



HAL
open science

Caractérisation d'un processus symbiotique alternatif entre légumineuses et Bradyrhizobium impliquant le système de sécrétion de type 3 (T3SS) mais pas la synthèse de facteurs Nods

Albin Teulet

► **To cite this version:**

Albin Teulet. Caractérisation d'un processus symbiotique alternatif entre légumineuses et Bradyrhizobium impliquant le système de sécrétion de type 3 (T3SS) mais pas la synthèse de facteurs Nods. Sciences agricoles. Université Montpellier, 2019. Français. NNT : 2019MONTG045 . tel-02481186

HAL Id: tel-02481186

<https://theses.hal.science/tel-02481186>

Submitted on 17 Feb 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.

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biologie des Interactions

École doctorale GAIA - Mécanismes des Interactions parasitaires pathogènes et symbiotiques

Unité Mixte de recherche : Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes

**Caractérisation d'un processus symbiotique alternatif
entre légumineuses et *Bradyrhizobium* impliquant le
système de sécrétion de type 3 (T3SS) mais pas la
synthèse de facteurs Nods.**

**Présentée par Albin TEULET
Le 18 décembre 2019**

Sous la direction du Dr. Eric GIRAUD (IRD, LSTM)

Devant le jury composé de

Dr. Catherine MASSON-BOIVIN, Directrice de Recherche, INRA-LIPM

Dr. Stéphane GENIN, Directeur de Recherche, CNRS-LIPM

Dr. Marie-Agnès JACQUES, Directrice de Recherche, INRA-IRHS

Pr. Guilhem DESBROSSES, Professeur des universités, Université de Montpellier-BPMP

Dr. Eric GIRAUD, Directeur de Recherche, IRD-LSTM

Rapporteure

Rapporteur

Examinatrice

Président du jury

Directeur de thèse



**UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER**

« Une chose que nous savons sur ces grands innovateurs, c'est qu'ils ont tous, presque sans exception, travaillé à devenir des connaisseurs experts de leur domaine, avant de commencer à en repousser les frontières »

K. Anders Ericsson

À Edwige et Aurore

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury de thèse d'avoir accepté d'évaluer ce travail de doctorat, mes deux rapporteurs **Catherine Masson-Boivin** et **Stéphane Génin**, ainsi que mes deux examinateurs **Marie-Agnès Jacques** et **Guilhem Desbrosses**. Je remercie également les membres de mes deux comités de thèse, pour le suivi du travail présenté dans ce manuscrit et pour leurs recommandations, **Laurent Deslandes**, **Peter Mergaert**, **Ralf Koebnik**, **Michael Göttfert**. Enfin, je remercie **Robin Duponnois** pour son accueil au sein de l'unité LSTM.

Je remercie infiniment tous nos collaborateurs, sans qui ce travail n'aurait pu aboutir sur une si belle conclusion. Encore merci à **Peter Mergaert**, **Laurent Deslandes** et **Ralf Koebnik** pour leur travail et leur investissement à faire de cette étude la belle histoire qu'elle est devenue. Merci également à **Alain Jauneau** et **Virginie Comorge**, qui ont travaillé aux côtés de **Laurent**. Je tiens également à remercier **Florent Lassalle** pour toutes ses analyses et son investissement sur l'étude génomique comparative. Merci à **Shin Okazaki** et à toute son équipe pour avoir rendu nos séjours au Japon très agréables. Un grand merci à nos collaborateurs thaïlandais, **Neung Teaumroong**, **Panlada Tittabutr**, **Komonluck Teamtisong**, **Pongdet Piromyou** et à tous les membres de leur laboratoire pour cette belle collaboration. Merci également à tous les Post-Doc, les doctorants et étudiants qui ont tous pris de leur temps pour nous faire visiter leur merveilleux pays. Je tiens à remercier tout particulièrement **Jane** et **Yee**, avec qui j'ai passé d'excellents moments au laboratoire. Enfin, Je souhaite remercier **Nicolas Busset**, collègue et ami, qui était là à mes débuts et de qui j'ai beaucoup appris.

Merci mille fois à toute l'équipe pour tous les moments passés ensemble au labo, pour tous les conseils et pour toute l'aide que chacun m'a apporté. Un grand merci à **Frédéric Gressent** sans qui, bien entendu, cette thèse n'aurait pu être possible ; merci pour cette lourde responsabilité que tu as prise en devenant mon « directeur de thèse ». Merci à **Fabienne Cartieaux** pour le temps que tu as consacré à m'initier à la CIV et aux RT-qPCR. Merci **Djamel Gully** pour ta rigueur et la passion qui t'anime au quotidien dans ton travail. Merci **Jean-François**, pour avoir toujours été de bons conseils (et pour m'avoir longuement écouté raconter toutes sortes de choses absurdes durant ces trois années de thèse...). Merci **Nico Nouwen** pour ton aide et pour toutes ces conversations scientifiques, toujours enrichissantes, que l'on a eu ensemble ; tu es pour moi l'exemple du chercheur passionné et passionnant. Merci **Clémence Chaintreuil** pour être toujours restée souriante et m'avoir toujours conseillé avec bienveillance. Enfin, un immense merci à **Joël Fardoux** ; merci pour ton investissement dans ce travail de thèse, il est certain qu'il ne serait pas ce qu'il est sans toi ; merci de m'avoir formé,

de m'avoir toujours aidé en toutes circonstances ; merci pour toutes ces petites pauses discussions au labo ; merci d'être toujours présent et de porter assistance à chacun d'entre nous.

Ce paragraphe est le dernier que j'ai écrit, on peut alors considérer que les derniers mots de ce travail te reviennent, **Eric**. D'abord en licence, puis en master, puis en doctorat, et encore un peu plus... On peut dire que notre duo à plutôt bien fonctionné, non ? Comment te remercier pour toutes les heures que tu m'as consacrées ? Depuis mon premier stage, et jusqu'à la rédaction de ce manuscrit, ta porte est toujours restée ouverte, tu as toujours été présent, tu m'as toujours guidé vers la bonne voie et toujours avec le sourire. Merci de m'avoir offert la possibilité de travailler sur ce sujet qui me passionne tant. Merci pour t'être autant investi à faire ce que je suis devenu. J'admire ton travail, ta rigueur et toute la passion qui t'amène au quotidien. J'ai beau repousser l'échéance, il faudra bien que je quitte le nid ! Mais quel plaisir d'avoir travaillé à tes côtés. Quelle fierté ! Merci pour tout, et du fond du cœur.

Merci à tous les membres de la grande famille LSTM, avec qui j'ai pris tant de plaisir à discuter, travailler, partager, et rire. En particulier... Un grand merci **Naïma**, pour ta bienveillance et pour le travail indispensable que tu mènes au quotidien pour le bon fonctionnement de ce laboratoire. Merci à **Nathalie** et à **Cathy** pour votre aide si précieuse dans toutes mes démarches administratives. Toutes mes pauses auraient été bien ternes sans vous, alors un grand merci à **Maiwenn, Johanna, Souhir, Denis**, et bien sûr à **Alexandre**, pour les bons moments à discuter et à rire à la plateforme. Je remercie le comité d'accueil du matin, **Nathalie, Naïma, Cathy, Julie, Marjorie, Ezéchiel, Yves et Robin** ; vous êtes bien plus efficaces qu'un simple café pour commencer une journée. Merci à mes deux camarades de bureau, **Johan et Stéphane**, avec qui j'ai pris beaucoup de plaisir à parler de science. Merci **Philippe** pour ta participation active dans ce qui fut la première équipe de volley officielle du LSTM.

Mais également... Merci à tous les étudiants de passage, dont la liste serait longue à écrire, mais qui ont chacun contribué à la bonne ambiance du laboratoire. Je remercie particulièrement **Dylan Gallo et Mamadou Mbaye**, avec qui j'ai pris beaucoup de plaisir à travailler. Mais surtout, un grand merci à **Alicia Camuel** ; tu es la numéro 1 des stagiaires (!) ; merci pour ta bonne humeur quotidienne, pour ton investissement et pour la passion qui a animé ton travail pendant les 5 mois que tu as passé avec nous.

Je pense que l'on peut aisément admettre que BGPI a été mon deuxième lieu de travail, ou au moins de repos... Alors je remercie toute la communauté BGPIène pour m'avoir accepté, presque comme l'un des leurs, au sein de ce laboratoire que me plaît tant. Merci aux irréductibles **Maëlle**,

Coralie, Maud, Emeline, Anne, Audrey, Kevin, Jérémy DM, Thomas, Mathias (avec un seul T), **Pascal, Valentin, Rémi et Jérémy V** pour tous ces midis, ces soirs et toutes ces pauses café passés ensemble !
Merci à **Matthieu Chabannes** pour ce que je retiendrais être le meilleur stage que j'ai suivi. Enfin, merci également à la communauté Roller : **Faustine, Florian** (et **Elise**) et **Guillaume** (oui ! toi aussi on peut dire que tu fais partie de BGPI) pour ces petites randonnées sportives du vendredi soir.

Même si de grandes distances nous séparent depuis plusieurs années maintenant, merci à **Louise** d'être toujours là, et de me rappeler tous ces moments fantastiques que l'on a passé en prépa. Enfin, merci à **Pierrick**, mon acolyte de BFP, pour toutes tes photos de voyage qui me font rêver d'évasion !

Je remercie ma famille, et plus particulièrement **Maman, Amélie**, et **mes grands-parents** pour m'avoir toujours soutenu. Un grand merci à **Elodie, Nathalie**, et **Olivier** qui, à n'en pas douter, ont eu une grande contribution dans ce travail de par leur présence, leur bienveillance et leur écoute dans nos moments difficiles.

Enfin, je terminerais par toi **Edwige**. Merci d'avoir toujours été à l'écoute durant toutes ces années. On peut dire que la dernière n'a pas été de tout repos... malgré tout, ton courage et ta grande patience nous a permis de traverser toutes ces épreuves. Quel bonheur de vous avoir toutes les deux à mes côtés. Merci de prendre soin de nous, quotidiennement. Je t'aime.

*(Et sans oublier **Luffy**, un peu moins humaine que toutes les autres personnes que j'ai remerciées ici, mais que je ne n'oublie pas. Merci bébé chat)*

Liste des figures (hors articles)

	titre	page
Figure 1	Variations morphologiques des nodules dans l'interaction symbiotique entre les rhizobiums et les légumineuses	3
Figure 2	Origine de la capacité à former des endosymbioses nodulaires	4
Figure 3	Arbre phylogénétique de la famille des <i>Fabaceae</i>	5
Figure 4	Formation et progression du cordon d'infection chez <i>M. truncatula</i>	7
Figure 5	Représentation des différentes étapes de développement nodulaire d'un nodule déterminé de soja et indéterminé de pois	8
Figure 6	Internalisation des bactéries dans les cellules du tissu infectieux	9
Figure 7	Structure de la nitrogénase et organisation des gènes impliqués dans sa biosynthèse	10
Figure 8	Représentation du métabolisme au cours de la fixation d'azote et des différents échanges entre le bactéroïde et la cellule hôte	11
Figure 9	Structure chimique générique de différents flavonoïdes produits par les légumineuses	12
Figure 10	Modèle de la régulation de l'expression des gènes <i>nod</i> chez la souche <i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> USDA110	13
Figure 11	Structure chimique générique des facteurs Nods produits par les rhizobiums	13
Figure 12	Reconnaissance des FNs et de différents oligosaccharides par des récepteurs LysM-RLKs	15
Figure 13	Mesure spatio-temporelle des oscillations calciques générées dans un poil absorbant lors de la reconnaissance des FNs par les récepteurs NFR1/NFR5	15
Figure 14	Modèle de la voie de signalisation conduisant à la génération des oscillations calciques	16
Figure 15	Modèle de la voie de signalisation en aval des oscillations calciques	17
Figure 16	Modèle de la communication symplasmique au cours des premières étapes du développement nodulaire chez <i>M. truncatula</i>	17
Figure 17	Rôle des auxines et des cytokinines dans l'induction du méristème nodulaire	18
Figure 18	Conservation de la voie de signalisation symbiotique commune (CSSP) au cours du processus de nodulation et de mycorrhization	19
Figure 19	Différents exemples de RLKs impliqués dans la reconnaissance de MAMPs	20

	titre	page
Figure 20	Représentation des trois types de système d'injection utilisés par les bactéries Gram négatives pour la sécrétion d'effecteurs dans les cellules de l'hôte	21
Figure 21	Illustration du modèle en zig-zag proposé par John et Dangls en 2006	21
Figure 22	Architecture de l'enveloppe membranaire d'une bactérie Gram négative présentant différents types de polysaccharides de surface	22
Figure 23	Modèle de la perception en deux étapes d'une souche de rhizobium compatible	23
Figure 24	Balance entre la réponse immunitaire et la réponse symbiotique au cours du processus d'infection des rhizobiums	24
Figure 25	Structure du système de sécrétion de type III des bactéries pathogènes et des rhizobiums	26
Figure 26	Modèles putatifs de la structure extracellulaire du T3SS des rhizobiums	28
Figure 27	Comparaison de la structure du corps basal du flagelle et du T3SS	29
Figure 28	Scénario putatif de l'évolution du flagelle conduisant à l'apparition du T3SS	30
Figure 29	Modèle du mécanisme du transfert horizontal d'un îlot symbiotique	31
Figure 30	Arbres phylogénétiques du T3SS chez les rhizobiums et chez les bactéries pathogènes de plantes et d'animaux basés sur les homologues de la protéine SctU	31
Figure 31	Organisation génétique des clusters fonctionnels Rhcl chez les rhizobiums modèles	32
Figure 32	Représentation WebLogo du consensus de 30 <i>tts</i> box différentes	33
Figure 33	Modèle de la régulation transcriptionnelle du T3SS et des effecteurs Nops chez <i>B. diazoefficiens</i> USDA110	34
Figure 34	Fonctions cellulaires connues des effecteurs Nops	37
Figure 35	Phylogénie du genre <i>Bradyrhizobium</i>	41
Figure 36	Phylogénie du genre <i>Aeschynomene</i> et des genres associés	42
Figure 37	La nodulation de tige chez les <i>Aeschynomene</i>	43
Figure 38	Les groupes d'inoculations croisées entre <i>Bradyrhizobium</i> et <i>Aeschynomene</i>	44
Figure 39	Au moins deux processus symbiotiques existent chez les légumineuses du genre <i>Aeschynomene</i>	45

	titre	page
Figure 40	Observations des couronnes de poils axillaires et de leurs colonisations par ORS285 chez <i>A. indica</i>	46
Figure 41	Comparaison du processus d'infection et d'organogénèse nodulaire chez <i>A. afraspera</i> et chez <i>A. indica</i> en interaction avec ORS285	47
Figure 42	La morphologie des bactéroïdes d'ORS285 varie en fonction de la plante hôte	48
Figure 43	Structure et rôles des hopanoïdes de BTAi1 en interaction avec <i>A. evenia</i>	49
Figure 44	La synthèse de cytokinines par ORS285 contribue à l'interaction symbiotique avec <i>A. indica</i>	51
Figure 45	Représentation schématique de la cascade de gènes symbiotiques identifiés chez <i>M. truncatula</i> / <i>L. japonicus</i> et conservés chez <i>A. evenia</i>	52
Figure 46	Trois scénarios possibles de l'émergence de la symbiose FN-indépendante	54
Figure 47	Modèle évolutif de la nodulation des légumineuses au cours du processus symbiotique	54
Figure 48	<i>B. elkanii</i> USDA61 est capable de noduler <i>G. max</i> cv. Enrei en l'absence de FNs	55
Figure 49	Le processus d'infection FN-indépendant T3SS-dépendant passe par la voie intercellulaire sur En1282 (<i>nfr1</i>)	56
Figure 50	Modèle de la signalisation moléculaire utilisée par USDA61 pour l'induction de la nodulation FN-indépendante T3SS-dépendante sur <i>G. max</i>	56
Figure 51	Propriétés symbiotiques de <i>B. elkanii</i> USDA61 et <i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS3257 sur <i>A. indica</i>	57
Figure 52	Certaines <i>Aeschynomene</i> sont nodulées par des souches de <i>Bradyrhizobium</i> selon deux processus symbiotiques FN-indépendant différents	58
Figure 53	Analyse de la localisation nucléaire d'ErnA chez la souche <i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS3257 lors de son interaction avec <i>A. indica</i>	64
Figure 54	Représentation schématique de l'organisation des trois motifs identifiés par MEME dans les séquences protéiques de la version courte et longue d'ErnA	65
Figure 55	Rôle de l'extrémité C-terminale d'ErnA chez la souche <i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS3257 lors de son interaction avec <i>A. indica</i>	66
Figure 56	Arbre phylogénétique des <i>Bradyrhizobium</i>	72

Liste des tableaux (hors articles)

	titre	page
Tableau 1	Composants structuraux du T3SS des rhizobiums et leur homologue chez le flagelle	27
Tableau 2	Liste des 14 <i>bona fide</i> effecteurs Nops	36
Tableau 3	Liste des effecteurs utilisés pour la recherche de motifs conservés en utilisant le logiciel MEME	65
Tableau 4	Liste des mutants et des amorces utilisées dans le complément d'information de l'Article 1	67
Tableau 5	Propriétés symbiotiques de diverses souches de <i>Bradyrhizobium</i> testées sur <i>A. indica</i>	71
Tableau 6	Gènes candidats pour l'induction de la nodulation sur <i>A. indica</i> pour les souches ne possédant pas <i>ernA</i>	75

Liste des annexes

	titre	page
Annexe 1	Rhizobium–legume symbiosis in the absence of Nod factors: two possible scenarios with or without the T3SS	120

Liste des abréviations (hors articles)

µm	micromètre
aa	Acide Aminé
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AMP	Adénosine Monophosphate
ARA	Acetylene Reduction Assay
ARN	Acide Ribonucléique
ARNt	ARN de transfert
ATP	Adénosine Triphosphate
Avr	Avirulence
CM	Conserved Motif
cm	centimètre
CSSP	Common symbiotic signaling pathway
DAMP	Damage-Associated Molecular Patterns
EMS	Ethyl Méthane Sulfonate
EPS	Exopolysaccharide
ERF	Ethylene Response Factor
ETI	Effector Triggered Immunity
ETS	Effector Triggered Susceptibility
Fix+/Fix-	Présence/Absence d'activité fixatrice d'azote
FLIM	Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy
FN	Facteur Nod
FRET	Förster Resonance Energy Transfer
GFP	Green Fluorescent Protein
ha	hectare
HGT	Horizontal Gene Transfert
HoLA	Hopanoïd-lipidA
HR	Hypersensitive response
Inf+/Inf-	Présence/Absence d'infection des nodules
IRLC	Inverted Repeat Lacking Clade
kg	kilogramme
KPS	K-antigen polysaccharide
LCO	Lipo-chitooligosaccharide
LPS	Lipopolysaccharide
LRR	Leucine-Rich Repeats
LysM	Lysin motif
MAMP	Microbe-Associated Molecular Pattern
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MIIA	Metal Ion-Inducible Autocleavage
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucléotide Phosphate
NB-LRR	Nucleotide-Binding/Leucine-Rich-Repeat
NCR	Nodule-specific Cysteine Rich
Ndv-	Altération sévère du développement nodulaire
NEL	Novel E3-ubiquitine ligase
NES	Nuclear Export Signal
NLR	NOD-Like Receptor
NLS	Nuclear Localization Signal
Nod+/Nod-	Présence/Absence de nodule
Nop	Nodulation Outer Protein
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Pattern

pb	Paire de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	Potentiel Hydrogène
PR protéine	Pathogenesis-related protein
PRR	Pattern recognition receptor
PTI	Pattern-Triggered Immunity
Rhc	Rhizobium conserved
RLK	Receptor-Like Kinase
RLP	Receptor-Like protein
RNAi	ARN-interférence
ROS	Reactive Oxygen Species
Sct	Secretion and Cellular Translocation
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
T3E	Type III effector
T3SS	Système de Sécrétion de Type III
T4SS	Système de Sécrétion de Type IV
T6SS	Système de Sécrétion de Type VI
TCA	Acide Tricarboxylique
TIR	Toll-Interleukin Receptor
tts	Type III secretion
u.a.	Unité Arbitraire
VLCFA	Very Long Chain Fatty Acid

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE.....	1
1. L'ENDOSYMBIOSE NODULAIRE ENTRE RHIZOBIUMS / LEGUMINEUSES.....	2
1.1. Généralité sur la symbiose fixatrice d'azote entre les rhizobiums et légumineuses.....	2
1.1.1. L'azote, un élément essentiel au développement des plantes	2
1.1.2. Les endosymbioses nodulaires.....	3
1.1.3. Diversité des rhizobiums.....	4
1.1.4. Diversité des légumineuses.....	4
1.1.5. Les spécificités d'interaction entre les rhizobiums et les légumineuses.....	5
1.2. Mise en place de l'organe symbiotique	6
1.2.1. Formation du cordon d'infection	6
1.2.2. Les différentes étapes de l'organogenèse nodulaire	8
1.2.3. Internalisation des bactéries dans le primordium nodulaire	8
1.2.4. La nitrogénase	10
1.2.5. Echanges nutritionnels au sein du nodule.....	11
1.3. Les bases moléculaires de l'interaction symbiotique entre les rhizobiums et les légumineuses	12
1.3.1. L'étape pré-symbiotique : la reconnaissance des deux partenaires et le dialogue moléculaire ...	12
1.3.2. La perception des facteurs Nods par la plante	14
1.3.3. Le déclenchement des oscillations calciques.....	15
1.3.4. Interprétation des oscillations et expression des premiers gènes de nodulation.....	16
1.3.5. Contrôle génétique et hormonale de l'organogène et de l'infection des nodules	17
1.3.6. Existence d'une voie symbiotique commune à la nodulation et à la mycorhization	18
1.4. Implication du système immunitaire dans l'interaction symbiotique entre les rhizobiums et les légumineuses	19
1.4.1 Le système immunitaire végétal : le modèle en zig-zag.....	20
1.4.2. Le rôle des MAMPs au cours de l'interaction symbiotique	22
1.4.3. L'activation des mécanismes de défense des légumineuses au cours de l'interaction symbiotique	23
1.4.4. La répression des mécanismes de défenses au cours de l'interaction entre les rhizobiums et les légumineuses	24
2. LE SYSTEME DE SECRETION DE TYPE III (T3SS) DES RHIZOBIUMS	25
2.1. La structure du système de sécrétion de type III	25
2.1.1. Le T3SS : la découverte	25
2.1.2. Le corps basal du système de sécrétion de type III.....	26
2.1.3. La structure extracellulaire du système de sécrétion de type III.....	28

2.1.4. L'origine du système de sécrétion de type III	29
2.2. Distribution et diversité des clusters T3SS	30
2.2.1. Acquisition du T3SS par les bactéries	30
2.2.2. Phylogénétique des clusters T3SS	31
2.3. Le cluster Rhcl des rhizobiums.....	32
2.3.1. Structure et organisation génétique du cluster Rhcl	32
2.3.2. Régulation de l'expression des gènes du T3SS et des effecteurs chez les rhizobiums	33
2.4. Les effecteurs de type III.....	34
2.4.1. Généralité sur les effecteurs de type III.....	34
2.4.2. Identification des effecteurs Nops	35
2.4.3. Caractéristiques et fonctions de cinq effecteurs Nops	36
2.4.4. Les effecteurs Nops : une épée à double tranchant	38
3. LES SYMBIOSES FN-INDEPENDANTES DANS LE MODELE SYMBIOTIQUE <i>BRADYRHIZOBIUM</i> / <i>AESCHYNOMENE</i>	41
3.1. Le couple symbiotique <i>Bradyrhizobium</i> / <i>Aeschynomene</i>	41
3.1.1. La diversité du genre <i>Bradyrhizobium</i>	41
3.1.2. Les <i>Aeschynomene</i> : des légumineuses à nodulation caulinaire	43
3.1.3. Les groupes d'inoculations croisées	44
3.2. Le mécanisme symbiotique FN-indépendant entre les <i>Bradyrhizobium</i> photosynthétiques et les <i>Aeschynomene</i> du groupe III	45
3.2.1. La découverte du premier mécanisme symbiotique FN-indépendante	45
3.2.2. Organogenèse et infection des nodules racinaires chez les <i>Aeschynomene</i>	46
3.2.3. La différenciation en bactéroïde chez les <i>Aeschynomene</i>	47
3.2.4. Adaptation des <i>Bradyrhizobium</i> à la vie libre et symbiotique : la composition de l'enveloppe bactérienne joue un rôle essentiel dans la résistance aux stress biotiques et abiotiques.....	49
3.3. Les bases moléculaires de l'interaction entre les <i>Bradyrhizobium</i> photosynthétiques et les <i>Aeschynomene</i> : à la recherche du signal « non-Nod ».....	50
3.3.1. La production de cytokinines par la bactérie contribue à l'organogenèse nodulaire	50
3.3.2. Le processus symbiotique FN-indépendant recrute la voie symbiotique commune	51
3.3.3. Le développement d'une collection de mutants de nodulation : vers l'identification de nouveaux gènes symbiotiques chez <i>A. evenia</i>	53
3.3.4. Les différents scénarios évolutifs de la symbiose entre les <i>Bradyrhizobium</i> photosynthétiques et les <i>Aeschynomene</i>	54
3.4. Le piratage de la voie symbiotique par des <i>Bradyrhizobium</i> non-photosynthétiques : le mécanisme symbiotique FN-indépendant T3SS-dépendant.....	55
3.4.1. Découverte d'un nouveau processus symbiotique FN-indépendant chez le soja <i>Glycine max</i>	55
3.4.2. Le mécanisme symbiotique FN-indépendant T3SS-dépendant chez <i>Aeschynomene</i>	56

