci reste bien sûr à démontrer.

La respiration nitrate-NO sert à régénérer l'ATP lors de l'hypoxie (Igamberdiev *et al.*, 2005 ; Stoimenova *et al.*, 2007 ; Igamberdiev et Hill, 2009). Les analyses réalisées sur nodosités entières ont permis de montrer que l'état énergétique des nodosités (rapport ATP/ADP) dépend de l'activité NR et le fonctionnement de la CTE (voir partie 1 des résultats). Il reste maintenant à confirmer que la production d'ATP par les MP anoxiées peut être assurée par la réduction du nitrite *in vitro*, comme cela a été montré sur les MP de riz et d'orge (Stoimenova *et al.*, 2007).

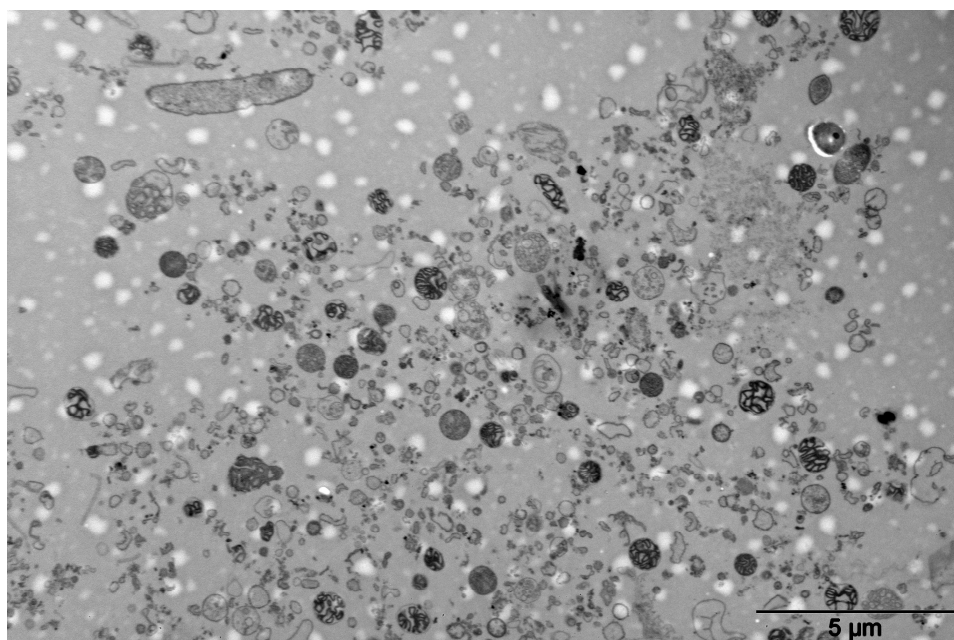
Afin de savoir si le système de transport mitochondrial de nitrite peut être impliqué dans le transport d'autres ions, trois autres ions : le nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ), le chlorure ( $\text{Cl}^-$ ) et le sulfate ( $\text{SO}_4^{2-}$ ), ont été testés en compétition avec le nitrite. Cependant, aucun effet inhibiteur sur la production de NO à partir de nitrite par les mitochondries de racine n'a été observé après l'ajout de 0,5 mM de  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{NaCl}$  ou de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Quoique les expériences aient été réalisées sur des mitochondries purifiées, et non sur des systèmes reconstitués dédiés aux études de transport (i.e., œufs de Xénope), on peut penser que le transport du nitrite n'entre pas en compétition avec celui de ces autres ions et que les mitochondries possèdent peut être un système de transport spécifique pour le nitrite.

### c) Vers une mise au point d'un protocole de purification de mitochondries de nodosités

L'intérêt de purifier des mitochondries de nodosités réside dans la validation des observations de production de NO à partir de nitrite sur le modèle biologique qu'est la nodosité de *M. truncatula*. Plusieurs protocoles ont été testés, mais pour l'instant aucun n'a permis d'obtenir des mitochondries dans un état de purification suffisant pour analyser le transport du nitrite. Dans un premier temps, le protocole d'extraction de MP de racines a été

**Tableau 14** : Activités spécifiques des marqueurs subcellulaires de mitochondries, dans l'extrait brut (EB) et dans les mitochondries purifiées (MP) de nodosités de *Medicago truncatula*. Le gradient de Percoll utilisé est un gradient discontinu (de bas en haut) : 45 – 21 – 13 % (v/v). Les mitochondries sont retrouvées dans la fraction du bas du tube. AT : activité totale, AS : activité spécifique, prot : protéines, Vtot : volume total, Rdt : rendement, Enricht : enrichissement.

Echantillon	Activité fumarase (mitochondries)				
	AT: nmoles.min <sup>-1</sup>	Rdt (% MP vs EB)	AS: nmoles.min <sup>-1</sup> .mg prot <sup>-1</sup>	Enricht (% MP vs EB)	Fraction de Percoll (%)
EB	1475,41	1	1,47	1	-
1	13,11	0,89	3,84	262	45
2	47,54	3,22	23,65	1614	45-21
3	0,00	0,00	0,00	0	21
4	0,00	0,00	0,00	0	21-13
5	0,00	0,00	0,00	0	13



**Figure 37** : Observation en microscopie électronique à transmission (MET) des mitochondries purifiées extraites de nodosités de *Medicago truncatula* sur gradient discontinu de Percoll 13 – 21 – 45 % (v/v). Barre : 5  $\mu$ m.

utilisé mais les mitochondries de nodosités n'avaient pas la même densité que les mitochondries de racines et se retrouvaient donc plus haut dans le gradient de Percoll, mélangées au peroxyosomes. Plusieurs concentrations de gradient continu de Percoll ont alors été testées (20, 25, 28 et 30 %) pour tenter d'obtenir, comme pour les mitochondries de racines, une configuration avec les mitochondries au fond du gradient. La purification sur gradient de Percoll continu à 25 % (v/v) a permis d'obtenir des activités enzymatiques marqueurs des contaminants peroxyosomaux acceptables (Tableau 13). Aucune contamination par les plastes n'a été détectée. L'activité NR a servi de marqueur pour les bactéroïdes dans la mesure où, comme pour la purification des mitochondries de racines, la fraction cytoplasmique n'est pas contaminante. Aucune activité NR n'a été détectée. En revanche, l'observation microscopique en MET a révélé environ 50 % de contamination des MP par les bactéroïdes. Il s'avère que le dosage de la NR n'est pas assez sensible comme méthode d'évaluation de la contamination bactéroïdienne.

Une amélioration du protocole est envisagée par l'utilisation d'un gradient discontinu 13 – 21 – 45 % (v/v) de Percoll, comme cela a été utilisé pour la purification de nodosités de soja (Puppo *et al.*, 1987). L'activité fumarase, marqueur des mitochondries, a été détectée à l'interphase 21 – 45 % (Tableau 14). Pour évaluer la contamination par les bactéroïdes, les racines de *M. truncatula* ont été inoculées avec une souche de *S. meliloti* qui exprime de manière stable la protéine GFP ("Green Fluorescent Protein") en plante (souche de collection UNA 371), mais aucune fluorescence GFP n'a été observée en microscopie à fluorescence, alors que les mitochondries sont visibles en fluorescence rouge marquées par le Mitotracker Red. En revanche, les observations en MET ont révélées encore une fois des contaminations importantes par les bactéroïdes et d'autres contaminants non identifiés (Figure 37).

Au bilan nous n'avons pas encore réussi à mettre au point un protocole d'extraction de MP permettant d'obtenir des mitochondries pures. La contamination par les bactéroïdes est gênante pour l'observation de la production de NO à partir des MP car les bactéroïdes sont capables de produire du NO en anoxie par la voie de dénitrification (Zumft, 1999). Les bactéroïdes sont plus lourds que les mitochondries et ils sont retrouvés plus bas dans le gradient de densité (Puppo *et al.*, 1987). Des adaptations sont donc encore nécessaires (nature et concentration en osmoticum, pourcentage de Percoll) pour trouver le bon compromis qui permettra de séparer les bactéroïdes des mitochondries.



## **Résultats**

### **Partie 3 : Identification et caractérisation de systèmes de transport du nitrite.**



## A-Introduction

Le fonctionnement de la respiration nitrate-NO permet de maintenir le statut énergétique et le fonctionnement métabolique de la cellule en situation d'hypoxie (Igamberdiev *et al.*, 2011; Gupta et Igamberdiev, 2011). Dans la première partie de ces travaux de thèse, nous avons montré l'existence probable de la respiration nitrate-NO dans les nodosités fixatrices et mis en évidence le rôle clé de la NR dans la production de NO et la régénération de l'énergie nécessaire aux processus de réduction et d'assimilation de l'azote. Dans la seconde partie de ce travail, nous avons purifié des mitochondries de racines de *M. truncatula* et caractérisé la production de NO par les mitochondries, en présence de nitrite et de pouvoir réducteur. Cette production implique que le nitrite est transporté dans les mitochondries, puis réduit en NO par le fonctionnement de la CTE. L'objectif de cette troisième partie a donc été d'identifier un ou plusieurs systèmes capables de transporter le nitrite à travers la membrane interne des mitochondries.

Peu de données sont disponibles sur les transporteurs de nitrite (NiTR) chez les végétaux. En revanche, les systèmes de transport du nitrite sont assez bien caractérisés chez les bactéries (Moir et Wood, 2001). Ils sont en général bi-spécifiques "nitrate/nitrite" et appartiennent à la famille NARK (Moir et Wood, 2001). Chez les eucaryotes, les transporteurs de nitrate (NRT) sont rattachés à deux familles distinctes, NRT1 et NRT2 (Galván et Fernández, 2001). Les transporteurs de type NRT1 appartiennent à la famille protéique des transporteurs d'oligopeptides protons-dépendants (POT ou PTR). Les transporteurs de type NRT2 sont de la famille des perméases nitrate/nitrite ("nitrate/nitrite porters", NNP), qui correspond à la famille 8 de la superfamille des facilitateurs ("Major Facilitator Superfamily", MFS), (Pao *et al.*, 1998). De manière générale, les transporteurs de type NRT1 sont plutôt des transporteurs à faible affinité de substrat, alors que les transporteurs de type NRT2 ont plutôt une forte affinité pour leur substrat. Il existe une autre famille, appelée NRT3, dont les membres ne sont pas eux-mêmes des transporteurs, mais qui ont un rôle dans la régulation de l'activité de transport de haute affinité des NRT2 (Okamoto *et al.*, 2006).

Chez l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii*, plusieurs systèmes de transports bi-spécifiques "nitrate/nitrite" ont été caractérisés au niveau de la membrane plasmique (PM), (Galván et Fernández, 2001), et un transporteur spécifique du nitrite, CrNAR1.1, a été identifié au niveau des chloroplastes (Rexach *et al.*, 2000). En revanche, un seul NiTR a été



identifié chez les végétaux supérieurs : il s'agit du transporteur chloroplastique CsNiTR1, de type NRT1, chez le concombre (*Cucumis sativus*), (Sugiura *et al.*, 2007). Le gène *CsNitr1* est transcrit sous deux isoformes -L et -S (Sugiura *et al.*, 2007). La protéine correspondant à la première isoforme est localisée sur la membrane interne des chloroplastes et présente une activité d'import du nitrite. La protéine correspondant à la seconde isoforme est adressée à la PM et présente plutôt une activité d'export du nitrite hors de la cellule.

Les systèmes de transport du nitrite connus chez les plantes appartiennent donc aux mêmes familles protéiques que les transporteurs de nitrate. Par ailleurs, il a été montré que les canaux à chlorure (ClC) sont capables, dans certains cas, de transporter le nitrate (De Angeli *et al.*, 2007).

Afin d'identifier les NiTRs ou ClC responsables du transport du nitrite mitochondrial chez *M. truncatula*, deux stratégies ont été employées. Premièrement, une recherche *in silico* a été conduite, visant à identifier dans le génome de *M. truncatula* des gènes de type NRT, ou ClC, exprimés dans les racines et les nodosités, et dont la protéine prédite est potentiellement adressés aux mitochondries. D'autre part, dans le but d'identifier des candidats par une approche de protéomique, une analyse par spectrométrie de masse (MS) des protéines présentes sur les membranes de mitochondries a été réalisée. Le chapitre qui suit présente les résultats obtenus et les pistes d'investigation actuellement en cours.

## **B-Résultats et discussion**

### **a) Recherche *in silico* de gènes codant pour des systèmes de transport du nitrite au niveau de la mitochondrie**

Pour débiter la recherche de gènes candidats codant pour des transporteurs de nitrite, nous nous sommes appuyés sur une étude récente de l'équipe de MK Udvardy (Benedito *et al.* 2010), dans laquelle les auteurs ont dressé un inventaire de l'ensemble des gènes pouvant coder pour des protéines de transport dans le génome de *M. truncatula* (version 2.0 d'IMGAG, "International Medicago Genome Annotation Group"). La fonction de "transport" associée à l'ensemble des gènes répertoriés dans leur inventaire a été validée sur la base de plusieurs critères : (i) la présence de domaines transmembranaires dans la séquence

**Tableau 15 :** Analyse génomique des transporteurs membranaires de *Medicago truncatula*.  
<sup>a</sup>IMGAG : "International Medicago Genome Annotation Group", <sup>b</sup>MTGI : "Medicago truncatula Gene Index", <sup>c</sup>nombre de gènes non redondants, <sup>d</sup>TMD : protéines avec des domaines transmembranaires identifiées avec au moins un algorithme, TCDB : "Transporter Classification Data Base". Tiré de Benedito *et al.*, 2010.

	IMGAG <sup>a</sup> v.2	MTGI <sup>b</sup> v.8	Total <sup>c</sup>
Nombre de séquences	38 335	36 850	60 823
Protéines avec TMD <sup>d</sup>	18 684	-	-
Protéines avec des homologues dans TCDB	2 039	2 051	3 830
Protéines classées comme transporteurs	1 681	1 759	2 673

**Tableau 16 :** Les 30 plus abondantes familles de transporteurs chez *Medicago truncatula*.  
Tiré de Benedito *et al.*, 2010.

Numéro TCDB	Nom de la famille	Gènes	Transcrits	Séquences non	Sonde
		IMGAG	MTGI	redondantes	Affymetrix
1.A.1	Voltage-gated Ion Channel (VIC) Superfamily	33	13	33	23
1.A.4	Transient Receptor Potential Ca <sup>2+</sup> Channel (TRP-CC)	73	65	116	113
1.A.8	Major Intrinsic Protein (MIP)	32	53	64	72
1.A.20	gp91phox Phagocyte NADPH Oxidase-associated Cytochrome b558 H <sup>+</sup> channel (C <sub>y</sub> )	15	34	34	43
1.A.31	Annexin (Annexin)	19	14	25	22
1.C.45	Plant Defensin (PD)	9	14	21	20
2.A.1	Major Facilitator Superfamily (MFS)	110	116	175	163
2.A.3	Amino Acid-Polyamine-Organocation (APC)	8	27	29	33
2.A.5	Zinc (Zn <sup>2+</sup> )-Iron (Fe <sup>2+</sup> ) Permease (ZIP)	11	15	19	23
2.A.6	Resistance-Nodulation-Cell Division (RND) Superfamily	13	18	23	27
2.A.7	Drug/Metabolite Transporter (DMT) Superfamily	119	93	168	159
2.A.17	H <sup>+</sup> -dependent Oligopeptide Transporter (POT)	71	79	111	101
2.A.18	Amino Acid/Auxin Permease (AAP)	57	61	96	87
2.A.19	Ca <sup>2+</sup> :Cation Antiporter (CaCA)	11	14	18	26
2.A.29	Mitochondrial Carrier (MC)	91	86	134	119
2.A.37	Monovalent Cation-Proton Antiporter-2 (CPA2)	29	6	30	29
2.A.40	Nucleobase:Cation Symporter-2 (NCS2)	10	14	19	18
2.A.49	Chloride Channel (CIC)	26	14	32	38
2.A.53	Sulfate Permease (SuIP)	12	29	33	34
2.A.66	Multidrug/Oligosaccharidyl-lipid/Polysaccharide (MOP) Flippase Superfamily	53	48	73	79
2.A.67	Oligopeptide Transporter (OPT)	23	17	30	26
2.A.69	Auxin Efflux Carrier (AEC)	22	9	27	23
2.A.72	K <sup>+</sup> Uptake Permease (KUP)	15	22	30	25
3.A.1	ATP-binding Cassette (ABC) Superfamily	160	160	254	219
3.A.2	H <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> -translocating F-, V- and A-type ATPase (F-ATPase) Superfamily	34	49	64	77
3.A.3	P-type ATPase (P-ATPase) Superfamily	37	71	85	84
3.A.5	General Secretory Pathway (Sec)	63	82	108	114
3.A.8	Mitochondrial Protein Translocase (MPT)	11	26	30	34
3.A.9	Chloroplast Envelope Protein Translocase (CEPT or Tic-Toc)	40	51	73	75
3.A.16	Endoplasmic Reticular Retrotranslocon (ER-RT)	72	67	109	114

des protéines, à l'aide des algorithmes HMMTOP 2.0 (Tusnady et Simon, 2001), TMPred (Hoffman et Stoffel, 1993), et SOSUI (Hirokawa *et al.*, 1998) ; (ii) la comparaison avec les séquences contenues dans la base de données des transporteurs "Transporter Classification Database" (TCDB) (Saier *et al.*, 2006) ; et (iii) la comparaison aux banques de données protéiques telles que "Swiss-Prot database" (Boeckmann *et al.*, 2003) et "Non-Redundant NCBI GenBank" (Benson *et al.*, 2008).

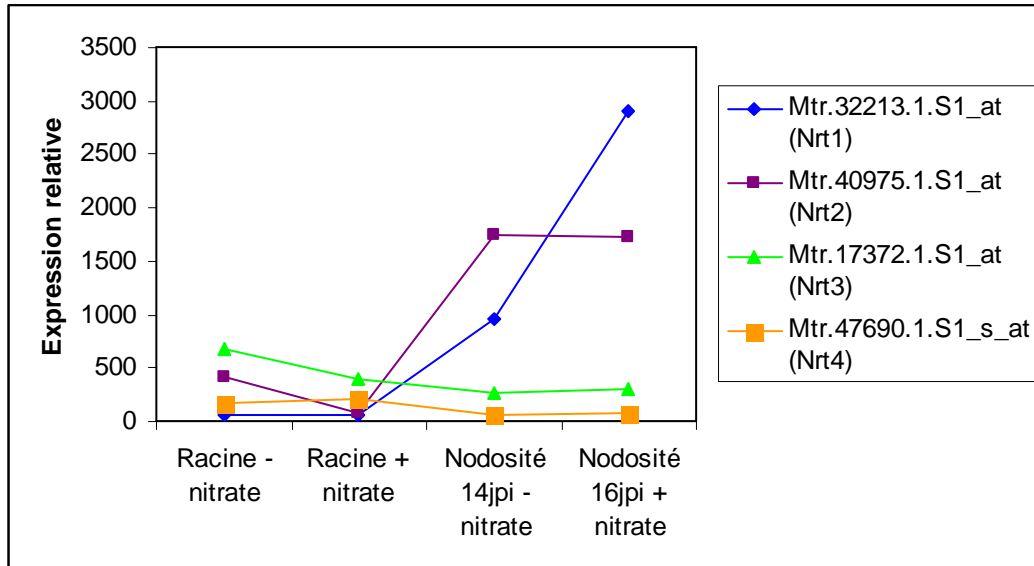
De cet inventaire, sont ressortis 2 673 transporteurs membranaires putatifs (Tableau 15), parmi lesquels 71 transporteurs de nitrate et/ou nitrite appartenant à la famille des POT, 26 transporteurs de type CIC, et une centaine de séquences d'EST ("Expressed Sequenced Tag"), assignés ou non, codant potentiellement pour des transporteurs de nitrate/nitrite, soit 143 séquences non redondantes de candidats potentiels (Tableau 16). Pour ces transporteurs putatifs, nous avons vérifié l'annotation automatique des séquences grâce à l'utilisation d'algorithmes identifiant les domaines protéiques tels que Pfam et InterPro (voir Matériel et Méthodes).

A partir de ce inventaire, nous avons cherché à sélectionner les gènes codants pour des transporteurs de nitrite mitochondriaux, en réalisant une analyse approfondie (i) de l'adressage sub-cellulaire, et (ii) du profil d'expression de chacun de ces gènes.

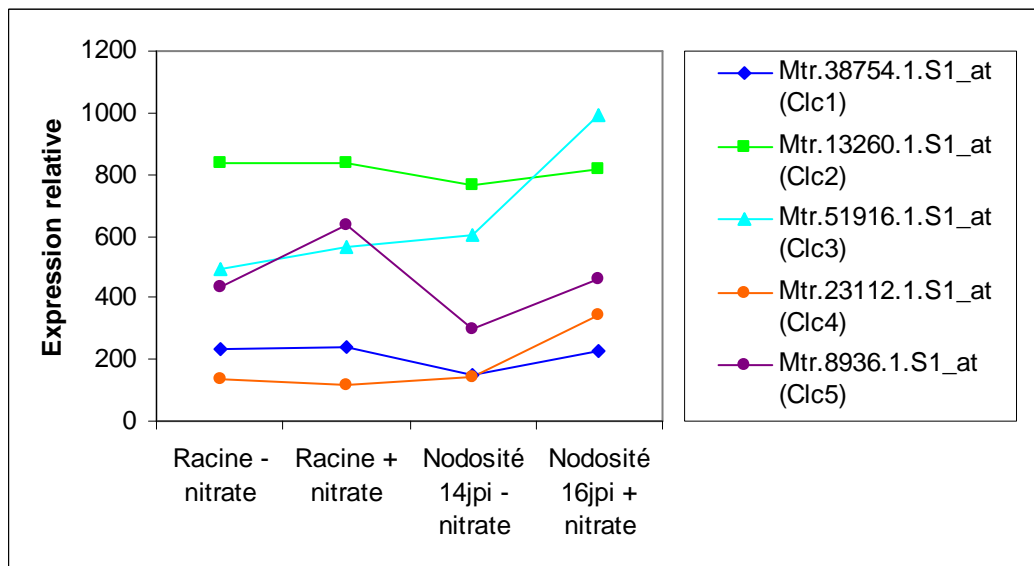
Ainsi, les prédictions d'adressage issues des travaux de Benedito *et al.* (2010), à l'aide des programmes TargetP (Emanuelsson *et al.*, 2000) et Wolf-PSort (Horton *et al.*, 2006), ont été complétées par des analyses avec des programmes de type Predotar (Small *et al.*, 2004), SLP Local (Matsuda *et al.*, 2005), MITOPRED (Guda *et al.*, 2004), MitoProt\_v2 (Claros et Vincens, 1996). Cette analyse complémentaire a été croisée avec les informations disponibles pour chaque séquence. Cela permet de donner plus de poids à la prédiction de l'adressage sub-cellulaire, lorsqu'elle est confirmée par plusieurs programmes, ou cela montre que les données sont à prendre avec précaution lorsque plusieurs programmes sont en contradiction.

Plusieurs données sont disponibles concernant le profil d'expression des gènes candidats. Lors de la réalisation de l'inventaire des transporteurs putatifs membranaires, Benedito *et al.* (2010) ont recherché les références de sondes de puces d'expression "Affymetrix Medicago GeneChip" (Benedito *et al.*, 2008) et également les EST correspondants (Medicago truncatula Gene Index – MTGI, version 8.0). Pour la majorité des gènes candidats retenus, des informations sur le profil d'expression provenant de résultats des puces d'expression sont disponibles via le site web du "Medicago truncatula Gene Expression Atlas". Ainsi, sur la base du profil d'expression, nous avons cherché à sélectionner des gènes

A.



B.



**Figure 38** : Profil d'expression de transporteurs putatifs de nitrite de type (A) transporteur de nitrate (NRT) et (B) canaux à chlorures (CIC), dans les racines et les nodosités de *Medicago truncatula* en présence ou absence de nitrate. Les données proviennent des puces d'expression de *M. truncatula* "Affymetrix Medicago GeneChip", <http://bioinfo.noble.org/gene-atlas/v2> (Benedito *et al.*, 2008).



candidats préférentiellement exprimés dans les racines et les nodosités. Par ailleurs, nous avons également pris en compte l'absence de répression des gènes candidats par le nitrate, dans la mesure où le nitrate est nécessaire au bon fonctionnement de la respiration nitrate-NO. Des exemples de profils intéressants sont montrés dans la Figure 38.

D'autre part, des informations complémentaires peuvent être apportées par une étude transcriptomique sur des racines de *M. truncatula*, traitées avec des donneurs de NO lors de la symbiose rhizobienne (Ferrarini *et al.*, 2008). Cette étude a permis d'identifier des gènes dont l'expression est régulée par le NO. Ces données peuvent apporter des informations supplémentaires sur le mode de régulation de l'expression des gènes candidats. En effet, le NO étant le produit de la réduction du nitrite par la COX en situation d'hypoxie, il est envisageable que l'augmentation de la teneur en NO agisse comme modulateur de l'expression du transporteur de nitrite. Cependant, parmi les gènes identifiés dans cette étude comme étant régulés par le NO, aucun ne correspond à un transporteur de nitrate/nitrite.

Récemment, une étude transcriptomique a été réalisée au laboratoire (Boscari *et al.*, 2012) en utilisant un piègeur de NO, le cPTIO, dans les premiers stades de l'interaction symbiotique (quatre jours après inoculation). L'objectif de cette étude était d'identifier l'ensemble des gènes régulés par le NO à ce stade de l'interaction. Bien que certains gènes codant pour des transporteurs de nitrate/nitrite soient régulés par le NO dans les racines, aucun d'entre eux n'a été retenu car leur niveau d'expression était trop faible ou inexistant dans les racines et/ou les nodosités.

La respiration nitrate-NO est supposée fonctionner dans les tissus microoxiés des nodosités, c'est-à-dire dans les zones II et surtout III. Aucune analyse transcriptomique n'a été réalisée sur la zone III. En revanche des données sont disponibles sur la zone II des nodosités, qui est une zone qui se prépare à recevoir les bactéries et qui est le siège de nombreuses modifications dans le métabolisme (Damiani *et al.*, 2012). Cette étude a montré qu'une seule EST (TC111556), codant pour un transporteur de nitrate/nitrite potentiel était induit en zone II (Damiani *et al.*, 2012). Cependant, cette EST ne répondait pas aux autres critères de sélection, dans la mesure où son expression est réprimée par le traitement nitrate dans les données de puces Affymetrix et où il n'est pas possible de déterminer l'adressage sub-cellulaire, car l'EST n'est pas en pleine taille.

Une autre piste était de comparer les protéines identifiées dans des études de protéomes mitochondriaux chez les végétaux avec les transporteurs putatifs de notre analyse.

**Tableau 17** : Liste des gènes candidats pour le transport du nitrite mitochondrial retenus sur la base de leur annotation après analyse *in silico*. IMGAG : "International Medicago Genome Annotation Group", TCDB : "Transporter Classification Database", TM : trans-membranaire, *A.th* : *Arabidopsis thaliana*, POT/PTR : "Proton-dependent Oligopeptide Transporter", EST: "Expressed Sequenced Tag", MTGI: "*Medicago truncatula* Gene Index". \* donnée issue de Benedito *et al.*, 2010.

IMGAG v2	Annotation	Prediction domaines TM (HMMTOP)	Meilleur score TCDB*	Famille protéique*	Meilleur hit SwissProt*	Sonde Affymetrix Medicago GeneChip*	EST (MTGI)*	Prediction adressage mitochondrial <i>in silico</i>
<i>AC173291_13.5</i> ( <i>Nrt1</i> )	Recepteur TGF-beta	11	P46032 PTR2-B (transporteur histidine)_ <i>A.th</i>	POT	P46032 PTR2_ <i>A.th</i>	Mtr.32213.1.S1_at	AL377378, TC99508, AW684979	Wolf, Mitopred, Mitoprot2
<i>CU302332_3.3</i> ( <i>Nrt2</i> )	Recepteur TGF-beta	10	P46032 PTR2-B (transporteur histidine)_ <i>A.th</i>	POT	P46032 PTR2_ <i>A.th</i>	Mtr.40975.1.S1_at	TC108457	SLP local, Mitopred
<i>AC141109_43.5</i> ( <i>Nrt3</i> )	Recepteur TGF-beta	12	P46032 PTR2-B (transporteur histidine)_ <i>A.th</i>	POT	P46032 PTR2_ <i>A.th</i>	Mtr.17372.1.S1_at	-	SLP local, Target P, Mitopred, Mitoprot2
<i>AC148406_22.5</i> ( <i>Nrt4</i> )	Recepteur TGF-beta	12	P46032 PTR2-B (transporteur histidine)_ <i>A.th</i>	POT	P46032 PTR2_ <i>A.th</i>	Mtr.47690.1.S1_s_at	TC109517, TC96773	SLP local, Mitopred, Mitoprot2, Wolf
<i>CT009656_10.5</i> ( <i>Cic1</i> )	CBS; CIC-	10	Q9GKE7 CIC extérieure_ <i>Sus scrofa</i> (Cochon)	CIC	Q8GX93 CICe_ <i>A.th</i>	Mtr.38754.1.S1_at	AW688836, TC103461	Mitoprot2
<i>AC144657_5.5</i> ( <i>Cic4</i> )	CBS; CIC-	12	Q9XF71 CIC-NT2_ <i>Nicotiana tabacum</i>	CIC	P60300 CICg_ <i>A.th</i>	Mtr.23112.1.S1_at	CX549773	SLP local, Target P, Mitopred

```

>lcl|46521 CsNirt1
Length=603

Score = 771 bits (1991), Expect = 0.0, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 367/542 (68%), Positives = 452/542 (83%), Gaps = 20/542 (4%)

Query 1  MPLVAASNTLTFNGGTSSFTPLIGALLADSFAGRFWTITVGCGLIYELGLISITVSTILPH 60
Sbjct 73  MPLV ASN LTNF TSSFT LIGAL+ADSFAGRFWTIT+ +IYELG+++IT+S ILP
MPLVPASNILTMFAATSSFTSLIGALIADSFAGRFWTITIASIYELGHWITTSAILPS 132

Query 61  FRPPCPTQVWCKEATSSQLLPLYMSLLTSLGSGGIRPCVVPFSADQFDHTKEGVA SRK 120
Sbjct 133  LHPPCPTQINCTQASGTQLMILYLALLTSLGAGGIRPCVVAADQFDHTKVGIA GRT 192

Query 121  WNLFNWYFPIMGFASLSALTYVYVQDNVGVGWLGIPTIAMMISVIFVLGSPLYKTYK 180
Sbjct 193  WNFNFWYFCMGMATLTALTVVVYIQDNVGVGWFGLPTIAMALSVVAFVVGSPLYNKLK 252

Query 181  PEGSPLVRLAQVVVAAVKRRKETLPDDPKFLYHNRELDAAISLEGSLHNSNOYKWLDKAA 240
Sbjct 253  P GSPVRLAQVVVAA K RK LPDD K LY N ELDAAI+++G L+H++Q+KWLDKAA
PSGSPLVRLAQVVVAAFKMRKAVLPDDSKLLYRNHELDAAIAIQGRVHVDQFKWLDKAA 312

Query 241  IITEEEAKDSNA-PPNLWMLVTVHRVEELKAIIRMLPIWASGILLIMSSHLG SFVIQQA 299
Sbjct 313  VIT---SPDSTANPPNLWRLATVHRVEELKSIIRMLPIWAAAGILLVTASSHQHSFTIQQA 369

Query 300  RSMDRHLTHSFQIAPANMSIFGLVLTMMIGVMLYERFFVFPFARRFTKNPAGITCLQRMGVG 359
Sbjct 370  R+M+RHLT +FQI PA +SIFG+L+M+ G++LY+R VPFA++ T NP+GITCLQRMGVG
RTMNRHLTPTFQIPATLSIFGLSMLTGLVLDRLVLPFAKKLTHNPSGITCLQRMGVG 429

Query 360  FVWNIATIVSALVETKRTVAAKFNLLDDPKAIIPEVSVFVLPVQYCLHGVAEVFMSVGH 419
Sbjct 430  F +NI+AT+V3+VE KKK AA LLD+P A IPEVSVFVLPVQ+ LHG+AEVFMVSVGH
FAINLATLVSSIVEIKRKK-AAHGLLDNPTATIPFSVFMVLPVQFVHGIAEVFMVSVGH 488

Query 420  LEFLDQSPESMRSSATALYCIITTAIGNYSGTLVSVVHKYTGKKNWLPDRNLNRGRLD 479
Sbjct 489  LEF+DQSPES+RS+ATALY + ++GNY GTL+V +VHKYTG+E+NWLPDRNLNRGRLD+
LEFMYDQSPESLRSTATALYVLAISVGNVIGTLMVYLVHKYTGEEHNWLPDRNLNRGRLE 548

Query 480  YYYLISGLIQVINLIYYIWCWAFYTYKPMGEVCERSKEEDELEQASANIS IENLKD GKEEE 539
Sbjct 549  YYYLWVSGIQVMNLVYYIWCWAFYTYKPLEE-----EKINIEN-KDGDQEW 593

Query 540  KK 541
Sbjct 594  ++
ER 595

```

**Figure 39** : Alignement de séquences protéiques sur NCBI BLAST entre (A) CsNiTR1 (Sbjct) et MtNRT1 (Query).

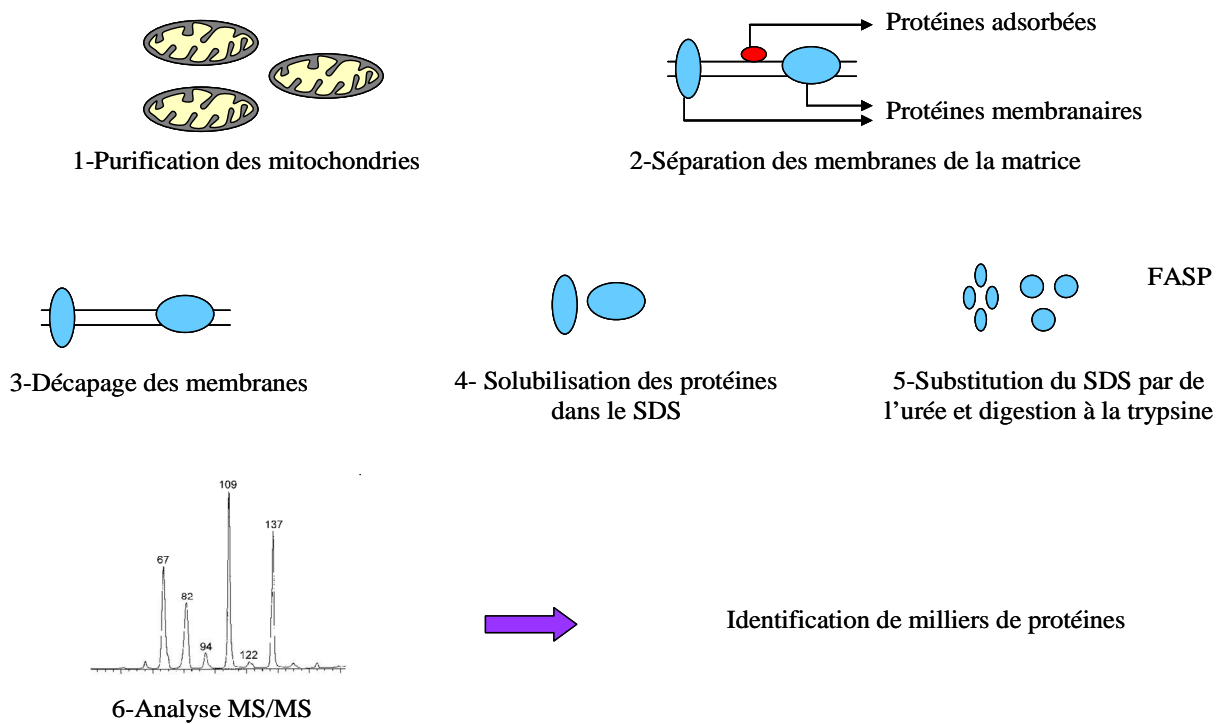
L'identification de protéines mitochondriales a été réalisée dans plusieurs études chez *A. thaliana* (Brugière *et al.*, 2004 ; Heazlewood *et al.*, 2004) et *O. sativa* (Heazlewood *et al.*, 2003 ; Huang *et al.*, 2009). Cependant, parmi les protéines de transport mitochondriales identifiées, aucune ne correspondait à un membre de la famille NRT ou CIC.

Peu de transporteurs du nitrite ont été identifiés et caractérisés chez les végétaux. Cependant, il est possible de retrouver par Blast, l'orthologue d'une protéine provenant d'une autre plante chez *M. truncatula*. Ainsi, CsNiTR1 de *Cucumis sativus* (Sugiura *et al.*, 2007) est responsable de l'import du nitrite dans les chloroplastes. Un des nombreux systèmes de transport identifiés comme transporteurs de nitrite potentiels dans la liste dressée par Benedito *et al.* (2010) s'est avéré être l'orthologue de CsNiTR1 chez *M. truncatula* (Blast réciproque). La fonction de transporteur de nitrite est donc probable pour ce candidat.

D'autres transporteurs tels que GmN70 et LjN70 chez le soja (Vincill *et al.*, 2005) et le lotier (Szczyglowski *et al.*, 1998), respectivement, sont capables de transporter les anions, dont le nitrite. Ces transporteurs sont localisés au niveau de la membrane du symbiosome (MPB). Certaines séquences sont proches chez *M. truncatula*, mais aucune ne correspond à l'orthologue de GmN70/LjN70 dans la version actuelle du séquençage de *M. truncatula*.

Enfin, chez l'algue verte *C. reinhardtii*, en plus des systèmes de transport de nitrate/nitrite présents au niveau de la membrane plasmique (Galván *et al.*, 1996, Rexach *et al.*, 1999), il a été montré que le transporteur NAR1 (Rexach *et al.*, 2000) est responsable de l'import de nitrite dans le chloroplaste (Galván *et al.*, 2002). Néanmoins, l'algue unicellulaire étant éloigné phylogénétiquement des plantes supérieures, aucune séquence correspondant à *Nar1* n'a été trouvée chez *M. truncatula*, ni chez d'autres plantes.

Au bilan, sur 143 gènes candidats au départ, nous en avons sélectionné 6 dont le profil d'expression (dans les racines et les nodosités, absence de répression par le nitrate) et l'adressage subcellulaire de la protéine prédite (prédiction d'adressage aux mitochondries par le plus grand nombre de programmes de localisation sub-cellulaire possible) nous permettaient de les considérer comme de bons candidats pour un transport de nitrite mitochondrial. Les candidats (Tableau 17), dont quatre gènes de type *Nrt* : *AC173291\_13.5* (*Nrt1*), *CU302332\_3.3* (*Nrt2*), *AC141109\_43.5* (*Nrt3*) et *AC148406\_22.5* (*Nrt4*), (version 2.0 IMGAG) et dont deux de type *Clc* : *CT009656\_10.5* (*Clc1*) et *AC144657\_5.5* (*Clc4*), (version 2.0 IMGAG), ont été retenus pour la suite de notre travail. Le candidat appelé *Nrt1* est particulièrement ressorti puisqu'il est l'orthologue de *CsNitr1*, le transporteur chloroplastique de nitrite du concombre (*C. sativus*), (Sugiura *et al.*, 2007), avec 83 % de similarité (figure 39).



**Figure 40** : Préparation de membranes de mitochondries décapées par la méthode de Santoni *et al.* (2003) pour la spectrométrie de masse à l'aide de la technique FASP ("Filter Aided Sample Preparation") décrite par Wisniewski *et al.* (2009).

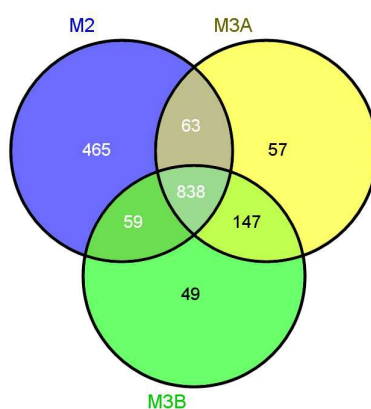
## b) Analyse par spectrométrie de masse de systèmes des protéines membranaires mitochondriales

La seconde stratégie employée pour rechercher des transporteurs de nitrite mitochondriaux a consisté à préparer des membranes de mitochondries purifiées, puis à analyser les protéines par spectrométrie de masse (MS). Jusqu'à présent aucune étude protéomique de mitochondries végétales n'a permis d'identifier des transporteurs des familles NRT ou CIC. Quelques centaines de protéines au maximum ont été identifiées par spectrométrie de masse (MS), alors que le nombre de protéines mitochondriales est estimé à 2000-3000 (Millar *et al.*, 2005). Chez *A. thaliana*, 416 protéines mitochondriales ont été identifiées par Heazlewood *et al.* (2004), et seulement 114 dans l'analyse de Brugière *et al.* (2004). Chez le riz (*O. sativa*), 149 et 322 protéines mitochondriales ont été identifiées respectivement par Heazlewood *et al.* (2003) et par Huang *et al.* (2009). Chez *M. truncatula*, une étude du protéome mitochondrial a été menée, conduisant à l'identification de 176 protéines dont la plupart sont des protéines du cycle de Krebs et des différents complexes de la CTE (Dubinin *et al.*, 2011). Encore une fois, aucun transporteur de type NRT ou CIC n'a été mis en évidence dans cette étude d'où la nécessité de trouver une méthode d'analyse mieux adaptée aux protéines membranaires. Une des limitations des techniques utilisées est la perte d'une grande partie des protéines membranaires lors de la préparation de l'échantillon en vue de la MS. En effet, les protéines membranaires sont difficiles à solubiliser et la plupart des méthodes classiques de séparation des protéines sur gel d'acrylamide dénaturants ne sont pas adaptées pour ces protéines dans la mesure où le SDS empêche l'analyse des protéines en MS. Par ailleurs, les protéines les plus petites (< 5-15 kDa) et les plus grosses (> 100-200 kDa) sont exclues des gels (Heazlewood *et al.*, 2003 ; Dubinin *et al.*, 2011).

Ces difficultés ont été contournées par l'utilisation d'une nouvelle technique : le FASP pour "Filter Aided Sample Preparation", (Figure 40) développée par Wisniewski *et al.* (2009). Brièvement, le principe de cette méthode est le suivant: les protéines sont solubilisées dans le SDS, qui est le meilleur détergent pour solubiliser les protéines membranaires, mais qui n'est pas compatible avec une analyse MS. Puis, le SDS est substitué par de l'urée grâce à une unité de filtration de type Amicon, avec une membrane verticale de 30 kDa de cut-off. On estime que les protéines recherchées sont de l'ordre de 60 kDa car l'analyse *in silico* a montré que les protéines classées comme transporteurs avec 12 domaines TM ont une taille de minimum 500-600 acides aminés. Après remplacement du SDS par l'urée, les protéines sont

**Tableau 18** : Répartition fonctionnelle des protéines identifiées à partir de membranes de mitochondries purifiées de *Medicago truncatula* par spectrométrie de masse (MS) en pourcentage du total. Toutes les protéines détectées n'ont pas une fonction assignée car certaines ne sont pas retrouvées dans le génome de *M. truncatula* v3.5 par le logiciel Mapman utilisé (Thimm *et al.*, 2004). La proportion de protéines assignées/détectée est indiqué dans la ligne du total. M1 : analyse de MS 1 sur membranes non décapées ; M2 : analyse de MS 2 sur membranes décapées ; M3A et M3B: analyses de MS 3 sur membranes décapées, injections 1 et 2; CTE : chaîne de transfert des électrons.

	M1 (%)	M2 (%)	M3A (%)	M3B (%)	Protéines communes aux 4 (%)
Métabolisme	18,58	20,37	16,71	17,00	21,61
Processus liés aux protéines	25,04	20,77	22,85	23,19	23,22
Fonction inconnue	17,45	20,16	20,10	19,24	17,01
CTE mitochondriale/synthèse ATP	7,59	5,09	6,14	6,32	9,20
Transport	6,14	7,03	7,31	7,51	7,59
Stress, redox et signalisation	7,59	9,16	10,18	9,88	7,82
Processus liés à l'ARN	5,01	3,46	2,48	2,64	2,53
Processus liés à l'ADN	2,58	2,24	2,61	3,16	1,84
Autres	10,02	11,71	11,62	11,07	9,20
<b>Total</b>	619/872	982/1425	766/1105	759/1093	435/614



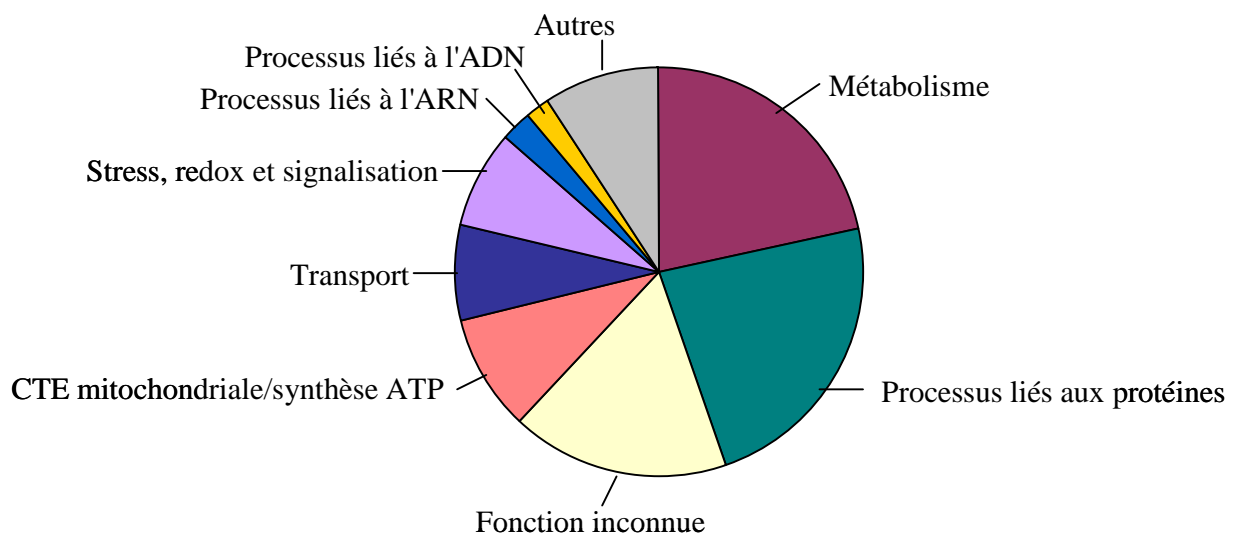
**Figure 41** : Quantification des protéines membranaires mitochondriales de *M. truncatula* identifiées dans les trois répétitions d'analyse par spectrométrie de masse (MS) sur membranes décapées. Le diagramme de Venny quantifie les protéines communes aux trois expériences. M2 : analyse de MS 2 ; M3A : analyse de MS 3, injection 1 ; M3B : analyse de MS 3, injection 2.

réduites, puis alkylées, et digérées à la trypsine. Après élution des peptides de l'Amicon, la préparation est dessalée sur colonne d'interactions hydrophobes. Les peptides sont ensuite séparés par chromatographie d'échange de cations avant d'être analysés par MS/MS. Les analyses par MS ont été réalisées par Sonia Hem et Valérie Rofidal (Laboratoire de Protéomique Fonctionnelle, INRA de Montpellier en collaboration avec Michel Rossignol) et par Jean-Marie Guigonis (Plateforme Bernard Rossi CEA TIRO, Institut Pasteur de Nice).

Les mitochondries utilisées pour ces analyses ont été purifiées à partir de racines de *M. truncatula*. Après la séparation de la fraction membranaire de la matrice, les membranes peuvent être décapées par un traitement salin dans le but d'éliminer au mieux les protéines adsorbées (Figure 40, Santoni *et al.*, 2003). Dans le cadre de ce travail, trois campagnes d'analyses par MS ont été réalisées, la première (M1) sur des membranes non décapées et les deux suivantes (M2 et M3) sur des membranes décapées. La troisième expérience a été réalisée en duplicata technique (M3A et M3B), par conséquent, trois réplicas ont été effectués pour les échantillons de membranes décapées. Lors de l'étape de décapage, on considère que les pertes de protéines sont de l'ordre de 50 %. Les quantités de protéines mitochondriales de chaque échantillon (après préparation de la fraction membranaire et avant préparation pour les analyses en MS) étaient de 7,5 mg pour M1, 1,5 mg pour M2 (après décapage) et 8,5 mg pour M3 (après décapage).

Les protéines considérées sont celles dont le score MASCOT d'identification est supérieur ou égal à 60. L'analyse réalisée sur un échantillon de membrane non décapée, M1, a permis d'identifier 872 protéines différentes (Tableau 18). Sur les trois analyses réalisées avec des membranes décapées, 1 425 protéines ont été identifiées dans l'expérience M2, 1 105 dans l'expérience M3A, et 1 093 dans l'expérience M3B (Figure 41). Sur un total de 1 678 protéines différentes identifiées à partir de membranes décapées, 838 (la moitié) ont été retrouvées dans les trois analyses, et 614 protéines sont communes aux 4 analyses réalisées (Tableau 18). On peut noter que le décapage a permis d'identifier 200 à 500 protéines supplémentaires par rapport à l'échantillon non décapé. Par ailleurs, bien que la quantité de protéines utilisées pour la troisième expérience (M3) ait été environ 5 fois supérieure à celle utilisée pour l'expérience M2, cela n'a pas permis d'identifier davantage de protéines (Tableau 18, Figure 41). Ceci permet de penser que l'inventaire des protéines obtenu doit être exhaustif.

La proportion des différentes catégories fonctionnelles des protéines identifiées est globalement conservée entre les quatre analyses, ainsi que pour les protéines retrouvées



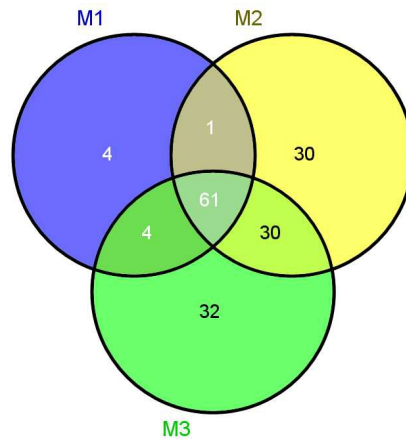
**Figure 42** : Répartition fonctionnelle des protéines identifiées à partir de membranes de mitochondries purifiées de *Medicago truncatula*. Cette analyse est réalisée sur l'ensemble des protéines, communes aux quatre analyses réalisées. CTE : chaîne de transfert des électrons.



communes aux quatre analyses (Tableau 18, Figure 42). 17 à 20 % des protéines sont des protéines impliquées dans le métabolisme au sens large (métabolisme primaire et secondaire, métabolisme énergétique, carboné et azoté, des acides aminés, des nucléotides, des vitamines, des lipides, des hormones). 20 à 25 % des protéines ont une fonction liée aux processus qui concernent les protéines (synthèse, dégradation, conformation et modification post-traductionnelles). 17 à 20 % des protéines ont une fonction inconnue. Presque 10 % des protéines sont associées à la chaîne de transfert des électrons et à la synthèse d'ATP. Autour de 7-8 % des protéines sont associées à une fonction de transport (la liste des protéines assignées à une fonction de transport identifiées dans les quatre analyses figure en Annexe 1), et autant sont associées à l'état redox, la réponse au stress et la signalisation. Environ 4 % des protéines sont liées aux processus liés à l'ARN et à l'ADN (synthèse ou réparation de l'ADN, épissage et régulation de l'ARN). Enfin, les protéines restantes (10 %) sont assignées à des fonctions diverses : protéines associées aux photosystèmes, à la paroi, au fonctionnement cellulaire, au développement, aux cytochromes, etc.

Il est important de noter que toutes les protéines identifiées ne sont pas mitochondriales. Lors de l'évaluation de la pureté des préparations de MP (voir partie 2B-a) des résultats), les marqueurs enzymatiques ont révélé la présence de contaminants, en particulier les peroxysomes. La MET a également révélé la présence d'autres contaminants non identifiés. Sur la base de l'observation en MET, on estime que la proportion de mitochondries se situe entre 80 et 95 %. De plus, l'observation microscopique de la fluorescence des mitochondries marquées au Mitotracker Red a montré que la proportion de mitochondries (actives) était prépondérante. En conclusion, dans la mesure où certaines protéines peuvent avoir des adressages sub-cellulaire multiples, il est difficile de déterminer quelles sont celles qui sont contaminantes.

Bien que la première analyse de protéines membranaire de membranes non décapées a permit d'identifier 872 protéines de score MASCOT supérieur à 60 (Tableau 18), dont 70 protéines impliquées dans le transport (soit 8 % du total), aucune ne correspondait à un NRT ou un CIC. Parmi les protéines de transport identifiées figuraient des protéines du complexe "Translocases Inner/Outer Membrane" (TIM/TOM) qui sont responsables de l'import de protéines dans la mitochondrie, des aquaporines qui permettent le passage d'eau, des transporteurs d'ADP/ATP, des "Voltage-dependent Anion-selective Channel" (VDAC) qui facilitent le passage de métabolites à travers la membrane externe (Wandrey *et al.*, 2004), et des transporteurs de type ATP-Binding Cassette (ABC) qui transportent divers substrats



**Figure 43 :** Protéines avec une fonction de transport, issues des membranes de mitochondries de *Medicago truncatula*, identifiées dans les trois répétitions de spectrométrie de masse (MS). Le diagramme de Venny illustre les protéines communes aux trois expériences. M1 : analyse de MS 1 sur membranes non décapées ; M2 : analyse de MS 2 sur membranes décapées ; M3A : analyse de MS 3 sur membranes décapées.

```

>lcl|54409 AtNRT1.1
Length=590

Score = 744 bits (1921), Expect = 0.0, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 369/585 (63%), Positives = 463/585 (79%), Gaps = 8/585 (1%)

Query 3 TLPTTQGTVP-DASDYKGRPADRSTTGCHSAAAAMILGGEVHERLTLTGIAVNLVYTLTG 61
+LP T+ + DA D++GRPADRS TGGW++AAMIL E +ERLTLGI VNLVYTLTG
Sbjct 2 SLPETKSDDILLDAWDFQGRPADRSKTGGWASAAMILCIEAVERLTLTGIGVNLVYTLTG 61

Query 62 TMHLGMAASANVVTNVLGTSFMLCLLGGFLADTFLGRVLTIAIFAAVQAIQVTLTISTI 121
TMHLGNA +AN VTNVLGTSFMLCLLGGF+ADTFLGRVLTIAIFAA+QA GV+ILT+STI
Sbjct 62 TMHLGNATAANTVTNVLGTSFMLCLLGGFIADTFLGRVLTIAIFAAIQATGVSILTISTI 121

Query 122 IPSLHPPCKEDSKS-CIQADSKQLLVMLALYITALTGTGGLKSSVSGFGSDQFDDSDQ 180
IP L PP+C + S C QA QL V+YLALY+TALGTGG+K+SVSGFGSDQFD+++ +
Sbjct 122 IPGLRPPRCNPTTSSHCEQASCIQLTVLYLALYLTAALGTGGKASVSGFGSDQFDETEPK 181

Query 181 EKKGMKFFSFWFFVFSIGSLAAVTVLVYIQDNGRCGWGYGICAVAVVALLVPLSGTRK 240
E+ M FF+ F+F +++GSL AVTVLVY+QD+ GR WGYGICA AIV+AL VFL+GT +
Sbjct 182 ERSKMTYFFNRFFFCINVGSLLAIVTVLVYQDDVGRKWGYGICAFVAVLALSVFLAGTNR 241

Query 241 YRIKQLVGSPLTQIAVVFVAAMRKRHMQLPDSLSLYEEDDILCETPKTK-KQRMPHSKQ 299
YR E+L+GSP+TQ+A V VAAWR R ++LP+D S LY+ DDI+ K EQ++PH++Q
Sbjct 242 YRFKLLIGSPHTQVAAVIVAAMRNKLELPADPSTLYDIDDITAAEGSMKKGKQLPHEQ 301

Query 300 FRFLDKAAIKGIESGCTITIKEKWIYISTLTDVEEVKMIIRMLPIWATTIMFWTIHAQMIT 359
FR LDKAAI+ E+G T + KW +STLTDVEEVK ++RMLPIWAT I+FWT+HAQ+IT
Sbjct 302 FRSLDKAAIRDQEAQVTSNVFNKWTLSLTDVEEVKQIVRMLPIWATCILFWTVHAQLIT 361

Query 360 FSVSQATIMDCIGTFQIPAAASMTVFLIGTILLTVPFYDRFIRPVAKKVLMNSHGFTPLQ 419
SV+Q+ T+D IG+F+IP ASM VF +G +LLT YDR + KK+ N HG PLQ
Sbjct 362 LSAQSETLDRSIGSFELPPASMAVYVGGLLTTAVYDRVAIRLCKLFWYPHGLRPLQ 421

Query 420 RIGVGLVLSVISHVAAAALIEMKRKLKFAHSHGFVDDPTAK-MPLSVFVLVPQFFVSGSEA 478
RIG+GL ++M AAL+E+KRL+ A +HG PT K +PL + L+PQ+ VG GEA
Sbjct 422 RIGLGLFFGSMAMAVAALVELKRLRTAHAG----PTVKTLPLGFYLLIPQYLVIGGSEA 477

Query 479 FMYGQLDFFLRECPKGMKMTSTGLFSLTSLIGFFFSLLVTLVNNVTPGNKPWIADNLD 538
+Y QLDFFLRECPKGMK MSTGL LSTL++GFFFS+LVT+V TG PWIAD+L+
Sbjct 478 LIYTGQLDFFLRECPKGMKMTSTGLLSTLALGFFFSVLTIVTEKFTGKAHPWIADDLN 537

Query 539 QGRLYDFYVLLAMLAINVVIYLACAKWVYVKRRLAEAGIELEE 583
+GRLY+FYUL+A+L A+N +I+L +KVVYK+ERLAE GIEL++
Sbjct 538 KGRLYNFYVLLAVLVALNFIPLVFSKWVYKRLAEVGLIEDD 582

```

**Figure 44 :** Alignement de séquences protéiques sur NCBI BLAST entre (B) AtNRT1.1 (Sbjct) et MtNRT1 (Query).

comme des métaux lourds, des phytohormones et de nombreux métabolites (Kretzschmar *et al.*, 2011). Les transporteurs de type ABC sont connus pour transporter du nitrate chez les bactéries (Moir et Wood, 2001), mais cela n'a jamais été montré chez les plantes. Enfin, des "Mitochondrial Carriers" (MC) ont été identifiés dans cette analyse. Ces MC sont responsables du transport de différents substrats comme les di- et tri-carboxylates, l'ATP/ADP ou le phosphate (Haferkamp, 2007).