4. PRESENTATION DU SUJET DE THESE	59
CHAPITRE I	61
1. CONTEXTE DE L'ÉTUDE.....	62
2. ARTICLE 1 : THE RHIZOBIAL TYPE III EFFECTOR ERNA CONFERS THE ABILITY TO FORM NODULES IN LEGUMES	63
3. RESULTATS COMPLEMENTAIRES SUR L'ÉTUDE FONCTIONNELLE D'ERNA	64
3.1. Etude complémentaire de la localisation nucléaire d'ErnA	64
3.2. Analyse in silico comparative de la séquence protéique d'ErnA.....	65
3.3. L'extrémité C-terminale joue un rôle essentiel dans la fonction symbiotique d'ErnA	66
3.4. Matériels et Méthodes complémentaires	67
CHAPITRE II	68
1. CONTEXTE DE L'ÉTUDE.....	69
2. ARTICLE 2 : PHYLOGENETIC DISTRIBUTION AND EVOLUTIONARY DYNAMICS OF NOD AND T3SS GENES IN THE GENUS <i>BRADYRHIZOBIUM</i>	70
3. IDENTIFICATION DES DETERMINANTS COMMUNS ET SPECIFIQUES DES <i>BRADYRHIZOBIUM</i> NODULANT <i>A.</i> <i>INDICA</i>	71
3.1. Résultats des tests symbiotiques sur <i>A. indica</i>	71
3.2. Analyse de la répartition des homologues d' <i>ernA</i> dans l'arbre des <i>Bradyrhizobium</i>	72
3.2.1. Certains <i>Bradyrhizobium</i> nodulant <i>A. indica</i> ont bien un homologue d' <i>ernA</i>	73
3.2.2. Certains <i>Bradyrhizobium</i> ont un homologue d' <i>ernA</i> mais ne nodulent pas <i>A. indica</i>	73
3.2.3. Certains <i>Bradyrhizobium</i> , possédant un cluster Rhci-T3SS, nodulent <i>A. indica</i> alors qu'ils n'ont pas d'homologue d' <i>ernA</i>	75
CHAPITRE III	77
1. CONTEXTE DE L'ÉTUDE.....	78
2. ARTICLE 3 : TYPE 3 SECRETION SYSTEM (T3SS) OF BRADYRHIZOBIUM SP. DOA9 AND ITS ROLES IN LÉGUME SYMBIOSIS AND RICE ENDOPHYTIC ASSOCIATION	79
3. ARTICLE 4 : SYMBIOTIC PROPERTIES OF CHIMERIC NOD-INDEPENDENT PHOTOSYNTHETIC BRADYRHIZOBIUM STRAIN OBTAINED BY CONJUGATIVE TRANSFERT OF A SYMBIOTIC PLASMID.....	79
4. ARTICLE 5 : COMPLETE GENOME SEQUENCE OF <i>BRADYRHIZOBIUM</i> SP. ORS285, A PHOTOSYNTHETIC STRAIN ABLE TO ESTABLISH NOD FACTOR-DEPENDENT AND NOF FACTOR-INDÉPENDENTE SYMBIOSIS WITH <i>AESCHYNOMENE</i> LEGUMES.....	79

5. ARTICLE 6 : COMPLETE GENOME SEQUENCE OF <i>BRADYRHIZOBIUM</i> SP. STRAIN ORS3257, AN EFFICIENT NITROGEN-FIXING BACTERIUM ISOLATED FROM COWPEA IN SENEGAL	79
CONCLUSIONS & PERSPECTIVES	80
1. LA SYMBIOSE FN-INDEPENDANTE T3SS-DEPENDANTE : UN PROCESSUS COMPLEXE IMPLIQUANT UN COCKTAIL SUBTIL DE DIVERS EFFECTEURS	81
2. ERNA, LE PREMIER EXEMPLE D'UNE FAMILLE D'EFFECTEURS CAPABLES D'INDUIRE LA NODULATION ?	82
3. L'INDUCTION DE LA NODULATION PAR ERNA RECRUTE-T-ELLE CERTAINS ACTEURS DE LA VOIE DE SIGNALISATION NOD ?	83
4. QUELS SONT LES CIBLES ET LES INTERACTANTS D'ERNA ?	84
5. LE ROLE DU T3SS DES <i>BRADYRHIZOBIUM</i> AURAIT-IL ETE SOUS-ESTIME ?	85
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	87
ANNEXE	119

Introduction générale

1. L'endosymbiose nodulaire entre rhizobiums / légumineuses

1.1. Généralité sur la symbiose fixatrice d'azote entre les rhizobiums et légumineuses

1.1.1. L'azote, un élément essentiel au développement des plantes

L'azote est un élément majeur retrouvé dans des familles de molécules essentielles au monde vivant telles que les protéines, les acides nucléiques et d'autres composés organiques. Cet élément est l'un des plus abondants sur Terre, où il représente 79% de l'atmosphère, sous forme de diazote (N_2) gazeux. Paradoxalement, aucun organisme eucaryote ne possède le matériel enzymatique nécessaire pour l'assimilation du N_2 qui est chimiquement stable grâce à une triple liaison covalente liant les deux atomes d'azote. C'est le cas des plantes, dont le développement est ainsi dépendant de la disponibilité d'autres sources d'azote (telles que l'ammonium NH_4^+ ou le nitrate NO_3^-) présentes dans le sol, mais souvent en quantités limitantes. L'azote constitue ainsi, avec le manque d'eau et de phosphate, une des principales limitations à la croissance des végétaux (Cleland et Harpole, 2010).

Le recours à la fertilisation des sols est l'une des pratiques agricoles ayant le plus contribué à la fertilité des sols et à l'augmentation considérable des rendements des cultures au cours du siècle dernier. Cette pratique a permis de doubler la production céréalière mondiale en l'espace de 40 ans et ainsi subvenir au besoin alimentaire de plus de 6 milliards d'êtres humains (Tilman *et al.*, 2001, 2002). Ce succès, aussi appelé « révolution verte », repose largement sur le procédé Haber-Bosh utilisé pour la fabrication d'engrais azotés et servant à la synthèse d'ammoniaque (NH_3) par hydrogénation du N_2 atmosphérique. Cependant, l'utilisation intensive d'engrais azotés a des conséquences dramatiques sur l'environnement et la santé humaine. Toutes cultures confondues, il est estimé que 50% de l'azote épandu n'est pas absorbé par les plantes mais lessivé, provoquant d'importantes pollutions des eaux de surface et une eutrophisation des milieux aquatiques (Vance, 2001). A cela s'ajoute une augmentation croissante de dégagement d'oxyde nitreux (N_2O), résultant de l'activité dénitrifiante de la microflore du sol, ayant un impact important sur l'effet de serre. Enfin, la production et l'épandage de ces engrais chimiques entraînent une consommation d'énergies fossiles considérable, aggravant leurs impacts écologiques (Graham et Vance, 2003). Il devient donc de plus en plus important de développer d'autres pratiques agricoles, moins gourmandes en intrants azotés et plus respectueuses de l'environnement.

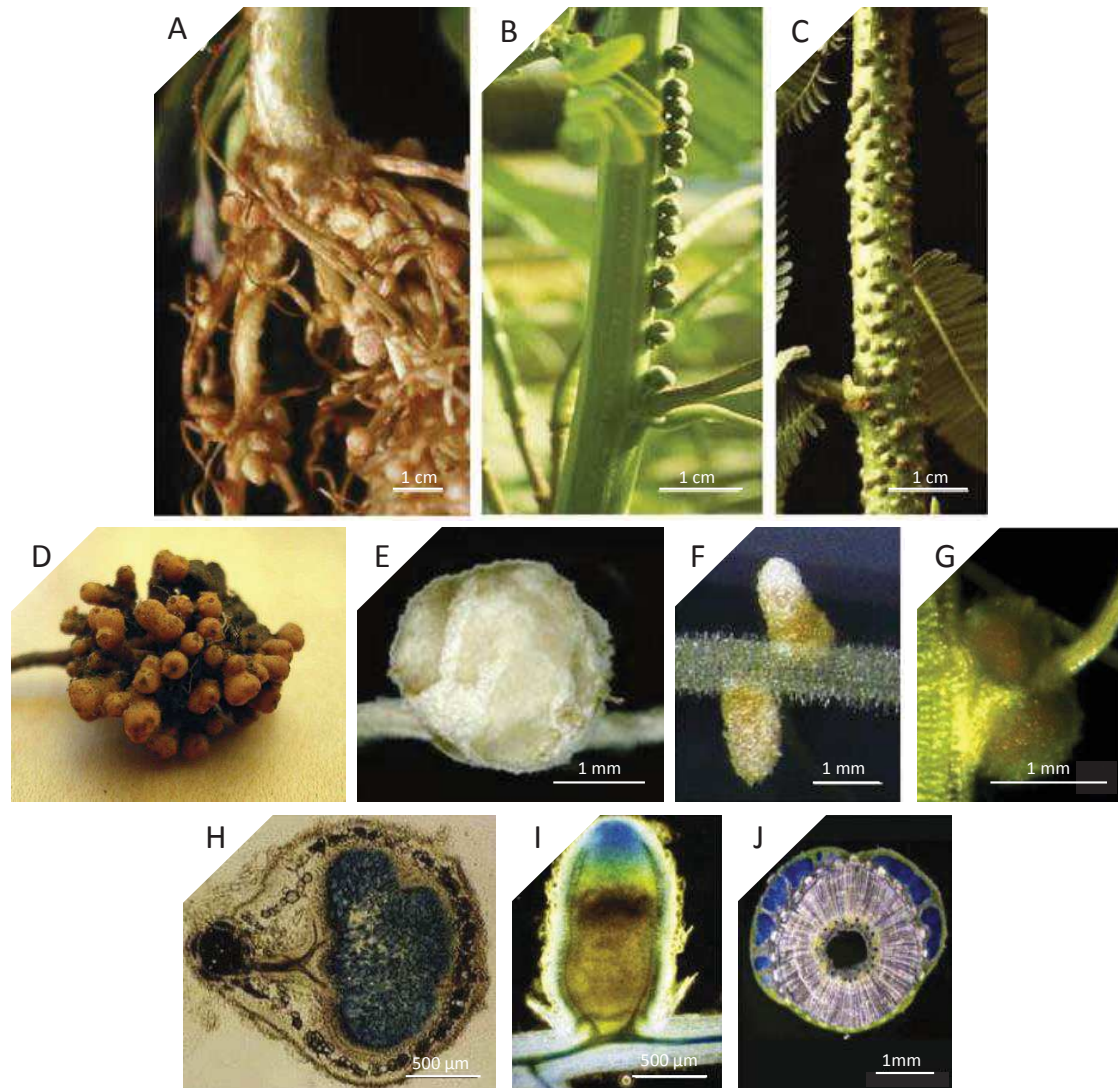


Figure 1. Variations morphologiques des nodules dans l'interaction symbiotique entre les rhizobiums et les légumineuses

A à G. Observations macroscopiques de nodules de racine et de tige. **A.** Système racinaire de *Mimosa pudica* nodulé par *Cupriavidus tawanensis*. **B.** Nodules de tige de *Sesbania rostrata* induits par *Azorhizobium caulinidans*. **C.** Nodules de tige d'*Aeschynomene afraspera* induits par *Bradyrhizobium* sp. ORS322. **D.** Nodules actinorhiziens induits par *Frankia* sp. sur une racine d'Aulne blanc (*Alnus incana*). **E.** Nodule déterminé de soja induit par *Ensifer fredii*. **F.** Nodule de type indéterminé de *Medicago sativa* induit par *Ensifer meliloti*. **G.** Nodule racinaire de type aeschynomenoïde induit sur *A. indica* par *Bradyrhizobium* sp. ORS285. **H, I et J.** Section de nodule racinaire de lotier (*L. japonicum*) (**H**) et de *M. sativa* (**I**) et de nodule de tige d'*A. sensitiva* infecté par la souche ORS278 marquée avec le gène rapporteur *lacZ* (**J**).

(Adapté de Masson-Boivin et al., 2009, Bonaldi et al., 2011 et Belin et al., 2018)

1.1.2. Les endosymbioses nodulaires

Le renouvellement des formes assimilables de l'azote peut être assuré naturellement par certains micro-organismes diazotrophes ayant la capacité de fixer naturellement le N_2 atmosphérique en ammonium NH_4^+ . Cette capacité leur est attribuée grâce à l'utilisation d'un complexe enzymatique, la nitrogénase, très conservée parmi les micro-organismes diazotrophes (Oldroyd *et al.*, 2014) (voir la partie 1.2.4). Ces organismes peuvent vivre librement, mais également en interaction symbiotique avec d'autres organismes. Parmi ces interactions symbiotiques, l'endosymbiose nodulaire est probablement celle ayant été le plus étudiée à ce jour. Elle associe des angiospermes à différentes bactéries Gram négatives (Gram -) du sol, des rhizobiums (on parle alors de symbiose rhizobactérienne), ou à des bactéries filamenteuses Gram positive (Gram +) du genre *Frankia* (on parle alors de symbiose actinorhizienne). Cette symbiose conduit à la formation d'un nouvel organe sur les racines ou les tiges de la plante, le nodule, infecté intracellulairement par la bactérie (Figure 1). Au cours de l'endosymbiose nodulaire, la plante fournit à la bactérie des substrats carbonés, issus de son activité photosynthétique, et reçoit en échange du NH_4^+ issu de la réduction du N_2 grâce à l'activité de la nitrogénase bactérienne.

La symbiose actinorhizienne est retrouvée chez 25 genres de plantes répartis aux seins de huit familles d'angiospermes (Betulaceae, Casuarinaceae, Elaeagnaceae, Myriaceae, Rhamnaceae, Rosaceae, Datisceae et Coriariaceae) (Pawlowski et Demchenko, 2012). Ces plantes peuvent former des nodules sur les racines, mais également sur les troncs de certains arbres (comme chez les filaos). La symbiose rhizobactérienne, quant à elle, s'établit avec des espèces de la famille des légumineuses (famille des *Fabaceae*), et chez la non-légumineuse *Parasponia*. L'interaction symbiotique entre les rhizobiums et les légumineuses fait l'objet de ce présent travail et les mécanismes assurant sa mise en place seront décrits dans la suite du manuscrit.

Des analyses phylogénétiques ont démontré que toutes les plantes ayant la capacité à former des endosymbioses nodulaires appartiennent au clade des Eurosoid I, incluant des plantes appartenant aux clades Fabale, Fagale, Cucurbitale et Rosale (Fa Fa Cu Ro) (Soltis *et al.*, 2000). Il est supposé que la capacité à établir ces endosymbioses fixatrices d'azote viendrait d'une prédisposition acquise par un ancêtre commun, certainement une angiosperme, il y a environ 100 millions d'années (Figure 2) (Werner *et al.*, 2014). Il existe de nombreuses similarités entre les endosymbioses nodulaires et l'interaction symbiotique des plantes avec les champignons mycorhiziens à arbuscules. Cette dernière, aussi appelée endomycorhization, s'établit entre des glomérormycètes en interaction avec près de 80% des plantes vasculaires connues (Parniske, 2008). L'endomycorhization aurait une origine bien plus ancienne que l'endosymbiose nodulaire et il est aujourd'hui largement admis que l'établissement d'une endosymbiose nodulaire vient d'une néo-fonctionnalisation de la capacité à

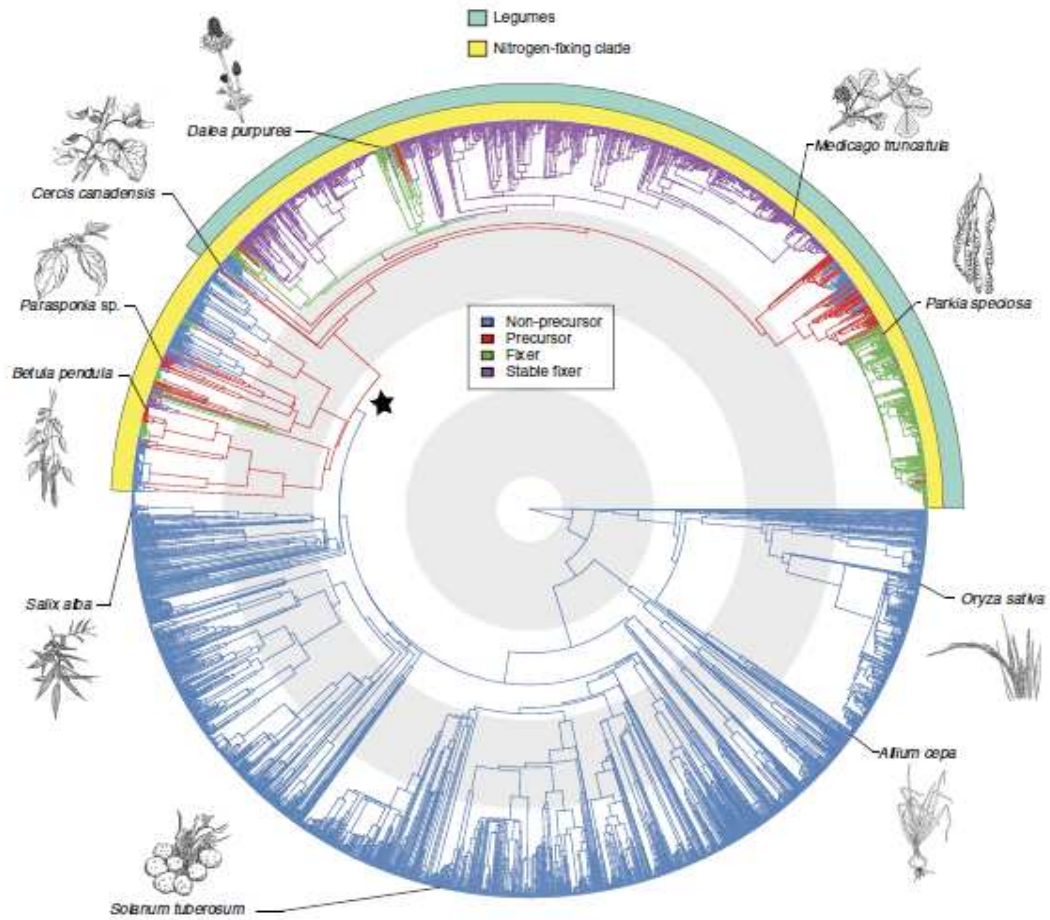


Figure 2. Origine de la capacité à former des endosymbioses nodulaires

Arbre phylogénétique de 3 467 espèces d'angiosperme obtenu par maximum de vraisemblance à partir de l'étude de 7 loci (18S, 26S, ITS, *matK*, *rbcL*, *atpB* and *trnLF*). Les branches sont colorées en fonction de l'état le plus probable de leurs nœuds ancestraux. L'étoile noire indique l'origine du précurseur probable de l'endosymbiose nodulaire. Les cercles concentriques gris et blanc représentent une période de 50 millions d'années à partir du présent. Les positions de quelques angiospermes importantes sont indiquées par des dessins autour de l'arbre. Les bandes turquoise et jaunes indiquent les légumineuses et le clade dit « fixateur d'azote », qui contient tous les angiospermes nodulants connus. (Werner *et al.*, 2014)

établir une symbiose mycorhizienne (voir la partie 1.3.6) (Kritner et Parniske, 2002). Récemment, une étude de phylogénomique comparative réalisée sur 37 espèces de légumineuses ayant la capacité ou non de développer des endosymbioses rhizobiennes a mis en évidence que cet événement d'acquisition a été suivi par de multiples événements de pertes indiquant que la fixation biologique de l'azote ne constitue pas forcément un avantage sélectif (Griesmann *et al.*, 2018).

1.1.3. Diversité des rhizobiums

Le terme général « rhizobiums » (ou « rhizobia ») regroupe toutes les bactéries Gram négatives qui induisent des nodules sur les racines, et occasionnellement sur les tiges, des légumineuses. D'un point de vue taxonomique, ils appartiennent à plusieurs clades différents des protéobactéries, et de ce fait, le terme « rhizobium » ne représente pas un taxon unique mais un groupe polyphylétique de bactéries qui partagent une fonction similaire, celle d'entrer en symbiose avec les légumineuses (de Lajudie et Young, 2017). A ce jour, les rhizobiums appartiennent à 14 genres bactériens différents répartis en deux grandes classes (Remigi *et al.*, 2016). La plupart sont des α -protéobactéries mais certains appartiennent aux β -protéobactéries (de Lajudie *et al.*, 2019). Malgré une très grande diversité phylogénétique, les rhizobiums possèdent tous un génome de grande taille (entre 5 et 10 Mb) avec un nombre de réplicons allant de 1 à 7. Leur génome est très plastique, riche en éléments transposables, en transporteurs et en gènes de régulation qui leur assurent une polyvalence sur le plan métabolique nécessaire pour la vie dans les sols et en interaction avec leurs hôtes (Masson-Boivin *et al.*, 2009). En 2008, Amadou et ses collaborateurs montrent que le corps génome des rhizobiums est relativement restreint (moins de 10% de leur génome), ce qui illustre une très grande variabilité génétique. De plus, ils mettent en évidence que les rhizobiums ne partagent pas de gènes spécifiques qui ne sont pas retrouvés chez d'autres bactéries. Les auteurs concluent qu'il n'existe pas de stratégie unique permettant l'interaction des rhizobiums avec les légumineuses. En effet, plusieurs stratégies pour la mise en place de la nodulation sont aujourd'hui connues. Elles seront présentées dans les différentes parties de cette introduction.

1.1.4. Diversité des légumineuses

Les légumineuses représentent un terme générique désignant les plantes appartenant à la famille des *Fabaceae*. Certaines plantes de cette famille présentent un intérêt agronomique majeur (comme le soja/*Glycine max*, l'arachide/*Arachis hypogaea*, le pois commun/*Pisum sativum* ou même le niébé/*Vigna unguiculata*), que ce soit pour la qualité des graines (riches en protéines) ou en tant que plantes fourragères (comme pour la luzerne/*Medicago truncatula*, ou le faux mimosa/*Leucaena*

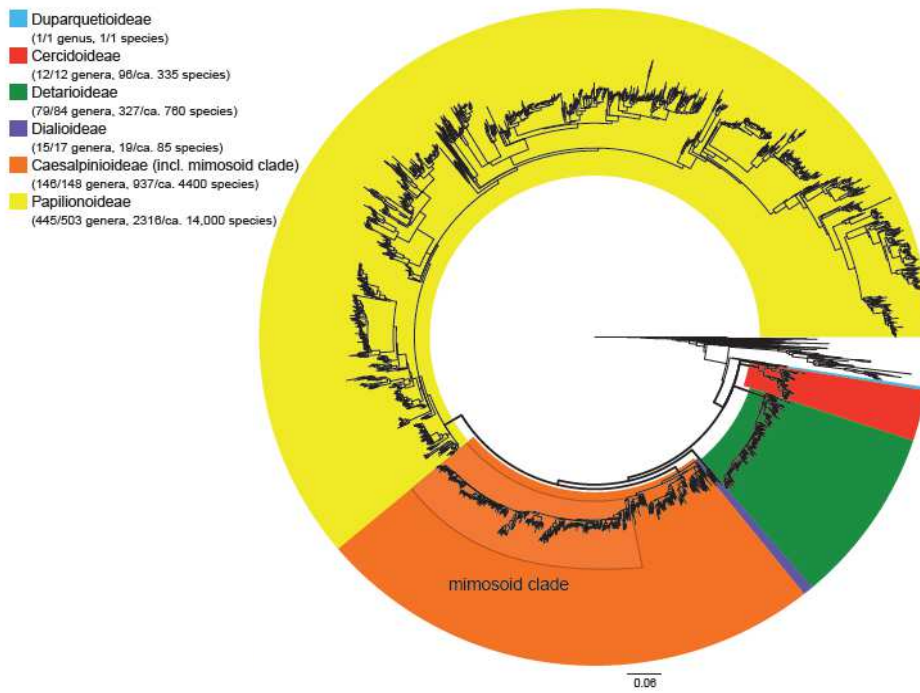


Figure 3. Arbre phylogénétique de la famille des *Fabaceae*

Arbre phylogénétique obtenu par analyse bayésienne du gène *matK* réalisée sur 3 696 représentants de légumineuses.