Dans le but d'enrichir les échantillons en protéines intrinsèques aux membranes, la deuxième analyse a été réalisée sur des membranes décapées. 1 425 protéines ont été identifiées, avec un score MASCOT supérieur à 60, soit 75 % de plus en comparaison avec la première analyse. La seule différence avec l'analyse précédente est le décapage des membranes. Cette étape a donc permis d'améliorer la détection des protéines membranaires, probablement en éliminant des protéines contaminantes. Parmi les protéines identifiées, 122 ont une fonction de transport, soit 8,6% du total. Sur ces 122 transporteurs identifiés dans cette analyse, 62 sont communs avec la première analyse (Figure 43). Les transporteurs retrouvés appartiennent de manière générale, aux mêmes types de familles que ceux retrouvés dans l'analyse 1.

Parmi les protéines nouvellement identifiées, trois transporteurs pourraient être des candidats intéressants pour le transport de nitrite mitochondrial. En effet, un transporteur nitrate a été détecté dans cette analyse. Il correspond au gène *Medtr5g012290.1* (nommé *Nrt6*) qui se trouve être l'orthologue de *Nrt1.1* d'*A. thaliana* (Liu *et al.*, 1999). En ce qui concerne l'analyse fonctionnelle de la séquence protéique, le meilleur hit SwissProt (e-value 0.0) correspond à AtNRT1.1 (Q05085). Sur la "Transporter Classification Database" (TCDB), les deux meilleurs hits (e-value 0.0) sont un POT de *B. napus* (Q43390) et de nouveau AtNRT1.1 (Q05085). Il est probable que NRT6 soit fonctionnel et capable de transporter du nitrate dans la mesure où sa séquence est très proche d'AtNRT1.1 (79 % de similarité, Figure 44), qui est un transporteur de nitrate et de chlorate fonctionnel (Tsay *et al.*, 1993). En revanche, il n'est pas prédit comme "mitochondrial" par les logiciels d'adressage subcellulaire (MitoPred et Mitoprot2), mais plutôt localisé au niveau de la PM (Wolf). Il faut tenir compte qu'il existe une contamination par d'autres fractions subcellulaires dans l'échantillon envoyé en MS.

*Medtr3g092030.1* (nommé *Nrt5*) est également identifié comme un candidat potentiel car il appartient à la famille MFS dont le substrat est inconnu (Pao *et al.*, 1998). Pour NRT5, le meilleur hit sur SwissProt est un MFS humain de classe 5 (Q6N075|MFSD5\_Human, e-value  $6.10^{-81}$ ). Sur TCDB, le meilleur hit (e-value  $e^{-56}$ ) est aussi un MFS5 de singe



(Q5R542|MFS5\_*Pongo abelii*). La famille 5 des MFS rassemble des transporteurs d'oligosaccharides (en symport avec un proton), (Pao *et al.*, 1998). Ainsi, en l'absence d'une caractérisation fonctionnelle qui détermine le substrat de ce transporteur, *Nrt5* a été retenu dans la suite de l'analyse.

Enfin, une protéine identifiée dans une partie non assemblée du génome, correspondant au *contig\_21690\_1.1* (nommée NRT7), est un morceau d'un gène de type *Nrt3*. Les protéines de type NRT3 présentent des homologies avec CrNAR2 et sont nécessaires pour le transport de haute affinité du nitrate (Okamoto *et al.*, 2006). Le meilleur hit de SwissProt (e-value  $3.10^{-32}$ ) et de TCDB (e-value  $e^{-19}$ ) correspond dans les deux cas à AtNRT3.1 (Q9FGS5). NRT7 correspond donc à un gène de type NRT3. Il n'est pas capable de transporter lui-même le nitrate, mais il est nécessaire au HANT comme cela a été montré pour AtNRT3.1 (Okamoto *et al.*, 2003). Le Km apparent du transport de nitrite mesuré dans les mitochondries purifiées est de l'ordre de 100  $\mu\text{M}$ , ce qui oriente plutôt vers un mécanisme de transport de type LANiT. NRT7 peut intervenir dans le HANiT mitochondrial. Il est possible aussi que les notions de transport haute/faible affinité du nitrite soit différentes de celles du nitrate. Cependant, les valeurs de Km de 5  $\mu\text{M}$  pour le système III et 33  $\mu\text{M}$  pour le système IV de *C. reinhardtii* pour le transport du nitrite sont considérées comme HANiT (Rexach *et al.*, 1999).

La troisième analyse MS a été réalisée sur des protéines issues de membranes de mitochondries décapées. Pour cette répétition, l'injection en MS a été réalisée en duplicata technique dans le but d'améliorer l'identification (environ 10 %). La première injection a permis d'identifier 1 105 protéines de score MASCOT supérieur à 60. La deuxième injection a permis d'identifier 1 093 protéines avec un score MASCOT supérieur à 60. En tout, 1 212 protéines différentes ont été identifiées, dans au moins une répétition. Le nombre de transporteurs identifiés est du même ordre de grandeur que pour la répétition 2 : 127 protéines avec une fonction de transporteurs ont été identifiées, ce qui représente 10,5 % des protéines totales. Parmi les protéines de transport identifiées, 95 sont communes à au moins une des répétitions précédente. 61 transporteurs sont communs aux trois analyses (Figure 43). Les trois protéines candidates au transport du nitrite mitochondrial identifiées dans la deuxième analyse sont retrouvées dans cette répétition. NRT5 est retrouvé dans les deux injections avec un score MASCOT fiable (131,7 et 215,9). En revanche, NRT6 est retrouvé dans une seule injection avec un score de 58, avec un seul peptide identifié, ce qui est à la limite de la fiabilité. NRT7 est retrouvé dans les deux injections (M3A et M3B) avec un bon score pour l'une (118,2) et un score de 58 pour l'autre.

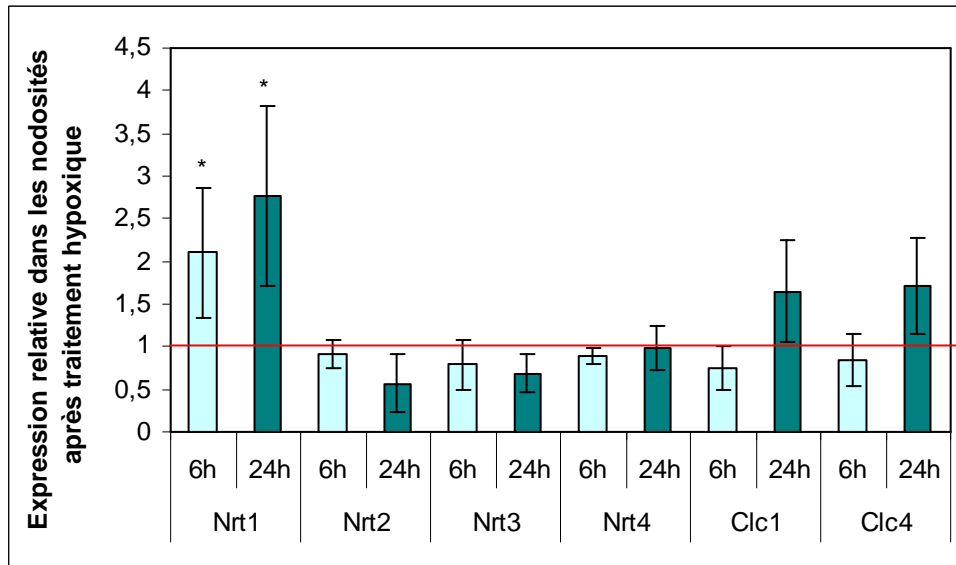


La technique du FASP (Wisniewski *et al.*, 2009) a permis d'améliorer de manière significative le nombre de protéines identifiées. Ceci s'explique, d'une part, par une meilleure solubilisation des protéines membranaires et, d'autre part, par une moindre perte de protéines moins abondantes ou habituellement exclues des gels à cause de leur taille (avec les protocoles de préparation par électrophorèse bi-dimensionnelle) au cours de la préparation des protéines. De plus cette technique permet la détection de 2 000 protéines environ à partir de seulement 1-2 µg de matériel (Wisniewski *et al.*, 2009).

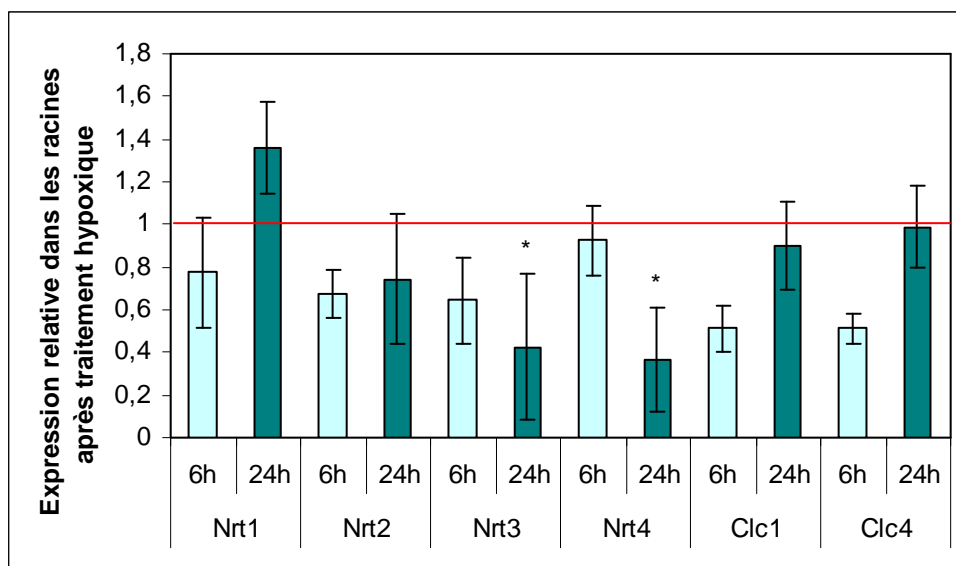
Malgré cette amélioration considérable de l'identification de protéines membranaires, le candidat NRT1 révélé par l'analyse *in silico* n'a pas été retrouvé dans les données de MS. Cependant, jusqu'à la vérification de sa localisation sub-cellulaire, il n'est pas exclu qu'il soit associé aux mitochondries de *M. truncatula*.

Cette étude est la seule ayant identifié un nombre aussi important de protéines appartenant aux membranes mitochondriales. Chez *M. truncatula*, une étude protéomique avait déjà été réalisée mais le nombre de protéines identifiées était très inférieur : 176 protéines dont seulement trois transporteurs membranaires, des VDAC, qui sont localisés sur la membrane externe (Dubinin *et al.*, 2011). Les échantillons de membranes de mitochondries proviennent des mitochondries de racines extraites selon le protocole décrit dans le Matériel et Méthodes. Cependant, la partie 2B-a) des résultats montre que les mitochondries sont purifiées avec la présence de quelques contaminants, en particulier des peroxyosomes. Une technique aussi sensible que la MS a détecté certaines protéines caractéristiques des peroxyosomes comme la catalase. Il est clair que les protéines ayant une fonction dans les mitochondries comme des ATP synthases, des composants de la CTE, etc, appartiennent aux protéines mitochondriales. Pour les autres protéines, il est souvent difficile de déterminer lorsqu'elles proviennent d'autres compartiments cellulaires dans la mesure où une protéine peut être représentée dans plusieurs compartiments et avoir des rôles différents en fonctions de sa localisation sub-cellulaire. Environ 30 % des peptides détectés en MS ne correspondent à aucune protéine. Certaines protéines sont probablement codées par le génome mitochondrial qui n'est actuellement pas disponible chez *M. truncatula*. Mais la plupart de ces protéines sont semblables à des protéines codées par le génome nucléaires et doivent donc présenter des homologies, mêmes faibles, avec des protéines d'origine nucléaire. Par ailleurs, pour compléter le travail réalisé et déterminer plus finement le pourcentage de contamination des mitochondries par d'autres compartiments cellulaires, nous envisageons d'analyser la localisation cellulaire de toutes les protéines d'*Arabidopsis* homologues aux protéines de *Medicago truncatula* identifiées dans notre étude à l'aide de la base de données "Sub-cellular

## A. Nodosités



## B. Racines



**Figure 45** : Analyse par qRT-PCR de l'expression des candidats au transport du nitrite, identifiés par l'approche *in silico*, dans les nodosités (A) et les racines (B) de *Medicago truncatula*. L'expression des gènes a été suivie après 6 h (barres bleu claires) et 24 h (barres bleu-vert) de traitement hypoxique. Le niveau d'expression de chaque gène est exprimé par rapport à l'expression de ces mêmes gènes dans les nodosités/racines contrôles au même temps rapporté à 1 (seuil rouge). L'astérisque indique que la condition testée est significativement différente de la condition contrôle au seuil de 0,05 (test de *t*-Student).



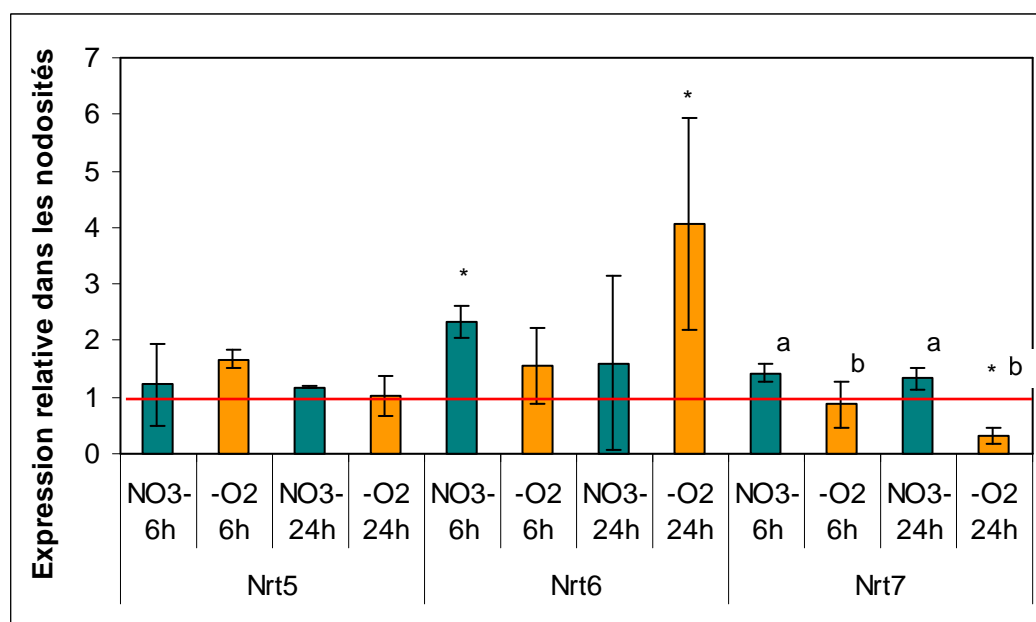
location data base for Arabidopsis" (SUBA : <http://suba.plantenergy.uwa.edu.au/>) de la même manière que dans les travaux de Dubinin *et al.* (2011). De plus, les mitochondries présentent des similitudes avec les procaryotes et il sera intéressant de comparer les protéines non assignées à des protéines bactériennes (par NCBI BLAST contre une banque de donnée de protéines bactérienne). Un des objectifs à venir est d'identifier les protéines qui ont une fonction de transport de nitrite chez les bactéries parmi les protéines mitochondriales que nous avons identifiées.

### c) Analyse du profil d'expression des transporteurs putatifs de nitrite

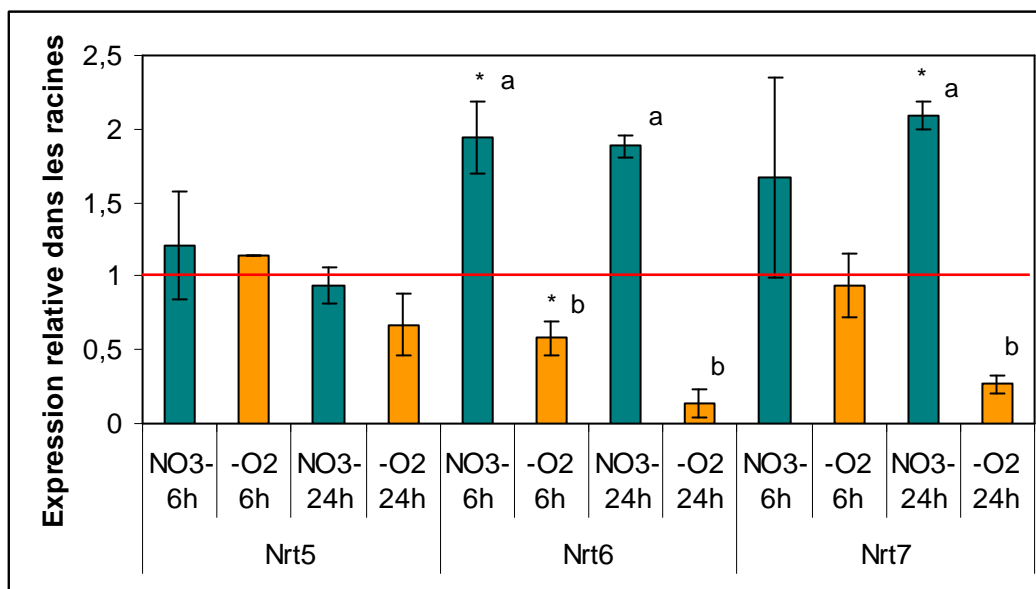
La première étape de caractérisation des gènes candidats a consisté à analyser par qRT-PCR, leur expression dans les tissus (nodosités matures et racines) et dans différentes conditions d'intérêt ( $\pm$  nitrate,  $\pm$  traitement hypoxique). Pour contrôler au mieux les conditions de culture et les traitements, nous avons choisi de cultiver les plants de *M. truncatula* en système de culture hydroponique. En effet, la concentration de nitrate apportée aux plantes, ici 1 mM de KNO<sub>3</sub>, peut être déterminée avec exactitude et le traitement hypoxique a été effectué par arrêt du bullage du milieu. L'analyse d'expression des gènes candidats par qRT-PCR a été réalisée sur triplicatas biologiques pour chacun des candidats retenus par l'approche *in silico* (Figure 45), et soumise à un test statistique (t-student).

Parmi les gènes analysés, seul le gène *Nrt1* est induit de manière significative après 6 et 24 h de traitement hypoxique dans les nodosités. Par contre, le même traitement n'a eu qu'un effet modéré, sur l'expression de ce gène dans la racine. En ce qui concerne les trois autres systèmes de type *Nrt*, la tendance est plutôt à la baisse du niveau de transcrits par le traitement hypoxique. Ainsi, *Nrt2* présente une diminution de 40 % du niveau de transcrits dans les nodosités après 24 h d'exposition à l'hypoxie (seuil de confiance 0,1), (Figure 45). De même, *Nrt3* et *Nrt4* présentent une diminution de 50 à 60 % de leur transcrits dans les racines après 24 h d'exposition à l'hypoxie (Figure 45). Ces résultats font ressortir *Nrt1* comme le meilleur candidat. En effet, l'expression tissulaire du gène pourrait correspondre à celle du transporteur recherché en particulier parce qu'il est induit dans les nodosités par le stress hypoxique et que le gène est exprimé dans les racines et les nodosités. De plus, son homologie de séquence avec le transporteur de nitrite chloroplastique *CsNitr1* (Sugiura *et al.*, 2007), va dans le sens d'un transporteur de nitrite.

### A. Nodosités



### B. Racines



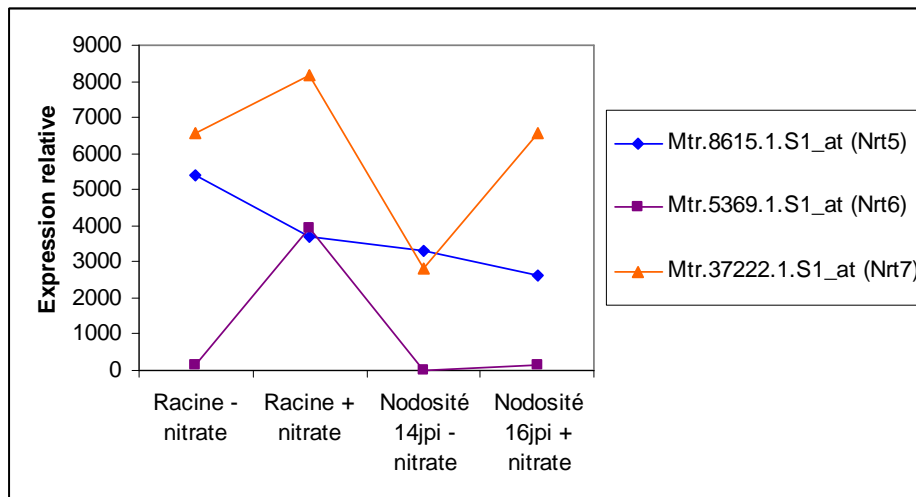
**Figure 46** : Analyse, par qRT-PCR, de l'expression des candidats au transport du nitrite identifiés par spectrométrie de masse, dans les nodosités (A) et les racines (B) de *Medicago truncatula*. Le niveau d'expression des gènes dans les nodosités/racines après 6 h (barres bleu-vert) et 24 h (barres orange) de traitement 1 mM KNO<sub>3</sub> (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) ou de traitement hypoxique (-O<sub>2</sub>), est exprimé par rapport à l'expression de ces mêmes gènes dans les nodosités/racines contrôles au même temps rapporté à 1 (seuil rouge). L'astérisque indique que la condition testée est significativement différente de la condition contrôle au seuil de 0,05 (test de *t*-Student). Les conditions nitrate et hypoxie sont comparées entre elles pour le même temps. Les lettres (*a* et *b*) indiquent que les conditions sont significativement différentes l'une de l'autre (test de *t*-Student).

Les profils de *Clc1* et *Clc4* sont intéressants (Figure 45). En effet, ces gènes répondent de manière positive au stress hypoxique dans les nodosités à 24 h de traitement (seuil 0,1). Les résultats sont moins enthousiasmants pour les racines car l'expression est réprimée à 6 h (seuil 0,1) mais le niveau d'expression à 24 h remonte au niveau du contrôle. Ceci étant, les candidats *Clc1* et *Clc4*, ne sont pas retenus en premier choix. En effet, une étude récente a montré que la sélectivité des ClC pour l'anion  $\text{NO}_3^-$  au lieu du  $\text{Cl}^-$  et est conféré par la présence d'une proline à la position 160 (Wege *et al.*, 2010), or ces 2 candidats ne possèdent pas ce critère. Ces deux candidats sont donc mis de côté sans pour autant être définitivement écartés car la présence de la proline 160 n'est peut être pas indispensable dans le cas du transport du nitrite.

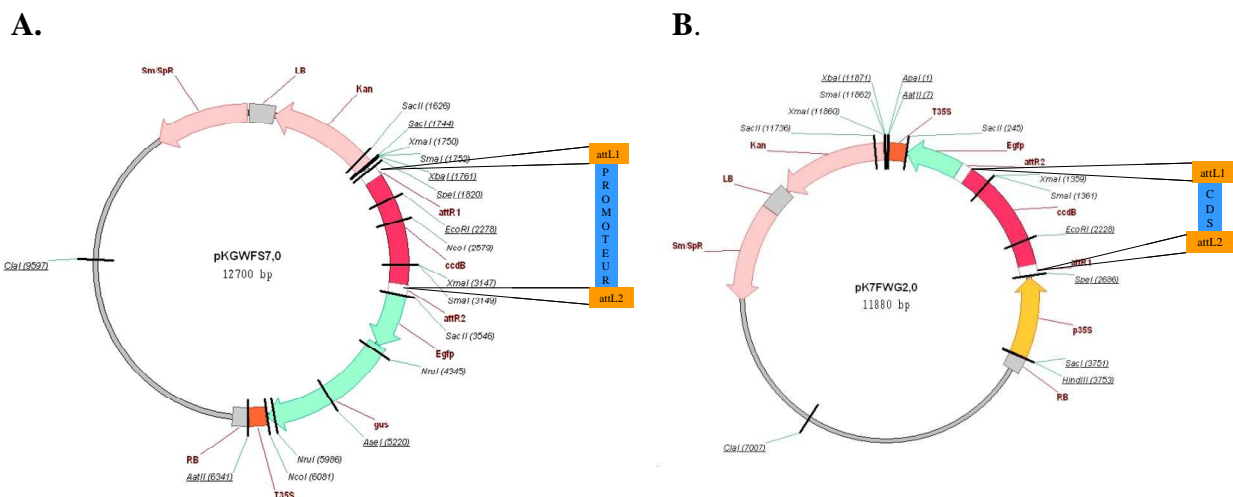
De la même manière que les candidats retenus après analyse *in silico*, les profils d'expression des candidats révélés par MS ont été caractérisés dans les nodosités matures et les racines, après un traitement ou non au nitrate (1 mM  $\text{KNO}_3$ ) ou à l'hypoxie (Figure 46). L'expression de *Nrt5* apparaît stable dans les nodosités après les traitements nitrate et hypoxique. Il est réprimé par l'hypoxie à 24 h dans les racines (seuil 0,1). Les données des puces d'expression de *M. truncatula* "Affymetrix Medicago GeneChip", montrent un très haut niveau d'expression de ce gène (Mtr.8615.1.S1\_at) dans les nodosités et les racines (Figure 47). En revanche le nitrate semble avoir un effet négatif, ce qui n'est pas confirmé par les résultats de qRT-PCR (Figure 46).

Le gène *Nrt6* répond positivement au nitrate dans les racines et les nodosités dans les puces d'expression Affymetrix (Mtr.5369.1.S1\_at). L'analyse par RT-PCR a confirmé cette tendance, avec une induction significative du gène dans les nodosités à 6 h et dans les racines à 6 h et 24 h après le traitement nitrate. En revanche, les effets de l'hypoxie sont inversés dans les nodosités et les racines. *Nrt6* est induit d'un facteur 4 après 24 h dans les nodosités par rapport au contrôle. En revanche, il est fortement réprimé dans les racines à 6 h (40 %) et 24 h (85 %). Bien que ce gène soit réprimé en réponse à l'hypoxie dans les racines, il reste un candidat intéressant au regard de son induction dans les nodosités par ce même traitement hypoxique. Il est en effet possible que le transporteur de nitrite mitochondrial recherché soit une protéine différente dans les deux tissus. De plus son homologie de séquence avec *AtNrt1.1* (Liu *et al.*, 1999) va dans le sens d'un transporteur fonctionnel.

Les données d'expression de *Nrt7* dans les puces d'expression Affymetrix (Mtr.37222.1.S1\_at) montrent que le gène est exprimé à un bon niveau dans les racines et les nodosités Et qu'il est induit par le traitement au nitrate dans les nodosités et les racines (Figure 47). L'effet du nitrate n'est pas confirmé de manière significative par l'analyse de qRT-PCR,



**Figure 47** : Profil d'expression de transporteurs putatifs de nitrite *Nrt5*, *Nrt6* et *Nrt7*, dans les racines et les nodosités de *Medicago truncatula* en présence ou absence de nitrate. Les données proviennent des puces d'expression de *M. truncatula* "Affymetrix Medicago GeneChip", <http://bioinfo.noble.org/gene-atlas/v2> (Benedito *et al.*, 2008).