(Adapté de LPGW, 2017)

leucocephala). Elles sont également beaucoup utilisées en agroforesterie (comme le robinier/*Robinia pseudoacacia* ou le faux ébénier/*Laburnum anagyroides*) ou en tant que plantes pionnières pour la restauration des sols dégradés (comme le lotier/*Lotus japonicus* ou le lupin/*Lupinus luteus*) (Yahara *et al.*, 2013). La famille des *Fabaceae* comprend près de 765 genres et plus de 19 500 espèces avec une forte diversité géographique et morphologique (LPGW, 2017). Elle constitue ainsi la troisième famille la plus diversifiée après les *Orchidaceae* et les *Asteraceae* (Kenicer, 2005; Lewis *et al.*, 2013; LPGW, 2017). Les légumineuses s'étendent des forêts pluviales, aux déserts arides et aux plaines alpines, certaines d'entre elles sont même des espèces aquatiques ou semi-aquatiques. Elles comprennent des espèces annuelles ou pérennes, des arbres, des arbustes, des lianes ou des plantes herbacées (Doyle et Luckow, 2003). A ce jour, la classification des *Fabaceae* (qui se base sur le gène *matK*) distingue six sous-familles : Caesalpinioideae (qui inclut le clade des Mimosoideae), Cercidoideae, Detarioideae, Dialioideae, Duparquetioideae, et Papilionoideae (Figure 3) (LPGW, 2017). Chaque sous-famille est représentée par un nombre variable d'espèces, mais celle des Papilionoideae constitue la plus grande et la plus diversifiée avec 503 genres pour près de 14 000 espèces (LPGW, 2017).

1.1.5. Les spécificités d'interaction entre les rhizobiums et les légumineuses

Plus de 95% des espèces de Papilionoideae forment des nodules fixateurs d'azote avec les rhizobiums (Doyle & Luckow, 2003). Cependant, il existe une certaine spécificité dans l'établissement de l'interaction. Chaque espèce de légumineuse ne peut entrer en interaction qu'avec un nombre restreint de souches de rhizobiums et de la même manière, chaque souche de rhizobium possède son spectre d'hôtes de légumineuses spécifiques. Cette caractéristique est appelée « spécificité d'hôte ». Certaines souches de rhizobium présentent un spectre d'hôtes très large. C'est le cas d'*Ensifer fredii* NGR234 avec un spectre d'hôtes qui s'étend à plus de 120 genres de légumineuses différentes et à la plante non-légumineuse *Parasponia andersonii* (Pueppke et Broughton, 1999). A l'inverse, d'autres souches peuvent présenter un spectre très réduit, comme *Azorhizobium caulinodans* qui ne s'associe qu'avec *Sesbania rostrata*. Aucune corrélation ne peut être établie entre la phylogénie des légumineuses et celles des rhizobiums avec lesquelles elles interagissent.

Comme nous le verrons dans la suite du manuscrit, cette spécificité d'interaction est déterminée par de très nombreux processus qui font intervenir la reconnaissance de patterns moléculaires tout au long de l'établissement de l'interaction symbiotique, aussi bien du côté bactérien que du côté plante.

1.2. Mise en place de l'organe symbiotique

La spécificité d'interaction décrite précédemment met en évidence l'existence d'une reconnaissance spécifique des deux partenaires symbiotiques. C'est la reconnaissance de la bactérie par la plante qui déclenche les mécanismes moléculaires et physiologiques conduisant à l'organogénèse du nodule et à son infection par la bactérie. De très nombreuses études se sont attachées à la description de toutes les étapes conduisant à son établissement. Dans cette partie 1.2, nous nous attacherons à décrire, d'un point de vue physiologique et anatomique, les différentes étapes de l'organogénèse et de l'infection des nodules. Ces étapes ont été caractérisées chez plusieurs espèces de légumineuses pour lesquelles il a été observé certaines spécificités, mais je ne m'attacherais à décrire ici que le cas le plus courant, à savoir celui qui a été décrit chez les deux légumineuses modèles *Medicago truncatula* (la luzerne) et *Lotus japonicus* (le lotier).

Chez ces deux plantes, la reconnaissance des rhizobiums en surface de la racine déclenche deux réponses développementales différentes, coordonnées dans l'espace et dans le temps : l'infection et l'organogénèse nodulaire. Une première réponse a lieu au niveau des poils absorbants de l'épiderme racinaire et conduit à la formation d'un cordon d'infection qui transporte les bactéries vers le cortex en s'internalisant dans le poil absorbant. La seconde réponse est déclenchée plus profondément, au niveau du cortex ou du péricycle et assure le développement d'un primordium nodulaire par reprise de divisions cellulaires. L'élongation du cordon d'infection depuis l'épiderme jusqu'au cortex racinaire permet d'accompagner les bactéries au primordium nodulaire préalablement induit. Les bactéries seront ensuite délivrées dans les cellules du primordium où elles pourront fixer l'azote atmosphérique après une étape de différenciation en bactéroïde (Oldroyd et Downie, 2008).

1.2.1. Formation du cordon d'infection

L'épiderme racinaire représente la première barrière que la bactérie doit traverser au cours de l'infection de la plante. Dans la plupart des cas, l'étape d'infection est initiée au niveau des poils absorbants de la racine. C'est à leur extrémité que le processus symbiotique débute. Ces poils absorbants jouent un rôle fondamental dans l'attraction de la bactérie à leur surface par sécrétion, entre autres, d'acides carboxyliques et de flavonoïdes. Ils sont également impliqués dans le contrôle de la compatibilité des symbiotes via la reconnaissance de patterns moléculaires spécifiques de la bactérie, à commencer par les facteurs Nods (FNs), mais également les lipopolysaccharides (LPS), les exopolysaccharides (EPS), les polysaccharides capsulaires (KPS) ou les effecteurs sécrétés (voir la partie 1.4) (Gourion *et al.*, 2014). Cependant, chez certaines légumineuses, comme celles appartenant aux clades des Dalbergioïdes et des Genistioïdes, la barrière formée par l'épiderme est

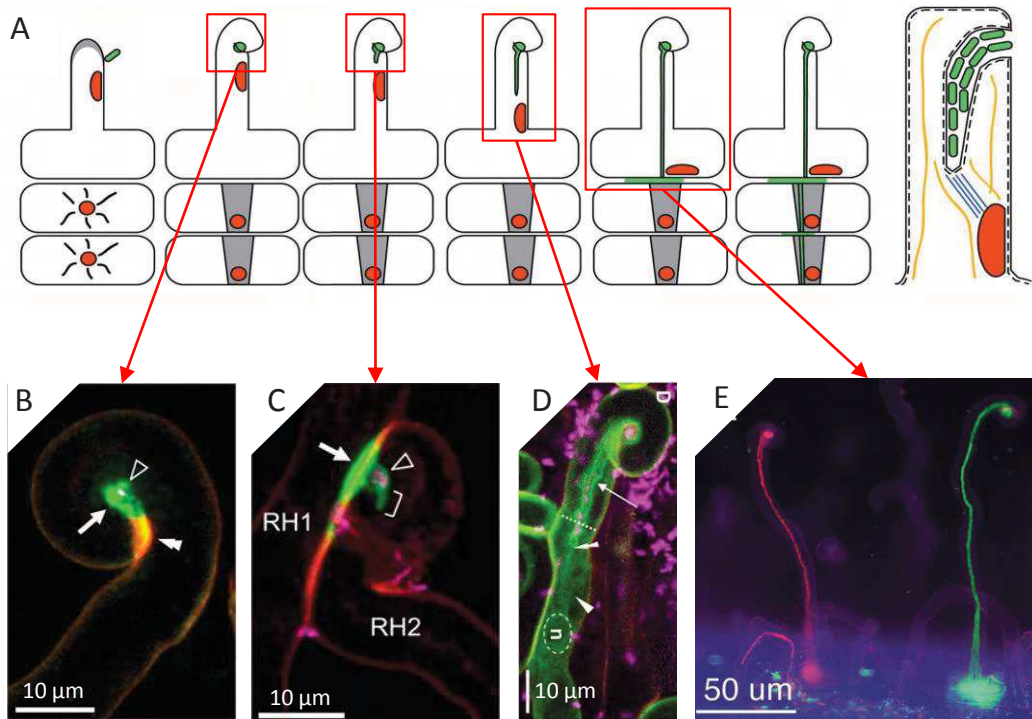


Figure 4. Formation et progression du cordon d'infection chez *M. truncatula*

A. Vue d'ensemble de la progression du cordon d'infection dans le poil absorbant (Adapté de Gage *et al.*, 2004). **B.** La reconnaissance de la bactérie (en violet) provoque une courbure du poil absorbant (en jaune) qui emprisonne la bactérie dans la chambre d'infection (en vert). **C.** La formation du pré-cordon d'infection (en vert) débute en face de la micro-colonie bactérienne (en violet). **D.** L'élongation du cordon (en vert) se fait dans l'axe du poil absorbant, guidée par le noyau (n). **E.** Le cordon d'infection transporte les bactéries (en rouge et en vert) jusqu'à la base du poil absorbant où il continuera sa progression dans les cellules suivantes.

(Adapté de Gage *et al.*, 2004 et de Fournier *et al.*, 2008; 2015)

contournée via une infection intercellulaire au niveau de zones de blessures ou de « cracks » formés à l'émergence des racines latérales (Oldroyd et Downie, 2008; Madsen *et al.*, 2010). Ce mode d'infection particulier sera décrit dans le cadre de l'interaction symbiotique entre les *Bradyrhizobium* et les plantes du genre *Aeschynomene* dans la partie 3.2.2.

Le premier changement morphologique induit par la reconnaissance des rhizobiums correspond à la courbure du poil absorbant puis à la formation d'une crosse. La courbure est provoquée par une croissance nouvellement induite à l'extrémité du poil et continuellement réorientée sur le côté, là où les rhizobiums ont adhéré en surface. De cette manière, la bactérie se retrouve piégée dans une poche formée par la courbure du poil, on parle de « chambre d'infection » (Heidstra *et al.*, 1994 ; Esseling *et al.*, 2003). Il est généralement admis que la chambre d'infection enferme une seule cellule bactérienne, qui formera une micro-colonie après division. La formation du cordon d'infection débute en face de la micro-colonie par invagination de la membrane plasmique et par accumulation de vésicules en provenance de l'appareil de Golgi, on parle alors de pré-cordon d'infection (Gage, 2004). Des observations au microscope électronique à transmission suggèrent que l'invagination et l'accès au cordon nouvellement formé sont facilités par une dégradation de la paroi pecto-cellulosique à l'endroit de l'invagination (Callaham et Torrey, 1981 ; Turgeon et Bauer, 1985).

Une fois initié, le cordon s'allonge de l'extrémité du poil absorbant jusqu'à sa base en emportant les bactéries. Cette élongation nécessite un apport actif de membrane vésiculaire et la direction de l'élongation est guidée par le noyau, relié à l'extrémité du cordon par un réseau de microtubules et d'actines (Nutman, 1959 ; Gage *et al.*, 2004). Le transport des vésicules de l'appareil de Golgi au cordon est guidé par ce réseau cytosquelettique. Les vésicules apportent du matériel pariétal pour la formation d'une paroi cellulosique interne au cordon, mais également du matériel membranaire nécessaire à son élongation (Fournier *et al.*, 2015) (Figure 4). Le rhizobium joue également un rôle important dans l'élongation du cordon d'infection via la sécrétion de composés, tels que des EPS. Ces derniers aident à la rigidification du cordon (Pellock *et al.*, 2000) et jouent un rôle de signalisation important (voir partie 1.4.2). A l'approche de la base du poil absorbant, le noyau de la cellule corticale adjacente se repositionne et un pont cytoplasmique se forme pour établir un nouveau pré-cordon (Timmer *et al.*, 1999). La paroi cellulaire à la base du poil absorbant subit alors une dégradation locale, ce qui permet au cordon de poursuivre sa progression dans l'assise cellulaire suivante. Ce processus est répété à chaque jonction cellulaire et assure la progression du cordon jusqu'au méristème nodulaire localisé dans le cortex (Gage *et al.*, 2004) (Figure 4).

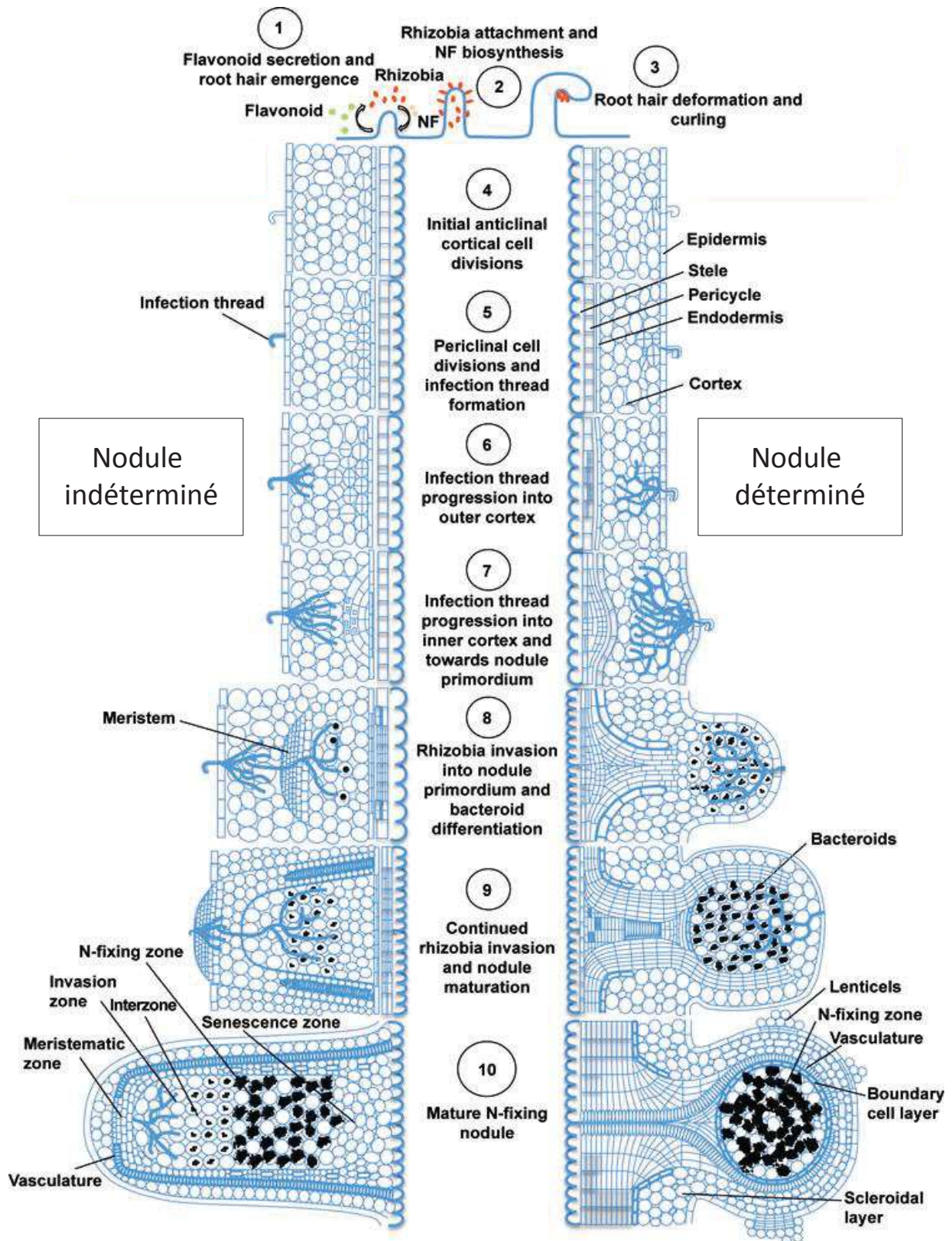


Figure 5. Représentation des différentes étapes de développement nodulaire d'un nodule déterminé de soja (à droite) et indéterminé de pois (à gauche)

Les numéros correspondent aux différentes étapes du processus d'induction et d'infection des nodules. Les nodules déterminés ont une croissance définie qui s'arrête lorsque le nodule devient capable de fixer l'azote atmosphérique. Le tissu central contient de nombreuses cellules infectées par les bactéries (en noires). Les nodules indéterminés continuent leur croissance en longueur indéfiniment. Leur tissu central est découpé en 4 zones : (I) un méristème apical assurant la croissance en longueur du nodule; (II) une zone d'infection contenant des cellules parcourues de cordon d'infection portant les bactéries; (III) une zone de fixation contenant les cellules infectés capables de fixer l'azote atmosphérique; (IV) une zone de senescence où les symbiosomes sont éliminés des cellules.

(Adapté de Ferguson *et al.*, 2010)

1.2.2. Les différentes étapes de l'organogénèse nodulaire

En plus de la formation du cordon d'infection, la reconnaissance des rhizobiums en surface déclenche une reprise du cycle cellulaire de certaines cellules du cortex. L'organogénèse nodulaire est initiée dans les tissus internes de la racine et doit être synchronisée avec la formation et l'élongation du cordon d'infection pour que la libération de la bactérie se fasse dans les bonnes cellules et au bon moment. Trois morphologies différentes de nodules ont été décrites chez les légumineuses : (I) les nodules indéterminés, allongés, dont la croissance est continue grâce à un méristème apical; (II) des nodules déterminés, arrondis, dont la croissance s'arrête peu après la libération des bactéries dans les cellules du primordium et (III) les nodules aeshynomenoïdes, également à croissance déterminée dont les particularités seront décrites dans la partie 3.2.2. Quelle que soit la morphologie du nodule, il est toujours constitué d'une zone centrale et d'une zone périphérique. La zone centrale correspond au tissu infectieux contenant les bactéries et est le siège de la fixation biologique de l'azote atmosphérique. La zone périphérique est quant à elle constituée de trois tissus différents remplissant des rôles distincts. Le tissu épidermique joue un rôle de structure et de maintien de l'intégrité physique du nodule. Le tissu endodermique forme une barrière hermétique empêchant l'oxygène de pénétrer dans le tissu infectieux. Et enfin, le tissu vasculaire assure les échanges nutritionnels entre le nodule et le reste de la plante (Guinel, 2009). Une succession de divisions cellulaires anticlines et périclines assure la formation du primordium nodulaire (Figure 5). Ces divisions débutent à un endroit différent en fonction du type de nodules formés (Oldroyd *et al.*, 2011). Les nodules de type indéterminé, comme observés chez *M. truncatula* ou *Phaseolus vulgaris* (le haricot commun), sont initiés dans le cortex interne et le péricycle (Timmers *et al.*, 1999) alors que les nodules déterminés, comme chez *L. japonicus* ou le soja *Glycine max*, proviennent du cortex moyen et externe (Ferguson et Mathesius, 2014).

Les nodules indéterminés ont la particularité de posséder un méristème apical qui assure au nodule une croissance en longueur continue, ce qui lui confère une forme allongée. La zone infectieuse de ces nodules est divisée en quatre parties en fonction du niveau de différenciation des bactéries dans les cellules (Figure 5).

1.2.3. Internalisation des bactéries dans le primordium nodulaire

Lorsque le cordon d'infection atteint le primordium nodulaire, les bactéries sont internalisées dans les cellules du cortex et forment un compartiment individuel entouré d'une membrane, et sans paroi, que l'on appelle « symbiosome » (Brewin, 2004). L'internalisation est assurée par un mécanisme comparable à une endocytose de la membrane du cordon d'infection, appelée « infection droplet » (Figure 6). Au sein du symbiosome, un profond changement métabolique va

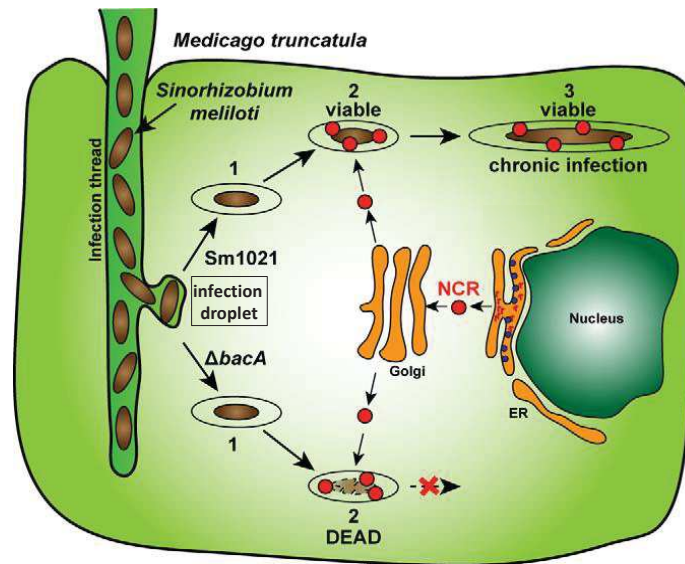


Figure 6. Internalisation des bactéries dans les cellules du tissu infectieux

Les symbiosomes sont formés par internalisation des bactéries dans les cellules du tissu infectieux depuis des « infections droplet » émergents des cordons d’infection (1). Chez les plantes du clade des IRLC et des Dalbergioïdes, les bactéries sont soumises aux NCRs sécrétés par la cellule hôte en provenance de l’appareil de Golgi (2 en haut). Le transporteur BacA (ou BclA chez les *Bradyrhizobium*) permet à la bactérie de résister à l’activité antimicrobienne des NCRs (3 en haut). En cas de mutation de ces transporteurs, la bactérie meurt et le processus symbiotique est avorté (2 en bas).

(Adapté de Haag *et al.*, 2011)

permettre à la bactérie de fixer l'azote atmosphérique grâce à la nitrogénase, c'est le processus de différenciation en bactéroïde. Chez la plupart des légumineuses, incluant *L. japonicus*, les bactéroïdes ont une taille et une forme comparables à la bactérie en vie libre. Ils conservent également leur capacité de division une fois libérés des nodules. On parle alors de bactéroïdes de type U (pour « unmodified ») (Mergaert *et al.*, 2006). Les symbiosomes contiennent généralement plus de deux bactéroïdes de type U. En revanche, la différenciation est parfois accompagnée d'un changement morphologique de la taille et de l'aspect des bactéroïdes, c'est le cas chez certaines légumineuses, comme celles du clade des IRLC (Inverted Repeat Lacking Clade) auquel appartient *M. truncatula* (Haag *et al.*, 2013) ou celles du clade des Dalbergoïdes, auxquels appartiennent les *Aeschynomene* et les plantes du genre *Arachis*. Chez *Medicago truncatula* ou *Aeschynomene afraspera*, le symbiosome contient un unique bactéroïde de forme allongée, parfois ramifié, caractérisé par une perméabilité membranaire plus importante. On parle de bactéroïdes de type E (pour « elongated »). En revanche, chez l'arachide ou chez d'autres espèces d'*Aeschynomene* comme *A. indica*, les bactéroïdes ont une forme sphérique. On parle de type S (pour « spherical ») (voir la partie 3.2.3). Dans les deux cas, durant leur différenciation, les bactéroïdes de type E et S deviennent polyploïdes (par endoréplication) et leur capacité à retrouver une croissance en vie libre est compromise. On parle alors de « différenciation terminale » et il est supposé que cette différenciation conduit à une optimisation de l'interaction symbiotique (Mergaert *et al.*, 2006; Oono et Denison, 2010; Czernic *et al.*, 2015).

Le phénomène de différenciation terminale est contrôlé par la plante hôte via la production massive d'une large diversité de petits peptides anti-microbiens riches en cystéines, les NCRs (pour « nodule-specific cysteine rich ») (Mergaert *et al.*, 2003; Van de Velde *et al.*, 2010). Chez *M. truncatula*, plus de 600 gènes codant pour des NCRs ont été identifiés et beaucoup d'entre eux sont localisés dans les mêmes régions génomiques. Malgré leur nombre considérable, suggérant une redondance fonctionnelle, certains d'entre eux sont essentiels et leur mutation spécifique conduit, chez *M. truncatula*, à des problèmes de différenciation et à une symbiose non fonctionnelle (Horváth *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2017). Pendant longtemps, il était supposé que le processus de différenciation impliquant des NCRs était spécifique aux légumineuses du clade des IRLC mais récemment, comme décrit dans la partie 3.2.3, des NCRs-like ont pu être mis en évidence chez les plantes du genre *Aeschynomene*.