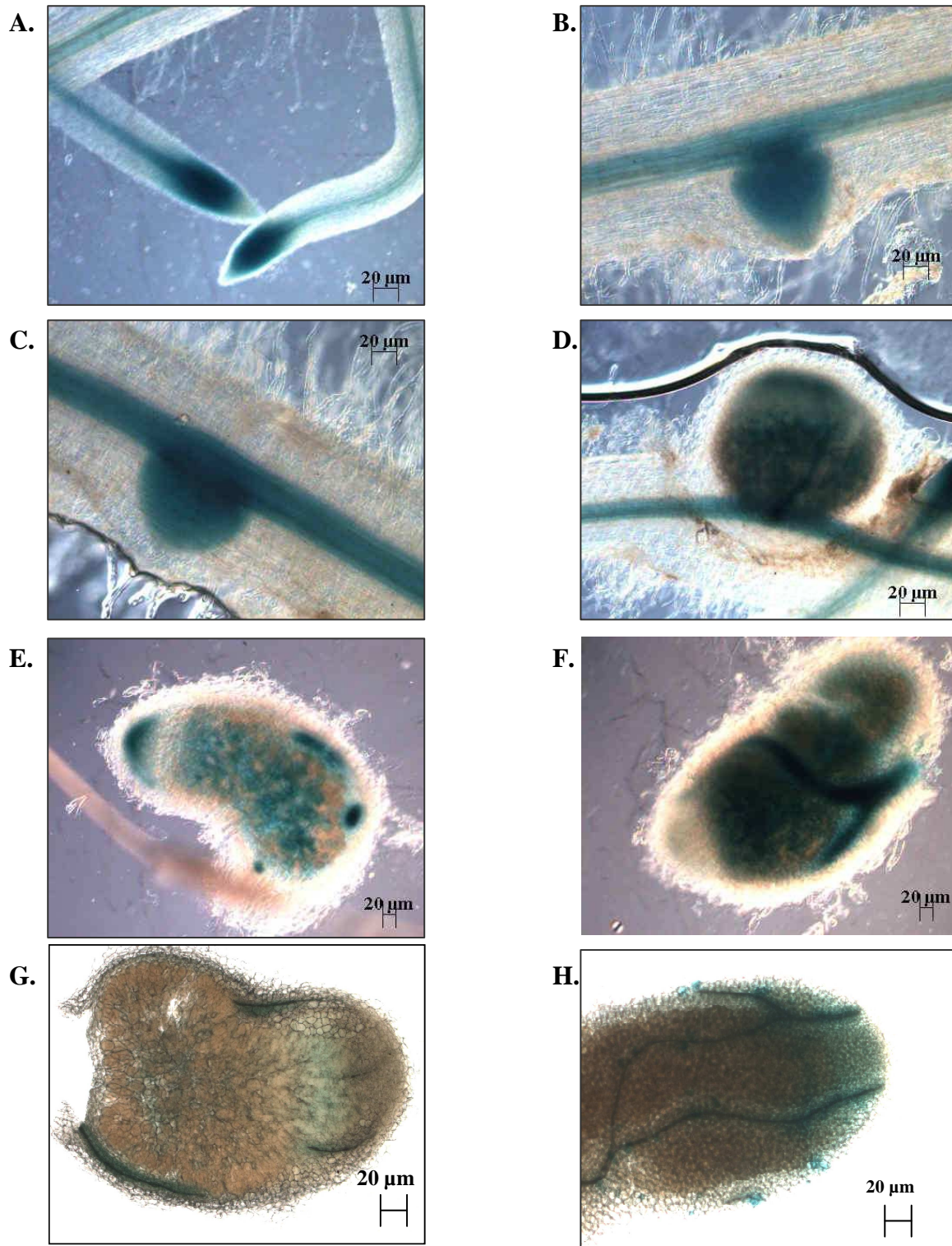
**Figure 48** : Vecteurs d'expression utilisés: (A) pKGWFS7 pour la construction avec la séquence du promoteur devant les gènes rapporteurs *Gfp* et *Gus*, et (B) pK7FWG2 pour la construction de la partie codante (CDS) en fusion C-terminale du gène avec la *Gfp* et derrière un promoteur fort *p35S*. Les deux vecteurs possèdent un gène de résistance à la spectinomycine et à la kanamycine.

sauf dans les racines après 24 h de traitement de nitrate (Figure 46). En revanche, l'hypoxie a un effet répresseur sur l'expression de *Nrt7* à 24 h, dans les nodosités et les racines.

## d) Caractérisation des transporteurs putatifs de nitrite

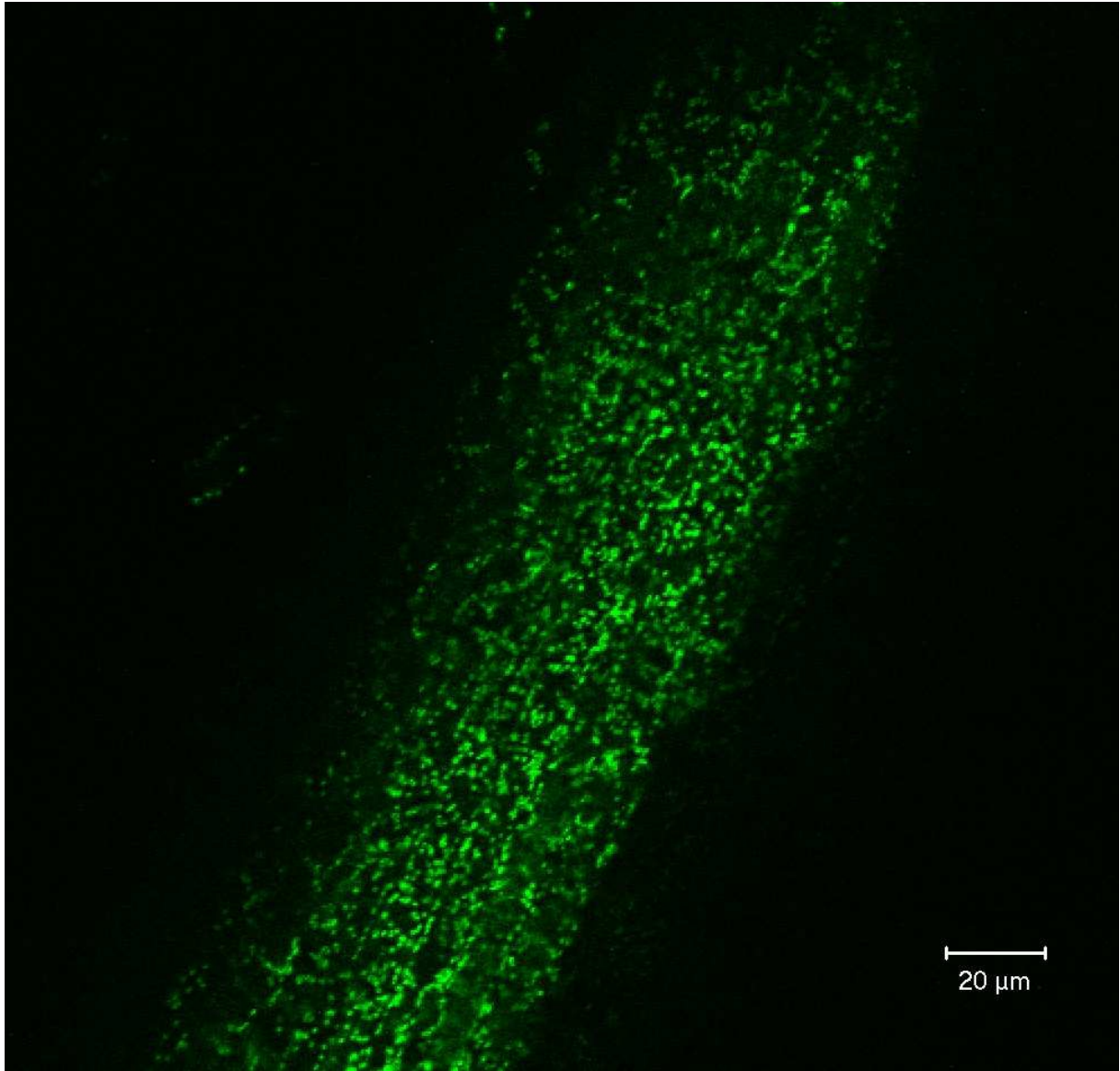
Sur la base des résultats de recherches des candidats au transport de nitrite mitochondrial par les approches *in silico* et protéomique, et en tenant compte des profils d'expression des gènes en réponse au nitrate et à l'hypoxie, nous avons retenu 6 candidats pour la suite de l'analyse. *Nrt1* et *Nrt6* ont été retenus car ils sont induits en réponse à l'hypoxie dans les nodosités (Figures 45 et 46). *Nrt5* se maintient sur nitrate et en hypoxie. NRT5 est retenu car, en l'absence de validation fonctionnelle en œufs de Xénope, il est possible qu'il transporte le nitrate/nitrite. NRT7 reste un candidat à étudier même si étant de type NRT3, il est peu probable qu'il soit lui-même un transporteur fonctionnel, il est envisageable que NRT7 facilite l'activité d'un transporteur de type NRT2. Il faudra alors rechercher le transporteur qui lui est associé en recherchant par exemple les protéines qui interagissent avec NRT7. Par exemple la technique de l'interaction en double hybride peut être utilisée. Il est également possible d'envisager l'identification de complexes protéiques par MS en utilisant la protéine NRT7 avec un "Tag" (de type histidine) comme appât sur une colonne de chromatographie d'affinité, puis en éluant le complexe. Pour chacun de ces 6 candidats, la partie codante (CDS) pour la protéine, d'une part, et la zone promotrice du gène (promoteur), d'autre part, ont été clonées dans des vecteurs d'expression de plante (Figure 48). Pour la CDS, l'expression de la protéine a été mise sous le contrôle d'un promoteur fort (*p35S*, virus de la mosaïque du chou fleur) et la protéine exprimée a été dotée de la GFP en fusion C-terminale. Cette construction a permis de visualiser l'adressage subcellulaire de la protéine par fluorescence de la GFP. Pour sa part, le promoteur a été mis en fusion avec 2 gènes rapporteurs : la séquence codante du gène *Gfp* et celle du gène *Uida*, qui code pour la  $\beta$ -glucuronidase (GUS). L'expression de ces gènes a permis de visualiser la localisation tissulaire de ces protéines exprimées sous le contrôle du promoteur, soit par fluorescence (GFP), soit par réaction enzymatique colorée (GUS).

En ce qui concerne le candidat *Nrt1*, les deux constructions (promoteur et CDS) ont été obtenues. Les plantes ont été transformées avec *Agrobacterium rhizogenes* contenant la construction d'intérêt. Pour la construction promoteur, l'expression des gènes *Gfp* et *Uida* a



**Figure 49 :** Observation au microscope Zeiss Axioplan 2 de l'expression du gène *Gus* induit par *pNrt1* dans des racines et les nodosités de *Medicago truncatula*. (A et B) racines trois semaines après transformation génétique. Nodosités âgées de (C) une, (D) deux, (E et F) trois, (G) quatre et (H) cinq (sénescence induite par un traitement de 10 mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) semaines post inoculation par *Sinorhizobium meliloti*. Echelle: 20 µm.

été suivie au cours du développement de la plante après inoculation par *S. meliloti*. Aucune fluorescence de la GFP n'a été observée avec la construction *pNrt1-Gfp::Gus*, probablement car il est plus difficile de détecter la GFP dans les tissus vivants à cause de l'autofluorescence des tissus végétaux (Ruijter *et al.*, 2003). En revanche, avec cette même construction, la coloration GUS pour révéler la localisation tissulaire de la protéine s'est révélée plus efficace, ce qui s'explique par la fixation des tissus dans méthode de coloration GUS et un temps de coloration qui est modulable en fonction de l'apparition de la couleur bleue (de Ruijter *et al.*, 2003). Dans ce cas, une coloration bleue a été observée à partir de la troisième semaine après infection par *A. rhizogenes*. Les résultats obtenus montrent que, dans la partie racinaire, le gène est exprimé dans les vaisseaux conducteurs du cylindre central (Figures 49A et B), dans la pointe racinaire de la racine principale (Figure 49A), mais aussi dans l'émergence des racines secondaires (Figure 49B). Après inoculation par *S. meliloti*, la coloration est visible sur les nodosités émergentes (Figure 49C). Pour plus de précision sur les nodosités matures, des coupes de 100 µm ont été réalisées. La coloration GUS est visible dans les vaisseaux conducteurs à l'intérieur et autour des nodosités matures (Figures 49E et 49F). De manière générale, la coloration bleue est très nette dans la nodosité entière. Cependant, lors des coupes réalisées sur des nodosités matures, la coloration s'estompe au fil des coupes jusqu'à disparaître totalement du centre de la nodosité et ne subsister que dans les vaisseaux conducteurs qui alimentent les nodosités (Figure 49G). Dans le but d'observer l'expression de *Gus* dans la zone de sénescence, un traitement avec 10 mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  a été appliqué aux nodosités dans le but d'induire une sénescence (Cam *et al.*, 2012). Seul l'apex de la nodosité est coloré en bleu, ce qui suggère que le gène ne s'exprime pas dans la zone de sénescence (Figure 49H). La réalisation de coupes fines de quelques microns pourrait apporter d'avantage d'informations sur la localisation précise et le type cellulaire privilégié de NRT1 et pourrait permettre de d'éclairer sur sa fonction dans la plante. Cette première expérience de cinétique de localisation tissulaire a été réalisée avec un promoteur d'une taille de 1 500 paires de bases (pb). Le même type d'expériences pourrait être réalisé avec une construction du promoteur contenant un fragment plus grand car il est possible que certains éléments régulateurs ne soient pas présents sur le fragment étudié. En effet certains éléments régulateurs nécessaires pour l'expression peuvent être distants de 5 kpb comme cela a été montré pour l'expression d'un gène de floraison chez *A. thaliana* (Adrian *et al.*, 2010) Il est envisageable qu'un promoteur plus grand contienne des éléments régulateurs différents et induise une expression tissulaire différente et peut être à l'intérieur de la nodosité.



**Figure 50** : Observation confocale de la construction *p35S-Nrt5::Gfp*. La fluorescence verte correspond à la GFP. Les points verts pourraient correspondre à des mitochondries. Echelle : 20 μm.



Pour la construction CDS, la localisation sub-cellulaire de la protéine d'intérêt peut être déterminée grâce à la fluorescence de la GFP présente en C-terminal. Aucune fluorescence due à la GFP n'a été observée. Ceci peut être expliqué par diverses raisons. Tout d'abord, l'absence de fluorescence peut être causée par une mauvaise conformation de la GFP ou une instabilité de la protéine chimérique due à la fusion (Hanson et Köhler, 2001). Cependant, on ne peut écarter la conséquence d'une mauvaise efficacité de transformation des plantes, d'autant que la seule sélection des racines transgéniques se fait sur la base de leur résistance à la kanamycine, qui, même si c'est une bonne sélection, n'est pas totalement efficace.

Le clonage des candidats *Nrt5*, *Nrt6* et *Nrt7* a été restreint à la partie codante par manque de temps. Pour le gène *Nrt5*, une fluorescence spécifique de la GFP a été observée pour la construction avec la CDS (Figure 50). La taille et la fréquence des points de GFP pourraient correspondre à des mitochondries car elles sont très similaires aux types de points GFP observés habituellement avec une protéine adressée aux mitochondries (Bahaji *et al.*, 2011). Ces résultats sont importants car, si ils sont confirmés, ils permettraient de valider qu'une protéine d'origine mitochondriale identifiée par MS est bien localisée dans la mitochondrie. Une expérience de co-localisation avec le Mitotracker Red CM-H2XROS pour confirmer la localisation mitochondriale a été réalisée, mais les premiers résultats n'ont pas permis de conclure. Les conditions d'analyse sont à mettre au point et les expériences sont à reproduire. Par ailleurs, en l'absence d'une caractérisation fonctionnelle de la protéine, il n'est pas possible de déterminer le substrat de ce transporteur MFS.

En ce qui concerne les constructions de fusion GFP avec NRT6 et NRT7 (*p35S-Nrt5::Gfp*, *p35S-Nrt6::Gfp* et *p35S-Nrt7::Gfp*), aucune fluorescence n'a pour l'instant été observée ce qui peut être expliqué avec les mêmes raisons déjà énoncées pour le cas de la construction avec NRT1.

En conclusion, la caractérisation des gènes candidats en utilisant des vecteur d'expression a permis d'obtenir des informations sur l'expression tissulaire de *Nrt1*. Il reste à affiner les résultats obtenus, en les répétant d'une part et en les reproduisant en utilisant une construction avec un promoteur plus grand. Il sera également intéressant d'étudier l'expression tissulaire des candidats *Nrt5*, *Nrt6* et *Nrt7*. *Nrt7* a été identifié sur la partie non assemblée du génome; il n'est donc difficile de récupérer la séquence du promoteur. Pour récupérer le promoteur, deux options sont possibles. Si la partie en amont du gène est séquencée, elle sera probablement disponible dans les banques de données. En revanche, si la partie en amont du gène n'est pas séquencée, le seul moyen de récupérer la séquence est de



tenter d'amplifier l'ADNg à partir d'un oligonucléotide dégénéré en 5' et d'une amorce spécifique du gène (au début) en 3'.

En ce qui concerne la localisation sub-cellulaire, les résultats sur NRT5 tendent à suggérer sa localisation aux mitochondries. Cependant, les données obtenues doivent être renforcées par des expériences complémentaires. Pour NRT1, NRT6 et NRT7, la technique utilisée n'a pas permis de localiser la protéine grâce à la GFP. Il est envisageable d'utiliser un autre vecteur d'expression contenant un marquage comme un "Tag" (de type histidine). La protéine recombinante pourra alors être retenue sur une colonne de chromatographie d'affinité. Si la protéine est mitochondriale, la fraction MP sera enrichie par rapport à l'EB et il sera possible de voir la différence sur un gel de protéines. Ce type d'expérience peut également être réalisé pour confirmer la localisation de NRT5.

Enfin, l'étape fondamentale pour la caractérisation des candidats NRT1, NRT5, NRT6 et NRT7 est la validation fonctionnelle du transport du nitrite en œufs de Xénope en utilisant du  $^{15}\text{N}$ , qu'il reste à réaliser. Il est aussi envisagé de caractériser le phénotype des mutants RNAi de chacun de ces candidats.

# Conclusion générale et perspectives

Les résultats obtenus au cours de cette thèse apportent des éléments nouveaux dans la compréhension des mécanismes de fonctionnement de la nodosité fixatrice d'azote et plus largement sur l'adaptation des plantes à l'hypoxie. En particulier, l'importance du NO comme intermédiaire métabolique intervenant dans la respiration nitrate-NO pour le fonctionnement des nodosités été démontrée.

Dans la partie 1 de ce travail, nous avons posé l'hypothèse selon laquelle le maintien du métabolisme énergétique des nodosités repose sur le fonctionnement d'une respiration nitrate-NO, dans laquelle le nitrite se substitue à l'oxygène comme accepteur terminal d'électrons de la CTE. Les résultats que nous avons obtenus montrent que (i) le NO produit par les nodosités provient du fonctionnement de la CTE ; (ii) la NR cytosolique participe au fonctionnement de la respiration nitrate-NO en produisant du nitrite par son activité réductrice du nitrate ; et (iii) que le fonctionnement de la respiration nitrate-NO maintient un état énergétique suffisant pour assurer le fonctionnement du métabolisme de fixation de l'azote dans les nodosités hypoxiées. Le rôle de la respiration nitrate-NO est particulièrement important lorsque l'hypoxie limite fortement le fonctionnement de la CTE et la production d'ATP par les mitochondries. Dans ce cas, le nitrite est l'accepteur terminal de la CTE alternatif à l'oxygène. Le nitrite et le pouvoir réducteur étant accumulés lors d'une hypoxie, ce mécanisme permet de les utiliser et d'éviter le blocage du métabolisme énergétique, carboné et azoté (Igamberdiev et Hill, 2009 ; Gupta *et al.*, 2011b ; Igamberdiev *et al.*, 2010).

Dans la partie 2 des résultats, nous avons mis en évidence et caractérisé le transport du nitrite à travers les membranes mitochondriales. Les données concernant la caractérisation du transport du nitrite confirment les observations déjà réalisées sur les mitochondries purifiées de végétaux (réponse aux effecteurs, inhibiteurs,  $K_m$ ...), (Tischner *et al.*, 2004 ; Planchet *et al.*, 2005 ; Gupta *et al.*, 2005 ; Stoimenova *et al.*, 2007 ; Gupta *et al.*, 2010). Cette étude a apporté une compréhension plus fine du mécanisme de production de NO par les mitochondries. En effet, nous avons pu confirmer que le fonctionnement de la CTE en anoxie est responsable de la production de NO et que celle-ci dépend de la présence de nitrite et de pouvoir réducteur (NADH). Ces travaux de thèse ont apporté les informations suivantes: (i) les mitochondries doivent être énergisées (en ATP) pour produire le NO, probablement pour importer le nitrite dans la matrice; (ii) le  $K_m$  apparent du transport du nitrite est de l'ordre de

la centaine de  $\mu\text{M}$  ce qui permet de penser que le  $\text{NO}_2^-$  est transporté par un mécanisme de type HANiT ; et (iii) les mitochondries purifiées de racines sont capables de produire du NO immédiatement après transition en atmosphère anoxiée. Cette dernière observation montre que les MP répondent instantanément à l'apport en nitrite et suggère que d'une part le transporteur de nitrite est présent et rapidement fonctionnel dans les racines et d'autre part que la capacité de la COX à utiliser le nitrite comme accepteur terminal en hypoxie est constitutive. Il reste encore des points à éclaircir pour caractériser précisément le transport du nitrite vers les mitochondries. Ainsi, il serait important de déterminer si le transport est ATP-dépendant ; cela fournirait une information supplémentaire sur le mécanisme de transport et éventuellement le type de protéine impliquée. Il est possible de répondre à cette question en réalisant, par exemple, des expériences de production de NO à partir de  $\text{NO}_2^-$  sur MP en réalisant une compétition entre l'ATP et un homologue non hydrolysable. Il serait également nécessaire de démontrer la capacité des mitochondries à produire de l'ATP en anoxie, grâce à l'utilisation du nitrite comme accepteur terminal de la CTE. Enfin, le  $K_m$  exact du transporteur pourrait être déterminé en suivant du nitrite marqué au  $^{15}\text{N}$ , ce qui permettrait de définir avec certitude le type de transport HANiT ou LANiT.

Enfin, dans la partie 3 des résultats, nous avons pu mettre en évidence des pistes prometteuses pour l'identification de système(s) de transport du nitrite dans les mitochondries. Cette avancée est originale car aucun NiTR mitochondrial n'a été reporté à ce jour dans la littérature. Par les deux approches utilisées, moléculaire et protéomique, nous avons identifié plusieurs systèmes de transport qui pourraient correspondre au transporteur recherché. En effet, le candidat appelé *Nrt1* possède un profil d'expression intéressant puisqu'il est induit par le traitement hypoxique dans les racines et les nodosités. Ainsi, l'étude de son expression tissulaire a pu montrer une expression dans les racines (vaisseaux conducteurs, apex racinaires et racines secondaires émergentes) et les nodosités (vaisseaux conducteurs, cortex nodositaire et primordium nodositaires). par ailleurs, ce gène est l'orthologue de *CsNitr1*, qui transporte du nitrite vers le chloroplaste (Sugiura *et al.*, 2007) et la probabilité qu'il transporte le nitrite est donc élevée. Il reste à prouver sa fonctionnalité en système hétérologue et à déterminer son adressage sub-cellulaire. Les candidats NRT5, NRT6 et NRT7 sont issus de l'identification des protéines membranaires des mitochondries. Ces protéines sont donc probablement localisées aux mitochondries. La détermination de la localisation sub-cellulaire de NRT5 en fusion C-terminal avec la GFP tend à confirmer cette donnée. NRT6 est l'orthologue de AtNRT1.1 (Tsay *et al.*, 1993) qui est un transporteur de nitrate fonctionnel ; la probabilité que NRT6 soit un transporteur de nitrate fonctionnel est

élevée. Enfin, il est peu probable que NRT7 soit lui-même un transporteur, car il est de type NRT3, donc associé au transport de haute affinité (Okamoto *et al.*, 2003). Cependant, il reste un candidat potentiel si le transport est de type HANiT. Il est envisageable que NRT7 facilite l'activité d'un transporteur de type NRT2. Il faudra alors rechercher le transporteur qui lui est associé en recherchant par exemple les protéines qui interagissent avec NRT7. Le transporteur de nitrite mitochondrial est l'élément qui reste inconnu dans le cadre du modèle de la respiration nitrate-NO mais les perspectives pour l'identifier sont prometteuses. En particulier, la validation fonctionnelle en œufs de Xénope des candidats révélés par ces travaux pourrait permettre d'apporter des informations nouvelles sur l'identité du transporteur de nitrite.

Ces travaux de thèse ont permis de valider sur de nombreux points, le fonctionnement de la respiration nitrate-NO dans les nodosités et les tissus hypoxiés de manière générale. Malgré cela, pour définitivement démontrer le fonctionnement de la respiration nitrate-NO et son efficacité pour le métabolisme fixateur d'azote, plusieurs éléments restent à démontrer. Par exemple, il reste à étudier l'implication des nsHb1 et des Lb dans ce mécanisme. De la même manière que pour étudier l'implication des NR, une approche de mutation par RNAi peut être envisagée. Les premiers résultats de dosages de métabolites en anoxie ont souligné l'importance, via le fonctionnement de la NR, du fonctionnement de la respiration nitrate-NO. Il serait également intéressant d'étudier plus en détail l'effet du fonctionnement (ou du dysfonctionnement) de la respiration nitrate-NO sur le métabolisme énergétique, carboné et azoté, et sur la fixation de l'azote.

# Références bibliographiques

- 1-Abat JK** and Deswal R (2009) Differential modulation of S-nitrosoproteome of *Brassica juncea* by low temperature: change in S-nitrosylation of Rubisco is responsible for the inactivation of its carboxylase activity. *Proteomics* 9(18): 4368-80.
- 2-Abat JK**, Mattoo AK and Deswal R (2008) S-nitrosylated proteins of a medicinal CAM plant *Kalanchoe pinnata*- ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activity targeted for inhibition. *FEBS J.* 275(11): 2862-72.
- 3-Adrian J**, Farrona S, Reimer JJ, Albani MC, Coupland G, Turck F (2010) cis-Regulatory elements and chromatin state coordinately control temporal and spatial expression of *FLOWERING LOCUS T* in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 22(5): 1425-40.
- 4-Ali R**, Ma W, Lemtiri-Chlieh F, Tsaltas D, Leng Q, von Bodman S and Berkowitz GA (2007) Death don't have no mercy and neither does calcium: *Arabidopsis* CYCLIC NUCLEOTIDE GATED CHANNEL2 and innate immunity. *Plant Cell* 19: 1081-1095.
- 5-Almagro A**, Lin SH and Tsay YF (2008) Characterization of the *Arabidopsis* nitrate transporter NRT1.6 reveals a role of nitrate in early embryo development. *Plant Cell.* 20(12): 3289-99.
- 6-Amarasinghe BH**, de Bruxelles GL, Braddon M, Onyeocha I, Forde BG and Udvardi MK (1998) Regulation of *GmNRT2* expression and nitrate transport activity in roots of soybean (*Glycine max*). *Planta* 206(1): 44-52.
- 7-An L**, Liu Y, Zhang M, Chen T and Wang X (2005) Effects of nitric oxide on growth of maize seedling leaves in the presence or absence of ultraviolet-B radiation. *J. Plant Physiol.* 162: 317-326.
- 8-Angelo M**, Hausladen A, Singel DJ and Stamler JS (2008) Interactions of NO with hemoglobin: from microbes to man. *Methods Enzymol.* 436: 131-68.
- 9-Arnaud N**, Murgia I, Boucherez J, Briat J-F, Cellier F and Gaymard F (2006) An iron-induced nitric oxide burst precedes ubiquitin-dependent protein degradation for *Arabidopsis AtFer1* ferritin gene expression. *J. Biol. Chem.* 281: 23579-23588.
- 10-Astier J**, Kulik A, Koen E, Besson-Bard A, Bourque S, Jeandroz S, Lamotte O and Wendehenne D (2012) Protein S-nitrosylation: What's going on in plants? *Free Radic Biol Med.* 53(5): 1101-10.
- 11-Astier J**, Rasul S, Koen E, Manzoor H, Besson-Bard A, Lamotte O, Jeandroz S, Durner J, Lindermayr C and Wendehenne D (2011) S-nitrosylation: An emerging post-translational protein modification in plants. *Plant Science* 181: 527-533.
- 12-Bagchi R**, Salehin M, Adeyemo OS, Salazar C, Shulaev V, Sherrier DJ and Dickstein R (2012) Functional assessment of the *Medicago* NIP/LATD protein demonstrates that it is a high affinity nitrate transporter. *Plant Physiol.* 160(2): 906-16.

- 13-Bahaji** A, Ovecka M, Bárány I, Risueño MC, Muñoz FJ, Baroja-Fernández E, Montero M, Li J, Hidalgo M, Sesma MT, Ezquer I, Testillano PS and Pozueta-Romero J (2011) Dual targeting to mitochondria and plastids of AtBT1 and ZmBT1, two members of the mitochondrial carrier family. *Plant Cell Physiol.* 52(4): 597-609.
- 14-Barbaree** JM and Payne W J (1967) Products of denitrification by a marine bacterium as revealed by gas chromatography. *Marine Biology* 1(2): 136-139.
- 15-Barbier-Brygoo** H, Vinauger M, Colcombet J, Ephritikhine G, Frachisse J and Maurel C (2000) Anion channels in higher plants: functional characterization, molecular structure and physiological role. *Biochim Biophys Acta.* 1465(1-2): 199-218.
- 16-Barroso** JB, Corpas FJ, Carreras A, Rodríguez-Serrano M, Esteban FJ, Fernández-Ocaña A, Chaki M, Romero-Puertas MC, Valderrama R, Sandalio LM and del Río LA (2006) Localization of S-nitrosoglutathione and expression of S-nitrosoglutathione reductase in pea plants under cadmium stress. *J.Exp.Bot.* 57: 1785-1793.
- 17-Barroso** JB, Corpas FJ, Carreras A, Sandalio LM, Valderrama R, Palma JM, Lupiáñez JA and del Río LA (1999) Localization of nitric-oxide synthase in plant peroxisomes. *J Biol Chem.* 274(51): 36729-33.
- 18-Bartha** B, Kolbert Z and Erdei L (2005) Nitric oxide production induced by heavy metals in *Brassica juncea* L. Czern. and *Pisum sativum* L. *Acta Biol. Szegediensis* 49: 9-12.
- 19-Basu** S, Azarova NA, Michael D, Font MD, King SB, Hogg N, Gladwin MT, Shiva S and Kim-Shapiro DB (2008) Nitrite reductase activity of cytochrome c. *The journal of Biological Chemistry* 283 (47): 32590-32597.
- 20-Baudouin** E, Pieuchot L, Engler G, Pauly N and Puppo A (2006) Nitric oxide is formed in *Medicago truncatula-Sinorhizobium meliloti* functional nodules. *Mol. Plant Microbe Interact.* 19: 970-975.
- 21-Becker** A, Bergès H, Krol E, Bruand C, Rüberg S, Capela D, Lauber E, Meilhoc E, Ampe F, de Bruijn FJ, Fourment J, Francez-Charlot A, Kahn D, Küster H, Liebe C, Pühler A, Weidner S, and Batut J (2004) Global changes in gene expression in *Sinorhizobium meliloti* 1021 under microoxic and symbiotic conditions. *Mol. Plant- Microbe Interact.* 17: 292-303.
- 22-Beers** RJ and Sizer IW (1952) A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.* 195: 133-40.
- 23-Belenghi** B, Romero-Puertas MC, Vercammen D, Brackenier A, Inzé D, Delledonne M and Van Breusegem F (2007) Metacaspase activity of *Arabidopsis thaliana* is regulated by S-nitrosylation of a critical cysteine residue. *J Biol Chem.* 282(2): 1352-8.
- 24-Beligni** M.V., and Lamattina, L. (2000) Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants. *Planta* 210: 215-221.



- 25-Benamar** A, Rolletschek H, Borisjuk L, Avelange-Macherel MH, Curien G, Mostefai HA, Andriantsitohaina R and Macherel D (2008) Nitrite-nitric oxide control of mitochondrial respiration at the frontier of anoxia. *Biochim Biophys Acta* 1777(10): 1268-75.
- 26-Benedito** VA, Li H, Dai X, Wandrey M, He J, Kaundal R, Torres-Jerez I, Karen Gomez S, Harrison MJ, Tang Y, Zhao PX and Udvardi MK (2010) Genomic inventory and transcriptional analysis of *Medicago truncatula* transporters. *Plant Physiol.* 152: 1716-1730.
- 27-Benedito** VA, Torres-Jerez I, Murray JD, Andriankaja A, Allen S, Kakar K, Wandrey M, Verdier J, Zuber H, Ott T, Moreau S, Niebel A, Frickey T, Weiller G, He J, Dai X, Zhao PX, Tang Y and Udvardi MK (2008) A gene expression atlas of the model legume *Medicago truncatula*. *Plant J.* 55(3): 504-13.
- 28-Benhar** M, Forrester MT and Stamler JS (2009) Protein denitrosylation: enzymatic mechanisms and cellular functions. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 10: 721-32.
- 29-Benson** DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J and Wheeler DL (2008) GenBank. *Nucl Acids Res* 36: D25-30.
- 30-Besson-Bard** A and Wendehenne D (2009) NO contributes to cadmium toxicity in *Arabidopsis thaliana* by mediating an iron deprivation response. *Plant Signal Behav.* 4(3): 252-4.
- 31-Besson-Bard** A, Pugin A and Wendehenne D (2008a) New insights into nitric oxide signalling in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 21-39.
- 32-Besson-Bard** A, Courtois C, Gauthier A, Dahan J, Dobrowolska G, Jeandroz S, Pugin A and Wendehenne D (2008b) Nitric oxide in plants: production and cross-talk with  $Ca_2^+$  signalling. *Molecular Plant* 1: 218-228.
- 33-Bethke** PC, Libourel IGL, Reinöhl V and Jones RL (2006) Sodium nitroprusside, cyanide, nitrite, and nitrate break *Arabidopsis* seed dormancy in a nitric oxide-dependent manner. *Planta* 223: 805-812.
- 34-Bethke** PC, Badger MR and Jones RL (2004) Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues. *The Plant Cell* 16: 332-341.
- 35-Bobik** C, Meilhoc E and Batut J (2006) FixJ: a major regulator of the oxygen limitation response and late symbiotic functions of *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol.* 188(13): 4890-902.
- 36-Boeckmann** B, Bairoch A, Apweiler R, Blatter MC, Estreicher A, Gasteiger E, Martin MJ, Michoud K, O'Donovan C, Phan I, Pilbout S and Schneider M (2003) The SWISS-PROT protein knowledge base and its supplement TrEMBL in 2003. *Nucl Acids Res* 31: 365-370.
- 37-Boisson-Dernier** A, Chabaud M, Garcia F, Bécard G, Rosenberg C and Barker DG (2001) *Agrobacterium rhizogene*-transformed roots of *Medicago truncatula* for the study of nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations. *Mol Plant Microbe Interact* 14: 695-700.
- 38-Bonamore** A and Boffi A (2008) Flavohemoglobin: structure and reactivity. *IUBMB Life* 60(1): 19-28.

- 39-Boscari A**, Del Giudice J, Ferrarini A, Venturi L, Zaffini AL, Delledonne M and Puppo A (2012) Expression dynamics of the *Medicago truncatula* transcriptome during the symbiotic interaction with *Sinorhizobium meliloti*: which role for nitric oxide ? *Plant Physiol.* 2012 Nov 7: pp.112.208538.
- 40-Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248–254.
- 41-Bright J**, Desikan R, Hancock JT, Weir IS and Neill SJ (2006) ABA-induced NO generation and stomatal closure in *Arabidopsis* are dependent on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> synthesis. *Plant J.* 45: 113-122.
- 42-Brugière S**, Kowalski S, Ferro M, Seigneurin-Berny D, Miras S, Salvi D, Ravanel S, d'Hérin P, Garin J, Bourguignon J, Joyard J and Rolland N (2004) The hydrophobic proteome of mitochondrial membranes from *Arabidopsis* cell suspensions. *Phytochemistry.* 2004 Jun;65(12):1693-707.
- 43-Brunswick P** and Cresswell CF (1988) Nitrite uptake into intact pea chloroplasts : I. Kinetics and relationship with nitrite assimilation. *Plant Physiol.* 86(2): 378-83.
- 44-Buchanan BB**, Gruisseau W and Jones RL (2000) *Biochemistry and molecular biology of plants.* American Society of Plant Physiologists Rockville, Maryland: p813.
- 45-Cabrera JJ**, Sánchez C, Gates AJ, Bedmar EJ, Mesa S, Richardson DJ and Delgado MJ (2011) The nitric oxide response in plant-associated endosymbiotic bacteria. *Biochem Soc Trans.* 39(6): 1880-5.
- 46-Cai C**, Wang JY, Zhu YG, Shen QR, Li B, Tong YP and Li ZS (2008) Gene structure and expression of the high-affinity nitrate transport system in rice roots. *J Integr Plant Biol.* 50(4): 443-51.
- 47-Cam Y**, Pierre O, Boncompagni E, Hérouart D, Meilhoc E and Bruand C (2012) Nitric oxide (NO) : a key player in the senescence of *Medicago truncatula* root nodules. *New Phytol.* 196(2): 548-60.
- 48-Cantrel C**, Vazquez T, Puyaubert J, Rezé N, Lesch M, Kaiser WM, Dutilleul C, Guillas I, Zachowski A and Baudouin E (2011) Nitric oxide participates in cold-responsive phosphosphingolipid formation and gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.* 189(2): 415-27.
- 49-Carimi F**, Zottini M, Costa A, Cattelan I, De Michele R, Terzi M and Lo Schiavo F (2005) NO signalling in cytokinin-induced programmed cell death. *Plant Cell Environ.* 28: 1171-1178.
- 50-Caro A** and Puntarulo S (1999) Nitric oxide generation by soybean embryonic axes. Possible effect on mitochondrial function. *Free Radic Res.*31: S205-12.
- 51-Cassina AM**, Hodara R, Souza JM, Thomson L, Castro L, Ischiropoulos H, Freeman BA and Radi R (2000) Cytochrome c nitration by peroxynitrite. *J Biol Chem.* 275(28): 21409-15.

- 52-Castello PR**, Woo DK, Ball K, Wojcik J, Liu L and Poyton RO (2008) Oxygen-regulated isoforms of cytochrome c oxidase have differential effects on its nitric oxide production and on hypoxic signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(24): 8203-8.
- 53-Castello PR**, David PS, McClure T, Crook Z and Poyton RO (2006) Mitochondrial cytochrome oxidase produces nitric oxide under hypoxic conditions: implications for oxygen sensing and hypoxic signaling in eukaryotes. *Cell Metab.* 3(4): 277-87.
- 54-Chiu CC**, Lin CS, Hsia AP, Su RC, Lin HL and Tsay YF (2004) Mutation of a nitrate transporter, *AtNRT1:4*, results in a reduced petiole nitrate content and altered leaf development. *Plant Cell Physiol.* 45(9): 1139-48.
- 55-Chopin F**, Orsel M, Dorbe MF, Chardon F, Truong HN, Miller AJ, Krapp A and Daniel-Vedele F (2007) The *Arabidopsis* *ATNRT2.7* nitrate transporter controls nitrate content in seeds. *Plant Cell* 19(5): 1590-602.
- 56-Clarke A**, Desikan R, Hurst RD, Hancock JT and Neill SJ (2000) NO way back: nitric oxide and programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *Plant J.* 24: 667-677.
- 57-Claros M** and Vincens P (1996) Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur. J. Biochem.* 241: 779-786.
- 58-Conrath U**, Amoroso G, Köhle H and Sültemeyer DF (2004) Non-invasive online detection of nitric oxide from plants and some other organisms by mass spectrometry. *Plant J.* 38: 1015-1022.
- 59-Córdoba F**, Cárdenas J and Fernández E (1986) Kinetic Characterization of Nitrite Uptake and Reduction by *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 82(4): 904-8.
- 60-Corpas FJ**, Letierrier M, Valderrama R, Airaki M, Chaki M, Palma JM and Barroso JB (2011) Nitric oxide imbalance provokes a nitrosative response in plants under abiotic stress. *Plant Science* 181: 604-611.
- 61-Corpas FJ**, Barroso JB, Carreras A, Quirós M, León AM, Romero-Puertas MC, Esteban FJ, Valderrama R, Palma JM, Sandalio LM, Gómez M and del Río LA (2004) Cellular and subcellular localization of endogenous nitric oxide in young and senescent pea plants. *Plant Physiol.* 136(1): 2722-33.
- 62-Correa-Aragunde N**, Graziano M, Chevalier C and Lamattina L (2006) Nitric oxide modulates the expression of cell cycle regulatory genes during lateral root formation in tomato. *J. Exp. Bot.* 57: 581-588.
- 63-Correa-Aragunde N**, Graziano M and Lamattina L (2004) Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato. *Planta* 218: 900-905.
- 64-Crisuolo G**, Valkov VT, Parlati A, Alves LM and Chiurazzi M (2012) Molecular characterization of the *Lotus japonicus* *NRT1(PTR)* and *NRT2* families. *Plant Cell Environ.* 35(9): 1567-81.
- 65-Cueto M**, Hernández-Perera O, Martín R, Bentura ML, Rodrigo J, Lamas S and Golvano MP (1996) Presence of nitric oxide synthase activity in roots and nodules of *Lupinus albus*. *FEBS Lett.* 398(2-3): 159-64.

- 66-Damiani I**, Baldacci-Cresp F, Hopkins J, Andrio E, Balzergue S, Lecomte P, Puppo A, Abad P, Favery B and Hérouart D (2012) Plant genes involved in harbouring symbiotic rhizobia or pathogenic nematodes. *New Phytol.* 94(2): 511-22.
- 67-Dean JV** and Harper JE (1988) The conversion of nitrite to nitrogen oxide(s) by the constitutive NAD(P)H-nitrate reductase enzyme from Soybean. *Plant Physiol.* 88(2): 389-95.
- 68-Dean JV** and Harper JE (1986) Nitric oxide and nitrous oxide production by Soybean and Winged Bean during the *in vivo* nitrate reductase assay. *Plant Physiol.* 82(3): 718-23.
- 69-DeAngeli A**, Monachello D, Ephritikhine G, Frachisse JM, Thomine S, Gambale F and Barbier-Brygoo H (2009) CLC-mediated anion transport in plant cells. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 364: 195–201.
- 70-DeAngeli A**, Thomine S, Frachisse JM, Ephritikhine G, Gambale F and Barbier-Brygoo H (2007) Anion channels and transporters in plant cell membranes. *FEBS Lett.* 581(12): 2367-74.
- 71-DeAngeli A**, Monachello D, Ephritikhine G, Frachisse JM, Thomine S and Gambale F (2006) The nitrate / proton antiporter AtCLCa mediates nitrate accumulation in plant vacuoles. *Nature* 442 (7105): 939-42.
- 72-Dechorgnat J**, Patrit O, Krapp A, Fagard M and Daniel-Vedele F (2012) Characterization of the *Nrt2.6* Gene in *Arabidopsis thaliana*: A Link with Plant Response to Biotic and Abiotic Stress. *PLoS One* 7(8): e42491.
- 73-Dechorgnat J**, Nguyen CT, Armengaud P, Jossier M, Diatloff E, Filleur S and Daniel-Vedele F (2011) From the soil to the seeds: the long journey of nitrate in plants. *J Exp Bot.* 62(4): 1349-59.
- 74-del Giudice J**, Cam Y, Damiani I, Fung-Chat F, Meilhoc E, Bruand C, Brouquisse R, Puppo A and Boscari A (2011) Nitric oxide is required for an optimal establishment of the *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium meliloti* symbiosis. *New Phytol.* 191(2): 405-17.
- 75-Delledonne M** (2005) NO news is good news for plants. *Curr Opin Plant Biol.* 8(4): 390-6.
- 76-Delledonne M**, Xia Y, Dixon RA and Lamb C (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* 394(6693): 585-8.
- 77-del Río LA**, Corpas FJ and Barroso JB (2004) Nitric oxide and nitric oxide synthase activity in plants. *Phytochemistry* 65(7): 783-92.
- 78-De Michele R**, Vurro E, Rigo C, Costa A, Elviri L, Di Valentin M, Careri M, Zottini M, Sanità di Toppi L and Lo Schiavo F (2009) Nitric oxide is involved in cadmium-induced programmed cell death in *Arabidopsis* suspension cultures. *Plant Physiol.* 150(1): 217-28.
- 79-de Ruijter NCA**, Verhees J, van Leeuwen W and van der Krol AR (2003) Evaluation and comparison of the GUS, LUC and GFP reporter system for gene expression studies in plants. *Plant Biology* 5(2): 103-115.
- 80-Desikan R**, Cheung MK, Bright J, Henson D, Hancock JT and Neill SJ (2004) ABA, hydrogen peroxide and nitric oxide signalling in stomatal guard cells. *J Exp Bot.* 55(395): 205-12.

- 81-Desikan R, Griffiths R, Hancock J and Neill S (2002)** A new role for an old enzyme: nitrate reductase-mediated nitric oxide generation is required for abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 16314-16318.
- 82-Dordas C, Hasinoff BB, Rivoal J and Hill RD (2004)** Class-1 hemoglobins, nitrate and NO levels in anoxic maize cell-suspension cultures. Planta 219(1): 66-72.
- 83-Dordas C, Hasinoff BB, Igamberdiev AU, Manac'h N, Rivoal J and Hill RD (2003)** Expression of a stress-induced hemoglobin affects NO levels produced by alfalfa root cultures under hypoxic stress. Plant J. 35(6): 763-70.
- 84-Douce R, Bourguignon J, Brouquisse R and Neuburger M (1987)** Isolation of plant mitochondria: general principles and criteria of integrity. Methods in Enzymology 48: 403-415.
- 85-Doyle JJ and Luckow MA (2003)** The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. Plant Physiol 131: 900-910.
- 86-Dubin J, Braun HP, Schmitz U and Colditz F (2011)** The mitochondrial proteome of the model legume *Medicago truncatula*. Biochim Biophys Acta 1814(12): 1658-68.
- 87-Düppe PM, Talbierski PM, Hornig FS, Rauen U, Korth HG, Wille T, Boese R, Omlor T, de Groot H and Sustmann R (2010)** Pyrene-based fluorescent nitric oxide cheletropic traps (FNOCTs) for the detection of nitric oxide in cell cultures and tissues. Chemistry. 16(36): 11121-32.
- 88-Durner J, Wendehenne D and Klessig DF (1998)** Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 10328-10333.
- 89-Elviri L, Speroni F, Careri M, Mangia A, di Toppi LS and Zottini M (2010)** Identification of in vivo nitrosylated phytochelatin in *Arabidopsis thaliana* cells by liquid chromatography-direct electrospray-linear ion trap-mass spectrometry. J Chromatogr A. 1217(25): 4120-6.
- 90-Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S and von Heijne G (2000)** Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. J Mol Biol. 21;300(4):1005-16.
- 91-Eubel H, Lee CP, Kuo J, Meyer EH, Taylor NL and Millar AH (2007)** Free-flow electrophoresis for purification of plant mitochondria by surface charge. Plant J. 52(3): 583-94.
- 92-Fan SC, Lin CS, Hsu PK, Lin SH and Tsay YF (2009)** The *Arabidopsis* nitrate transporter NRT1.7, expressed in phloem, is responsible for source-to-sink remobilization of nitrate. Plant Cell 21(9): 2750-61.
- 93-Fast B, Lindgren P and Götz F (1996)** Cloning, sequencing, and characterization of a gene (*narT*) encoding a transport protein involved in dissimilatory nitrate reduction in *Staphylococcus carnosus*. Arch Microbiol. 166(6): 361-7.
- 94-Faure-Rabasse S, Le Deunff E, Lainé P, Macduff JH and Ourry A (2002)** Effects of nitrate pulses on *BnNRT1* and *BnNRT2* genes: mRNA levels and nitrate influx rates in relation to the duration of N deprivation in *Brassica napus L.* J Exp Bot. 53(375): 1711-21.

- 95-Feng H, Yan M, Fan X, Li B, Shen Q, Miller AJ and Xu G (2011)** Spatial expression and regulation of rice high-affinity nitrate transporters by nitrogen and carbon status. *J Exp Bot.* 62(7): 2319-32.
- 96-Ferrarini A, De Stefano M, Baudouin E, Pucciariello C, Polverari A, Puppo A and Delledonne M (2008)** Expression of *Medicago truncatula* genes responsive to nitric oxide in pathogenic and symbiotic conditions. *Mol. Plant Microbe Interact.* 21: 781-790.
- 97-Ferrario-Méry S, Meyer C and Hodges M (2008)** Chloroplast nitrite uptake is enhanced in *Arabidopsis* PII mutants. *FEBS Lett.* 582(7): 1061-6.
- 98-Floryszak-Wieczorek J, Arasimowicz M, Milczarek G, Jelen H and Jackowiak H (2007)** Only an early nitric oxide burst and the following wave of secondary nitric oxide generation enhanced effective defence responses of pelargonium to a necrotrophic pathogen. *New Phytol.* 175(4): 718-30.
- 99-Foissner I, Wendehenne D, Langebartels C and Durner J (2000)** In vivo imaging of an elicitor-induced nitric oxide burst in tobacco. *Plant J.* 23: 817-824.
- 100-Forde BG (2000)** Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation, *Biochimica et Biophysica Acta* 1465: 219-235.
- 101-Foresi N, Correa-Aragunde N, Parisi G, Calo G, Salerno G and Lamattina L (2010)** Characterization of a nitric oxide synthase from the plant kingdom: NO generation from the green alga *Ostreococcus tauri* is light irradiance and growth phase dependent. *Plant Cell* 22: 3816-3830.
- 102-Foucher F and Kondorosi E (2000)** Cell cycle regulation in the course of nodule organogenesis in *Medicago*. *Plant Mol. Biol.* 43(5-6): 773-86.
- 103-Fraisier V, Dorbe MF and Daniel-Vedele F (2001)** Identification and expression analyses of two genes encoding putative low-affinity nitrate transporters from *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Mol Biol.* 45(2): 181-90.
- 104-Fraisier V, Gojon A, Tillard P and Daniel-Vedele F (2000)** Constitutive expression of a putative high-affinity nitrate transporter in *Nicotiana plumbaginifolia*: evidence for post-transcriptional regulation by a reduced nitrogen source. *Plant J.* 23(4): 489-96.
- 105-Fraysse N, Couderc F and Poinso V (2003)** Surface polysaccharide involvement in establishing the rhizobium-legume symbiosis. *Eur. J. Biochem.* 270: 1365–1380.
- 106-Fröhlich A and Durner J (2011)** The hunt for plant nitric oxide synthase (NOS): is one really needed? *Plant Sci.* 181(4): 401-4.
- 107-Gage DJ (2004)** Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate Legumes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68: 280-300.
- 108-Gage DJ (2002)** Analysis of infection thread development using Gfp- and DsRed-expressing *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 184: 7042–7046.

- 109-Galván A**, Rexach J, Mariscal V and Fernández E (2002) Nitrite transport to the chloroplast in *Chlamydomonas reinhardtii*: molecular evidence for a regulated process. *Journal of Experimental Botany* 53: 845–853.
- 110-Galván A** and Fernández E (2001) Eukaryotic nitrate and nitrite transporters. *Cell. Mol. Life Sci.* 58: 225-233.
- 111-Galván A**, Quesada A and Fernández E (1996) Nitrate and nitrite are transported by different specific transport systems and by a bispecific transporter in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Biological Chemistry* 271(4): 2088-2092.
- 112-Garcês H**, Durzan D and Pedroso MC (2001) Mechanical stress elicits nitric oxide formation and DNA fragmentation in *Arabidopsis thaliana*. *Ann. Bot.* 87: 567-574.
- 113-García-Mata C**, Gay R, Sokolovski S, Hills A, Lamattina L and Blatt MR (2003) Nitric oxide regulates K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> channels in guard cells through a subset of abscisic acid-evoked signaling pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 11116-11121.
- 114-García-Mata C** and Lamattina L (2002) Nitric oxide and abscisic acid cross talk in guard cells. *Plant Physiol.* 128: 790-792.
- 115-García-Mata C** and Lamattina L (2001) Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptative plant responses against drought stress. *Plant Physiol.* 126: 1196-1204.
- 116-Geigenberger P** (2003) Response of plant metabolism to too little oxygen. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 247-256.
- 117-Geurts R**, Fedorova E and Bisseling T (2005) Nod factor signaling genes and their function in the early stages of *Rhizobium* infection. *Current Opinion in Plant Biology* 8: 346-352.
- 118-Ghafourifar P**, Parihar MS, Nazarewicz R, Zenebe WJ and Parihar A (2008) Detection assays for determination of mitochondrial nitric oxide synthase activity; advantages and limitations. *Methods Enzymol.* 440: 317-34.
- 119-Gibbs J** and Greenway H (2003) Mechanisms of anoxia tolerance in plants. I. Growth, survival and anaerobic catabolism. *Functional Plant Biology* 30(353): 1-47.
- 120-Goddard AD**, Moir JW, Richardson DJ and Ferguson SJ (2008) Interdependence of two NarK domains in a fused nitrate/nitrite transporter. *Mol Microbiol.* 70(3): 667-81.
- 121-Gómez-Hernández N**, Reyes-González A, Sánchez C, Mora Y, Delgado MJ and Girard L (2011) Regulation and symbiotic role of nirK and norC expression in *Rhizobium etli*. *Mol Plant Microbe Interact.* 24(2): 233-45.
- 122-Gong YW** and Yuan YJ (2006) Nitric oxide mediates inactivation of glutathione S-transferase in suspension culture of *Taxus cuspidata* during shear stress. *J. Biotechnol.* 123: 185-192.
- 123-Gould KS**, Lamotte O, Klinguer A, Pugin A and Wendehenne D (2003) Nitric oxide production in tobacco leaf cells: a generalized stress response? *Plant Cell Environ.* 26: 1851-1862.
- 124-Gouvêa CMCP**, Souza JF, Magalhães ACN and Martins IS (1997) NO-releasing substances that induce growth elongation in maize root segments. *Plant Growth Regul.* 21: 183-187.

- 125-Gow** AJ, Duran D, Malcolm S and Ischiropoulos H (1996) Effects of peroxynitrite-induced protein modifications on tyrosine phosphorylation and degradation. *FEBS Lett.* 385(1-2):63-6.
- 126-Graziano** M, Beligni MV and Lamattina L (2002) Nitric oxide improves internal iron availability in plants. *Plant Physiol.* 130: 1852-1859.
- 127-Greenway** H and Gibbs J (2003) Mechanisms of anoxia tolerance in plants. II. Energy requirements for maintenance and energy distribution to essential processes. *Functional Plant Biology* 30(353): 999-1036.
- 128-Griffith** OW and Kilbourn RG (1996) Nitric oxide synthase inhibitors: amino acids. *Methods Enzymol.* 268: 375-92.
- 129-Groppa** MD, Rosales EP, Iannone MF and Benavides MP (2008) Nitric oxide, polyamines and Cd-induced phytotoxicity in wheat roots. *Phytochemistry* 69(14): 2609-15.
- 130-Guda** C, Fahy E and Subramaniam S (2004) MITOPRED: A genome-scale method for prediction of nuclear-encoded mitochondrial proteins. *Bioinformatics* 20(11): 1785-94.
- 131-Guo** FQ and Crawford NM (2005) Arabidopsis nitric oxide synthase1 is targeted to mitochondria and protects against oxidative damage and dark-induced senescence. *Plant Cell* 17: 3436-3450.
- 132-Guo** FQ, Okamoto M and Crawford NM (2003) Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. *Science* 302(5642): 100-3.
- 133-Gupta** KJ (2011) Protein S-nitrosylation in plants: photorespiratory metabolism and NO signaling. *Sci Signal.* 4(154): jc1.
- 134-Gupta** KJ, Hebelstrup KH, Mur LA and Igamberdiev AU (2011a) Plant hemoglobins: important players at the crossroads between oxygen and nitric oxide. *FEBS Lett.* 585(24): 3843-9.
- 135-Gupta** KJ, Igamberdiev AU, Manjunatha G, Segu S, Moran JF, Neelawarne B, Bauwe H, Kaiser WM (2011b) The emerging roles of nitric oxide (NO) in plant mitochondria. *Plant Sci.* 181(5): 520-6.
- 136-Gupta** KJ and Igamberdiev AU (2011) The anoxic plant mitochondrion as a nitrite: NO reductase. *Mitochondrion* 11(4): 537-43.
- 137-Gupta** KJ and Kaiser WM (2010) Production and scavenging of nitric oxide by Barley root mitochondria. *Plant Cell Physiol.* 51(4): 576-584.
- 138-Gupta** KJ, Stoimenova M and Kaiser WM (2005) In higher plants, only root mitochondria, but not leaf mitochondria reduce nitrite to NO, *in vitro* and *in situ*. *Journal of Experimental Botany* 56(420): 2601-2609.
- 139-Hachiya** T and Noguchi K (2011) Integrative response of plant mitochondrial electron transport chain to nitrogen source. *Plant Cell Rep* 30: 195-204.
- 140-Haferkamp** I (2007) The diverse members of the mitochondrial carrier family in plants. *FEBS Lett.* 581(12): 2375-9.
- 141-Hanson** MR and Köhler RH (2001) GFP imaging: methodology and application to investigate cellular compartmentation in plants. *J Exp Bot.* 52(356): 529-39.