Du côté bactérien les gènes *bacA*, ou *bclA* chez certains *Bradyrhizobium*, représentent des éléments clés de la différenciation en bactéroïde. Ces gènes codent pour des transporteurs membranaires qui confèrent une résistance à l'activité anti-microbienne des NCRs (Haag *et al.*, 2011). Un mutant du gène *bacA* chez *Ensifer meliloti*, ou *bclA* chez la souche *Bradyrhizobium* sp. ORS285, induit la formation de nodules non-fonctionnels dans lesquels les bactéries ne se

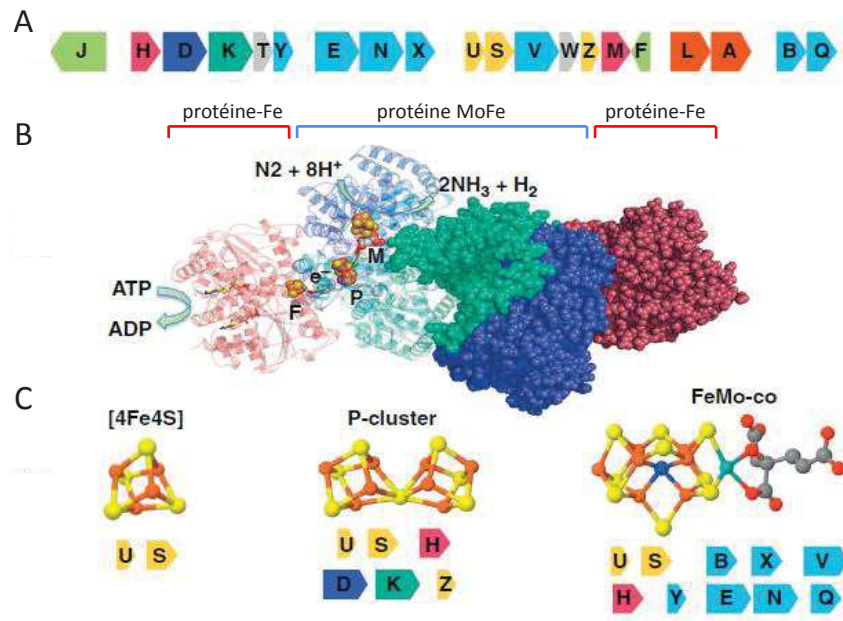


Figure 7. Structure de la nitrogénase et organisation des gènes impliqués dans sa biosynthèse

A. Organisation du cluster de gènes de fixation d'azote *nif* d'une bactérie fixatrice d'azote, *Klebsiella oxytoca*. La couleur des gènes se rapporte à la structure en 3 dimensions représentée en **B**. **B.** Structure enzymatique du complexe nitrogénase. **C.** Organisation atomique des trois différents métallocusters de la nitrogénase. Les gènes *nif* impliqués dans la biosynthèse de chaque métallocuster sont représentés en dessous.

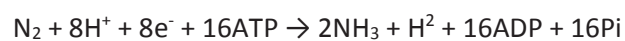
(Adapté de Oldroy et Dixon, 2014)

différencient pas en bactéroïdes et meurent rapidement après avoir été confrontées aux NCRs produits par la cellule hôte (Haag *et al.*, 2011; Guefrachi *et al.*, 2015) (Figure 6).

1.2.4. La nitrogénase

Une fois intégrée dans les symbiosomes, ou une fois le processus de différenciation en bactéroïde terminé, les bactéries deviennent aptes à fixer l'azote atmosphérique grâce à l'expression des gènes codant pour la nitrogénase. Chez les rhizobiums, la nitrogénase est un complexe enzymatique associant un homodimère δ_2 (protéine-Fe; NifH) constitué de deux chaînes identiques, et un hétérotétramère $\alpha_2\beta_2$ (protéine Mo-Fe; NifDK). La protéine-Fe est une dinitrogénase réductase qui possède un centre Fer-Soufre (le cluster-P) et un site d'interaction avec l'ATP (adénosine triphosphate). La protéine Mo-Fe est composée de deux sous-unités α (NifD), de deux sous-unités β (NifK) et porte deux métalclusters 4Fe-4S ainsi que deux cofacteurs polypeptidiques fer-molybdène-soufre (FeMo-co). Les gènes *nifH*, *nifD* et *nifK* sont généralement retrouvés sur un plasmide ou un îlot symbiotique à proximité de d'autres gènes *nif* et *fix* impliqués dans la synthèse du FeMo-co, la maturation, le fonctionnement et la régulation de la nitrogénase (Figure 7).

La réaction de fixation d'azote commence par la réduction de deux molécules d'ATPs par la protéine-Fe qui induit un changement de conformation et la rend capable d'oxyder une ferrédoxine ou une flavodoxine d'origine végétale. Les électrons captés sont ensuite transférés à la protéine Mo-Fe par l'intermédiaire du molybdène où la réduction du diazote en NH_3 a lieu selon la réaction suivante :



La fixation d'azote par la nitrogénase nécessite un apport en ATPs très important. En effet, en tenant compte du besoin en ferrédoxine ou flavodoxine réduite, la réduction du diazote atmosphérique requiert 25 équivalents d'ATPs par molécule de N_2 fixée, ce qui fait de ce processus l'un des plus coûteux en énergie du monde vivant (Simpson et Burris, 1984). De manière surprenante, malgré la capacité à fixer le N_2 en condition symbiotique, la plupart des rhizobiums sont incapables de le fixer en condition de vie libre. En effet, la synthèse d'un des constituants essentiels de la nitrogénase, le FeMo-co, nécessite l'apport d'homocitrate non synthétisé par la bactérie mais transféré par la plante aux bactéroïdes. Seules certaines souches de *Bradyrhizobium* et *Azorhizobium caulinodans* qui présentent le gène *nifV*, codant une homocitrate synthase, possèdent la capacité de fixation du N_2 en vie libre (Dreyfus *et al.*, 1988; Alazard, 1990; Wongdee *et al.*, 2016; Nouwen *et al.*, 2017).

Le contrôle de la pression partielle en oxygène dans le tissu infectieux du nodule est très important. En effet, la nitrogénase est en partie constituée de métalclusters qui peuvent s'oxyder

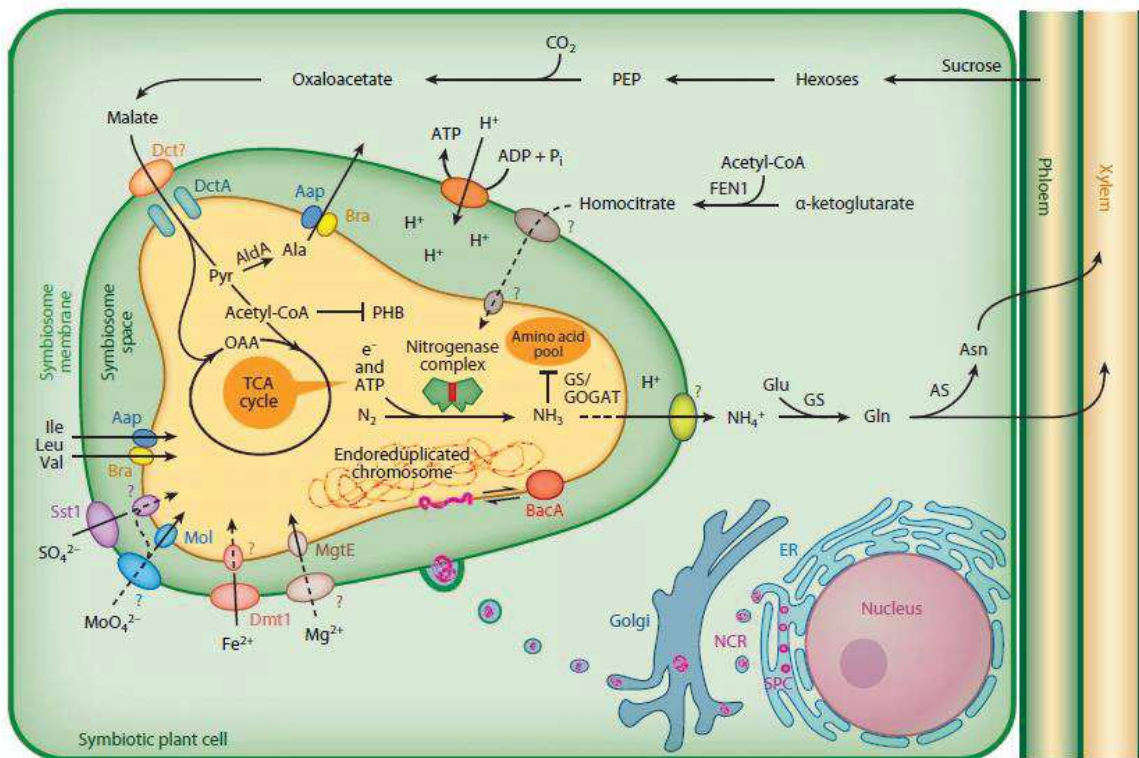


Figure 8. Représentation du métabolisme au cours de la fixation d'azote et des différents échanges entre le bactéroïde et la cellule hôte

La partie en bas à droite est spécifique des plantes du clade des IRLC et des Dalbergoïdes et représente la production de NCRs et leur sécrétion dans le symbiosome. En bref, la plante fournit à la bactérie des substrats carbonés, majoritairement sous forme de malate, issus du catabolisme des hexoses produits par la photosynthèse. Ces substrats sont utilisés par la bactérie pour la production d'ATPs via le cycle de Krebs (cycle TCA) qui assure l'apport énergétique pour l'activité nitrogénase. L'azote fixé par la nitrogénase est exporté sous forme de NH₄⁺ dans la cellule hôte qui peut ensuite le métaboliser dans des acides aminés grâce à la glutamate synthase (GS).

(Adapté de Oldroyd *et al.*, 2011)

en présence de dioxygène et ainsi rendre la nitrogénase irréversiblement inactive. Afin de réduire la pression partielle en oxygène, la plante produit une globine spécifique à l'intérieur du nodule, la leghémoglobine, qui séquestre l'oxygène pour assurer le bon fonctionnement de la nitrogénase (Oldroyd et Dixon, 2014). L'abondance de cette protéine dans les nodules est responsable de la coloration rose du tissu infectieux.

1.2.5. Echanges nutritionnels au sein du nodule

La membrane du symbiosome est une interface qui assure la régulation du transport de métabolites entre la plante hôte et les bactéroïdes fixateurs d'azote. De nombreux transporteurs et canaux ont été caractérisés et permettent le contrôle des échanges entre les deux organismes (Clarke *et al.*, 2014). Les principaux échanges de nutriments à travers la membrane des symbiosomes sont les transports de dicarboxylates, de la plante aux bactéroïdes, en échange du produit de fixation de la nitrogénase, le $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ (Halbleid et Ludden, 2000). La plante fournit principalement du malate aux bactéroïdes, venant de l'oxydation des hexoses produits par son activité photosynthétique. Elle apporte également à la bactérie l'homocitrate nécessaire à la synthèse du FeMo-co de la nitrogénase. L'oxydation du malate par la bactérie via le cycle de Krebs (ou cycle TCA pour « tricarboxilic acid ») fournit l'ATP nécessaire pour le fonctionnement de la nitrogénase. Chez les bactéroïdes, l'assimilation de l'ammonium produit par la nitrogénase est bloquée pour être secrétée dans les cellules végétales. D'autres échanges de nutriments ont lieu au cours de l'interaction symbiotique et pour plus d'informations, j'invite le lecteur à consulter les revues suivantes : Oldroyd *et al.*, 2011; Udvardi et Poole, 2013; Clarke *et al.*, 2014 (Figure 8).

De la reconnaissance des rhizobiums jusqu'à la formation d'un nodule fixateur d'azote, la symbiose entre les rhizobiums et les légumineuses est un processus complexe qui fait intervenir de très nombreux acteurs moléculaires. Dans la partie suivante, nous nous attacherons à la description des acteurs principaux qui assurent la mise en place et le maintien de cette interaction symbiotique.

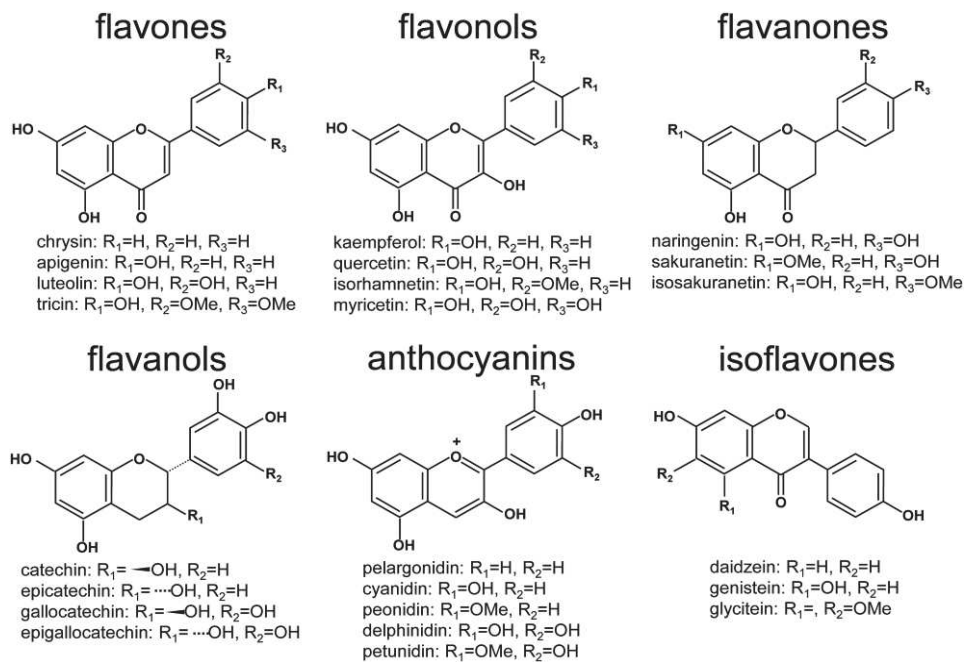


Figure 9. Structure chimique générique de différents flavonoïdes produits par les légumineuses

Les différentes structures des flavonoïdes produits par les légumineuses influencent leur reconnaissance par NodD ce qui conditionne le spectre d'hôte de la plante.

(Tohge *et al.*, 2017)

1.3. Les bases moléculaires de l'interaction symbiotique entre les rhizobiums et les légumineuses

1.3.1. L'étape pré-symbiotique : la reconnaissance des deux partenaires et le dialogue moléculaire

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires, des polyphénols, aux fonctions extrêmement variées chez les plantes. Plus de 8000 flavonoïdes différents ont été identifiés jusqu'à présent, ce qui en fait la classe de polyphénols la plus représentée (Falcone Ferreyra *et al.*, 2012; Tohge *et al.*, 2017). Ces molécules sont excrétées par le système racinaire des plantes et représentent les premiers signaux perceptibles par la microflore de la rhizosphère (Mönchgesang *et al.*, 2016). Au cours de l'interaction entre les rhizobiums et les légumineuses, ces flavonoïdes remplissent plusieurs fonctions déterminantes. Tout d'abord, ils agissent en tant que chimio-attractant pour aider à l'attraction des bactéries vers la surface des racines. Cependant, ils sont principalement connus pour leur rôle dans l'induction de l'expression des gènes de nodulation (gène *nod*) chez les rhizobiums. Comme nous le verrons, ces gènes interviennent dans la synthèse et la sécrétion des facteurs Nods (FNs), la molécule signal dont la reconnaissance par la plante déclenche le processus symbiotique (Rolfe, 1988; Lerouge *et al.*, 1990). Cette induction chez la bactérie se fait par l'intermédiaire de NodD, un facteur de transcription de la famille LysR qui, en se liant avec les flavonoïdes, assure l'induction des gènes de nodulation *nod* (Schell, 1993). Tous les flavonoïdes ne peuvent pas agir en tant qu'inducteur. Il existe une certaine spécificité de l'interaction de NodD avec les flavonoïdes, ce qui constitue une première étape de sélection du partenaire symbiotique et permet une modulation du spectre d'hôtes de la plante (Cunningham *et al.*, 1991) (Figure 9).

Comme tous les membres de la famille de facteurs de transcription LysR, le régulateur NodD possède un domaine C-terminale de fixation à un inducteur, et un domaine N-terminal caractérisé par un motif HTH (pour « helix-turn-helix ») permettant l'interaction avec l'ADN. Une fois la liaison avec les flavonoïdes établie, NodD interagit avec l'ADN sur une séquence conservée, appelée *nod* box, et déclenche l'expression des gènes *nod* situés en aval. Comme nous le verrons dans la partie 2.3.2, NodD régule également l'expression des gènes codant pour les systèmes de sécrétion de type III (T3SS) et IV (T4SS) (Deakin et Broughton, 2009). Certaines souches de rhizobiums, comme *Rhizobium leguminosarum*, ne possèdent qu'une seule copie de NodD et sa mutation leur fait perdre leur capacité de nodulation. A l'inverse, de nombreux rhizobiums possèdent plusieurs copies de NodD. C'est le cas de *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110, *Bradyrhizobium* sp. ORS285, *E. fredii* NGR234, *E. meliloti* ou même *Rhizobium tropici* qui possèdent entre deux et cinq copies de NodD (Broughton *et al.*, 2000). Il est supposé que les différentes versions de NodD interagissent avec

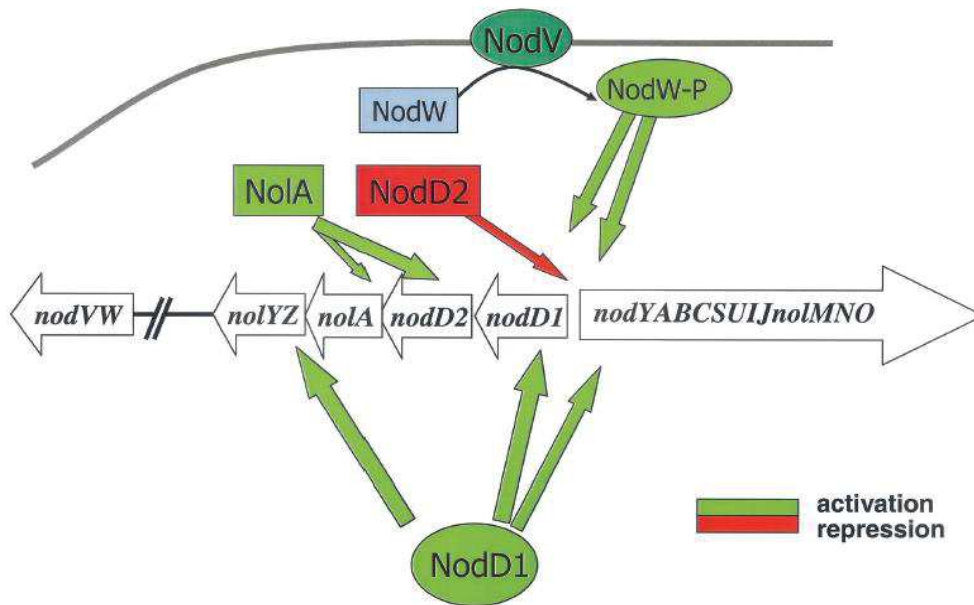


Figure 10. Modèle de la régulation de l'expression des gènes *nod* chez la souche *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110

Après reconnaissance de la génistéine, l'expression des gènes de nodulation *nod* et *nol* chez USDA110 est activée par les régulateurs NodD1 et NodVW. Une répression de l'expression des gènes de nodulation est contrôlée par Nola et par NodD2. Nola active l'expression de *nodD2* qui agit comme répresseur de l'expression des gènes *nod*.

(Loh et Stacey, 2003)

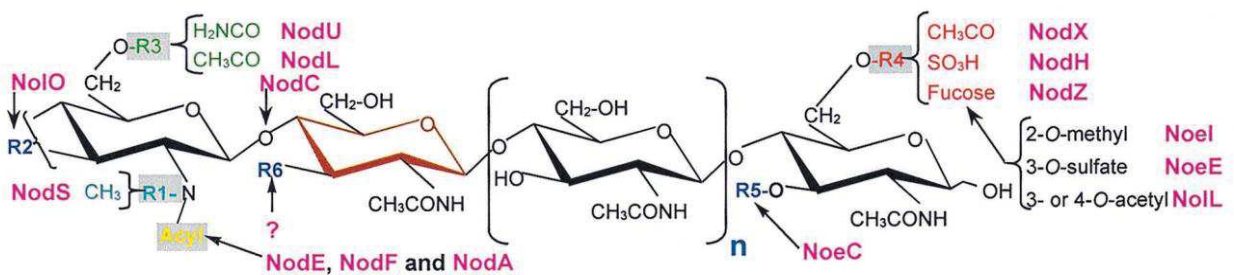


Figure 11. Structure chimique générique des facteurs Nods produits par les rhizobiums

La structure des FN peut varier d'une souche bactérienne à l'autre en fonction de son répertoire de gènes *nod*. Les gènes *nodABC* structuraux participent à la synthèse du core chimique des FN. D'autres gènes *nod*, plus spécifiques, et le plus souvent dispensables, sont impliqués dans l'ajout de décorations autour du squelette carboné aux emplacements R1 à R6.

(Perret *et al.*, 2000)

différents flavonoïdes, permettant ainsi une modulation du spectre d'hôtes de la bactérie. En effet, le transfert de NodD1 de NGR234 à d'autres rhizobiums leur confère la capacité de noduler de nouvelles plantes (Bender *et al.*, 1988).

Les facteurs de transcription de la famille LysR sont connus pour être fonctionnellement actifs sous forme de tétramère (Maddock et Oyston, 2008). Bien qu'aucune étude ne montre une interaction de NodD avec lui-même, la présence de plusieurs versions de NodD chez certains rhizobiums pourrait suggérer l'existence d'homo ou d'hétéro-tétramère. La combinaison de différents NodD au sein d'un hétéro-tétramère pourrait alors augmenter le nombre de flavonoïdes reconnus et ainsi contribuer à l'élargissement du spectre d'hôtes de la bactérie. Il est à noter qu'aucune interaction directe des flavonoïdes avec NodD n'a été à ce jour démontrée.

Même si NodD est considéré comme le « master régulateur » de l'expression des gènes de nodulation, d'autres types de régulateurs sont connus pour leur participation à la modulation de l'expression des gènes *nod*. Chez *E. meliloti*, un second régulateur LysR, SyrM, régule l'expression des gènes *nod* indépendamment de la reconnaissance de flavonoïdes (Kondorosi *et al.*, 1991). Chez *B. diazoefficiens* USDA110, les trois régulateurs supplémentaires Nola, NodV et NodW peuvent contrôler l'induction de l'expression des gènes de nodulation en l'absence de NodD (Loh et Stacey, 2003) (Figure 10).

Les facteurs Nod (FNs), synthétisés et sécrétés par les gènes *nod* suite à l'activation de NodD par les flavonoïdes, correspondent à des molécules de lipochitooligosaccharides (LCO). De manière intéressante, des LCOs sont aussi impliqués dans la mise en place de la symbiose mycorhizienne, ils sont alors appelés facteurs Myc-LCOs (Maillet *et al.*, 2011). Les FNs présentent un squelette moléculaire conservé chez tous les rhizobiums possédant des gènes *nod*. Ce squelette est constitué de trois à six résidus de N-acétyl-D-glucosamine liés en β -1,4 auquel est associé une chaîne d'acides gras qui peut présenter une longueur et un niveau de saturation variable (Sergeevish *et al.*, 2015) (Figure 11). Cette structure est très proche de celle de la chitine, à l'exception de la chaîne d'acides gras supplémentaires. Elle est synthétisée par trois gènes clés, *nodA*, *nodB* et *nodC*, organisés en opérons et strictement conservés chez tous les rhizobiums nodulants, à l'exception des *Bradyrhizobium* photosynthétiques dont je discuterai dans la partie 3.2. D'autres gènes *nod*, plus spécifiques à certaines espèces, voir même à certaines souches, contrôlent l'ajout de nombreuses modifications moléculaires sur le squelette des FNs. La plupart des rhizobiums sécrète un assortiment de FNs. Chaque souche possède ainsi un set spécifique de gènes *nod* qui, ensemble, permettent la synthèse d'un cocktail de FNs reconnus par la plante hôte (Sergeevish *et al.*, 2015). Le spectre d'hôtes d'un rhizobium est ainsi largement conditionné par ces différentes modifications. Pour exemple, les gènes *nodH*, *nodP* et *nodQ*, retrouvés chez *E. meliloti*, contrôlent l'ajout d'un

groupement sulfate à l'extrémité réductrice, ce qui permet à ces FNs d'être spécifiquement reconnus par la plante hôte *Medicago truncatula* (Ardourel *et al.*, 1994). L'inactivation de *nodS* (qui code pour une N-méthyltransferase) chez *A. caulinodans*, *E. fredii* NGR234 et *R. tropici* abolit la nodulation sur *Leucaena leucicephala* alors que son introduction chez d'autres souches la confère (Lewin *et al.*, 1990; Krishnan *et al.*, 1992; Jabbouri *et al.*, 1995; Welkens *et al.*, 1995). Il existe ainsi de multiples gènes *nod* spécifiques décrits chez différentes souches de rhizobiums, l'alphabet étant limité à 26 lettres, ceux-ci ont été dénommés par la suite *nol* puis *noe*. Le dernier en date, oublié en 2019 par Daubech et ses collaborateurs, a été nommé *noeM*. Malheureusement, il n'existe pas à l'heure actuelle de revue récente reprenant l'ensemble de ces gènes *nod*, *nol* et *noe*.

Enfin, les gènes *nodI*, *nodJ* codent pour des protéines formant un complexe impliqué dans la sécrétion des FNs à travers l'enveloppe bactérienne (Dénarié *et al.*, 1996).

1.3.2. La perception des facteurs Nods par la plante

Les études portant sur la perception des FNs, et sur la signalisation moléculaire qui en dérive, ont principalement été menées sur les deux légumineuses modèles *Medicago truncatula* et *Lotus japonicus*. Ce sont l'utilisation de la génétique directe et de l'analyse des phénotypes de banques de mutants, qui ont permis l'identification de la majorité des acteurs de la voie de transduction du signal de nodulation. Sauf à de rares exceptions, chacun des gènes caractérisés chez l'une des deux plantes modèles trouve son homologue fonctionnel chez la seconde. Dans cette partie, je m'attacherais à décrire les principaux acteurs de la voie de signalisation moléculaire conduisant à l'induction de la nodulation. Pour cela, j'utiliserais lorsque cela est possible, la nomenclature des gènes utilisée chez *Lotus japonicus*. Cette description n'a pas pour but d'être exhaustive, mais seulement d'apporter une vue d'ensemble de la voie de transduction déclenchée par la reconnaissance des FNs. Pour plus d'informations, j'invite le lecteur à consulter les revues détaillées suivantes : Ferguson *et al.*, 2010; Oldroyd, 2013; Sergeevich *et al.*, 2015; Kudla *et al.*, 2018.

L'analyse des banques de mutants de *M. truncatula* et *L. japonicus* a rapidement conduit à l'identification de locus impliqués dans la perception des FNs. Une mutation dans l'un de ces locus entraîne une perte systématique de la capacité à noduler, on parle de phénotype Nod⁻. Les gènes de ces locus ont été caractérisés comme codant pour des récepteurs sérine/thréonine kinases à motif lysine extracellulaire (LysM-RLK) (Amor *et al.*, 2003; Madsen *et al.* 2003; Radutoiu *et al.*, 2003). Les récepteurs LysM sont impliqués dans la perception de nombreux patterns moléculaires conservés chez les bactéries, les MAMPs (pour « microbe-associated molecular patterns »), tels que les lipopolysaccharides, les peptidoglycanes ou la chitine (Tanaka *et al.*, 2013; Zipfel et Oldroyd, 2017).

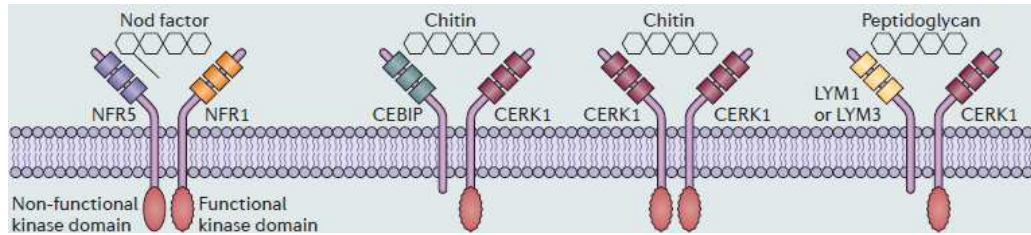


Figure 12. Reconnaissance des FNs et de différents oligosaccharides par des récepteurs LysM-RLKs

Les récepteurs LysM-RLKs sont impliqués dans la perception de composés oligosaccharidiques produits par les microorganismes. Les deux récepteurs NFR1/NFR5 reconnaissent les FNs produits par les rhizobiums de la même manière que les récepteurs CEBIP, CERK1 et LYM1/3 reconnaissent la chitine et les peptidoglycans. La perception des FNs entraîne l'activation de la signalisation symbiotique alors que la perception de la chitine ou des peptidoglycans entraîne une signalisation conduisant à l'activation du système immunitaire.

(Oldroyd, 2013)

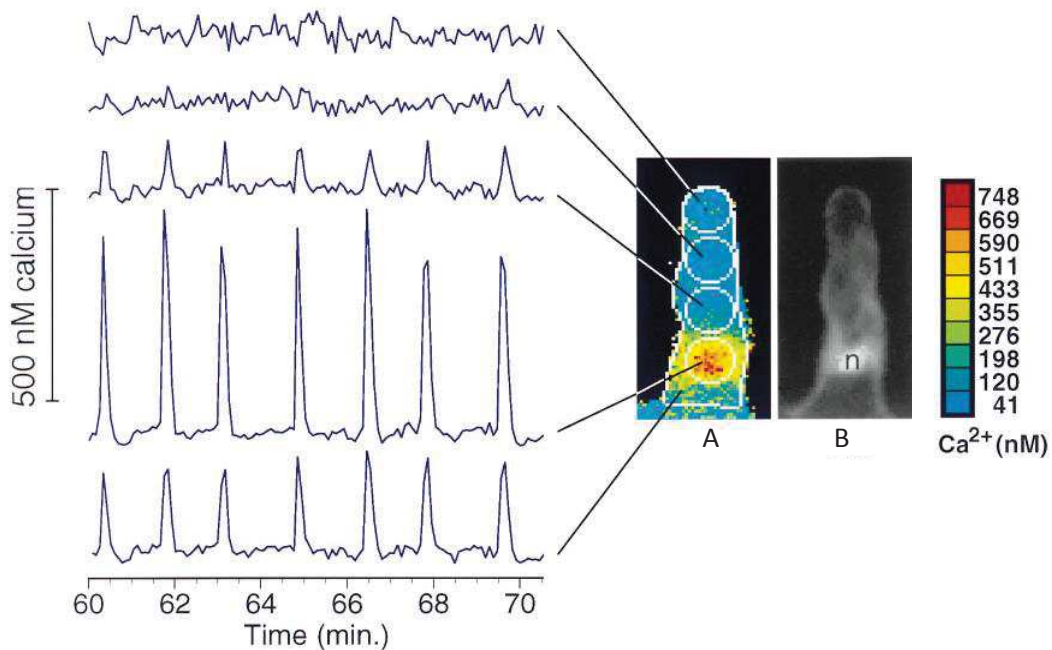


Figure 13. Mesure spatio-temporelle des oscillations calciques générées dans un poil absorbant lors de la reconnaissance des FNs par les récepteurs NFR1/NFR5

Les régions mesurées sont entourées d'un cercle blanc dans l'insert A. La concentration en calcium est représentée par un gradient de couleurs allant du bleu (moins concentré) au rouge (plus concentré) comme indiqué dans la barre d'échelle à droite. L'insert B permet de localiser l'emplacement du noyau (n).

(Adapté de Ehrhardt *et al.*, 1996)

Ces récepteurs sont caractérisés par la répétition d'un petit motif de 44 à 65 acides aminés (le motif LysM) associé à un domaine kinase (RLK). Deux récepteurs LysM-RLKs différents ont été identifiés comme jouant un rôle majeur dans la perception des FNs : NFR1 pour « *nod factor receptor 1* » (LYK3 chez *M. truncatula*) et NFR5 (NFP). Ces deux récepteurs sont membranaires et interagissent ensemble pour former un hétérodimère dont l'interaction avec les FNs a pu être démontré chez le lotier en 2012 (Broghamme *et al.*, 2012; Moling *et al.*, 2014). Le domaine kinase de NFR5 est naturellement muté, le rendant non fonctionnel. A l'inverse, celui de NFR1 est nécessaire pour l'induction nodulaire. Des analyses *in vitro* ont permis de démontrer qu'il possède une activité d'autophosphorylation et de transphosphorylation à NFR5 (Madsen *et al.*, 2011). Le modèle ainsi établi propose que la reconnaissance des FNs par le complexe NFR1/NFR5 libère l'activité d'autophosphorylation de NFR1 qui transfère ensuite le groupement phosphate à NFR5 (Figure 12).

Il est important de noter que ce mécanisme de reconnaissance des FNs est très proche de celui qui assure la reconnaissance de la chitine par le complexe de récepteurs LysM-RLKs LYK5/CERK1 chez *Arabidopsis thaliana* (Figure 12). Il a ainsi été suggéré que la fonction initiale des LysM-RLKs serait la reconnaissance de dérivés de chitine produits par les champignons pathogènes (Nakagawa *et al.*, 2011). De plus, l'étude des régions génomiques qui entourent les gènes LysM-RLKs chez les légumineuses et chez d'autres plantes (notamment *A. thaliana* et le riz) laisse supposer que les LysM-RLKs descendent tous d'un ancêtre commun (Zhu *et al.*, 2006). Zhang et ses collaborateurs (2007) proposent que les LysM-RLKs des légumineuses ont suivi plusieurs étapes de duplications et de diversifications ayant conduit à la capacité à reconnaître spécifiquement les FNs. Toutes ces données mettent en évidence les liens très étroits qui existent entre le déclenchement du système immunitaire et la voie de signalisation symbiotique (Zipfel et Oldroyd, 2017).

1.3.3. Le déclenchement des oscillations calciques

La perception des FNs au niveau de la membrane des poils absorbants entraîne deux réponses physiologiques : (I) un influx rapide de calcium Ca^{2+} dans la cellule depuis le milieu extracellulaire et; (II) une oscillation de la concentration en Ca^{2+} localisée autour du noyau (Ehrhardt *et al.*, 1996; Shaw et Long, 2003; Kosuta *et al.*, 2008) (Figure 13). Ces oscillations nucléaires représentent un marqueur de la réponse symbiotique et de nombreuses études ont permis l'identification des différentes protéines recrutées pour la mise en place de ce signal. Chez le lotier, deux transporteurs de potassium, CASTOR et POLLUX, localisés au niveau de l'enveloppe nucléaire, sont indispensables pour le déclenchement des oscillations. Chez *Medicago truncatula*, c'est DM11 qui remplit le rôle joué par CASTOR et POLLUX. Bien que ces canaux soient nécessaires pour la mise en place des oscillations calciques, ils n'assurent que le transport de potassium. Celui-ci permet de

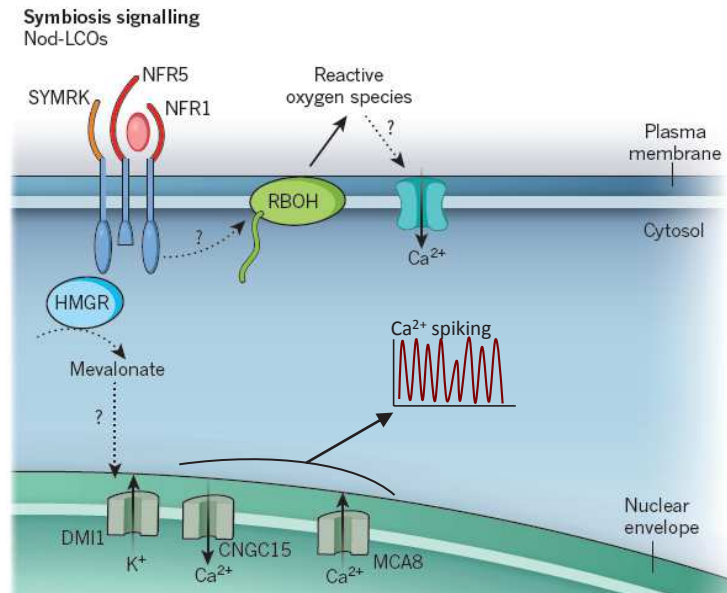


Figure 14. Modèle de la voie de signalisation conduisant à la génération des oscillations calciques

La reconnaissance des FNs par les deux récepteurs NFR1/NFR5 déclenche deux réponses calciques : (I) l'influx de calcium depuis le milieu extérieur qui est supposé être dépendant de certaines NADPH oxydases RBOH comme lors de l'activation du système immunitaire (Zipfel et Oldroyd, 2017); (II) des oscillations de la concentration en calcium localisées autour du noyau. Cette deuxième réponse serait dépendante de la production de mévalonate qui jouerait le rôle de second messager entre le site de reconnaissance des FNs sur la membrane cytoplasmique et celui de la génération des oscillations calciques par des transporteurs de l'enveloppe nucléaire. (Adapté de Oldroyd, 2013 et de Zipfel et Oldroyd, 2017)

contrebalancer la dépolarisation membranaire engendrée par les oscillations calciques. Le canal permettant le transport du calcium, CNGC15, n'a été identifié que récemment chez *Medicago truncatula*. Il interagit avec DMI1 et assure la libération du calcium depuis l'enveloppe nucléaire (Charpentier *et al.*, 2016). Enfin, l'homéostasie nucléaire du calcium est maintenue par la fonction de MCA8 dont l'activité est dépendante de l'hydrolyse d'ATP (Capoen *et al.*, 2011).

Pendant longtemps, le mécanisme qui relie la perception des FNs par NFR1/NFR5 au déclenchement des oscillations calciques nucléaires est resté énigmatique. Ces dernières années, de nombreuses études ont permis d'avancer sur la compréhension de cette étape. Identifié en 2002, la mutation de *SYMRK* (*DMI2*) entraîne un phénotype Nod-. Ce n'est qu'en 2014 qu'Antolin-Llovera et ses collaborateurs démontrent que SYMRK joue un rôle central dans la voie de transduction du signal. Le gène *SYMRK* code un récepteur sérine/thréonine kinase mais, à la différence de NFR1/NFR5, il ne possède pas de domaine LysM mais un domaine LRR (pour « leucine-rich repeats ») (Endre *et al.*, 2002). Il interagit avec NFR5 sur la membrane plasmique des cellules (Antolin-Llovera *et al.*, 2014) et son domaine kinase interagit du côté cytoplasmique avec HMGR (une 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA reductase), une enzyme clé de la voie de biosynthèse du mévalonate. Le mévalonate pourrait bien représenter le second messager assurant la transduction du signal de la membrane du poil absorbant au noyau puisque son application seule est suffisante pour activer les oscillations calciques (Venkateshwaranet *et al.*, 2015). La transduction du signal mévalonate semble passer du cytoplasme au noyau par les pores nucléaires puisque de nombreuses nucléo-porines (NUP85, NUP133 et NENA) sont nécessaires pour la génération des oscillations calciques (Kanamori *et al.*, 2006; Saito *et al.*, 2007). Combinant toutes ces données, un modèle de la génération des oscillations calciques, présenté dans la figure 14, a été proposé par Giles Oldroyd en 2013.

1.3.4. Interprétation des oscillations et expression des premiers gènes de nodulation

Les oscillations calciques nucléaires sont interprétées par la protéine calcium calmoduline-dépendante sérine/thréonine kinase CCaMK (*DMI3* chez *M. truncatula*) (Mitra *et al.*, 2004; Lévy *et al.*, 2004). L'activité de la CCaMK est dépendante de deux phénomènes : (I) une fixation directe du calcium à trois motifs « EF-hand » et; (II) la fixation de calcium à une calmoduline (CaM) qui interagit avec le domaine kinase de CCaMK (Tirichine *et al.*, 2006; Gleason *et al.*, 2006). Les oscillations calciques déclenchent une autophosphorylation de CCaMK puis un transfert du groupement phosphate à son substrat principal, le facteur de transcription CYCLOPS (IPD3) (Messinese *et al.*, 2007; Yano *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2014). CYCLOPS appartiendrait à un complexe qui contient au moins trois facteurs de transcription à domaine GRAS : NSP1, NSP2 et DELLA (Jin *et al.*, 2016; Fonouni-Farde *et al.*, 2016). Ce complexe participe, entre autres, à l'activation de l'expression

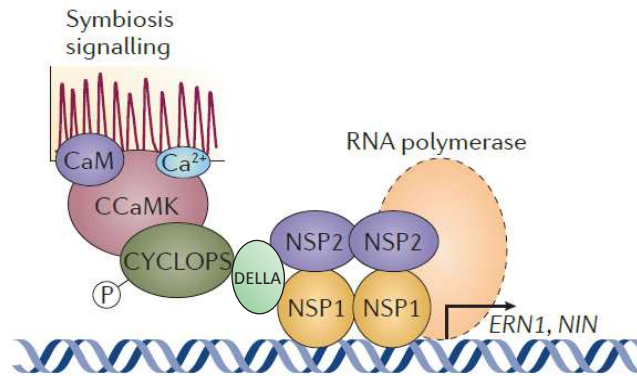


Figure 15. Modèle de la voie de signalisation en aval des oscillations calciques

La CCaMK est indispensable au décodage des oscillations calciques générées par la reconnaissance des FNs. Dans le noyau, la phosphorylation de CYCLOPS par la CCaMK active le complexe transcriptomique formé des protéines CYCLOPS, NSP1, NSP2 et DELLA. Ce complexe agit en tant qu'activateur de la transcription, entre autres, des deux gènes ERN1 et NIN, indispensables pour le déclenchement du processus d'infection et d'organogénèse des nodules. (Adapté de Oldroy, 2013)

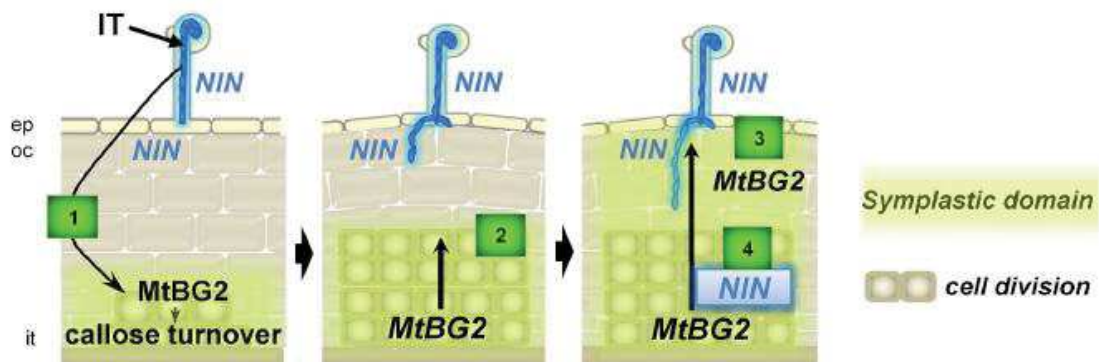


Figure 16. Modèle de la communication symplasmique au cours des premières étapes du développement nodulaire chez *M. truncatula*

La perception des FNs sur la membrane du poil absorbant entraîne l'expression, entre autres, de NIN et la formation du cordon d'infection. Un signal, dont la nature est encore inconnue, active l'expression de *MtBG2* dans les cellules du cortex interne et dans celles du péricyle (1). L'activité de *MtBG2* augmente la connectivité symplasmique depuis le cortex jusqu'à l'épiderme (2 et 3). Cette nouvelle connexion symplasmique est requise pour l'expression de NIN dans le cortex moyen et interne, aboutissant à la formation du primordium nodulaire (4). ep, épiderme; oc, cortex externe; IT, cordon d'infection; it, cortex interne.

(Gaudioso-Pedraza *et al.*, 2016)

génétique de deux autres facteurs de transcription jouant un rôle déterminant dans l'établissement de la symbiose : ERN1 (pour « ethylene response factor (ERF) required for nodulation 1 ») nécessaire à la formation du cordon d'infection et NIN (pour « nodule inception ») qui joue un double rôle dans l'infection et l'organogenèse nodulaire (Singh *et al.*, 2014; Cerri *et al.*, 2017) (Figure 15).

1.3.5. Contrôle génétique et hormonale de l'organogène et de l'infection des nodules

L'activation de la voie de signalisation décrite précédemment entraîne deux réponses spécifiques, une réponse épidermique aboutissant à la formation du cordon d'infection et une réponse corticale assurant une reprise des divisions cellulaires. Ces deux réponses sont séparées dans l'espace mais coordonnées dans le temps. Ainsi, les cellules épidermiques en cours d'infection doivent nécessairement communiquer avec les cellules du cortex/péricyle où le primordium nodulaire est initié (Xiao *et al.*, 2014). Ce processus est étroitement intégré et l'organogenèse cesse si l'infection échoue. Il a rapidement été proposé que la voie de transport symplasmique soit recrutée pour le transfert d'une signalisation entre les cellules de l'épiderme et celles du cortex. Récemment, il a été démontré chez *M. truncatula* que la reconnaissance des FNs au niveau de l'épiderme induit l'expression de MtBG2 au niveau du cortex. Ce dernier régule le transport intercellulaire via les plasmodesmes en augmentant leur perméabilité par dégradation de la callose (Gaudioso-Pedraza *et al.*, 2016). Sa mutation entraîne une diminution de la connectivité symplasmique entre le cortex et l'épiderme et est corrélée à une diminution drastique de l'expression de NIN en présence de rhizobiums. Le modèle ainsi établi propose que le signal assurant la communication entre le cortex et l'épiderme passe probablement par la voie symplasmique. Cependant, ce signal reste encore aujourd'hui à identifier (Figure 16).

Le déclenchement de la voie symbiotique au niveau de l'épiderme entraîne l'expression de nombreux gènes impliqués dans la courbure du poil absorbant, dans la formation du cordon d'infection et dans sa progression jusqu'au primordium nodulaire. La mutation de certains de ces gènes affecte précocement l'infection et aucune courbure du poil absorbant n'est observée (c'est le cas notamment de la mutation de *NIN*, *NSP1*, *NSP2*). D'autres mutations ne bloquent pas la formation de foyers d'infection, mais réduisent drastiquement le nombre de cordons induits (*cyclops*, *ern1*). Enfin, certains mutants présentent une croissance du cordon d'infection anormale ou prématurément arrêtée (*lin/cerberus*, *vapyrin*, *rpg*, *nap1*, *pir1*, *symrem1*) (Oldroyd *et al.*, 2011). Pour plus de détails sur le rôle spécifique de ces gènes, j'invite le lecteur à consulter la revue d'Oldroyd et ses collaborateurs (2011) qui établissent une liste de gènes impliqués dans ces processus.

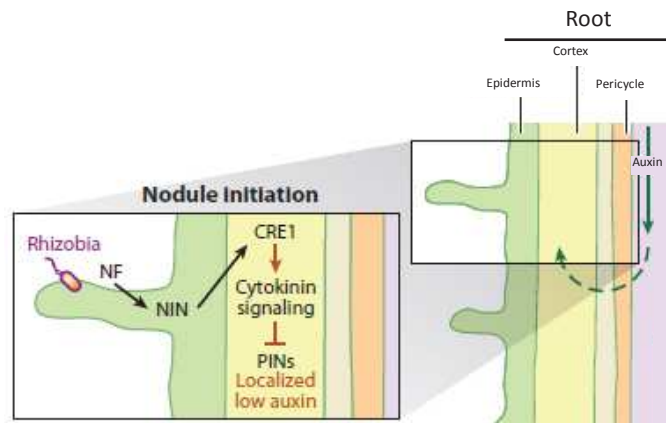


Figure 17. Rôle des auxines et des cytokinines dans l'induction du méristème nodulaire

L'activation de l'organogénèse nodulaire requiert la reconnaissance des FN à la surface du poil absorbant et l'induction du facteur de transcription NIN, qui est suffisant pour l'activation d'une signalisation impliquant les cytokinines dans le cortex de la racine. Cette signalisation passe par le récepteur des cytokinines LHK1 (CRE1) et inhibe l'activité des transporteurs d'auxines PINs dans les cellules du cortex. L'accumulation d'auxines qui en résulte induit une reprise des divisions cellulaires et la formation d'un primordium nodulaire.

(Adapté de Oldroyd et al., 2011)

L'activation artificielle de beaucoup de composants de la voie de signalisation décrit précédemment, tels que les récepteurs des FNs, la CCaMK ou CYCLOPS, entraîne la formation spontanée de nodules non infectés. L'ajout ectopique de cytokinines est également suffisant pour stimuler la formation de structures nodulaires sur les racines de certaines légumineuses (Cooper et Long, 1994; Heckmann *et al.*, 2011; Podlešáková *et al.*, 2013). Il apparaît alors que la signalisation induite par les cytokinines, joue un rôle important dans l'induction de l'organogenèse nodulaire (Miri *et al.*, 2016). L'organogenèse induite par les cytokinines est dépendante de l'activation des facteurs de transcription NSP1, NSP2, NIN et ERN1. Chez le lotier, ce processus est contrôlé par un récepteur des cytokinines, LHK1 (pour « lotus histidine kinase 1 »; CRE1 chez *M. truncatula*) (Heckman *et al.*, 2011; Plet *et al.*, 2011). L'activation de la voie cytokinine via LHK1 entraîne un changement dans le transport polarisé de l'auxine, inhibé après l'ajout de FNs ou de rhizobiums (Noorden *et al.*, 2006; Plet *et al.*, 2011). Ces résultats ont été reliés avec des études démontrant que l'ajout d'inhibiteurs du transport de l'auxine est suffisant pour induire une organogenèse nodulaire en l'absence de bactéries (Hirsh *et al.*, 1989). Ainsi, il est proposé que la signalisation induite par les cytokinines, activée lors de la reconnaissance des FNs, conduit à l'inhibition localisée du transport de l'auxine dans le cortex (et le péricycle chez *M. truncatula*), ce qui entraîne son accumulation et une reprise des divisions cellulaires. Il en résulte la formation du primordium nodulaire (Figure 17). D'autres phytohormones sont impliquées dans l'organogenèse et l'infection des nodules. Comme dans tous les processus développementaux, les réponses induites par ces hormones forment un réseau complexe et les interconnexions qu'elles établissent entre elles sont encore largement inconnues. Les réponses hormonales ont été étudiées sur différentes légumineuses, avec des méthodes et des conditions différentes, ce qui rend difficile la construction d'un modèle d'interaction hormonal au cours de la nodulation (Ferguson et Mathesius, 2014). J'invite ainsi le lecteur à lire la revue de Liu et ses collaborateurs (2018) qui fournit une analyse bibliographique récente des connaissances actuelles sur les réponses hormonales au cours du processus de nodulation.