- 142-Harada** H, Kuromori T, Hirayama T, Shinozaki K and Leigh RA (2004) Quantitative trait loci analysis of nitrate storage in *Arabidopsis* leading to an investigation of the contribution of the anion channel gene, *AtCLC-c*, to variation in nitrate levels. *J Exp Bot.* 55(405): 2005-14.
- 143-Hardy** RWF, Holsten RD, Jackson EK and Burns RC (1968) The acetylene-ethylene assay for N<sub>2</sub> fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiol.* 43(8): 1185-207.
- 144-He** JM, Xu H, She XP, Song XG and Zhao WM (2005) The role and the interrelationship of hydrogen peroxide and nitric oxide in the UV-B-induced stomatal closure in broad bean. *Func. Plant Biol.* 32: 237-247.
- 145-He** Y, Tang RH, Hao Y, Stevens RD, Cook CW, Ahn SM, Jing L, Yang Z, Chen L, Guo F, Fiorani F, Jackson RB, Crawford NM and Pei ZM (2004) Nitric oxide represses the *Arabidopsis* floral transition. *Science* 305: 1968-1971.
- 146-Heazlewood** JL and Millar AH (2005) AMPDB: the *Arabidopsis* Mitochondrial Protein Database. *Nucleic Acids Res.* 33(Database issue): D605-10.
- 147-Heazlewood** JL, Tonti-Filippini JS, Gout AM, Day DA, Whelan J and Millar AH (2004) Experimental analysis of the *Arabidopsis* mitochondrial proteome highlights signaling and regulatory components, provides assessment of targeting prediction programs, and indicates plant-specific mitochondrial proteins. *Plant Cell* 16(1): 241-56.
- 148-Heazlewood** JL, Howell KA, Whelan J and Millar AH (2003) Towards an analysis of the rice mitochondrial proteome. *Plant Physiol.* 132(1):230-42.
- 149-Herold** S and Puppo A (2005) Kinetics and mechanistic studies of the reactions of metleghemoglobin, ferrylleghemoglobin, and nitrosylleghemoglobin with reactive nitrogen species. *J Biol Inorg Chem* 10: 946-957.
- 150-Higgins** CF (2001) ABC transporters: physiology, structure and mechanism--an overview. *Res Microbiol.* 152(3-4): 205-10.
- 151-Hill** RL and Bradshaw RA (1969) Fumarase. *Methods Enzymol.* 13: 91-99.
- 152-Hirokawa** T, Boon-Chieng S and Mitaku S (1998) SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics* 14: 378-379.
- 153-Hirsch** AM, Lum MR and Downie JA (2001) What makes the rhizobia-legume symbiosis so special? *Plant physiology* 127: 1484-1492.
- 154-Hirsch** AM (1999) Role of lectins (and rhizobial exopolysaccharides) in legume nodulation. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2: 320-326.
- 155-Hoffman** K and Stoffel W (1993) TMbase - A database of membrane spanning proteins segments. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 374: 166.
- 156-Holtgreffe** S, Gohlke J, Starmann J, Druce S, Klocke S, Altmann B, Wojtera J, Lindermayr C and Scheibe R (2008) Regulation of plant cytosolic glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase isoforms by thiol modifications. *Physiol Plant.* 133(2): 211-28.

- 157-Hopkins** WG (2003) Introduction to plant physiology. Editions De Boeck Université, Bruxelles: p114-116.
- 158-Horchani** F, Prevot M, Boscari A, Evangelisti E, Meilhoc E, Bruand C, Raymond P, Boncompagni E, Aschi-Smiti S, Puppo A and Brouquisse R (2011) Both plant and bacterial nitrate reductases contribute to nitric oxide production in *Medicago truncatula* nitrogen-fixing nodules. *Plant Physiology* 155(2): 1023–1036.
- 159-Horton** P, Park KJ, Obayashi T and Nakai K (2006) Protein subcellular localization prediction with WoLF PSORT. Proceedings of the 4th Annual Asia Pacific Bioinformatics Conference APBC06, Taipei, Taiwan.: 39-48.
- 160-Hu** X, Neill SJ, Tang Z and Cai W (2005) Nitric oxide mediates gravitropic bending in soybean roots. *Plant Physiol.* 137: 663-670.
- 161-Huang** S, Taylor NL, Narsai R, Eubel H, Whelan J and Millar AH (2009) Experimental analysis of the rice mitochondrial proteome, its biogenesis, and heterogeneity. *Plant Physiol.* 149(2): 719-34.
- 162-Huang** X, Stettmaier K, Michel C, Hutzler P, Mueller MJ and Durner J (2004) Nitric oxide is induced by wounding and influences jasmonic acid signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 218: 938-946.
- 163-Huang** NC, Liu KH, Lo HJ and Tsay YF (1999) Cloning and functional characterization of an *Arabidopsis* nitrate transporter gene that encodes a constitutive component of low-affinity uptake. *Plant Cell* 11(8): 1381-92.
- 164-Huber** SC, Sugiyama T and Akazawa T (1986) Light modulation of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiol.* 82(2): 550–554.
- 165-Hughes** MN (2008) Chemistry of nitric oxide and related species. *Methods in Enzymology* 436 : 3–19.
- 166-Hunt** S, Gaito ST and Layzell DB (1988) Model of gas exchange and diffusion in legume nodules. *Planta* 173(1): 128-141.
- 167-Igamberdiev** AU, Bykova NV and Hill RD (2011) Structural and functional properties of class 1 plant hemoglobins. *IUBMB Life* 63(3): 146-52.
- 168-Igamberdiev** AU, Bykova NV, Shah JK and Hill RD (2010) Anoxic nitric oxide cycling in plants: participating reactions and possible mechanisms. *Physiologia Plantarum* 138: 393–404.
- 169-Igamberdiev** AU and Hill RD (2009) Plant mitochondrial function during anaerobiosis. *Ann Bot.* 103(2): 259-68.
- 170-Igamberdiev** AU, Stoimenova M, Seregélyes C and Hill RD (2006) Class-1 hemoglobin and antioxidant metabolism in alfalfa roots. *Planta* 223(5): 1041-6.
- 171-Igamberdiev** AU, Baron K, Manac'H-Little N, Stoimenova M and Hill RD (2005) The haemoglobin / nitric oxide cycle: involvement in flooding stress and effects on hormone signalling. *Annals of Botany* 96: 557–564.

- 172-Igamberdiev** AU, Seregelyes C, Manac'h N and Hill RD (2004a) NADH-dependent metabolism of nitric oxide in alfalfa root cultures expressing barley haemoglobin. *Planta* 219: 95-102.
- 173-Igamberdiev** AU and Hill RD (2004b) Nitrate, NO and haemoglobin in plant adaptation to hypoxia: an alternative to classic fermentation pathways. *Journal of Experimental Botany* 55 (408): 2473-2482.
- 174-Jones** KM, Kobayashi H, Davies BW, Taga ME and Walker GC (2007) How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model. *Nat. Rev. Microbiol.* 5: 619-633.
- 175-Kanayama** Y, Watanabe I and Yamamoto Y (1990) Inhibition of Nitrogen Fixation in Soybean Plants Supplied with Nitrate I. Nitrite Accumulation and Formation of Nitrosylhemoglobin in Nodules. *Plant Cell Physiol.* 31 (3): 341-346.
- 176-Karimi** M, Inze D and Depicker A (2002) GATEWAY vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci* 7: 193-195.
- 177-Kato** K, Kanahama K and Kanayama Y (2010) Involvement of nitric oxide in the inhibition of nitrogenase activity by nitrate in Lotus root nodules. *J. Plant Physiol.* 167: 238–241.
- 178-Kiba** T, Feria-Bourrellier AB, Lafouge F, Lezhneva L, Boutet-Mercey S, Orsel M, Bréhaut V, Miller A, Daniel-Vedele F, Sakakibara H and Krapp A (2012) The *Arabidopsis* nitrate transporter NRT2.4 plays a double role in roots and shoots of nitrogen-starved plants. *Plant Cell* 24(1): 245-58.
- 179-Koltermann** M, Moroni A, Gazzarini S, Nowara D and Tischner R (2003) Cloning, functional expression and expression studies of the nitrate transporter gene from *Chlorella sorokiniana* (strain 211-8k). *Plant Mol Biol.* 52(4): 855-64.
- 180-Kopyra** M and Gwóźdź, EA (2003) Nitric oxide stimulates seed germination and counteracts the inhibitory effect of heavy metals and salinity on root growth of *Lupinus luteus*. *Plant Physiol. Biochem.* 41: 1011-1017.
- 181-Kotur** Z, Mackenzie N, Ramesh S, Tyerman SD, Kaiser BN and Glass AD (2012) Nitrate transport capacity of the *Arabidopsis thaliana* NRT2 family members and their interactions with AtNAR2.1. *New Phytol.* 194(3): 724-31.
- 182-Kozlov** AV, Staniek K and Nohl H (1999) Nitrite reductase activity is a novel function of mammalian mitochondria. *FEBS Lett.* 454(1-2): 127-30.
- 183-Kretschmar** T, Burla B, Lee Y, Martinoia E and Nagy R (2011) Functions of ABC transporters in plants. *Essays Biochem.* 50(1):145-60.
- 184-Lamattina** L, García-Mata C, Graziano M and Pagnussat G (2003) Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. *Annu Rev Plant Biol.* 54: 109-36.
- 185-Lamed** R, Zeikus JG (1980) Glucose fermentation pathway of *Thermoanaerobium brockii*. *J Bacteriol* 141 : 1251 - 1257.

- 186-Lamotte** O, Courtois C, Dobrowolska G, Besson A, Pugin A and Wendehenne D (2006) Mechanisms of nitric-oxide-induced increase of free cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration in *Nicotiana glauca* cells. *Free Radic. Biol. Med.* 40: 1369-1376.
- 187-Lamotte** O, Gould K, Lecourieux D, Sequeira-LeGrand A, Lebrun-Garcia A, Durner J, Pugin A and Wendehenne D (2004) Analysis of nitric oxide signaling functions in tobacco cells challenged by the elicitor cryptogein. *Plant Physiol.* 135: 516-529.
- 188-Lanteri** ML, Pagnussat GC and Lamattina L (2006) Calcium and calcium-dependent protein kinases are involved in nitric oxide- and auxin-induced adventitious root formation in cucumber. *J. Exp. Bot.* 57: 1341-1351.
- 189-Lauter** FR, Ninnemann O, Bucher M, Riesmeier JW and Frommer WB (1996) Preferential expression of an ammonium transporter and of two putative nitrate transporters in root hairs of tomato. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(15): 8139-44.
- 190-Laxalt** AM, Raho N, Have AT and Lamattina L (2007) Nitric oxide is critical for inducing phosphatidic acid accumulation in xylanase-elicited tomato cells. *J. Biol. Chem.* 282: 21160-21168.
- 191-Layzell** DB and Hunt S (1990) Oxygen and the regulation of nitrogen-fixation in legume nodules. *Physiol. Plant.* 80: 322-327.
- 192-Leach** J, Keyster M, Du Plessis M and Ludidi N (2010) Nitric oxide synthase activity is required for development of functional nodules in soybean. *J Plant Physiol.* 167(18):1584-91.
- 193-Lee** HM, Flores E, Forchhammer K, Herrero A and Tandeau de Marsac N (2000) Phosphorylation of the signal transducer PII protein and an additional effector are required for the PII-mediated regulation of nitrate and nitrite uptake in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Eur. J. Biochem.* 267: 591-600.
- 194-Leitner** M, Vandelle E, Gaupels F, Bellin D and Delledonne M (2009) NO signals in the haze: nitric oxide signalling in plant defence. *Curr Opin Plant Biol.* 12(4): 451-8.
- 195-Leshem** YY and Pinchasov Y (2000) Non-invasive photoacoustic spectroscopic determination of relative endogenous nitric oxide and ethylene content stoichiometry during the ripening of strawberries *Fragaria ananassa* (Duch.) and avocados *Persea americana* (Mill.). *J Exp. Bot.* 51: 1471-1473.
- 196-Leshem** YY and Haramaty E (1996) The characterization and contrasting effects of the nitric oxide free radical in vegetative stress and senescence of *Pisum sativum* Linn. foliage. *J. Plant Physiol.* 148: 258-263.
- 197-Li** JY, Fu YL, Pike SM, Bao J, Tian W, Zhang Y, Chen CZ, Zhang Y, Li HM, Huang J, Li LG, Schroeder JI, Gassmann W and Gong JM (2010) The *Arabidopsis* nitrate transporter NRT1.8 functions in nitrate removal from the xylem sap and mediates cadmium tolerance. *Plant Cell* 22(5): 1633-46.

- 198-Li H**, Cui H, Kundu TK, Alzawahra W and Zweier JL (2008) Nitric oxide production from nitrite occurs primarily in tissues not in the blood: critical role of xanthine oxidase and aldehyde oxidase. *J Biol Chem.* 283(26): 17855-63.
- 199-Li W**, Wang Y, Okamoto M, Crawford NM, Siddiqi MY and Glass AD (2007) Dissection of the *AtNRT2.1:AtNRT2.2* inducible high-affinity nitrate transporter gene cluster. *Plant Physiol.* 143(1): 425-33.
- 200-Li H**, Samouilov A, Liu X and Zweier JL (2001) Characterization of the magnitude and kinetics of xanthine oxidase-catalyzed nitrite reduction. Evaluation of its role in nitric oxide generation in anoxic tissues. *J Biol Chem.* 276(27): 24482-9.
- 201-Lim MH** (2007) Preparation of a copper-based fluorescent probe for nitric oxide and its use in mammalian cultured cells. *Nat Protoc.* 2(2): 408-15.
- 202-Lim MH**, Xu D and Lippard SJ (2006) Visualization of nitric oxide in living cells by a copper-based fluorescent probe. *Nat Chem Biol.* 2(7): 375-80.
- 203-Lin SH**, Kuo HF, Canivenc G, Lin CS, Lepetit M, Hsu PK, Tillard P, Lin HL, Wang YY, Tsai CB, Gojon A and Tsay YF (2008) Mutation of the *Arabidopsis NRT1.5* nitrate transporter causes defective root-to-shoot nitrate transport. *Plant Cell.* 20(9): 2514-28.
- 204-Lin CM**, Koh S, Stacey G, Yu SM, Lin TY and Tsay YF (2000) Cloning and functional characterization of a constitutively expressed nitrate transporter gene, *OsNRT1*, from rice. *Plant Physiol.* 122(2): 379-88.
- 205-Lindermayr C**, Sell S, Müller B, Leister D and Durner J (2010) Redox regulation of the NPR1-TGA1 system of *Arabidopsis thaliana* by nitric oxide. *Plant Cell* 22(8): 2894-907.
- 206-Lindermayr C**, Saalbach G and Durner J (2005) Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 137(3): 921-30.
- 207-Liu KH** and Tsay YF (2003) Switching between the two action modes of the dual-affinity nitrate transporter CHL1 by phosphorylation. *EMBO J.* 22(5): 1005-13.
- 208-Liu KH**, Huang CY and Tsay YF (1999) CHL1 is a dual-affinity nitrate transporter of *Arabidopsis* involved in multiple phases of nitrate uptake. *Plant Cell* 11(5): 865-74.
- 209-Lombardo MC**, Graziano M, Polacco JC and Lamattina L (2006) Nitric oxide functions as a positive regulator of root hair development. *Plant Signal. Behav.* 1: 28-33.
- 210-Mahalingam R**, Jambunathan N, Gunjan SK, Faustin E, Weng H and Ayoubi P (2006) Analysis of oxidative signalling induced by ozone in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ.* 29: 1357-1371.
- 211-Manhart JR** and Wong PP (1980) Nitrate effect on nitrogen fixation (acetylene reduction). Activities of Legume root nodules induced by rhizobia with varied nitrate reductase activities. *Plant Physiol.* 65: 502-505.
- 212-Marmagne A**, Vinauger-Douard M, Monachello D, de Longevialle AF, Charon C, Allot M, Rappaport F, Wollman FA, Barbier-Brygoo H and Ephritikhine G (2007) Two members of the

- Arabidopsis CLC (chloride channel) family, AtCLCe and AtCLCf, are associated with thylakoid and Golgi membranes, respectively. *J Exp Bot.* 58(12): 3385-93.
- 213-Maskall** CS, Gibson JF and Dart PJ (1977) Electron-paramagnetic-resonance studies of leghaemoglobins from soya-bean and cowpea root nodules. Identification of nitrosyl-leghaemoglobin in crude leghaemoglobin preparations. *Biochem J.* 167(2): 435-45.
- 214-Mathieu** C, Moreau S, Frenco P, Puppo A and Davies MJ (1998) Direct detection of radicals in intact soybean nodules: presence of nitric oxide-leghemoglobin complexes. *Free Radic Biol Med.* 24(7-8): 1242-9.
- 215-Matsuda** S, Vert JP, Saigo H, Ueda N, Toh H and Akutsu T (2005) A novel representation of protein sequences for prediction of subcellular location using support vector machines. *Protein Sci.* 14(11): 2804-13.
- 216-Meakin** GE, Bueno E, Jepson B, Bedmar EJ, Richardson DJ and Delgado MJ (2007) The contribution of bacteroidal nitrate and nitrite reduction to the formation of nitrosylleghaemoglobin complexes in soybean root nodules. *Microbiology* 153(Pt 2): 411-9.
- 217-Meilhoc** E, Boscari A, Bruand C, Puppo A and Brouquisse R (2011) Nitric oxide in legume-rhizobium symbiosis. *Plant Sci.* 181(5): 573-81.
- 218-Meilhoc** E, Cam Y, Skapski A and Bruand C (2010) The response to nitric oxide of the nitrogen-fixing symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Mol Plant Microbe Interact.* 23(6): 748-59.
- 219-Mergaert** P, Uchiumi T, Alunni B, Evanno G, Cheron A, Catrice O, Mausset AE, Barloy-Hubler F, Galibert F, Kondorosi A and Kondorosi E (2006) Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the Rhizobium-legume symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 5230-5235.
- 220-Millar** AH, Heazlewood JL, Kristensen BK, Braun HP and Møller IM (2005) The plant mitochondrial proteome. *Trends Plant Sci.* 10(1):36-43.
- 221-Millar** AH, Liddell A and Leaver CJ (2001) Isolation and subfractionation of mitochondria from plants. *Methods Cell Biol.* 65: 53-74.
- 222-Millar** TM, Stevens CR, Benjamin N, Eisenthal R, Harrison R and Blake DR (1998) Xanthine oxidoreductase catalyses the reduction of nitrates and nitrite to nitric oxide under hypoxic conditions. *FEBS Lett.* 427(2): 225-8.
- 223-Millar** AH, Day DA and Bergersen FJ (1995) Microaerobic respiration and oxidative-phosphorylation by soybean nodule mitochondria: implications for nitrogen fixation. *Plant Cell Environ.* 18: 715-726.
- 224-Miller** AJ, Fan X, Orsel M, Smith SJ and Wells DM (2007) Nitrate transport and signalling. *J Exp Bot.* 58(9): 2297-306.
- 225-Minetti** M, Mallozzi C and Di Stasi AM (2002) Peroxynitrite activates kinases of the src family and upregulates tyrosine phosphorylation signaling. *Free Radic Biol Med.* 33(6): 744-54.

- 226-Moche** M, Stremlau S, Hecht L, Göbel C, Feussner I and Stöhr C (2010) Effect of nitrate supply and mycorrhizal inoculation on characteristics of tobacco root plasma membrane vesicles. *Planta* 231(2): 425-36.
- 227-Modolo** LV, Augusto O, Almeida IMG, Pinto-Maglio CAF, Oliveira HC, Seligman K and Salgado I (2006) Decreased arginine and nitrite levels in nitrate reductase-deficient *Arabidopsis thaliana* plants impair nitric oxide synthesis and the hypersensitive response to *Pseudomonas syringae*. *Plant Sci.* 171: 34-40.
- 228-Modolo** LV, Augusto O, Almeida IMG, Magalhaes JR and Salgado I (2005) Nitrite as the major source of nitric oxide production by *Arabidopsis thaliana* in response to *Pseudomonas syringae*. *FEBS Lett.* 579: 3814-3820.
- 229-Modolo** LV, Cunha FQ, Braga MR and Salgado I (2002) Nitric oxide synthase-mediated phytoalexin accumulation in soybean cotyledons in response to the *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* elicitor. *Plant Physiol.* 130(3): 1288-97.
- 230-Moir** JW and Wood NJ (2001) Nitrate and nitrite transport in bacteria. *Cell Mol Life Sci.* 58(2): 215-24.
- 231-Monachello** D, Allot M, Oliva S, Krapp A, Daniel-Vedele F, Barbier-Brygoo H and Ephritikhine G (2009) Two anion transporters AtClCa and AtClCe fulfil interconnecting but not redundant roles in nitrate assimilation pathways. *New Phytol.* 183(1): 88-94.
- 232-Moncada** S, Palmer RM and Higgs EA (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 43(2): 109-42.
- 233-Moreau** M, Lindermayr C, Durner J and Klessig DF (2010) NO synthesis and signalling in plants—where do we stand? *Physiologia Plantarum* 138: 372–383.
- 234-Moreau** M, Lee GI, Wang Y, Crane BR and Klessig DF (2008) AtNOS/AtNOA1 is a functional *Arabidopsis thaliana* cGTPase and not a nitric-oxide synthase. *J Biol Chem.* 283(47): 32957-67.
- 235-Morère-Le Paven** MC, Viau L, Hamon A, Vandecasteele C, Pellizzaro A, Bourdin C, Laffont C, Lapied B, Lepetit M, Frugier F, Legros C and Limami AM (2011) Characterization of a dual-affinity nitrate transporter MtNRT1.3 in the model legume *Medicago truncatula*. *J Exp Bot.* 62(15): 5595-605.
- 236-Mur** LA, Mandon J, Cristescu SM, Harren FJ and Prats E (2011) Methods of nitric oxide detection in plants: a commentary. *Plant Sci.* 181(5): 509-19.
- 237-Mur** LAJ, Santosa IE, Laarhoven LJJ, Holton NJ, Harren FJM and Smith AR (2005) Laser photoacoustic detection allows in planta detection of nitric oxide in tobacco following challenge with avirulent and virulent *Pseudomonas syringae* pathovars. *Plant Physiol.* 138: 1247-1258.
- 238-Murgia** I, Delledonne M and Soave C (2002) Nitric oxide mediates iron-induced ferritin accumulation in *Arabidopsis*. *Plant J.* 30: 521-528.
- 239-Nagano** T (1999) Practical methods for detection of nitric oxide. *Luminescence* 14(6): 283-90.

- 240-Nagata** M, Murakami E, Shimoda Y, Shimoda-Sasakura F, Kucho K, Suzuki A, Abe M, Higashi S and Uchiumi T (2008) Expression of a class 1 hemoglobin gene and production of nitric oxide in response to symbiotic and pathogenic bacteria in *Lotus japonicus*. *Mol Plant Microbe Interact.* 21(9): 1175-83.
- 241-Nathan** C and Xie QW (1994) Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* 78(6): 915-8.
- 242-Navarro** MT, Guerra E, Fernández E and Galván A (2000) Nitrite reductase mutants as an approach to understanding nitrate assimilation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 122(1): 283-90.
- 243-Nakamura** Y, Umemiya Y, Masuda K, Inoue H and Fukumoto M (2007) Molecular cloning and expression analysis of cDNAs encoding a putative *Nrt2* nitrate transporter from peach. *Tree Physiol.* 27(4): 503-10.
- 244-Nazoa** P, Vidmar JJ, Tranbarger TJ, Mouline K, Damiani I, Tillard P, Zhuo D, Glass AD and Touraine B (2003) Regulation of the nitrate transporter gene *AtNRT2.1* in *Arabidopsis thaliana*: responses to nitrate, amino acids and developmental stage. *Plant Mol Biol.* 52(3): 689-703.
- 245-Ninnemann** H and Maier J.(1996) Indications for the occurrence of nitric oxide synthases in fungi and plants and the involvement in photoconidiation of *Neurospora crassa*. *Photochem Photobiol.* 64(2): 393-8.
- 246-Noji** S, Nohno T, Saito T and Taniguchi S (1989) The narK gene product participates in nitrate transport induced in Escherichia coli nitrate-respiring cells. *FEBS Lett.* 252(1-2): 139-43.
- 247-Ogawa** K, Akagawa E, Yamane K, Sun ZW, LaCelle M, Zuber P and Nakano MM (1995) The *nasB* operon and *nasA* gene are required for nitrate/nitrite assimilation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* 177(5): 1409-13.
- 248-O'Hara** GW, Daniel RM, Steele KW (1983) Effects of oxygen on the synthesis, activity and breakdown of the Rhizobium denitrification system. *J. Gen. Microbiol.* 129: 2405–2412.
- 249-Okamoto** M, Kumar A, Li W, Wang Y, Siddiqi MY, Crawford NM and Glass AD (2006) High-affinity nitrate transport in roots of *Arabidopsis* depends on expression of the *NAR2*-like gene *AtNRT3.1*. *Plant Physiol.* 140(3): 1036-46.
- 250-Okamoto** M, Vidmar JJ and Glass AD (2003) Regulation of *NRT1* and *NRT2* gene families of *Arabidopsis thaliana*: responses to nitrate provision. *Plant Cell Physiol.* 44(3): 304-17.
- 251-Oldroyd** GE and Downie JA (2004) Calcium, kinases and nodulation signalling in legumes. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 5: 566-576.
- 252-Oliveros** JC (2007) VENNY: An interactive tool for comparing lists with Venn diagrams. <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>
- 253-Ono** F, Frommer WB and von Wirén N (2000) Coordinated Diurnal Regulation of Low- and High-Affinity Nitrate Transporters in Tomato. *Plant Biol.* 2: 17-23.
- 254-Orozco-Cárdenas** ML and Ryan CA (2002) Nitric oxide negatively modulates wound signaling in tomato plants. *Plant Physiol.* 130: 487-493.



- 255-Ötvös K**, Pasternak TP, Miskolczi P, Domoki M, Dorjgotov D, Szcs A, Bottka S, Dudits D and Fehér A (2005) Nitric oxide is required for, and promotes auxin-mediated activation of, cell division and embryogenic cell formation but does not influence cell cycle progression in alfalfa cell cultures. *Plant J.* 43: 849-860.
- 256-Overton TW**, Justino MC, Li Y, Baptista JM, Melo AM, Cole JA and Saraiva LM (2008) Widespread distribution in pathogenic bacteria of di-iron proteins that repair oxidative and nitrosative damage to iron-sulfur centers. *J Bacteriol.* 190(6): 2004-13.
- 257-Pagnussat GC**, Lanteri ML and Lamattina L (2003) Nitric oxide and cyclic GMP are messengers in the indole acetic acid-induced adventitious rooting process. *Plant Physiol.* 132: 1241-1248.
- 258-Palmieri MC**, Lindermayr C, Bauwe H, Steinhauser C and Durner J (2010) Regulation of plant glycine decarboxylase by s-nitrosylation and glutathionylation. *Plant Physiol.* 152(3): 1514-28.
- 259-Pao SS**, Paulsen IT and Saier MH Jr (1998) Major facilitator superfamily. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62(1):1-34.
- 260-París R**, Lamattina L and Casalongué CA (2007) Nitric-oxide promotes the wound-healing response of potato leaflets. *Plant Physiol. Biochem.* 45: 80-86.
- 261-Pauly N**, Ferrari C, Andrio E, Marino D, Piardi S, Brouquisse R, Baudouin E and Puppo A (2011) MtNOA1/RIF1 modulates *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium meliloti* nodule development without affecting its nitric oxide content. *J Exp Bot.* 62(3): 939-48.
- 262-Pedroso MC**, Magalhaes JR and Durzan D (2000) A nitric oxide burst precedes apoptosis in angiosperm and gymnosperm callus cells and foliar tissues. *J Exp Bot.* 51(347): 1027-36.
- 263-Perazzoli M**, Dominici P, Romero-Puertas MC, Zago E, Zeier J, Sonoda M, Lamb C and Delledonne M (2004) Arabidopsis nonsymbiotic hemoglobin AHb1 modulates nitric oxide bioactivity. *Plant Cell* 16(10): 2785-94.
- 264-Perret X**, Staehelin C, Broughton WJ (2000) Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64: 180–201.
- 265-Pii Y**, Crimi M, Cremonese G, Spena A and Pandolfini T (2007) Auxin and nitric oxide control indeterminate nodule formation. *BMC Plant Biol.* 8(7):21.
- 266-Planchet E**, Gupta KJ, Sonoda M and Kaiser WM (2005) Nitric oxide emission from tobacco leaves and cell suspensions: rate limiting factors and evidence for the involvement of mitochondrial electron transport. *The Plant Journal* 41: 732-743.
- 267-Plett D**, Toubia J, Garnett T, Tester M, Kaiser BN and Baumann U (2010) Dichotomy in the *NRT* gene families of dicots and grass species. *PLoS One.* 5(12): e15289.
- 268-Popp C** and Ott T (2011) Regulation of signal transduction and bacterial infection during root nodule symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology* 14: 458-467.
- 269-Porcelli AM**, Ghelli A, Zanna C, Pinton P, Rizzuto R and Rugolo M (2005) pH difference across the outer mitochondrial membrane measured with a green fluorescent protein mutant. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 326 (4): 799–804.