1.3.6. Existence d'une voie symbiotique commune à la nodulation et à la mycorhization

L'étude des nombreux gènes impliqués dans la voie de signalisation de la nodulation a montré que certains d'entre eux sont également impliqués dans le processus de mycorhization et dans le processus d'endosymbiose nodulaire entre les plantes actinorhiziennes et les bactéries du genre *Frankia* (Parninske, 2008; Hocher *et al.*, 2019). Ces études ont conduit à l'hypothèse que les symbioses mycorhiziennes à arbuscules et les endosymbioses nodulaires utilisent la même voie de signalisation. On parle alors de voie de signalisation symbiotique commune ou CSSP (pour « common symbiotic signaling pathway »). La CSSP est supposée débiter en aval de la perception des FNs, au

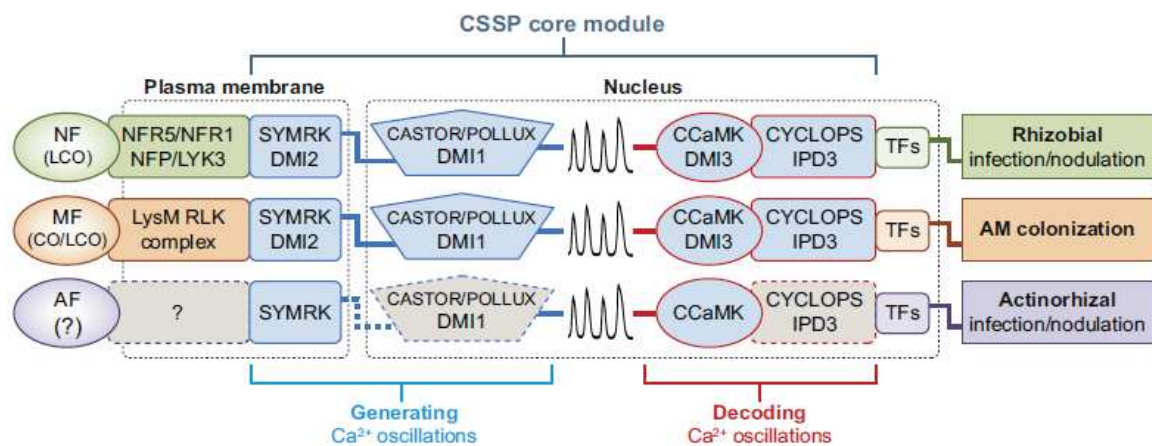


Figure 18. Conservation de la voie de signalisation symbiotique commune (CSSP) au cours du processus de nodulation (chez les légumineuses et les plantes actinorhiziennes) et de mycorhization

De nombreux gènes et seconds messagers sont nécessaires à la mise en place des deux endosymbioses nodulaires (rhizobactérienne et actinorhizienne) et de la mycorhization. Ces acteurs forment une voie de signalisation symbiotique commune ou CSSP. Les différents acteurs de la CSSP ont tout d'abord été caractérisés chez les légumineuses modèles (en vert) et leur implication dans le processus de mycorhization (en orange) a été démontrée plus tard. De nombreux gènes de la CSSP sont conservés chez *Casuarina glauca*, qui établit une endosymbiose nodulaire avec des bactéries Gram positives du genre *Frankia*. Il est aujourd'hui admis que le processus symbiotique déclenché par les *Frankia* sur *Casuarina* passe également par la CSSP (en violet). La molécule signal produite par les *Frankia* (AF), permettant le déclenchement du processus symbiotique, reste encore aujourd'hui inconnue (Hochoer *et al.*, 2019). (Barker *et al.*, 2017)

niveau de SYMRK, et se terminer en amont de l'expression des gènes spécifiques à la nodulation, au niveau de CYCLOPS (Figure 18).

Beaucoup de similarités existent entre la mycorhization et les endosymbioses nodulaires. Tout comme les rhizobiums produisent des FNs en réponse aux flavonoïdes, les champignons à arbuscules produisent, comme indiqué précédemment, des facteurs Myc-LCOs en réponse aux strigolactones (Akiyama *et al.*, 2005; Maillet *et al.*, 2011). Même si les récepteurs des facteurs Myc-LCOs ne sont pas encore connus, il est supposé que le mécanisme de leur reconnaissance fait intervenir des LysM-RLKs similaires à ceux déjà caractérisés pour la reconnaissance des FNs (Genre et Russo, 2016; Zipfel et Oldroyd, 2017). A ce jour, la molécule signal permettant le déclenchement de la nodulation des plantes actinorhiziennes par les *Frankia* reste encore inconnue mais de nombreuses études suggèrent qu'à la différence des FNs et Myc-LCOs, cette molécule signal n'est pas un dérivé de chitine (Hocher *et al.*, 2019).

L'hypothèse que les endosymbioses nodulaires ont évolué à partir du processus de mycorhization est aujourd'hui largement acceptée et permet d'expliquer les très nombreuses similarités qui existent entre ces deux interactions. En particulier, plusieurs caractéristiques de restructuration des cellules végétales au cours des deux interactions sont très similaires (Parniske *et al.*, 2008; Oldroyd *et al.*, 2013). Ainsi, le nombre de gènes conservés entre les deux processus doit probablement être plus important que les quelques-uns actuellement répertoriés dans la CSSP. Il n'est donc pas surprenant que l'on ait déjà identifié des gènes symbiotiques communs qui n'entrent pas dans la CSSP, comme CERBERUS ou VAPYRIN, qui participent tous les deux au processus d'infection des symbiotes bactériens et fongiques (Yano *et al.*, 2009; Ivanov *et al.*, 2012).

1.4. Implication du système immunitaire dans l'interaction symbiotique entre les rhizobiums et les légumineuses

La perception des signaux environnementaux et la capacité à y répondre sont des mécanismes essentiels à la survie des organismes. Dans leur environnement, les plantes doivent faire face à un contact permanent avec des populations très diverses de micro-organismes incluant les bactéries, les champignons ou les virus. A la différence des animaux, le système immunitaire des plantes repose uniquement sur une immunité innée, et non adaptative, qui intègre deux niveaux de perception différents. Le premier niveau passe par une reconnaissance de certains patterns moléculaires retrouvés majoritairement en surface des micro-organismes comme les LPS, les EPS, les KPS, la chitine, les peptidoglycane, ou la flagelline. On regroupe ces patterns sous le terme de MAMPs ou de PAMPs (pour « microbe- ou pathogen-associated molecular patterns ») (voir ci-dessous). Cette reconnaissance est assurée par des récepteurs membranaires PRRs (pour « pattern recognition

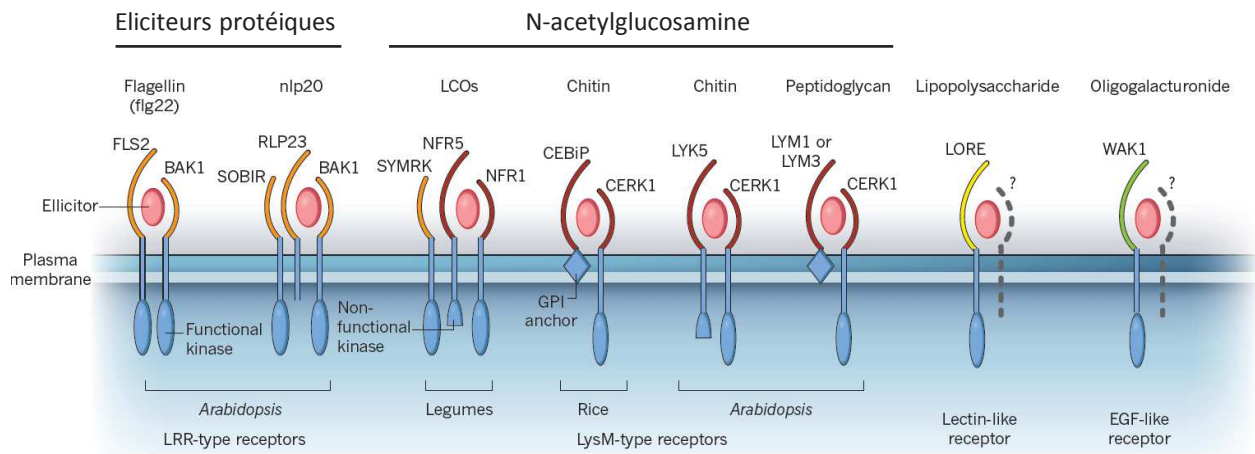


Figure 19. Différents exemples de RLKs impliqués dans la reconnaissance de MAMPs

Les principales classes de récepteur-like kinase (RLKs) impliquées dans la perception de MAMPs sont représentées (Zipfel et Oldroyd, 2017). En générale, les éliciteurs de nature protéique (comme les épitopes flg22 de la flagelline des bactéries et nlp20) sont reconnus par les récepteurs à domaine LRR extracellulaire (en orange). Les éliciteurs de type N-acetylglucosamine comme les lipochitooligosaccharides (LCOs), la chitine ou les peptidoglycanes, sont reconnus par des domaines LysM (en rouge). D'autres classes de récepteurs sont impliquées dans la reconnaissance de lipopolysaccharides, comme les récepteurs lectin-like en jaune, ou d'oligogalacturonides, comme les récepteurs de type EGF (pour « epidermal growth factor ») en vert. (Adapté de Zipfel et Oldroyd, 2017)

receptors ») qui conduit à l'activation de la PTI (pour « pattern-triggered imunity »; l'immunité médiée par les PAMPs). Le second niveau fait intervenir des récepteurs intracellulaires, souvent de type NLR (pour « nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptor »), qui permettent la reconnaissance directe ou indirecte de protéines effectrices sécrétées par certains pathogènes dans les cellules de l'hôte, on parle alors d'ETI (pour « effector triggered imunity »; l'immunité médiée par les effecteurs) (Macho et Zipfel, 2014).

1.4.1 Le système immunitaire végétal : le modèle en zig-zag

La **PTI** repose sur la perception de patterns moléculaires interprétés par la plante comme un signal de danger. Ces patterns peuvent être de nature moléculaire et d'origines différentes. On en distingue deux types : (I) les patterns du non-soi produits par un pathogène, ce sont les MAMPs ou les PAMPs et (II) les patterns du soi, libérés par la plante lors de la reconnaissance du pathogène ou à la faveur d'une blessure, on parle alors de DAMPs (pour « damage-associated molecular patterns ») (Boller et Felix, 2009). La reconnaissance de ces patterns est assurée par des récepteurs PRRs qui sont soit des receptor-like kinases (RLKs), ou des receptor-like proteins (RLPs). Les RLKs sont composés de trois domaines différents : un domaine extracellulaire potentiellement impliqué dans la reconnaissance du pattern moléculaire, un domaine transmembranaire et un domaine kinase intracellulaire impliqué dans la transduction du signal. Les RLPs ont une structure similaire au RLKs mais ne possèdent pas de domaine kinase. En fonction de la nature du domaine extracellulaire, ces récepteurs peuvent reconnaître différents types de MAMPs/PAMPs/DAMPs. Les récepteurs à motif leucine-rich-repeat (LRR-RLKs) sont impliqués dans la reconnaissance de protéines alors que les récepteurs à motifs lysine (LysM-RLKs) sont, quant à eux, impliqués dans la reconnaissance de composés polysaccharidiques (Macho et Zipfel, 2014) (Figure 19).

La reconnaissance d'un MAMPs, d'un PAMPs ou DAMPs par un PRR entraîne de nombreux changements physiologiques et génétiques parmi lesquels une augmentation cytosolique de la concentration en Ca^{2+} , une production et une libération rapide d'espèces réactifs de l'oxygène (des ROS pour « reactive oxxygen species »), une activation des voies de signalisation via des cascades de phosphorylation (MAPKs pour « mitogen-activated protein kinases »), le dépôt de callose dans la paroi végétale et l'expression de gènes relatifs à l'immunité (Boller et Felix, 2009). Ces mécanismes forment une réponse dite « basale » qui est, la plupart du temps, suffisante pour contenir l'infection du pathogène. La preuve de son efficacité est la nécessité pour les agents pathogènes à supprimer activement cette première réaction immunitaire pour développer une infection chronique (Dou et Zhou, 2012).

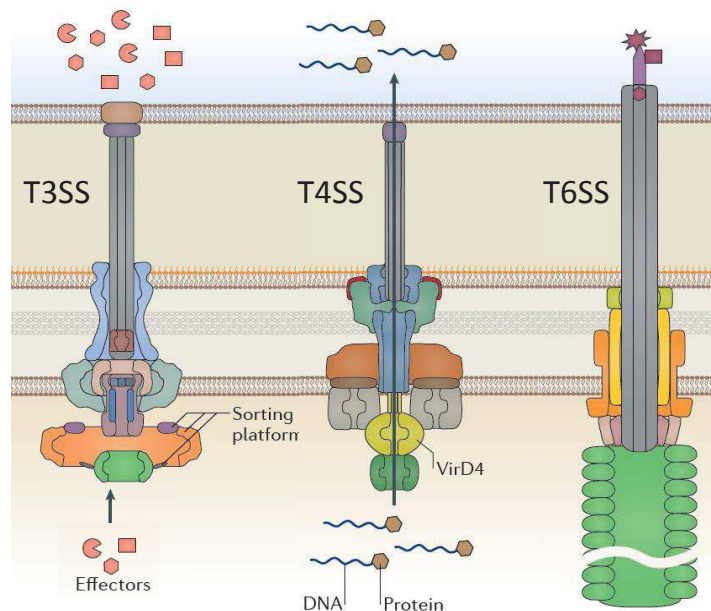


Figure 20. Représentation des trois types de système d'injection utilisés par les bactéries Gram négatives pour la sécrétion d'effecteurs dans les cellules de l'hôte

L'utilisation des systèmes de sécrétion de type III (T3SS), IV (T4SS) et VI (T6SS) par les bactéries répond au besoin de réprimer les mécanismes de défense de l'hôte pour assurer une infection chronique efficace. Ces systèmes sont spécialisés dans l'injection de protéines effectrices à l'intérieur des cellules de l'hôte grâce à une structure en injectisome par laquelle transite les effecteurs. Une fois dans les cellules de l'hôte, les effecteurs perturbent le plus souvent les voies de signalisation conduisant à l'activation du système immunitaire. La description détaillée du T3SS fait l'objet de la partie 2. (Adapté de Costa *et al.*, 2015)

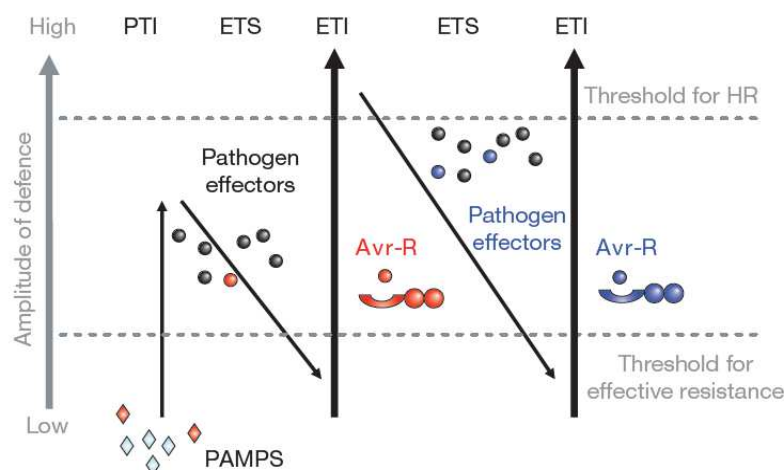


Figure 21. Illustration du modèle en zig-zag proposé par John et Dangls en 2006

Ce modèle illustre la notion de « course à l'armement » souvent utilisée pour qualifier la co-évolution des gènes de résistance des plantes et des effecteurs des pathogènes. La description de ce modèle fait l'objet de la partie 1.4.1. (John et Dangls, 2006)

De nombreux pathogènes ont développé des stratégies de contournement des défenses basales, passant la plupart du temps par la sécrétion de protéines effectrices, ou effecteurs, qui ont principalement pour rôle d'interférer avec les voies de signalisation qui assurent le déclenchement de la PTI, on parle alors d'**ETS** pour « effector triggered susceptibility ». Chez les bactéries Gram négatives, l'injection de ces protéines dans le cytoplasme des cellules hôtes nécessite l'utilisation de systèmes de sécrétion spécifiques. Trois types de système de sécrétion sont couramment utilisés par ces bactéries pour la sécrétion d'effecteurs : le système de sécrétion de type III (T3SS pour « type 3 secretion system »), le T4SS et le T6SS (Costa *et al.*, 2015) (Figure 20). Ces trois systèmes de sécrétion sont des complexes de protéines formant une structure comparable à une seringue assurant l'injection des effecteurs depuis le cytoplasme de la bactérie jusqu'à celui des cellules de la plante hôte. La diversité et les fonctions des effecteurs caractérisés à ce jour sont considérables et le cas du T3SS des rhizobiums, et des effecteurs qu'il secrète, sera détaillé dans la partie 2.

L'une des clés de la résistance des plantes aux agents pathogènes est leur capacité à reconnaître certains de ces effecteurs par l'intermédiaire de protéines de résistance (**protéine R**) correspondant la plupart du temps à des récepteurs cytosoliques nucleotide-binding/leucine-rich-repeat (**NB-LRR**). Cette reconnaissance entraîne le déclenchement d'une réponse immunitaire rapide et puissante, appelée **ETI**, qui est associée à une production massive de ROS et de composés antimicrobiens. L'ETI se distingue surtout de la PTI par le déclenchement d'une mort cellulaire programmée, une HR (pour « hypersensitive response »), autour du site de la reconnaissance de l'effecteur (Greenberg et Yao, 2004). L'effecteur ainsi reconnu est alors présenté comme un facteur d'avirulence (**Avr**), car il est responsable de la perte du pouvoir pathogène de la souche lorsqu'il est reconnu.

De manière comparable à une course à l'armement, la pression de sélection opérée par les protéines R a conduit les bactéries à développer des stratégies de contournement de l'ETI. Ces stratégies sont nombreuses et peuvent passer par l'acquisition de nouveaux effecteurs agissant comme suppresseur de l'ETI ou, à l'inverse, la modification ou la perte de l'effecteur reconnu par la protéine R. En parallèle, les plantes ont diversifié leurs protéines R pour assurer une reconnaissance efficace de nouveaux effecteurs.

Ce modèle de co-évolution de l'interaction plante-bactérie a pour la première fois été présenté par Jones et Dangl en 2006 et a été nommé modèle en zig-zag (Figure 21). Il décrit de manière simplifiée et claire, les bases de l'interaction plante/pathogène. Comme nous le verrons dans la suite du manuscrit, ce modèle s'applique également pour l'interaction symbiotique entre les rhizobiums et les légumineuses.

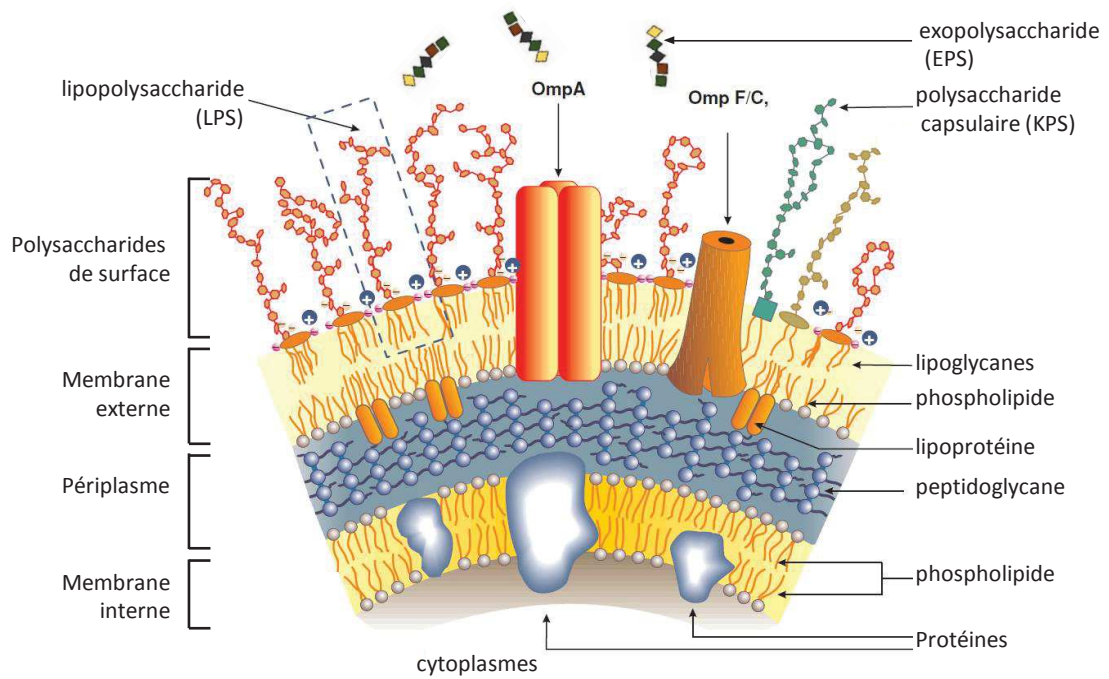


Figure 22. Architecture de l'enveloppe membranaire d'une bactérie Gram négative présentant différents types de polysaccharides de surface

L'enveloppe des bactéries Gram négative est constituée de deux membranes, externe et interne, séparées par un espace périplasmique contenant des peptidoglycane. Différents types de polysaccharides de surface sont ancrés dans la membrane externe de la bactérie, comme les LPS et les KPS. Ces polysaccharides trahissent la présence de la bactérie et agissent comme des éliciteurs puissants du système immunitaire des plantes. La sécrétion d'exopolysaccharides (EPS) dans le milieu extérieur permet, entre autres, de masquer la présence des polysaccharides de surface et agit comme une « cape d'invisibilité » pour la bactérie.

(Adapté d'Alexander et Rietschel, 2001)

1.4.2. Le rôle des MAMPs au cours de l'interaction symbiotique

Tout comme les bactéries pathogènes, les rhizobiums possèdent à leur surface de nombreux MAMPs, parmi lesquels la flagelline, et de nombreux polysaccharides de surface comme des lipopolysaccharides (LPS), des exopolysaccharides (EPS), des β -glucanes, et des polysaccharides capsulaires (K-antigen polysaccharide, KPS). Les polysaccharides de surface ont principalement pour fonction de former une barrière protectrice pour la bactérie et ils constituent ainsi un complexe macromoléculaire à l'interface entre le rhizobium et sa plante hôte. Les KPS forment une couche supérieure adhésive à la surface des bactéries alors que les EPS sont secrétées vers l'extérieur et ne sont pas, ou très peu, associés aux cellules bactériennes (Kannenberg et Brewin, 1994; Becker et Pühler, 1998). Les β -glucanes, qui forment des polymères cycliques, sont généralement concentrés dans le périplasme de l'enveloppe bactérienne où ils jouent un rôle important dans l'adaptation osmotique de la bactérie (Miller *et al.*, 1986; Breedveld *et al.*, 1993). Enfin, les LPS sont ancrés dans la membrane externe de l'enveloppe grâce à un lipide A relié à un core oligosaccharidique et un O-antigène polysaccharidique (Frayssé *et al.*, 2003) (Figure 22).

Tous ces composés de surface trahissent la présence de la bactérie et, dans un contexte pathogène, leurs reconnaissances par des récepteurs PRR entraînent, la plupart du temps, l'activation des défenses immunitaires conduisant à la PTI (Macho et Zipfel, 2014) (figure 1.4.2). Il semble cependant que la co-évolution des légumineuses et des rhizobiums ait conduit à une modification des MAMPs, et de leurs récepteurs respectifs chez les plantes, afin d'empêcher le déclenchement des défenses immunitaires au cours de la symbiose (Gourion *et al.*, 2014). Le cas de l'épitope 22 de la flagelline (flg22) des rhizobiums est souvent cité en exemple pour illustrer cette hypothèse. Dans un contexte pathogène, flg22 est reconnu par le récepteur de plante FLS2 (pour « flagellin sensitive 2 ») ce qui permet l'activation de la PTI (Chinchilla *et al.*, 2006). Des études menées sur l'épitope flg22 des rhizobiums ont montré qu'il est divergent par rapport à celui des bactéries pathogènes mais surtout qu'il est inactif en tant qu'éliciteur des défenses immunitaires (Felix *et al.*, 1999, Lopez-Gomez *et al.*, 2012). De plus, l'expression de FLS2 est drastiquement réduite dans les nodules de *L. japonicus*, ce qui suggère, une nouvelle fois, une adaptation du déclenchement du système immunitaire de la plante au cours de la nodulation (Lopez-Gomez *et al.*, 2012, Gourion *et al.*, 2014).