- 270-Pradet** A and Raymond P (1983) Adenine nucleotide ratios and adenylate energy charge in energy metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 34: 199-224.
- 271-Prado** AM, Porterfield DM and Feijó JA (2004) Nitric oxide is involved in growth regulation and re-orientation of pollen tubes. *Development* 131: 2707-2714.
- 272-Puppo** A, Dimitrijevic L, Rigaud J (1987) O<sub>2</sub> consumption and superoxide dismutase content in purified mitochondria from soybean root nodules. *Plant Science* 50: 3-11.
- 273-Quaggiotti** S, Ruperti B, Borsa P, Destro T and Malagoli M (2003) Expression of a putative high-affinity NO<sub>3</sub><sup>-</sup> transporter and of an H<sup>+</sup>-ATPase in relation to whole plant nitrate transport physiology in two maize genotypes differently responsive to low nitrogen availability. *J Exp Bot.* 54(384): 1023-31.
- 274-Quandt** H, Puhler A and Broer I (1993). Transgenic root nodules of *Vicia hirsuta*: a fast and efficient system for the study of gene expression in indeterminate-type nodules. *Mol Plant Microbe Interact* 6: 699-706.
- 275-Quesada** A, Krapp A, Trueman LJ, Daniel-Vedele F, Fernández E, Forde BG and Caboche M (1997) PCR-identification of a *Nicotiana plumbaginifolia* cDNA homologous to the high-affinity nitrate transporters of the *crnA* family. *Plant Mol Biol.* 34(2): 265-74.
- 276-Quesada** A, Galván A and Fernández E (1994) Identification of nitrate transporter genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J.* 5(3): 407-19.
- 277-Ramírez** S, Moreno R, Zafra O, Castán P, Vallés C and Berenguer J (2000) Two nitrate/nitrite transporters are encoded within the mobilizable plasmid for nitrate respiration of *Thermus thermophilus* HB8. *J Bacteriol.* 182(8): 2179-83.
- 278-Ramírez-Aguilar** SJ, Keuthe M, Rocha M, Fedyaev VV, Kramp K, Gupta KJ, Rasmusson AG, Schulze WX and van Dongen JT (2011) The composition of plant mitochondrial supercomplexes changes with oxygen availability. *J Biol Chem.* 286(50): 43045-53.
- 279-Rexach** J, Fernández E and Galván A (2000) The *Chlamydomonas reinhardtii* *Nar1* gene encodes a chloroplast membrane protein involved in nitrite transport. *The Plant Cell* 12: 1441-1453.
- 280-Rexach** J, Montero B, Fernández E and Galván A (1999) Differential regulation of the high affinity nitrite transport systems III and IV in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biol Chem.* 274(39): 27801-6.
- 281-Ribeiro** EA Jr, Cunha FQ, Tamashiro WM and Martins IS (1999) Growth phase-dependent subcellular localization of nitric oxide synthase in maize cells. *FEBS Lett.* 445(2-3): 283-6.
- 282-Rockel** P, Strube F, Rockel A, Wildt J and Kaiser WM (2002) Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase *in vivo* and *in vitro*. *J Exp Bot.* 53 (366): 103-110.
- 283-Rodríguez-Serrano** M, Romero-Puertas MC, Zabalza A, Corpas FJ, Gómez M, del Río LA and Sandalio LM (2006) Cadmium effect on oxidative metabolism of pea (*Pisum sativum* L.) roots. Imaging of reactive oxygen species and nitric oxide accumulation *in vivo*. *Plant Cell Environ.* 29: 1532-1544.

- 284-Romero-Puertas** MC, Laxa M, Mattè A, Zaninotto F, Finkemeier I, Jones AM, Perazzolli M, Vandelle E, Dietz KJ and Delledonne M (2007) S-nitrosylation of peroxiredoxin II E promotes peroxynitrite-mediated tyrosine nitration. *Plant Cell*. 19(12): 4120-30.
- 285-Rümer** S, Gupta KJ and Kaiser WM (2009) Plant cells oxidize hydroxylamines to NO. *J Exp Bot* 60: 2065–2072.
- 286-Rustérucci** C, Espunya MC, Díaz M, Chabannes M and Martínez MC (2007) S-nitrosogluthione reductase affords protection against pathogens in *Arabidopsis*, both locally and systemically. *Plant Physiol*. 143: 1282-1292.
- 287-Saier** MJ, Tran C and Barabote R (2006) TCDB: the Transporter Classification Database for membrane transport protein analyses and information. *Nucl Acids Res* 1: D181-186.
- 288-Sánchez** C, Gates AJ, Meakin GE, Uchiumi T, Girard L, Richardson DJ, Bedmar EJ and Delgado MJ (2010) Production of nitric oxide and nitrosylhemoglobin complexes in soybean nodules in response to flooding. *Mol Plant Microbe Interact*. 23(5): 702-11.
- 289-Santoni** V, Vinh J, Pflieger D, Sommerer N and Maurel C (2003) A proteomic study reveals novel insights into the diversity of aquaporin forms expressed in the plasma membrane of plant roots. *Biochem. J* 373: 289-296.
- 290-Savvides** SN, Scheiwein M, Bohme CC, Arteel GE, Karplus PA, Becker K and Schirmer RH (2002) Crystal structure of the antioxidant enzyme glutathione reductase inactivated by peroxynitrite. *J Biol Chem*. 277(4): 2779-84.
- 291-Sawada** H, Kuykendall D, and Young JM (2003) Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. *The Journal of General and Applied Microbiology* 49: 155-179.
- 292-Schrammel** A, Gorren AC, Schmidt K, Pfeiffer S and Mayer B (2003) S-nitrosation of glutathione by nitric oxide, peroxynitrite, and ( $\cdot$ )NO/O(2)( $\cdot^-$ ). *Free Radic Biol Med*. 34(8): 1078-88.
- 293-Scherer** GFE and Holk A (2000) NO donors mimic and NO inhibitors inhibit cytokinin action in betalaine accumulation in *Amaranthus caudatus*. *Plant Growth Regul*. 32: 345-350.
- 294-Schmidt** HH and Walter U (1994) NO at work. *Cell* 78(6): 919-25.
- 295-Schuchmann** S, Albrecht D, Heinemann U and von Bohlen und Halbach O (2002) Nitric oxide modulates low-Mg<sup>2+</sup>-induced epileptiform activity in rat hippocampal-entorhinal cortex slices. *Neurobiol Dis*. 11(1): 96-105.
- 296-Segonzac** C, Boyer JC, Ipotesi E, Szponarski W, Tillard P, Touraine B, Sommerer N, Rossignol M and Gibrat R (2007) Nitrate efflux at the root plasma membrane: identification of an *Arabidopsis* excretion transporter. *Plant Cell*. 19(11): 3760-77.
- 297-Serpa** V, Vernal J, Lamattina L, Grotewold E, Cassia R and Terenzi H (2007) Inhibition of AtMYB2 DNA-binding by nitric oxide involves cysteine S-nitrosylation. *Biochem Biophys Res Commun*. 361(4): 1048-53.

- 298-Sharma** V, Noriega CE and Rowe JJ (2006) Involvement of NarK1 and NarK2 proteins in transport of nitrate and nitrite in the denitrifying bacterium *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Appl Environ Microbiol.* 72(1): 695-701.
- 299-Shi** S, Wang G, Wang Y, Zhang L and Zhang L (2005) Protective effect of nitric oxide against oxidative stress under ultraviolet-B radiation. *Nitric Oxide* 13: 1-9.
- 300-Shimoda** Y, Shimoda-Sasakura F, Kucho K, Kanamori N, Nagata M, Suzuki A, Abe M, Higashi S and Uchiumi T (2009) Overexpression of class 1 plant hemoglobin genes enhances symbiotic nitrogen fixation activity between *Mesorhizobium loti* and *Lotus japonicus*. *Plant J.* 57(2): 254-63.
- 301-Shimoda** Y, Nagata M, Suzuki A, Abe M, Sato S, Kato T, Tabata S, Higashi S and Uchiumi T (2005) Symbiotic rhizobium and nitric oxide induce gene expression of non-symbiotic hemoglobin in *Lotus japonicus*. *Plant Cell Physiol.* 46(1): 99-107.
- 302-Simontacchi** M, Jasid S and Puntarulo S (2004) Nitric oxide generation during early germination of sorghum seeds. *Plant Sci.* 167: 839-847.
- 303-Smagghe** BJ, Hoy JA, Percifield R, Kundu S, Hargrove MS, Sarath G, Hilbert JL, Watts RA, Dennis ES, Peacock WJ, Dewilde S, Moens L, Blouin GC, Olson JS and Appleby CA (2009) Review: correlations between oxygen affinity and sequence classifications of plant hemoglobins. *Biopolymers* 91(12): 1083-96.
- 304-Small** I, Peeters N, Legeai F and Lurin C (2004) Predotar: A tool for rapidly screening proteomes for N-terminal targeting sequences. *Proteomics* 4(6):1581-90.
- 305-Smit** G, Kijne JW and Lugtenberg BJ (1989). Roles of flagella, lipopolysaccharide, and a Ca<sup>2+</sup>-dependent cell surface protein in attachment of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* to pea root hair tips. *J.Bacteriol.* 171: 569–572.
- 306-Smit** G, Kijne JW and Lugtenberg BJ (1987) Involvement of both cellulose fibrils and a Ca<sup>2+</sup>-dependent adhesion in the attachment of *Rhizobium leguminosarum* to pea root hair tips. *J.Bacteriol.* 169: 4294–4301.
- 307-Sohaskey** CD and Wayne LG (2003) Role of *narK2X* and *narGHJI* in hypoxic upregulation of nitrate reduction by *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol.* 185(24): 7247-56.
- 308-Song** F and Goodman RM (2001) Activity of nitric oxide is dependent on, but is partially required for function of, salicylic acid in the signaling pathway in tobacco systemic acquired resistance. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14: 1458-1462.
- 309-Srivastava** HS and Ormrod DP (1986) Effects of nitrogen dioxide and nitrate nutrition on nodulation, nitrogenase activity, growth, and nitrogen content of bean. *Plant Physiol.* 81(3): 737-41.
- 310-Starkov** AA and Fiskum G (2001) Myxothiazol induces H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production from mitochondrial respiratory chain. *Biochem Biophys Res Commun* 281(3): 645-50.

- 311-Stephens** BD and Neyra CA (1983) Nitrate and nitrite reduction in relation to nitrogenase activity in soybean nodules and *Rhizobium japonicum* bacteroids. *Plant Physiol.* 71: 731-735.
- 312-Stöhr** C and Stremlau S (2006) Formation and possible roles of nitric oxide in plant roots. *J Exp Bot.* 2006;57(3): 463-70.
- 313-Stöhr** C and Ullrich WR (2002) Generation and possible roles of NO in plant roots and their apoplastic space. *J Exp Bot.* 53(379): 2293-303.
- 314-Stöhr** C, Strube F, Marx G, Ullrich WR and Rockel P (2001) A plasma membrane-bound enzyme of tobacco roots catalyses the formation of nitric oxide from nitrite. *Planta* 212(5-6): 835-41.
- 315-Stoimenova** M, Igamberdiev AU, Gupta KJ and Hill RD (2007) Nitrite-driven anaerobic ATP synthesis in barley and rice root mitochondria. *Planta* 226: 465-474.
- 316-Steeter** JG (1982) Synthesis and accumulation of nitrite in Soybean nodules supplied with nitrate. *Plant Physiol.* 69: 1429-1434.
- 317-Sturms** R, DiSpirito AA and Hargrove MS (2011) Plant and cyanobacterial hemoglobins reduce nitrite to nitric oxide under anoxic conditions. *Biochemistry* 50(19): 3873–3878.
- 318-Sowa** AW, Duff SM, Guy PA and Hill RD (1998) Altering hemoglobin levels changes energy status in maize cells under hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(17): 10317-21.
- 319-Sugiura** M, Georgescu MN and Takahashi M (2007) A nitrite transporter associated with nitrite uptake by higher plant chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 48(7): 1022–1035.
- 320-Szczyglowski** K, Kapranov P, Hamburger D and de Bruijn FJ (1998) The *Lotus japonicus* *LjNOD70* nodulin gene encodes a protein with similarities to transporters. *Plant Molecular Biology* 37: 651–661.
- 321-Tada** Y, Spoel SH, Pajerowska-Mukhtar K, Mou Z, Song J, Wang C, Zuo J and Dong X (2008) Plant immunity requires conformational changes [corrected] of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. *Science* 321(5891): 952-6.
- 322-Tada** Y, Mori T, Shinogi T, Yao N, Takahashi S, Betsuyaku S, Sakamoto M, Park P, Nakayashiki H, Tosa Y and Mayama S (2004) Nitric oxide and reactive oxygen species do not elicit hypersensitive cell death but induce apoptosis in the adjacent cells during the defense response of oat. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 17: 245-253.
- 323-Taylor** ER, Nie XZ, MacGregor AW and Hill RD (1994) A cereal haemoglobin gene is expressed in seed and root tissues under anaerobic conditions. *Plant Mol. Biol.* 24(6): 853-62.
- 324-Thimm** O, Bläsing O, Gibon Y, Nagel A, Meyer S, Krüger P, Selbig J, Müller LA, Rhee SY and Stitt M (2004) MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *Plant J.* 37(6): 914-39.
- 325-Timmers** AC, Auriac MC and Truchet G (1999) Refined analysis of early symbiotic steps of the *Rhizobium-Medicago* interaction in relationship with microtubular cytoskeleton rearrangements. *Development* 126: 3617–3628.

- 326-Tischner** R, Planchet E, Kaiser WM (2004) Mitochondrial electron transport as a source for nitric oxide in the unicellular green alga *Chlorella sorokiniana*. *FEBS Letters* 576: 151-155.
- 327-Tong** Y, Zhou JJ, Li Z and Miller AJ (2005) A two-component high-affinity nitrate uptake system in barley. *Plant J.* 41(3): 442-50.
- 328-Torres** MJ, Bueno E, Mesa S, Bedmar EJ and Delgado MJ (2011) Emerging complexity in the denitrification regulatory network of *Bradyrhizobium japonicum*. *Biochem Soc Trans.* 39(1): 284-8.
- 329-Trinchant** JC and Rigaud J (1987). Acetylene reduction by bacteroids isolated from stem nodules of *Sesbania rostrata*. Specific role of lactate as an energy-yielding substrate. *J. Gen. Microbiol* 133: 37-43.
- 330-Trinchant** JC and Rigaud J (1982) Nitrite and nitric oxide as inhibitors of nitrogenase from soybean bacteroids. *Appl Environ Microbiol.* 44(6): 1385-8.
- 331-Trueman** LJ, Richardson A and Forde BG (1996) Molecular cloning of higher plant homologues of the high-affinity nitrate transporters of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Aspergillus nidulans*. *Gene* 175(1-2): 223-31.
- 332-Tsay** YF, Chiu CC, Tsai CB, Ho CH and Hsu PK (2007) Nitrate transporters and peptide transporters. *FEBS Letters* 581: 2290-2300.
- 333-Tsay** YF, Schroeder JI, Feldmann KA and Crawford NM (1993) The herbicide sensitivity gene *CHL1* of *Arabidopsis* encodes a nitrate-inducible nitrate transporter. *Cell.* 72(5): 705-13.
- 334-Tsujimoto** R, Yamazaki H, Maeda S and Omata T (2007) Distinct roles of nitrate and nitrite in regulation of expression of the nitrate transport genes in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Cell Physiol.* 48(3): 484-97.
- 335-Tun** NN, Santa-Catarina C, Begum T, Silveira V, Handro W, Floh EIS and Scherer GFE (2006) Polyamines induce rapid biosynthesis of nitric oxide (NO) in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Cell Physiol* 47: 346–354.
- 336-Tun** NN, Holk A and Scherer GF (2001) Rapid increase of NO release in plant cell cultures induced by cytokinin. *FEBS Lett.* 509(2): 174-6.
- 337-Tusnady** GE and Simon I (2001) The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics* 17: 849-850.
- 338-Udvardi** MK and Day DA (1997) Metabolite transport across symbiotic membranes of Legume nodules. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 493–523.
- 339-Unkles** SE, Hawker KL, Grieve C, Campbell EI, Montague P and Kinghorn JR (1991) *crnA* encodes a nitrate transporter in *Aspergillus nidulans*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88(1): 204-8.
- 340-Vance** CP (2001) Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition. *Plant nutrition in a world of declining renewable resources.* *Plant Physiol.* 127(2): 390-7.

- 341-Vandana S**, Sustmann R, Rauen U and Stöhr C (2012) FNOCT as a fluorescent probe for in vivo localization of nitric oxide distribution in tobacco roots. *Plant Physiol Biochem. Plant Physiol Biochem.* 59:80-9.
- 342-Vandelle E** and Delledonne M (2011) Peroxynitrite formation and function in plants. *Plant Science* 181: 534-539.
- 343-Vandelle E** and Delledonne M (2008) Methods for nitric oxide detection during plant-pathogen interactions. *Methods Enzymol.* 437: 575-94.
- 344-Vandelle E**, Poinssot B, Wendehenne D, Bentéjac M and Pugin A (2006) Integrated signaling network involving calcium, nitric oxide, and active oxygen species but not mitogen-activated protein kinases in BcPG1-elicited grapevine defenses. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19: 429-440.
- 345-Velikova V**, Pinelli P, Pasqualini S, Reale L, Ferranti F and Loreto F (2005) Isoprene decreases the concentration of nitric oxide in leaves exposed to elevated ozone. *New Phytol.* 166: 419-426.
- 346-Vidmar JJ**, Zhuo D, Siddiqi MY and Glass AD (2000) Isolation and characterization of *HvNRT2.3* and *HvNRT2.4*, cDNAs encoding high-affinity nitrate transporters from roots of barley. *Plant Physiol.* 122(3): 783-92.
- 347-Vincill ED**, Szczyglowski K and Roberts DM (2005) GmN70 and LjN70. Anion transporters of the symbiosome membrane of nodules with a transport preference for nitrate. *Plant Physiology* 137: 1435–1444.
- 348-Vitecek J**, Reinohl V and Jones RL (2008) Measuring NO production by plant tissues and suspension cultured cells. *Mol Plant* 1(2): 270-84.
- 349-von der Fecht-Bartenbach J**, Bogner M, Dynowski M and Ludewig U (2010) CLC-b-mediated NO<sup>3</sup>/H<sup>+</sup> exchange across the tonoplast of Arabidopsis vacuoles. *Plant Cell Physiol.* 51(6): 960-8.
- 350-Wandrey M**, Trevaskis B, Brewin N and Udvardi MK (2004) Molecular and cell biology of a family of voltage-dependent anion channel porins in *Lotus japonicus*. *Plant Physiol.* 134(1): 182-93.
- 351-Wang YQ**, Feechan A, Yun BW, Shafiei R, Hofmann A, Taylor P, Xue P, Yang FQ, Xie ZS, Pallas JA, Chu CC and Loake GJ (2009) S-nitrosylation of AtSABP3 antagonizes the expression of plant immunity. *J Biol Chem.* 284(4): 2131-7.
- 352-Wang JW**, Zheng LP, Wu JY and Tan RX (2006) Involvement of nitric oxide in oxidative burst, phenylalanine ammonia-lyase activation and taxol production induced by low-energy ultrasound in *Taxus yunnanensis* cell suspension cultures. *Nitric Oxide* 15: 351-358.
- 353-Wawer I**, Bucholc M, Astier J, Anielska-Mazur A, Dahan J, Kulik A, Wysłouch-Cieszyńska A, Zareba-Kozioł M, Krzywinska E, Dadlez M, Dobrowolska G and Wendehenne D (2010) Regulation of *Nicotiana tabacum* osmotic stress-activated protein kinase and its cellular partner GAPDH by nitric oxide in response to salinity. *Biochem J.* 429(1): 73-83.

- 354-Wege S, Jossier M, Filleur S, Thomine S, Barbier-Brygoo H, Gambale F and De Angeli A (2010)** The proline 160 in the selectivity filter of the Arabidopsis NO<sub>3</sub><sup>(-)</sup>/H<sup>(+)</sup> exchanger AtCLCa is essential for nitrate accumulation *in planta*. *Plant J.* 63(5): 861-9.
- 355-Wendehenne D, Durner J and Klessig DF (2004)** Nitric oxide: a new player in plant signalling and defense responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7: 449-55.
- 356-Wendehenne D, Pugin A, Klessig DF and Durner J (2001)** Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. *TRENDS in Plant Science* 6(4): 177-183.
- 357-Werhahn W, Niemeyer A, Jansch L, Kruff V, Schmitz UK and Braun H (2001)** Purification and characterization of the preprotein translocase of the outer mitochondrial membrane from Arabidopsis. Identification of multiple forms of TOM20. *Plant Physiol.* 125(2): 943-54.
- 358-White J, Prell J, James EK and Poole P (2007)** Nutrient sharing between symbionts. *Plant Physiol.* 144(2): 604-14.
- 359-Wilson I, Neill SJ and Hancock JT (2008)** Nitric oxide synthesis and signalling in plants. *Plant, Cell and Environment* 31: 622–631.
- 360-Wisniewski JR, Zougman A, Nagaraj N and Mann M (2009)** Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nature Methods* 6: 359-362.
- 361-Wittenberg JB (1974)** Facilitated oxygen diffusion. The role of leghemoglobin in nitrogen fixation by bacteroids isolated from soybean root nodules. *J Biol Chem* 249: 4057-4066.
- 362-Wood NJ, Alizadeh T, Richardson DJ, Ferguson SJ and Moir JW (2002)** Two domains of a dual-function NarK protein are required for nitrate uptake, the first step of denitrification in *Paracoccus pantotrophus*. *Mol Microbiol.* 44(1): 157-70.
- 363-Wu Q and Stewart V (1998)** NasFED proteins mediate assimilatory nitrate and nitrite transport in *Klebsiella oxytoca* (pneumoniae) M5al. *J Bacteriol.* 180(5): 1311-22.
- 364-Xing H, Tan L, An L, Zhao Z, Wang S and Zhang C (2004)** Evidence for the involvement of nitric oxide and reactive oxygen species in osmotic stress tolerance of wheat seedlings: Inverse correlation between leaf abscisic acid accumulation and leaf water loss. *Plant Growth Regul.* 42: 61-68.
- 365-Xiong J, Fu G, Yang Y, Zhu C and Tao L (2012)** Tungstate: is it really a specific nitrate reductase inhibitor in plant nitric oxide research? *J Exp Bot.* 63(1): 33-41.
- 366-Yamamoto A, Katou S, Yoshioka H, Doke N and Kawakita K (2004)** Involvement of nitric oxide generation in hypersensitive cell death induced by elicitor in tobacco cell suspension culture. *J. Gen. Plant Pathol.* 70: 85-92.
- 367-Yamasaki H and Cohen MF (2006)** NO signal at the crossroads: polyamine-induced nitric oxide synthesis in plants? *Trends Plant Sci.* 11(11): 522-4.
- 368-Yamasaki H (2000)** Nitrite-dependent nitric oxide production pathway: implications for involvement of active nitrogen species in photoinhibition *in vivo*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 355(1402): 1477-88.



- 369-Yang X**, Sun F, Xiong A, Wang F, Kong M, Wang Q, Wang J, Dai W, Xia X and Hou X (2012) BcNRT1, a plasma membrane-localized nitrate transporter from non-heading Chinese cabbage. *Mol Biol Rep.* 39(8): 7997-8006.
- 370-Yin LP**, Li P, Wen B, Taylor D and Berry JO (2007) Characterization and expression of a high-affinity nitrate system transporter gene (*TaNRT2.1*) from wheat roots, and its evolutionary relationship to other *NTR2* genes. *Plant Science* 172: 621-631.
- 371-Yokoyama T**, Kodama N, Aoshima H, Izu H, Matsushita K and Yamada M (2001) Cloning of a cDNA for a constitutive NRT1 transporter from soybean and comparison of gene expression of soybean NRT1 transporters. *Biochim Biophys Acta* 1518(1-2): 79-86.
- 372-Yong Z**, Kotur Z and Glass AD (2010) Characterization of an intact two-component high-affinity nitrate transporter from *Arabidopsis* roots. *Plant J.* 63(5): 739-48.
- 373-Zancani M**, Peresson C, Biroccio A, Federici G, Urbani A, Murgia I, Soave C, Micali F, Vianello A and Macrì F (2004) Evidence for the presence of ferritin in plant mitochondria. *Eur J Biochem.* 271(18): 3657-64.
- 374-Zeidler D**, Zähringer U, Gerber I, Dubery I, Hartung T, Bors W, Hutzler P and Durner J (2004) Innate immunity in *Arabidopsis thaliana*: lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 15811-15816.
- 375-Zhang A**, Jiang M, Zhang J, Ding H, Xu S, Hu X and Tan M (2007) Nitric oxide induced by hydrogen peroxide mediates abscisic acid-induced activation of the mitogen-activated protein kinase cascade involved in antioxidant defense in maize leaves. *New Phytol.* 175: 36-50.
- 376-Zhang L**, Wang Y, Zhao L, Shi S and Zhang L (2006a) Involvement of nitric oxide in light-mediated greening of barley seedlings. *J. Plant Physiol.* 163: 818-826.
- 377-Zhang Y**, Wang L, Liu Y, Zhang Q, Wei Q and Zhang W (2006b) Nitric oxide enhances salt tolerance in maize seedlings through increasing activities of proton-pump and  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiport in the tonoplast. *Planta* 224: 545-555.
- 378-Zhang X**, Chi R, Zou J and Zhang HS (2004) Development of a novel fluorescent probe for nitric oxide detection: 8-(3',4'-diaminophenyl)-difluoroboradiazas-indacene. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 60(13): 3129-34.
- 379-Zhang M**, An L, Feng H, Chen T, Chen K, Liu Y, Tang H, Chang J and Wang X (2003a) The cascade mechanisms of nitric oxide as a second messenger of ultraviolet B in inhibiting mesocotyl elongations. *Phytochem. Phytobiol.* 77: 219-225.
- 380-Zhang C**, Czymbek KJ and Shapiro AD (2003b) Nitric oxide does not trigger early programmed cell death events but may contribute to cell-to-cell signaling governing progression of the *Arabidopsis* hypersensitive response. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 16: 962-972.
- 381-Zhang X**, Kim WK, Hatcher N, Potgieter K, Moroz LL, Gillette R, Sweedler V (2002) Interfering with nitric oxide measurements. 4,5-diaminofluorescein reacts with dehydroascorbic acid and ascorbic acid. *J Biol Chem* 277: 48472-48478.

- 382-Zhao L, He J, Wang X and Zhang L (2008)** Nitric oxide protects against polyethylene glycol-induced oxidative damage in two ecotypes of reed suspension cultures. *J Plant Physiol.* 165(2):182-91.
- 383-Zhao L, Zhang F, Guo J, Yang Y, Li B and Zhang L (2004)** Nitric oxide functions as a signal in salt resistance in the calluses from two ecotypes of reed. *Plant Physiol.* 134: 849-857.
- 384-Zhou B, Guo Z, Xing J and Huang B (2005)** Nitric oxide is involved in abscisic acid-induced antioxidant activities in *Stylosanthes guianensis*. *J. Exp. Bot.* 56: 3223-3228.
- 385-Zhou JJ, Fernández E, Galván A and Miller AJ (2000)** A high affinity nitrate transport system from *Chlamydomonas* requires two gene products. *FEBS Lett.* 466(2-3): 225-7.
- 386-Zhou JJ, Theodoulou FL, Muldin I, Ingemarsson B and Miller AJ (1998)** Cloning and functional characterization of a *Brassica napus* transporter that is able to transport nitrate and histidine. *J Biol Chem.* 273(20): 12017-23.
- 387-Zhu H, Choi HK, Cook DR and Shoemaker RC (2005)** Bridging model and crop legumes through comparative genomics. *Plant Physiol.* 137(4): 1189-96.
- 388-Zottini M, Costa A, De Michele R, Ruzzene M, Carimi F and Lo Schiavo F (2007)** Salicylic acid activates nitric oxide synthesis in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 58: 1397-1405.
- 389-Zumft WG (1997)** Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol Mol Biol Rev.* 61(4): 533-616.