Tout comme les FNs, d'autres oligosaccharides, dont les LPS, les EPS et les peptidoglycanes, sont connus pour jouer un rôle important dans l'établissement du processus symbiotique (Downie, 2010). Ces différentes molécules sont supposées aider la bactérie à faire face aux stress immunitaires imposés par la plante, mais dans le cas des EPS, différentes variations de composition et de structure peuvent contribuer à la spécificité d'hôte (Downie, 2010, Gully *et al.*, 2016). En effet, un récepteur

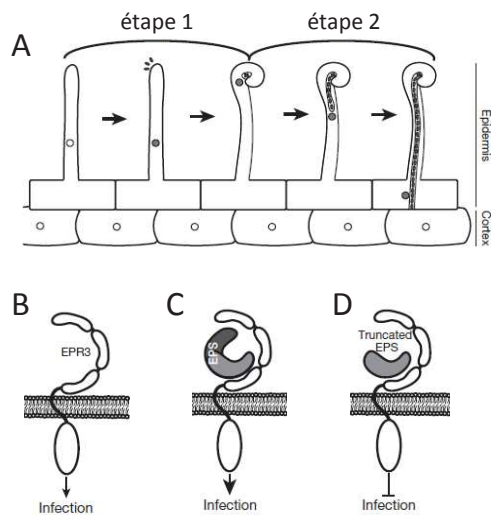


Figure 23. Modèle de la perception en deux étapes d'une souche de rhizobium compatible

A. La colonisation et la reconnaissance spécifique des FNs entraînent une expression de *EPR3* et l'induction du cordon d'infection après courbure du poil absorbant (étape 1). La perception des EPS et des FNs par *EPR3* et *NFR1/NFR5* respectivement, permet la poursuite du processus d'infection (étape 2). **B.** La signalisation de base médiée par *EPR3* influence positivement l'infection de la bactérie. **C.** La perception d'un EPS compatible par *EPR3* stimule la progression du processus d'infection. **D.** La reconnaissance d'un EPS incompatible bloque le processus d'infection.

(Adapté de Kawaharada *et al.*, 2015)

kinase à domaine LysM, *EPR3*, est impliqué chez le lotier dans la reconnaissance directe des EPS des rhizobiums (Kawaharada *et al.*, 2015). L'expression du gène *EPR3* est induite lors de la reconnaissance des FNs ce qui suggère un mécanisme de perception du rhizobium en deux étapes : (I) la première perception de la bactérie passe par la reconnaissance des FNs par les récepteurs NFR1/NFR5 et permet l'initiation du processus symbiotique; (II) un second niveau de perception passe par la reconnaissance spécifique des EPS par *EPR3* qui assure le contrôle de la compatibilité du rhizobium et la colonisation (Figure 23) (Kawahara *et al.*, 2015). Cette étude met en évidence le rôle déterminant joué par les récepteurs LysM-RLKs dans la nodulation.

1.4.3. L'activation des mécanismes de défense des légumineuses au cours de l'interaction symbiotique

Une analyse transcriptomique de la réponse précoce de *Glycine max* à *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110 a montré que de nombreux gènes de défenses des plantes sont induits 12h après inoculation mais que leur niveau d'expression diminue graduellement jusqu'à un niveau basal après 24h (Libault *et al.*, 2010). Des observations similaires ont été faites chez les deux légumineuses modèles *M. truncatula* et *L. japonicus* (Stacey *et al.*, 2006; Jones *et al.*, 2008). Pour exemple, un traitement de *L. japonicus* avec une suspension cellulaire de son symbiote hôte *Mesorhizobium loti* active les défenses de la plante de la même manière qu'un traitement avec un PAMPs couramment reconnu par les plantes, la flagelline flg22 (Lopez-Gomez *et al.*, 2012). Ce type de traitement entraîne une augmentation de la production d'éthylène et active des cascades de phosphorylation via les MAPKs. Comme nous l'avons vu précédemment, la reconnaissance des FNs par les récepteurs NFR1/NFR5, entraîne un influx de Ca^{2+} à l'intérieur des poils absorbants, mais également une production active de ROS (Cardenas *et al.*, 1999; Shaw et Long, 2003). Ces changements physiologiques sont assimilables à ceux activés lors du déclenchement de la PTI par un agent pathogène. De manière intéressante, la production de ROS, et plus particulièrement celle du peroxyde d'oxygène (H_2O_2), semble également jouer un rôle important dans l'établissement de l'interaction symbiotique puisqu'une souche mutée de *E. meliloti* sur-exprimant une catalase (une enzyme de dégradation de l' H_2O_2), montre des propriétés de nodulation et d'infection fortement altérées (Jamet *et al.*, 2007). Les ROS jouent également un rôle important dans les étapes plus tardives de l'interaction, puisque le gène *RbohA* de la plante (qui encode une NADPH oxydase impliquée dans la production de H_2O_2) est nécessaire à une nodulation efficiente chez *M. truncatula* (Marino *et al.*, 2011). Ainsi, toutes ces observations indiquent que le système immunitaire de la plante est bien activé au cours de la nodulation, mais surtout que son activation est nécessaire à l'établissement d'une interaction efficiente.

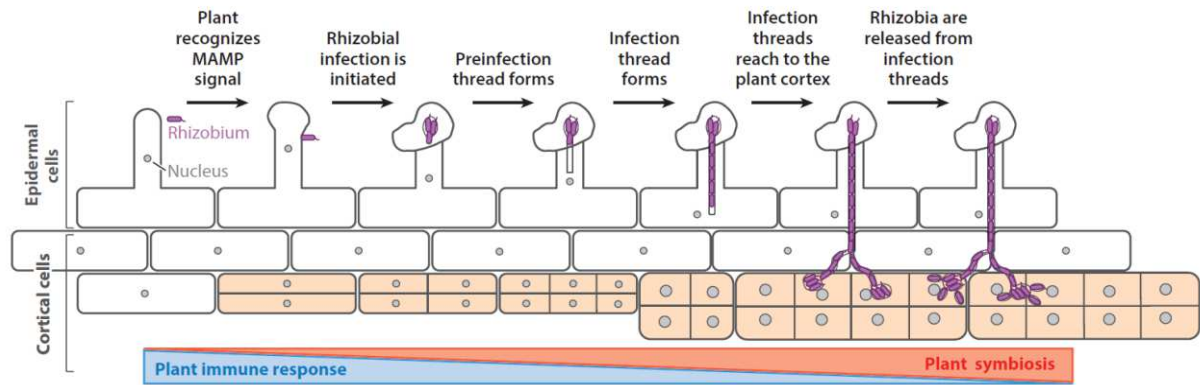


Figure 24. Balance entre la réponse immunitaire et la réponse symbiotique au cours du processus d'infection des rhizobiums

Les MAMPs produits par les rhizobiums activent une réponse immunitaire transitoire chez la plante comparable à une PTI (en bleu). La production de FNs par la bactérie, associée à la sécrétion d'effecteurs, participent à la répression de la PTI ce qui permet l'établissement d'une interaction symbiotique efficace (en rouge).

(Cao *et al.*, 2017)

1.4.4. La répression des mécanismes de défenses au cours de l'interaction entre les rhizobiums et les légumineuses

Comme décrit précédemment, l'activation des mécanismes de défenses par les FNs est rapidement suivi de leur répression et, paradoxalement, la reconnaissance des FNs participe activement à ce phénomène (Libault *et al.*, 2010; Gourion *et al.*, 2014). Beaucoup d'études montrent que la concentration en acide salicylique, une hormone impliquée dans la signalisation immunitaire, est plus élevée dans les racines d'une légumineuse inoculée avec une souche mutée incapable de produire des FNs (Martinez-Abarca *et al.*, 1998). Cette activité de suppression des défenses par les FNs est indépendante de la voie de signalisation de la nodulation puisqu'elle est toujours observée chez des sojas mutés dans les récepteurs aux FNs, NFR1/NFR5, mais elle est également observable chez des non-légumineuses telles qu'*Arabidopsis thaliana* (Liang *et al.*, 2013) (Figure 24).

Le séquençage massif de génomes de rhizobiums a permis de mettre en évidence que beaucoup d'entre eux possèdent au moins un système d'injection de type T3SS, T4SS ou T6SS utilisés pour la sécrétion de protéines effectrices (Sugawara *et al.*, 2013; Nelson et Sadowsky, 2015, Miwa *et al.*, 2017). La présence de ces systèmes de sécrétion répond nécessairement au besoin de suppression des mécanismes immunitaires de la plante au cours de l'interaction. Comme nous le verrons en détails pour le T3SS dans la partie 2.4, les analyses fonctionnelles montrent que la mutation de ces systèmes, ou bien d'un effecteur en particulier, conduit parfois à une diminution de l'efficacité symbiotique.

De même, plusieurs gènes chez la plante hôte (*MtDNF2*, *MtSymCRK*, et *MtRSD* identifiés chez *Medicago truncatula*) sont nécessaires pour la répression des mécanismes de défense dans le nodule, favorisant ainsi l'infection chronique de la bactérie. En effet, la mutation de ces gènes conduit à une mort des bactéries après leur internalisation dans la cellule (Berrabah *et al.*, 2014a; 2014b). Une étude réalisée par Berrabah et ses collaborateurs (2018) a montré que la répression du système immunitaire de la plante par *MtSymCRK* et *MtDNF2* passe par la voie de signalisation de l'éthylène, une hormone impliquée, entre autres, dans le contrôle de l'activation du système immunitaire (Zipfel *et al.*, 2013).

Depuis l'activation de la PTI au moment de la reconnaissance des FNs, jusqu'à l'utilisation de peptides NCRs antimicrobiens au cours de la différenciation en bactéroïde, tout semble indiquer qu'un contrôle excessivement fin de la réponse immunitaire, dans l'espace mais également dans le temps, est essentiel pour aboutir *in fine* à une nodulation efficiente dans laquelle la plante hôte accepte ou tolère une large population rhizobactérienne intracellulaire.

2. Le système de sécrétion de type III (T3SS) des rhizobiums

2.1. La structure du système de sécrétion de type III

2.1.1. Le T3SS : la découverte

Le système de sécrétion de type III est un complexe protéique formant une seringue spécialisée dans l'injection directe de protéines dites « effectrices » du cytoplasme bactérien au cytoplasme des cellules eucaryotes. Ces protéines effectrices, aussi appelées effecteurs de type III ou T3Es, jouent un rôle essentiel dans l'établissement de l'infection chez beaucoup de bactéries pathogènes et symbiotiques en réprimant les mécanismes immunitaires de l'hôte. Le T3SS est l'un des systèmes de sécrétion les plus sophistiqués et est probablement celui qui a été le plus étudié depuis les toutes premières études sur sa caractérisation, il y a presque 40 ans (Michiel *et al.*, 1990; Deng *et al.*, 2017). Il est retrouvé chez un très grand nombre de bactéries Gram négatives aux cycles de vie très variés et constitue un facteur de pathogénicité majeur chez la plupart des bactéries pathogènes. Les premières études sur des gènes du T3SS et des effecteurs remontent aux années 1980, où l'utilisation de différentes stratégies de mutagénèses aléatoires sur les bactéries ont permis la découverte des gènes indispensables pour leur pouvoir pathogène (Lindgren *et al.*, 1986). C'est en 1990 que ce complexe est pour la première fois caractérisé comme étant un système de sécrétion à part entière chez la bactérie pathogène de l'Homme *Yersinia* (Michiel *et al.*, 1990) et son nom lui est attribué en 1993 par Salmond et Reeves. Enfin, l'hypothèse que le T3SS pourrait être un système d'injection d'effecteurs comparable au T4SS, est proposée en 1997 après l'observation de structures filamenteuses associées au T3SS de *Pseudomonas* (Roine *et al.*, 1997). L'ensemble de ces études, menées en parallèle sur des bactéries pathogènes de plantes et d'animaux, a posé les bases de notre compréhension des mécanismes de pathogénicité de beaucoup de bactéries. A partir de ces découvertes, et grâce à l'avènement de la biologie moléculaire, le T3SS a ensuite été décrit chez les genres *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella* et chez de très nombreuses autres bactéries pathogènes et symbiotiques des animaux et des plantes (Hueck, 1998; Dale et Moran 2006; Hu *et al.*, 2017). Il aura fallu attendre 1997 et le séquençage du premier plasmide symbiotique (pNGR234a) de la souche *Ensifer fredii* NGR234, pour qu'un T3SS soit identifié pour la première fois chez un rhizobium (Freiberg *et al.*, 1997). Ce cluster a été initialement nommé *tts* pour (t_ype t_hree s_ecretion), puis renommé *rhc* (pour « r_hizobium c_onserved ») (Viprey *et al.*, 1998) et a rapidement été identifié chez d'autres souches, d'abord *Mesorhizobium loti* MAFF303099 (Kaneko *et al.*, 2000) puis *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110 (Göttfert *et al.*, 2001) et deux autres *Ensifer fredii* USDA257 et HH103 (Marie *et al.*, 2001).

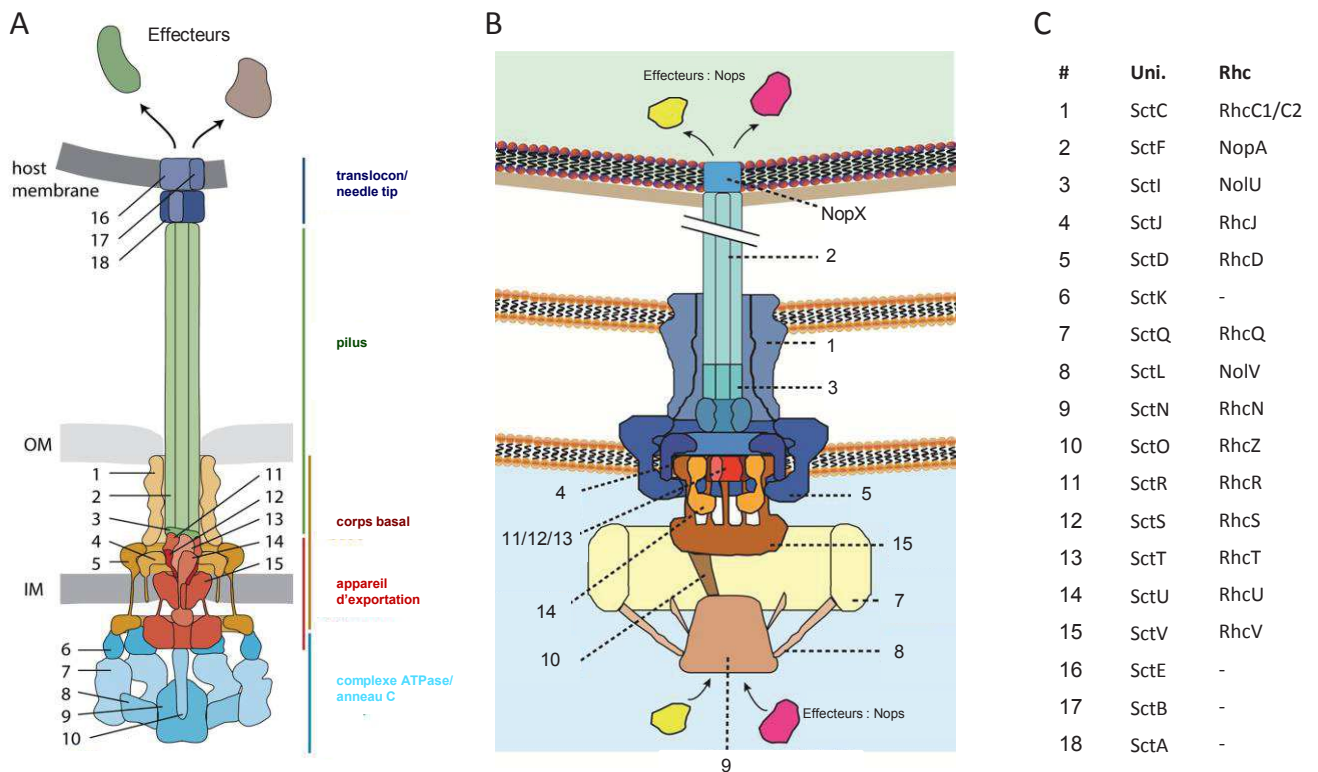


Figure 25. Structure du système de sécrétion de type III des bactéries pathogènes et des rhizobiums

A. Structure du système de sécrétion de type III des bactéries pathogènes (Adapté de Wagner *et al.*, 2018). **B.** Structure du T3SS des rhizobiums. A l'exception du SctK (le cofacteur de l'ATPase), les protéines composant le « needle tip » et le translocon, l'ensemble des constituants du T3SS des bactéries pathogènes est conservé chez les rhizobiums (Adapté de Staehelin et Krishnan, 2015). **C.** Nomenclature des composants du T3SS. La nomenclature universelle (Uni.) proposée par Hueck (1998), est écrite à gauche et son équivalent chez les rhizobiums (Rhc), d'après Viprey et ses collaborateurs (1998), est écrite à droite.

2.1.2. Le corps basal du système de sécrétion de type III

Depuis la découverte du T3SS, énormément d'études ont été publiées sur la structure et la fonction de chacune des protéines entrant dans sa composition. Cependant, ces études ont principalement été menées chez les bactéries pathogènes des animaux, et tout particulièrement chez les pathogènes de l'Homme *Salmonella/Yersinia/Escherichia*. Très peu d'études structurales ont été menées sur les pathogènes de plantes et les rhizobiums à l'exception des pili et des translocons (Marie *et al.*, 2003; Saad *et al.*, 2005; 2008). Malgré tout, étant donné le niveau de conservation de beaucoup d'éléments de la seringue, il est largement supposé que les protéines identifiées et caractérisées chez les pathogènes d'animaux possèdent la même structure et remplissent le même rôle que leurs homologues chez les rhizobiums. Les paragraphes suivants visent à apporter une vue générale et simplifiée de la structure du T3SS. Ils ne se veulent pas exhaustifs et pour plus d'informations, j'invite le lecteur à consulter les quatre excellentes revues suivantes : Büttner, 2012; Notti et Stebbins, 2016; Deng *et al.*, 2017 et Wagner *et al.*, 2018.

Le système de sécrétion de type III est constitué de plus de 20 protéines nommées historiquement de manières différentes suivant la bactérie dans lesquelles elles ont été identifiées. Afin d'éviter toute confusion et de faciliter les comparaisons entre les différentes bactéries, une nomenclature unifiée et universelle a rapidement été proposée pour nommer les différents composants du T3SS (Hueck, 1998). Cette nomenclature utilise le préfixe *Sct* pour «secretion and cellular translocation», suivi en suffixe de la lettre d'identité du gène correspondant utilisée dans la nomenclature *Ysc* de *Yersinia*.

Chez les rhizobiums, de la même manière, les gènes codant pour les composants du T3SS portent pour la plupart le préfixe *Rhc* suivi en suffixe de la même lettre d'identité du gène utilisée dans la nomenclature *Ysc* de *Yersinia*. Cette nomenclature a été proposée par Viprey et ses collaborateurs en 1998. Cependant, quelques exceptions existent. En effet, certains gènes codant pour des composants du T3SS des rhizobiums ont été identifiés dans le cadre de l'étude de la symbiose fixatrice d'azote. Avant de comprendre que ces gènes codent pour des composants du T3SS, et puisque leur mutation provoquait un phénotype symbiotique, ces gènes ont alors été confondus avec des gènes de nodulation et le suffixe *nod* leur a été attribué. De la même manière, les gènes codant pour la partie extracellulaire portent le suffixe *nop* (pour «nodulation outer protein»), utilisé pour les effecteurs de type III, car ils ont initialement été caractérisés comme codant des protéines sécrétées jouant un rôle symbiotique avant de comprendre qu'ils participent à la formation du pilus et du translocon. Enfin, d'autres gènes portent le suffixe *y4*, qui a été utilisé pour nommer les différents gènes identifiés lors de l'annotation du premier plasmide symbiotique chez *Ensifer fredii*

Nomenclature unifiée	Fonction putative	Homologue chez les rhizobium	Homologue chez le flagelle
SctC	Sécrétine	RhcC1/RhcC2	-
SctD	Anneau interne	RhcD	FliG
SctJ	Anneau interne	RhcJ	FliF
SctF	Pilus	NopA/NopB	FlgE
SctI	Inner rod	NoIU	-
SctU	Autoprotéase	RhcU	FlgB
SctV	Appareil d'export	RhcV	FliA
SctR	Anneau interne	RhcR	FliP
SctS	Anneau interne	RhcS	FliQ
SctT	Anneau interne	RhcT	FliR
SctQ	Anneau cytoplasmique	RhcQ	FliM-FliN
SctN	ATPase	RhcN	FliI
SctL	« Stator »	NoIV	FliH
SctO	« Stalk »	RhcZ	FliJ
SctE	translocon	NopX	-

Tableau 1. Composants structuraux du T3SS des rhizobiums et leur homologue chez le flagelle
(Adapté de Deng *et al.*, 2017)

NGR234 (Freiberg *et al.*, 1997). Malheureusement, il n'a jamais été proposé d'homogénéiser le nom de tous ces gènes en utilisant une seule et même nomenclature. J'utiliserais donc les noms qui sont les plus couramment utilisés pour nommer ces différents gènes.

Le T3SS peut être séparé en deux grandes structures : (I) un corps basal membranaire associé à tous les complexes intracellulaires nécessaires à son fonctionnement, très conservés entre les bactéries et; (II) une structure extracellulaire, très variable d'un genre bactérien à l'autre, composée du pilus et du translocon (Figure 25).

Le corps basal est organisé pour former un pore traversant la double membrane et la couche de peptidoglycane de l'enveloppe bactérienne. Il est constitué de trois protéines différentes SctC, SctD et SctJ formant deux anneaux transmembranaires et un troisième inter-membranaire. Les deux protéines SctD et SctJ forment l'anneau ancré dans la membrane interne de la bactérie tandis que la protéine SctC constitue les deux autres anneaux, l'un ancré dans la membrane externe et l'autre traversant l'espace inter-membranaire et assurant la liaison entre l'anneau externe et interne (Marlovits *et al.*, 2004 ; Schraidt et Marlovits, 2011). Localisés à la base du corps basal, ancrés dans la membrane interne, les cinq protéines SctRSTUV forment l'appareil d'exportation dont la structure n'est pas encore correctement caractérisée. Cependant, il est admis que cet appareil joue le rôle de porte d'entrée du T3SS pour les effecteurs (Zarivach *et al.*, 2008; Wiesand *et al.*, 2009). L'appareil d'exportation est entouré par un quatrième anneau, l'anneau C (ou C-ring) formé de la protéine SctQ et qui assure le chargement des effecteurs avant l'entrée dans le T3SS. Enfin, le complexe ATPase, situé sous l'anneau C, est constitué des protéines SctNLOK et assure, entre autres, l'apport énergétique nécessaire pour la sécrétion des effecteurs, notamment grâce à l'activité ATPase de SctN (Makino *et al.*, 2016; Radics *et al.*, 2014; Dohlich *et al.*, 2014). A l'intérieur de la lumière du pore formé par les trois anneaux, il est supposé que SctI forme un cylindre interne assurant la jonction entre le corps basal et le pilus extracellulaire (Marlovits *et al.*, 2004).

A l'exception de SctK, un homologue des gènes codant chacune de ces protéines a été identifié chez les rhizobiums (Staehelin *et al.*, 2015; Deng *et al.*, 2017) (Figure 25, Tableau 1). Cependant, le T3SS des rhizobiums présente la particularité de posséder deux homologues partiels du gène codant pour la sécrétine *sctC*, *rhcC1* et *rhcC2* (Abby et Rocha, 2012; Tampakaki *et al.*, 2014). Abby et ses collaborateurs (2012) soulignent que seul RhcC1 possède le domaine d'interaction avec SctD et que RhcC2 a la particularité de posséder un domaine d'interaction membranaire (Yeat et Bateman, 2003). Il est alors proposé que, chez les rhizobiums, RhcC2 forme l'anneau externe du corps basal et que RhcC1 permet de faire le lien entre l'anneau externe et l'anneau interne. Cette particularité structurale est à relier avec la présence de *y4y5*, un gène conservé et spécifique du cluster T3SS des rhizobiums, qui agirait comme stabilisateur de RhcC2 dans les membranes

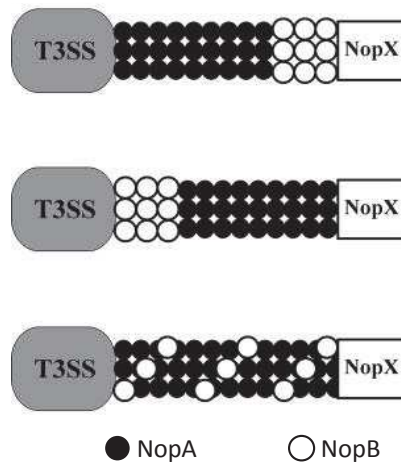


Figure 26. Modèles putatifs de la structure extracellulaire du T3SS des rhizobiums

Trois arrangements possibles des protéines NopA, NopB et NopX, constituant le pilus du T3SS de NGR234, ont été proposés par Saad et ses collaborateurs (2008). Dans les trois modèles, le corps basal du T3SS est représenté par un ovale gris et le putatif translocon NopX par un carré blanc. NopA et NopB sont représentés respectivement par des ronds noirs et blancs.

(Mercante *et al.*, 2015). Il est également intéressant de souligner qu'une troisième sécrétine RhcC3, de petite taille, a pu être identifiée chez *Bradyrhizobium elkanii* USDA61 (Okazaki *et al.*, 2009). Ainsi, toutes ces observations suggèrent que le corps basal du T3SS des rhizobiums pourrait bien posséder une structure légèrement différente par rapport à celui décrit chez les pathogènes des animaux.