**Annexe 1:** Protéines ayant une fonction dans le transport, identifiées par spectrométrie de masse (MS).  
 IMGAG : "International Medicago Genome Annotation Group", M1: analyse MS1, M2: analyse MS2,  
 M3: analyse MS3 avec A: injection 1 et B: injection 2, MW: poids moléculaire en kiloDaltons (kDa).  
 L'étoile indique que la protéine a été détectée dans une autre analyse MS avec un score inférieur à 60.

Annotation	Code gène IMGAG v3.5	MW	Score Mascot	Couverture	Identification
		[kDa]		de la séquence	
				(%)	de la protéine
Mitochondrial ADP/ATP carrier proteins	IMGA contig_52798_1.1	42,2	1629,0-2040,0	43,7-47,5	M1-M2-M3A-M3B
ATP synthase subunit alpha	IMGA Medtr1g005600.1	93,2	1809,1-1903,8	30,2	M3A-M3B
ADP,ATP carrier protein	IMGA Medtr8g036880.1	43,3	1521,0-1913,1	42,6-46,4	M1-M2-M3A-M3B
Phosphate carrier protein	IMGA Medtr7g083790.1	39,5	1342,0-1792,6	42,0-45,3	M1-M2-M3A-M3B
Porin/voltage-dependent anion-selective channel protein	IMGA contig_59684_1.1	30,0	1355,0-1605,7	62,0-66,2	M1-M2-M3A-M3B
Outer plastidial membrane protein porin	IMGA Medtr7g009330.1	29,6	1435,0-1571,3	76,1-79,8	M1-M2-M3A-M3B
Mitochondrial ADP/ATP carrier proteins	IMGA contig_53402_1.1	39,8	1240,3-1510,8	38,0-48,8	M1-M2-M3A-M3B
ABC transporter family pleiotropic drug resistance protein	IMGA Medtr8g014360.1	165,1	348,0-1367,5	4,0-18,0	M1-M2-M3A-M3B
Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein	IMGA Medtr8g086070.1	32,2	1099,4-1384,0	54,5-69,0	M1-M2-M3A-M3B
Mitochondrial import receptor subunit TOM40 homolog	IMGA Medtr8g106010.1	34,1	1228,2-1351,3	63,8-66,4	M1-M2-M3A-M3B
ABC superfamily ATP binding cassette transporter ABC protein	IMGA Medtr5g075960.1	162,1	550,0-1378,0	10,0-16,7	M1-M2-M3A-M3B
Mitochondrial outer membrane protein porin	IMGA Medtr5g015580.1	29,5	1107,2-1261,2	50,0-58,0	M1-M2-M3A-M3B
Calcium transporting ATPase	IMGA contig_49162_1.1	118,9	349,0-1063,3	6,0-19,0	M1-M2-M3A-M3B
Mitochondrial outer membrane protein porin	IMGA Medtr4g128300.1	30,0	535,0-1004,4	30,0-54,5	M1-M2-M3A-M3B
ABC transporter D family member	IMGA Medtr3g087350.1	152,5	73,0-1004,3	2,0-19,2	M1-M2-M3A-M3B
ADP,ATP carrier protein	IMGA Medtr2g098070.1	39,3	825,1-1005,9	27,9-32,0	M2-M3A-M3B
Mechanosensitive ion channel domain-containing protein / MS ion channel domain-containing protein	IMGA Medtr7g038120.1	59,4	221,0-903,5	12,0-29,4	M1-M2-M3A-M3B
Porin/voltage-dependent anion-selective channel protein	IMGA contig_83622_1.1	29,5	699,0-897	34,1-43,0	M1-M2-M3A-M3B
ABC transporter C family member	IMGA Medtr2g019020.1	191,5	683,1-739,1	9,3-14,1	M2-M3A-M3B*
Mitochondrial carrier-like protein	IMGA contig_162873_2.1	19,2	477,0-677,5	52,0-60,6	M1-M2-M3A-M3B
Cbs domain protein	IMGA Medtr5g076080.1	28,1	596,4-822,0	39,4-46,0	M1-M2-M3A-M3B

**Annexe 1: suite.**

<b>Annotation</b>	<b>Code gène IMGAG v3.5</b>	<b>MW [kDa]</b>	<b>Score Mascot</b>	<b>Couverture de la séquence (%)</b>	<b>Identification de la protéine</b>
Mitochondrial carnitine/acylcarnitine carrier-like protein	IMGA Medtr5g030530.1	30,7	599,1-748,7	38,0-44,1	M1-M2-M3A-M3B
Mitochondrial carrier-like protein	IMGA contig_162873_3.1	24,2	351,0-611,7	25,0-45,1	M1-M2-M3A-M3B
Aquaporin protein PIP11	IMGA Medtr3g070210.1	31,0	437,0-599,6	25,0-25,5	M1-M2-M3A-M3B
Aquaporin PIP2-7	IMGA Medtr2g094270.1	30,8	496,9-598,0	24,0-25,0	M1-M2-M3A-M3B
Mitochondrial outer membrane protein porin	IMGA Medtr1g018050.1	63,2	431,0-527,3	13,9-19,0	M1-M2-M3A-M3B
Aquaporin PIP2-7	IMGA Medtr4g059390.1	30,5	454,9-509,4	20,7-27,7	M1-M2-M3A-M3B
Calcium-binding mitochondrial carrier protein SCaMC-1	IMGA Medtr3g098460.1	54,0	186,0-877,2	10,0-29,6	M1-M2-M3A-M3B
Mitochondrial phosphate carrier protein	IMGA Medtr8g099910.1	38,4	350,3-502,9	19,8-20,0	M2-M3A-M3B
Peroxisomal adenine nucleotide transporter	IMGA Medtr5g039730.1	34,9	502,5-572-6	21,4-29,6	M3A-M3B
Mitochondrial import receptor subunit TOM20	IMGA Medtr3g085410.1	22,5	178,0-589,3	21,0-47,8	M1-M2-M3A-M3B
Mitochondrial carrier protein	IMGA contig_165429_1.1	23,4	278,0-425,6	26,0-36,0	M1-M2-M3A-M3B
Aquaporin PIP11	IMGA Medtr5g082070.1	30,9	337,0-452,0	25,0-27,0	M1-M2-M3A-M3B
Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim17	IMGA contig_66276_1.1	22,0	220,2-396,4	18,1-38,6	M1-M2-M3A-M3B
Mitochondrial import receptor subunit TOM20	IMGA contig_65188_1.1	25,9	288,0-499,0	26,7-37,5	M1-M2-M3A-M3B
ABC transporter G family member	IMGA contig_64080_1.1	151,8	266,8-386,7	4,4-4,7	M2-M3A-M3B
Protein transport protein Sec61 subunit alpha	IMGA Medtr8g058330.1	52,2	128,0-386,4	4,0-9,2	M1-M2-M3A-M3B
Translocase of inner mitochondrial membrane TIM23	IMGA Medtr2g099550.1	19,9	243,0-390,7	27,0-37,2	M1-M2-M3A-M3B
Metaxin-2	IMGA Medtr2g036910.1	36,9	162,0-412,4	10,0-24,5	M1-M2-M3A-M3B
Mitochondrial carrier protein	IMGA contig_84308_1.1	30,7	246,0-414,9	16,0-33,3	M1-M2-M3A-M3B
Calcium-binding mitochondrial carrier protein SCaMC-1-B	IMGA Medtr5g009500.1	42,3	213,0-360,7	13,0-22,9	M1-M2-M3A-M3B
Protein transport protein Sec61 beta subunit	IMGA Medtr2g093770.1	10,7	42,0-323,6	44,9-55,1	M2-M3A-M3B*
Translocon-associated protein subunit beta	IMGA Medtr7g083560.1	21,0	230,0-319,5	26,3-27,3	M1-M2-M3A-M3B
Mitochondrial import receptor subunit TOM22 homolog	IMGA contig_16246_1.1	10,2	168,0-359,3	46,0-60,0	M1-M2-M3A-M3B

**Annexe 1: suite.**

Annotation	Code gène IMGAG v3.5	MW	Score Mascot	Couverture	Identification
		[kDa]		de la séquence	
Mitochondrial carrier protein	IMGA contig_164436_1.1	17,4	294,0-313,9	35,0-36,6	M1-M2-M3A-M3B
Tumor suppressor candidate					M1-M2-M3A-
/magnesium transporter, oligosaccharyl transferase complex, signal (SP)	IMGA contig_58844_1.1	38,6	75,8-273,4	5,2-17,8	M3B
Mitochondrial carrier family protein	IMGA contig_83077_1.1	55,0	131,0-488,6	4,0-22,1	M1-M2-M3A-M3B
Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM44	IMGA Medtr2g083690.1	52,6	212,0-367,1	8,0-19,4	M1-M2-M3A-M3B
Arsenite translocating ATPase-like protein	IMGA contig_57290_2.1	12,0	173,7-262,7	38,0	M3A-M3B
Peroxisomal membrane carrier protein	IMGA contig_59632_1.1	29,3	205,6-251	14,7-18,8	M3A-M3B
Mitochondrial import receptor subunit TOM20	IMGA contig_166828_1.1	11,0	185,0-254	37,0-37,9	M1-M2-M3A-M3B
Mitochondrial substrate carrier family protein W	IMGA Medtr5g055410.1	38,2	244,8-278,4	14,7-18,6	M2-M3A-M3B
YSL transporter	IMGA Medtr3g092090.1	92,9	153,0-259,6	3,0-7,8	M1-M2-M3A-M3B
Multidrug resistance protein ABC transporter family	IMGA Medtr8g061970.1	167,5	152,7-227,7	2,5-3,7	M2-M3A-M3B
Copper transporter	IMGA Medtr3g105330.1	15,6	109,0-222,8	19,0-26,6	M1-M2-M3A-M3B
Glucose-6-phosphate/phosphate-translocator	IMGA Medtr3g049400.1	43,6	154,0-219,3	8,0-10,7	M1-M2-M3A-M3B
Translocon-associated protein subunit alpha	IMGA Medtr3g117740.1	28,1	209,8-224,0	13,6-22,1	M1-M2-M3A-M3B
Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM50	IMGA Medtr5g095530.1	42,1	196,8-273,5	13,6-17,0	M1-M2-M3A-M3B
V-type H(+)-translocating pyrophosphatase	IMGA contig_96979_1.1	36,0	123,7-183,2	6,6-9,6	M3A-M3B
Potassium-transporting ATPase B chain	IMGA contig_63388_2.1	16,4	64,8-181,9	10,0-21,3	M2-M3A-M3B
Mitochondrial carrier protein	IMGA contig_52393_1.1	32,8	63,0-180,4	8,0-12,5	M1-M2-M3A-M3B
TIM21-like protein mitochondrial	IMGA contig_129437_1.1	21,4	169,4-194,3	17,0-21,1	M1-M2-M3A-M3B
Mitochondrial carrier protein	IMGA contig_116722_1.1	23,8	111,0-174,4	11,0-11,1	M1-M2-M3A-M3B
Calcium-transporting ATPase	IMGA contig_58655_1.1	64,4	154,7-166,3	6,8	M3A-M3B*
Mitochondrial carrier protein	IMGA contig_167298_1.1	21,9	66,0-232,3	5,0-26,1	M1-M2-M3A-M3B
Mitochondrial carrier family protein	IMGA contig_57006_2.1	42,0	156,9-158,7	7,6-11,0	M2-M3A
Solute carrier family 25 member	IMGA Medtr5g073040.1	51,1	124,0-150,2	10,8-11,6	M3A-M3B*

**Annexe 1: suite.**

Annotation	Code gène IMGAG v3.5	MW	Score Mascot	Couverture	Identification
		[kDa]		de la séquence	
Importin subunit beta	IMGA contig_49649_1.1	96,2	149,9-183,4	4,5-6,2	M2-M3A-M3B
Multidrug resistance protein ABC transporter family	IMGA contig_94118_1.1	11,1	140,3-149,1	35,1	M3A-M3B
Phosphate/phosphoenolpyruvate translocator	IMGA Medtr3g077640.1	44,5	66,0-166,5	2,0-5,9	M1-M2-M3A-M3B
Predicted transporter	IMGA contig_74648_1.1	21,9	140,7	14,8	M3A
Potassium-transporting ATPase B chain	IMGA contig_49946_1.1	41,8	138,9-186,5	6,1-9,9	M3A-M3B
Major facilitator superfamily domain-containing protein (NRT5)	IMGA Medtr3g092030.1	50,7	131,7-215,9	3,7-7,8	M2-M3A-M3B
Predicted Co/Zn/Cd cation transporter	IMGA contig_52394_1.1	39,0	131,4-222,1	10,6-14,2	M2-M3A-M3B
Aquaporin PIP	IMGA Medtr1g095070.1	30,4	107,4-128,8	6,7-9,5	M2-M3A-M3B
Aquaporin TIP2-3	IMGA Medtr5g012810.1	24,9	128,0-148,0	6,0-6,5	M1-M2-M3A-M3B
Carnitine operon protein caiE	IMGA contig_61489_2.1	13,2	117,2-474,0	24,3-60,0	M1-M2-M3A-M3B
S-adenosylmethionine mitochondrial carrier protein	IMGA Medtr8g092080.1	34,8	116,7-158,7	12,6	M3A-M3B
ABC transporter B family member	IMGA AC229695_20.1	79,7	65,0-363,8	2,0-16,6	M1-M2-M3A-M3B
Protein transport protein SEC61 gamma subunit	IMGA Medtr4g127150.1	7,7	11,6-128,3	17,4-37,7	M2-M3A-M3B
Succinate/fumarate mitochondrial transporter	IMGA contig_163917_1.1	33,7	66,0-105,1	4,0-4,7	M1-M3A-M3B
Importin subunit alpha-1	IMGA Medtr2g034900.1	61,8	76,0-104,6	5,0-5,7	M2-M3A
Mitochondrial carnitine/acylcarnitine carrier protein	IMGA Medtr4g012850.1	33,3	103,8-232,5	12,5-19,7	M2-M3A-M3B
Aquaporin	IMGA contig_129758_1.1	25,4	91,0-103,5	6,0-6,8	M1-M2-M3A-M3B
Acyl carrier protein	IMGA Medtr7g080390.1	14,7	87,5-109,1	13,0-13,8	M1-M2-M3A-M3B
Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM14	IMGA contig_81613_2.1	13,5	100,9-113,4	14,2	M3A-M3B
Glucose transporter 1B/1C/1D/1F/2B	IMGA contig_79738_1.1	49,2	62,1-99,9	2,2-4,6	M2-M3A-M3B
Acyl carrier protein	IMGA Medtr7g080760.1	13,5	94,5-208,0	16,0-39,0	M1-M2-M3A-M3B
Translocation protein sec62	IMGA Medtr3g061490.1	41,9	78,8-94,3	3,8	M3A-M3B
Translocase of chloroplast	IMGA Medtr2g030630.1	146,5	91,4	1,2	M3A*
Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim8	IMGA Medtr3g098820.1	9,1	72,1-145,0	16,7-32,0	M1-M2-M3A-M3B
Calcium-transporting ATPase	IMGA contig_114117_2.1	49,0	90,1-109,9	5,3-5,6	M3A-M3B*

**Annexe 1: suite.**

Annotation	Code gène IMGAG v3.5	MW	Score Mascot	Couverture	Identification
		[kDa]		de la séquence	
Protein transport protein Sec24-like protein	IMGA Medtr7g111710.1	137,6	88,5	2,1	M3A*
ADP/ATP carrier protein family	IMGA contig_21839_1.1	21,8	87,8-124,3	9,7-10,2	M2-M3A-M3B
Importin subunit alpha	IMGA Medtr7g112350.1	62,2	87,4	5,0	M3A*
2-oxoglutarate/malate translocator-like protein	IMGA contig_65134_1.1	32,4	86,9	8,7	M3A*
Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim13	IMGA Medtr3g080670.1	9,5	85,9-321	18,4-59,0	M1-M3A
Calcium-transporting ATPase 2, plasma membrane-type	IMGA Medtr5g015590.1	113,6	85,6-90,4	2,1	M2-M3A*
Mitochondrial carrier like protein	IMGA contig_90825_1.1	8,0	77,4-84,9	18,9	M3A-M3B
Translocon-associated protein subunit alpha	IMGA Medtr4g075340.1	27,5	79,0-83,3	5,0	M3A-M3B*
V-type H(+)-translocating pyrophosphatase	IMGA contig_131082_1.1	38,0	81,0-81,9	4,0	M3A-M3B
Calcium-transporting ATPase	IMGA contig_63245_2.1	106,7	81,7-85,5	1,7	M3A-M3B*
Mitochondrial folate transporter/carrier	IMGA Medtr1g087840.1	41,8	77,2-205,0	3,0-11,9	M1-M2-M3A-M3B
Mitochondrial import receptor subunit TOM7-1	IMGA contig_57213_3.1	9,1	70,0-78,6	18,0-18,8	M1-M3A-M3B
Mitochondrial carrier-like protein	IMGA contig_8299_3.1	18,5	74,9-85,6	10,9	M3A-M3B
Anion-transporting ATPase	IMGA contig_13253_1.1	11,8	61,0-189,1	17,0-45,1	M1-M2-M3A-M3B
Aquaporin	IMGA Medtr5g010150.1	30,8	73,5	5,6	M3A*
ABC transporter like protein	IMGA Medtr3g070410.1	74,3	73,2-396,1	2,0-12,6	M2-M3A-M3B
Metaxin-1	IMGA Medtr4g127630.1	35,2	73,0-73,6	2,9	M3A-M3B
Mitochondrial glutamate carrier	IMGA Medtr1g095780.1	87,6	72,7-194,7	2,0-8,0	M2-M3A-M3B
Amino acid selective channel protein	IMGA contig_77175_2.1	7,3	73,9-82,8	16,7	M2-M3A-M3B*
Aquaporin	IMGA Medtr2g101370.1	25,2	69,5	4,4	M3A*
chr7 25477304-25482172 F EGN_Mt100125 20110616	IMGA Medtr7g085070.1	26,6	68,9-80,3	8,9	M3A-M3B
Peptide transporter	IMGA contig_83618_1.1	64,7	64,0	1,9	M3A
Mitochondrial carrier protein	IMGA contig_51507_2.1	41,0	63,4-111,3	2,7-8,8	M2-M3A-M3B*
Inorganic phosphate transporter 1-1	IMGA Medtr1g043200.1	58,5	60,0	2,6	M3A*
Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim9	IMGA contig_114266_1.1	52,3	61,1-126,0	13,5-22,0	M1-M3B*
Component of high affinity nitrate transporter (NRT7)	IMGA contig_21690_1.1	11,3	58,6-151,1	10,9-33,7	M2-(M3A*)-M3B
ABC-type transport system-like protein	IMGA contig_52040_1.1	47,6	93,1	8,1	M2*
ADP/ATP translocase-like protein	IMGA Medtr3g104500.1	36,3	170,0	15,0	M2*

**Annexe 1: suite.**

Annotation	Code gène IMGAG v3.5	MW	Score Mascot	Couverture	Identification
		[kDa]		de la séquence	
Mitochondrial ATP synthesis coupled proton transport protein	IMGA Medtr4g007030.1	29,0	63,0	4,0	M1*
Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member	IMGA contig_8514_1.1	41,1	69,1-154,7	2,3-9,5	M2-M3B*
2-oxoglutarate/malate translocator	IMGA Medtr2g009220.1	61,0	178,5	6,5	M2*
Cation-transporting ATPase	IMGA contig_8551_1.1	45,8	73,7	4,8	M3B*
ADP ATP carrier protein	IMGA contig_57335_1.1	41,2	209,5	17,1	M2*
ABC transporter C family protein	IMGA Medtr1g088680.1	169,4	136,3-174,6	1,8-3,6	M2-M3B*
Mitochondrial folate transporter/carrier	IMGA Medtr8g076760.1	38,2	112,1	8,2	M2*
Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim17 family protein	IMGA contig_134792_1.1	14,6	78,1-117,5	14,1-23,4	M2-M3B*
Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM22	IMGA Medtr4g077950.1	18,1	126,9	30,6	M2*
Translocase of chloroplast	IMGA Medtr7g088050.1	105,0	84,3	9,0	M3B*
Mitochondrial carrier-like protein	IMGA contig_64379_2.1	39,0	200,0	13,2	M2*
Mitochondrial carrier-like protein	IMGA contig_79689_1.1	23,4	79,6-97,6	8,5	M2-M3B
Sugar transport protein	IMGA Medtr4g091370.1	56,8	70,4	1,5	M2*
Translocase of inner mitochondrial membrane TIM23	IMGA Medtr8g018780.1	19,4	112,4-140,8	17,0-17,6	M2-M3B*
Aquaporin TIP2-1	IMGA Medtr8g013680.1	25,1	85,0	4,4	M3B
Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein	IMGA Medtr5g032420.1	34,3	64,5-91,5	6,2	M2-M3B*
Mitochondrial substrate carrier family protein P	IMGA Medtr6g091800.1	35,0	83,5	5,0	M3B
Nitrate transporter (NRT6)	IMGA Medtr5g012290.1	65,2	58,0-86,9	2,1-2,4	M2-(M3B*)
Carnitine operon protein caiE	IMGA contig_69456_1.1	29,0	288,6-492,0	23,4-34,0	M1-M2
Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim10	IMGA Medtr2g097870.1	9,7	192,0	19,0	M1
Ferritin-2	IMGA Medtr5g083170.1	27,9	120,0	17,0	M1
Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim9	IMGA Medtr4g021710.1	11,4	80,0	13,0	M1
Stearoyl acyl carrier protein desaturase	IMGA Medtr4g087440.1	44,6	414,9	25,7	M2
Mitochondrial carrier like protein	IMGA contig_83122_1.1	21,6	245,4	29,4	M2
Mitochondrial phosphate carrier protein	IMGA contig_49798_2.1	38,1	220,4	14,1	M2
Multidrug resistance protein ABC transporter family	IMGA contig_77734_1.1	59,4	193,0	12,8	M2
ABC transporter B family member	IMGA Medtr3g107800.1	142,8	192,0	2,6	M2
ABC transporter family protein	IMGA Medtr4g131330.1	25,7	169,9	21,8	M2*
Pore protein of (OEP24)	IMGA contig_76386_1.1	23,6	168,3	16,9	M2
ATP/ADP transporter	IMGA Medtr2g102740.1	71,6	167,2	4,8	M2



**Annexe 1:** suite.

Annotation	Code gène IMGAG v3.5	MW	Score Mascot	Couverture	Identification
		[kDa]		de la séquence	de la protéine
Mitochondrial substrate carrier family protein	IMGA Medtr8g068890.1	33,4	148,6	22,2	M2
ABC transporter B family member	IMGA Medtr1g086080.1	139,2	135,3	2,4	M2
ABC-type transport system involved in resistance to organic solvents	IMGA Medtr5g088340.1	43,8	133,8	6,0	M2
periplasmic component					
Mitochondrial carrier like protein	IMGA Medtr5g081150.1	48,6	102,8	11,6	M2
Metal transporter	IMGA Medtr3g088460.1	58,9	88,9	3,5	M2
MscS-Like mechanosensitive ion channel MSCL8	IMGA Medtr3g100320.1	69,2	86,7	2,9	M2
Mitochondrial carrier protein	IMGA contig_74869_2.1	7,9	82,4	20,8	M2
Cation-efflux family protein	IMGA contig_51641_1.1	49,1	82,1	7,8	M2
Lipid a export ATP-binding/permease protein msba	IMGA contig_164074_1.1	45,4	75,4	4,8	M2
Sodium/calcium exchanger protein	IMGA contig_8315_1.1	49,3	69,3	8,7	M2*
ADP,ATP carrier protein	IMGA Medtr8g107270.1	35,4	65,0	4,1	M2
ATP-binding cassette transporter subfamily I member 15 ABC component protein PpABC115	IMGA Medtr7g030030.1	61,0	63,0	3,7	M2

# Résumé

Les symbioses entre les légumineuses et les bactéries fixatrices d'azote (rhizobium) représentent un enjeu majeur pour la réduction des intrants azotés en agriculture. La réduction de l'azote moléculaire ( $N_2$ ) en ammonium ( $NH_4^+$ ) par la nitrogénase bactérienne, puis son assimilation par la cellule végétale constituent la fonction centrale des nodosités symbiotiques. Ce processus, très coûteux en énergie, présente le paradoxe de se produire dans un organe très appauvri en oxygène, ce qui conduit à fortement réduire la respiration mitochondriale, principale source d'ATP. La question se posait donc de savoir par quels mécanismes l'ATP nécessaire au fonctionnement cellulaire est régénéré au sein de la nodosité.

Sur la base d'observations récentes faites dans les racines en hypoxie, nous avons posé l'hypothèse selon laquelle, dans la nodosité fixatrice d'azote, une partie de l'ATP est régénérée par le biais d'une respiration cyclique (respiration nitrate-NO) en quatre étapes: 1) le nitrate ( $NO_3^-$ ) est réduit en nitrite ( $NO_2^-$ ) dans le cytosol par la nitrate réductase (NR); 2) le  $NO_2^-$  est transporté du cytosol dans la mitochondrie par l'intermédiaire d'un (ou plusieurs) transporteur(s); 3) le  $NO_2^-$  est réduit en oxyde nitrique (NO) par les électrons de la chaîne respiratoire (permettant ainsi le fonctionnement de la respiration et la régénération de l'ATP); et 4) le NO diffuse librement vers le cytosol où il est oxydé en  $NO_3^-$  par la leghémoglobine (Lb).

Au cours de ce travail de thèse, mené sur le modèle *Medicago truncatula-Sinorhizobium meliloti*, nous avons d'abord montré que les nitrate réductases et les chaînes de transfert d'électron des deux partenaires, végétal et bactérien, sont impliquées dans la production de NO dans les nodosités fonctionnelles. Nous avons également montré que l'activité nitrate réductase est nécessaire au maintien d'un état énergétique élevé permettant la fixation de l'azote. Dans un second temps, nous avons entrepris de caractériser le transport du nitrite chez des mitochondries purifiées de racines. L'objectif était ensuite d'identifier un ou plusieurs candidats pour le transport du nitrite dans les mitochondries. Pour cela, sur la base d'homologies de séquence avec des transporteurs déjà identifiés et de séquences d'adressage putatives, une recherche *in silico* des protéines prédites de *M. truncatula* a été conduite. Cette analyse a permis de sélectionner 6 candidats avec une localisation possible aux mitochondries. L'analyse par spectrométrie de masse des protéines présentes sur les membranes des mitochondries a révélé 3 autres candidats. L'expression des 9 candidats retenus a été caractérisée en situation de normoxie et d'hypoxie dans les racines et les nodosités. Cela a permis de mettre en évidence deux profils intéressants. Enfin, l'étude de l'adressage subcellulaire et l'expression tissulaire au cours du développement de la nodosité ont été débutés pour certains des candidats retenus sur leur profil d'expression et ceux obtenus par spectrométrie de masse.

# Abstract

Symbiosis between legume plants and nitrogen-fixing bacteria (rhizobium) constitute a major issue to reduce nitrogen fertilization in crops. Central function of nodules is the enzymatic reduction of atmospheric nitrogen ( $N_2$ ) into ammoniac ( $NH_4^+$ ) by the bacterial nitrogenase, and the subsequent assimilation in the plant cell. This highly energy-consuming process is a paradox as occurring in hypoxied tissue where mitochondrial respiration - the main ATP source- is strongly reduced. The question rose how the ATP required for cellular functioning is generated into nodules.

Based on recent observations on hypoxied roots, we rose the hypothesis that, in nodules, ATP is formed through a cyclic respiration -called nitrate-NO respiration- that consists in four steps: 1) nitrate reductase (NR) reduces nitrate ( $NO_3^-$ ) into nitrite ( $NO_2^-$ ) in the cytosol ; 2)  $NO_2^-$  is transported from cytosol into mitochondria using transporter(s) protein(s) ; 3) electrons of mitochondrial transfer chain reduces  $NO_2^-$  into nitric oxide (NO), thus allowing respiration functioning and ATP formation ; and 4) NO freely diffuses from mitochondria to cytosol to be oxidized back into  $NO_3^-$  through leghemoglobine (Lb) action.

During this thesis, we showed, using *Medicago truncatula-Sinorhizobium meliloti* system as a model, that NRs and electron transfer chains from both plant and bacterial partners were involved in NO production of functioning nodules. NR activity was also showed to be crucial to maintain high energetic status required for nitrogen fixation. The second aim was to characterized nitrite transport across purified root mitochondria. Then, mitochondrial nitrite transporter candidate(s) were investigated. An *in silico* strategy searching for predicted proteins in *M. truncatula* genome, potentially localized to mitochondria, that shared homologous sequences with known transporters was conducted. 6 candidates were chosen at the end of this analysis. Membrane mitochondria proteins were identified using mass spectrometry (MS) analysis, revealing 3 new candidates. The expression profile in normoxied and hypoxied roots and nodules was characterized for the 9 candidates retained. Two of them showed particularly promising patterns. Finally, sub-cellular localization and tissular expression during nodule development were analyzed for some candidates that shared interesting expression patterns.