2.1.3. La structure extracellulaire du système de sécrétion de type III

Le corps basal du T3SS est relié au pilus extracellulaire grâce à SctI et forme un canal par lequel les effecteurs peuvent transiter. Si les protéines du corps basal sont les plus conservées entre les différents types de T3SS étudiés à ce jour, les protéines constituant la partie extracellulaire sont en revanche extrêmement variables. Cette grande variabilité s'explique par le fait qu'elles sont en contact direct avec les cellules de l'hôte et doivent donc être adaptées pour assurer une interaction efficiente. Devant la diversité des protéines constituant cette partie extracellulaire chez les différentes bactéries, je ne m'attacherais à décrire uniquement celles des rhizobiums et j'invite une nouvelle fois les lecteurs à consulter les revues citées au début de la partie précédente pour obtenir plus d'informations sur la structure extracellulaire du T3SS des bactéries pathogènes de plantes et d'animaux.

Des observations au microscope électronique à transmission ont permis d'estimer la taille du pilus des rhizobiums à environ 2 μ m (Saad *et al.*, 2005). La purification du pilus extracellulaire d'*Ensifer fredii* NGR234 a montré qu'il est composé d'au moins trois protéines différentes, NopA, NopB et NopX, qui interagissent toutes l'une avec l'autre (Saad *et al.*, 2008). NopA ne montre aucune homologie avec les protéines des pilus des autres bactéries mais possède néanmoins une structure secondaire en harpin caractéristique des protéines entrant dans la composition des pili (Deakin *et al.*, 2005; Kim et Krishnan, 2014). Un BLAST de la protéine NopB révèle des homologies avec FlgK, une protéine faisant le lien entre le crochet et le pilus du flagelle (Saad *et al.*, 2008). Enfin, la protéine sécrétée NopX (ou NolX) est supposée jouer le rôle de translocon et bien qu'aucune démonstration formelle sur sa capacité à former un pore dans les membranes n'existe, NopX présente des homologies avec HrpF et PopF, deux translocons du T3SS de *Xanthomonas* et *Ralstonia*, respectivement (Buttner *et al.*, 2002; Meyer *et al.*, 2006). Ces observations ont permis à Saad et ses collaborateurs (2008) de proposer plusieurs modèles quant à la structure de la partie extracellulaire du T3SS des rhizobiums (Figure 26). De manière surprenante, un certain nombre de souches de *Bradyrhizobium*, dont la souche modèle *B. diazoefficiens* USDA110, ne possèdent aucun gène homologue à *nopX* sans que cela n'affecte la sécrétion de leurs effecteurs dans les cellules de l'hôte (Göttfert *et al.*, 2001; Krause *et al.*, 2002; Wenzel *et al.*, 2013; Okazaki *et al.*, 2016; Tampakaki *et al.*, 2014). De plus, Marie et ses collaborateurs (2003) démontrent que la mutation de *nopX* chez NGR234

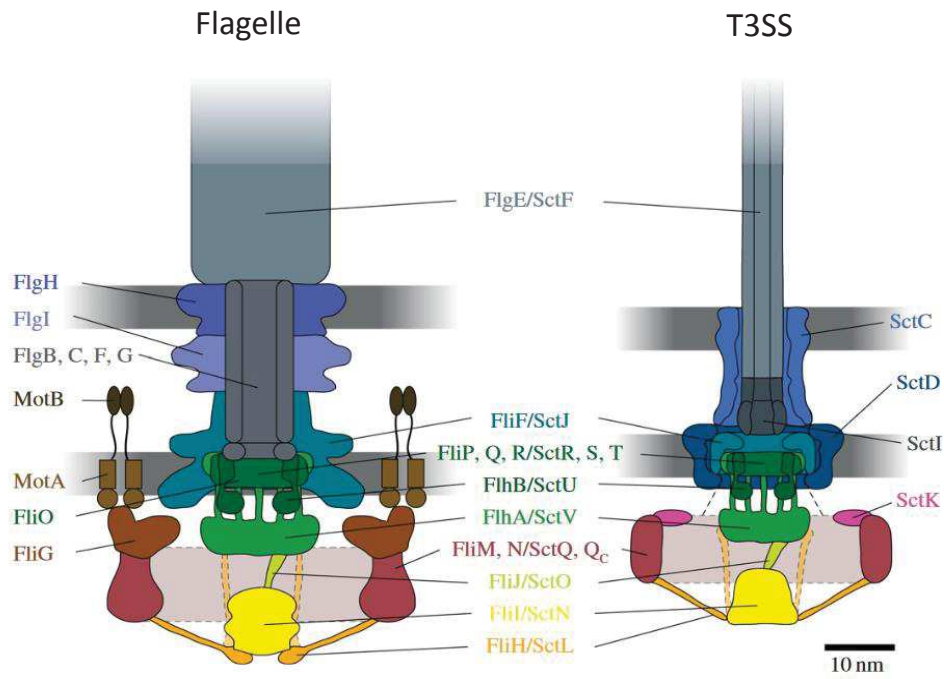


Figure 27 Comparaison de la structure du corps basal du flagelle et du T3SS

Les composants conservés chez les deux structures sont listés au centre. Les composants spécifiques à chacune des deux structures sont listés sur le côté gauche pour le flagelle et sur le côté droit pour le T3SS. (Adapté de Diepold et Armitage, 2015)

n'abolit pas totalement la fonction du T3SS. Ces observations sont d'autant plus troublantes considérant que, chez d'autres souches d'*Ensifer*, la mutation de *nopX* conduit à un phénotype équivalent à un mutant dans le T3SS (Zhao *et al.*, 2018). Une des hypothèses est que l'absence de NopX serait complétée par une autre protéine. Cependant, aucun autre translocon putatif n'a été identifié chez les rhizobiums et la recherche par BLAST des translocons connus ne permet pas de faire ressortir de candidat. Chez les pathogènes de plante, beaucoup de translocons prédits ne sont pas essentiels pour la pathogénicité (Büttner, 2012). Une des hypothèses avancée par Daniella Büttner (2012) serait que certaines harpins pourraient remplir le rôle de translocon. Cette hypothèse est principalement fondée sur l'observation que HrpZ, une harpin de *Pseudomonas syringae*, interagit avec les membranes de la cellule hôte pour former un pore transmembranaire fonctionnel (Engelhardt *et al.*, 2009 ; Haapalainen *et al.*, 2011). Très peu de choses sont connues sur la structure extracellulaire du T3SS des rhizobiums mais quoiqu'il en soit, ces observations laissent supposer que le translocon NopX pourrait bien être dispensable à la fonction d'injection d'effecteurs chez beaucoup de souches de rhizobiums.

2.1.4. L'origine du système de sécrétion de type III

Dès les premières observations structurales du T3SS au microscope électronique à transmission, de nombreux points communs ont été relevés entre sa structure et celle du flagelle des bactéries Gram négatives (Roine *et al.*, 1997). Tout comme le T3SS, le flagelle présente une structure filamenteuse extracellulaire associée à un corps basal ancré dans l'enveloppe bactérienne grâce à deux anneaux interne et externe (Figure 27). De plus, le mouvement de rotation du filament est assuré par un complexe moteur à ATPase, proche de celui utilisé pour l'injection des effecteurs à travers le T3SS (Berg, 2003). Sur l'ensemble des protéines constituant le T3SS, au moins 9 sont homologues à des protéines constituant le flagelle. Ces protéines (SctJ/FliF chez le flagelle, SctL/FliH, SctN/FliI, SctQ/FliM-FliN, SctR/FliP, SctS/FliQ, SctT/FliR, SctU/FliB and SctV/FliA) entrent toutes dans la constitution de la partie membranaire et intracellulaire des deux structures et sont codées par des gènes dont l'organisation génétique est en synténie (Van Gijsegem *et al.*, 1995; Huech 1998). Ces observations ont alors conduit à deux hypothèses quant à l'origine du T3SS : (I) soit le T3SS dériverait d'un flagelle ancestral; (II) soit les deux structures ont évolué indépendamment l'une de l'autre mais partagerait un ancêtre commun (McCann et Guttman, 2007). Une étude phylogénomique réalisée sur plus de 1000 génomes a permis la validation de la première hypothèse et démontre que le T3SS est issu d'une exaptation du flagelle (une adaptation sélective opportuniste ne remplissant pas les fonctions qui lui étaient initialement attribuées) (Abby et Rocha, 2012). L'évolution du flagelle en T3SS se serait produite en deux étapes consécutives. La première étape a conduit à l'apparition d'un

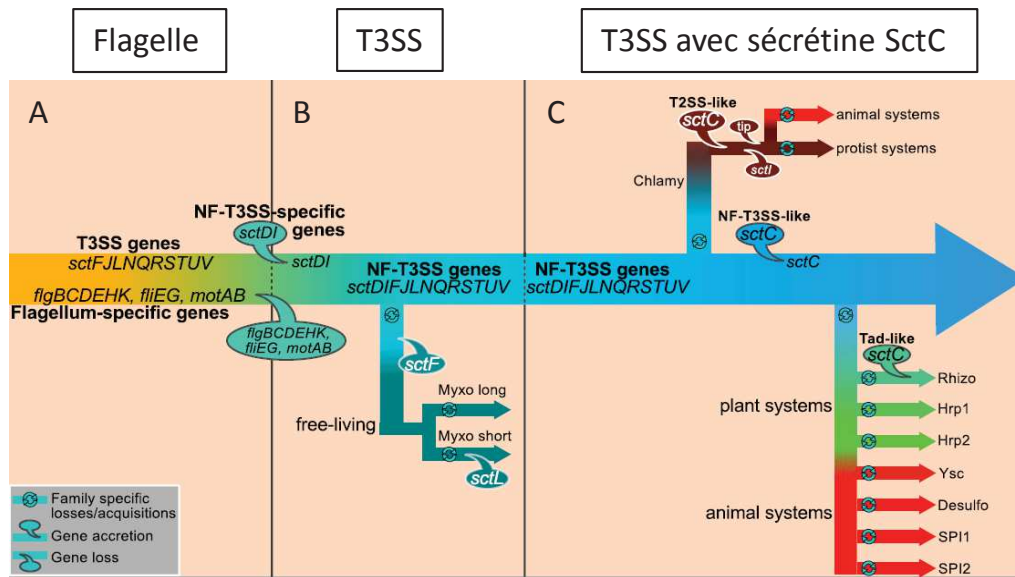


Figure 28. Scénario putatif de l'évolution du flagelle conduisant à l'apparition du T3SS

A. La perte de certains gènes spécifiques du flagelle est probablement la première étape ayant conduit à l'apparition d'un premier T3SS ancestral. **B.** L'acquisition de *sctD* et *sctI* aurait conduit à la formation d'un second intermédiaire, sans pilus, qui est encore conservé chez les bactéries du genre *Myxococcus*. **C.** L'acquisition du gène codant pour la sécrétine *sctC* aurait ensuite conduit à l'apparition du T3SS tel qu'il est connu aujourd'hui. Enfin, le T3SS a rapidement évolué indépendamment dans chacun des genres bactériens pour s'adapter aux différents hôtes. Chez les rhizobiums (Rhizo), un ou plusieurs événements supplémentaires ont conduit à l'acquisition de plusieurs homologues différents de *sctC* (*rhcC*). (Adapté de Abby et Roch, 2012)

intermédiaire ancestral ayant perdu les éléments essentiels à la mobilité du flagelle et que l'on peut encore retrouver chez certaines Myxobacteries (Abby et Rocha, 2012). La seconde étape a conduit à l'apparition du T3SS grâce à l'acquisition de la sécrétine SctC suivi d'adaptations multiples et spécifiques aux niches écologiques des différentes bactéries, ayant permis une diversification de la partie extracellulaire (Abby et Rocha, 2012) (Figure 28).

2.2. Distribution et diversité des clusters T3SS

2.2.1. Acquisition du T3SS par les bactéries

Ces dernières années, la disponibilité croissante de séquences génomes bactériens a révélé que le système de sécrétion de type III est très répandu mais que l'organisation génétique des clusters peut présenter des variations considérables (Abby et Rocha, 2012; Tampakaki *et al.*, 2014; Hu *et al.*, 2017). Chez toutes les bactéries, le système de sécrétion de type III est codé par un ensemble de 20 à 30 gènes, souvent organisés en plusieurs opérons. Ces clusters sont typiquement retrouvés aux seins d'îlots de pathogénicité aussi bien insérés dans le chromosome bactérien que distribués sur des plasmides. Il en est de même chez les rhizobiums où le cluster T3SS est souvent retrouvé dans une région de 50 à 100 kpb portée soit par un plasmide symbiotique (pSym), soit par un îlot symbiotique intégré dans le génome de la bactérie (Tampakaki *et al.*, 2014). En plus de contenir les gènes codant pour la seringue, ces îlots contiennent également une grande partie des gènes codant pour les effecteurs de type III. Ils portent de nombreux autres gènes impliqués souvent dans l'adaptation à la vie en association avec un hôte, et chez les rhizobiums, on y retrouve systématiquement les gènes de nodulation *nod* et de fixation d'azote *fix/nif*. Le G+C% de ces îlots est différent du reste du génome, ils sont riches en éléments transposables, en séquences répétées et en ARNs de transferts (ARNt) (Hsiao *et al.*, 2005). Toutes ces particularités font de ces îlots des régions très instables et sujettes à de très nombreux réarrangements génétiques (Alfano *et al.*, 2000). L'instabilité de ces îlots est considérée comme une force majeure de l'évolution des clusters T3SS et représente également un moteur important pour son acquisition par transfert horizontal (HGT pour « horizontal gene transfert ») (Juhas *et al.*, 2009). L'importance de ces HGTs dans l'évolution du T3SS et des bactéries est souvent mise en évidence chez les bactéries pathogènes par la présence de plusieurs T3SS codés par deux clusters différents au sein de la même souche. C'est le cas, par exemple, de *Salmonella enterica*, qui possède deux clusters T3SS SPI-I et SPI-II et qui les utilise différemment au cours de son cycle infectieux (Ramos-Morales, 2012). Chez les rhizobiums, l'acquisition du T3SS peut se faire soit lors de l'acquisition d'un plasmide (souvent le plasmide symbiotique), soit via le transfert d'un îlot symbiotique d'une souche à une autre. En 2016, Ling et

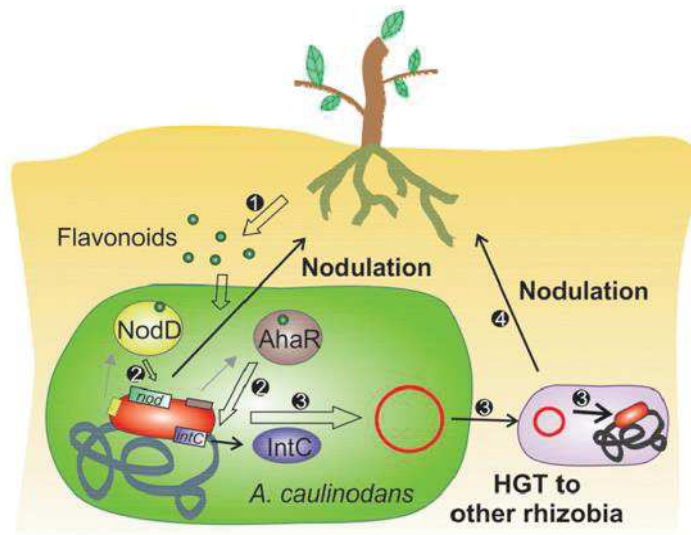


Figure 29. Modèle du mécanisme du transfert horizontal d'un îlot symbiotique

Le modèle a été proposé par Ling et ses collaborateurs (2016) à la suite de l'étude du transfert horizontal de l'îlot symbiotique d'*Azorhizobium caulinodans* à *Mesorhizobium huakui*. ① et ②: La reconnaissance des flavonoïdes par deux facteurs de transcription LysR différents de la bactérie déclenche deux processus : (I) l'expression des gènes de nodulation par le facteur de transcription NodD, indispensables à l'établissement de la symbiose; (II) l'induction de l'expression de l'intégrase C, *intC*, par le facteur de transcription AhaR. ③ : *intC* participe à l'excision de l'îlot symbiotique au niveau de l'ARNt-gly. L'îlot symbiotique peut alors être transféré par transfert horizontal sous forme circulaire à d'autres rhizobiums, leur conférant la capacité d'interagir avec de nouvelles plantes ④ (Ling *et al.*, 2016).

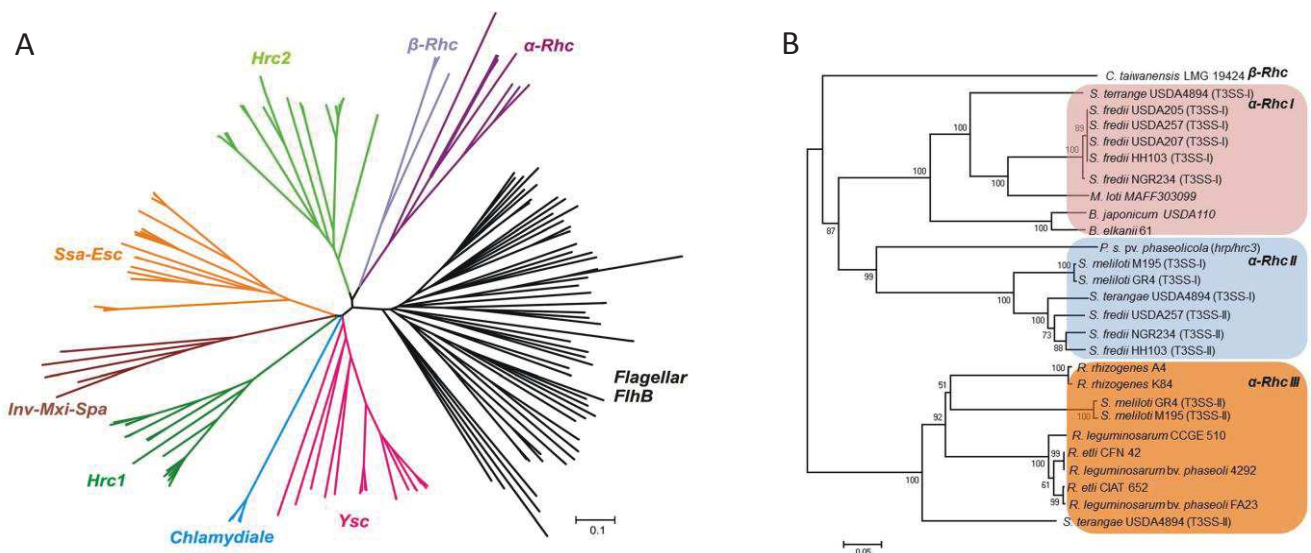


Figure 30. Arbres phylogénétiques du T3SS chez les rhizobiums et chez les bactéries pathogènes de plantes et d'animaux basés sur les homologues de la protéine SctU

A. Arbre phylogénétique des homologues de la protéine SctU. Chaque couleur représente une des 7 familles de T3SS différentes. Les deux sous-familles α - et β -Rhc composent la famille Rhc. Les homologues de SctU chez le flagelle sont en noir (Adapté de Gazi *et al.*, 2012). **B.** Arbre phylogénétique des homologues de la protéine SctU (RhcU) des rhizobiums. Chacune des couleurs représente une sous-famille Rhc différente (Tampakaki *et al.*, 2014).

ses collaborateurs montrent que ce transfert peut être stimulé par la sécrétion d'exsudats racinaires (des flavonoïdes) par la plante chez *Azorhizobium caulinodans* et peut ainsi conduire à des changements drastiques du spectre d'hôtes de la bactérie (Figure 29).

2.2.2. Phylogénétique des clusters T3SS

Des analyses phylogénétiques des protéines constituant le corps basal du T3SS permettent de répartir les différents clusters en 7 familles phylogénétiques au sein desquelles l'organisation génétique des clusters est relativement homogène (Gazi *et al.*, 2012) : (I) La famille *Ysc* avec les bactéries du genre *Yersinia* comme représentante; (II) *Inv-Mix-Spa* ou SPI-I formant une famille regroupant les clusters T3SS des *Salmonella* (*Inv-Spa*) et des *Shigella* (*Inv-Mix*); (III) la famille *Ssa-Esc* ou SPI-II regroupant les clusters T3SS retrouvés chez les *Escherichia* et *Salmonella*; (IV) la famille *Hrc-Hrp1* et (V) la famille *Hrc-Hrp2* retrouvées toutes les deux chez les bactéries pathogènes de plantes du genre *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Pantoea* et *Ralstonia*, mais également des pathogènes d'animaux du genre *Vibrio* et *Burkholderia*; (VI) la famille *Cds* ou *Chlamydiale* exclusivement retrouvée chez les *Chlamydia*; et enfin (VII) la famille *Rhc*, retrouvée chez les rhizobactéries (Figure 30A). Récemment, l'analyse de 20 000 génomes bactériens par Hu et ses collaborateurs (2017) a permis d'identifier, en plus des 7 familles déjà connus, 6 autres nouvelles familles phylogénétiques. Au-delà de la description formelle de nouveaux clusters, cette étude montre qu'il existe une diversité considérable de T3SS chez les bactéries. La comparaison des topologies des arbres phylogénétiques des bactéries (basée sur les séquences de l'ARN ribosomique 16S), et des arbres phylogénétiques des protéines composant le T3SS, montre une forte incongruence, ce qui renforce l'idée que le T3SS est rarement acquis de manière verticale mais à la faveur d'évènements de transfert horizontaux (Gophna *et al.*, 2003). Ces transferts ont lieu la plupart du temps entre des espèces qui partagent les mêmes niches écologiques (Pallen *et al.* 2005). Ainsi, les clusters *Hrp1* et *Hrp2* sont dans la grande majorité des cas conservés chez des pathogènes de plantes alors que les clusters de la famille *Rhc* ne sont en générale retrouvés que chez les rhizobiums.

Une analyse plus précise de la famille *Rhc* montre qu'elle est divisée en quatre sous-groupes différents (Figure 30B). Le groupe α -Rhcl contient les T3SS retrouvés sur les plasmides symbiotiques des *Ensifer*, et sur les îlots symbiotiques des *Mesorhizobium* et des *Bradyrhizobium*; le groupe α -Rhcll contient les clusters T3SS retrouvés sur d'autres plasmides de certaines souches d'*Ensifer* et chez certaines souches de *Mesorhizobium*; et le groupe α -Rhclll qui est représenté par des clusters T3SS retrouvés chez des souches du genre *Rhizobium*. Un quatrième groupe, β -Rhc, contient le cluster T3SS retrouvé chez les β -rhizobiums tels que *Cupriavidus taiwanensis* et certaines souches de *Burkholderia* (Gazi *et al.*, 2012; Tampakaki *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2018). Jusqu'à présent, seuls les

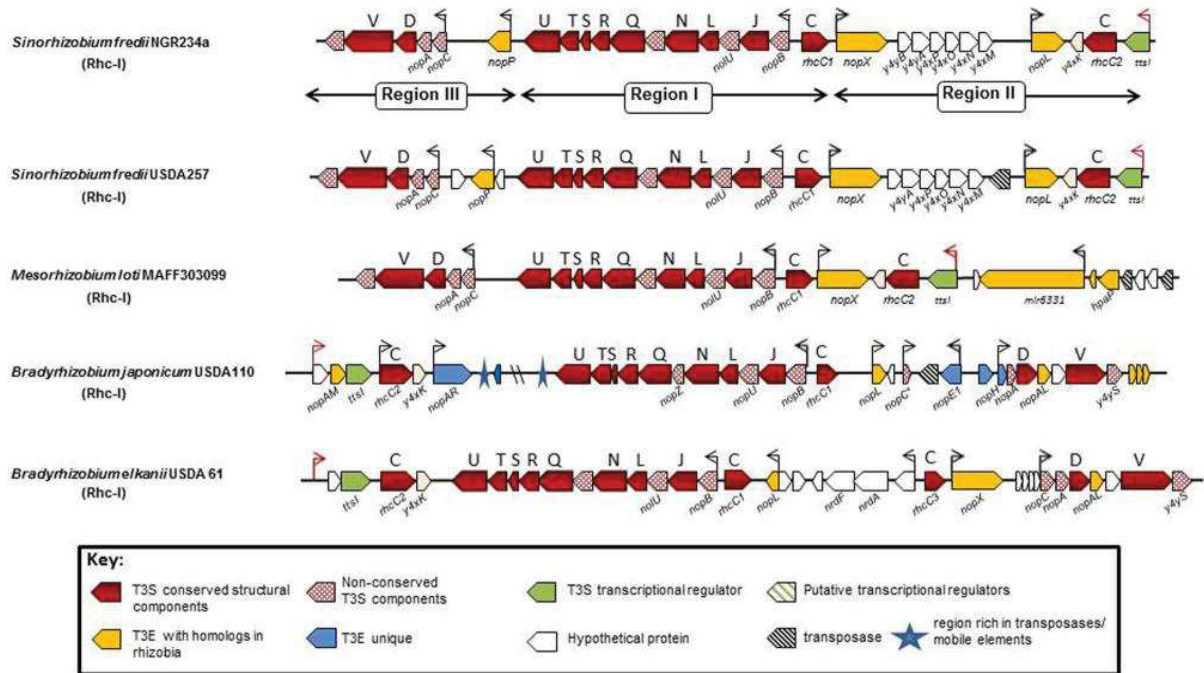


Figure 31. Organisation génétique des clusters fonctionnels RhoI chez les rhizobiums modèles

L'organisation génétique de la région I est très conservée chez les différents rhizobiums possédant un cluster de type RhoI. En revanche, de nombreuses variations existent dans l'organisation génétique des régions II et III. Chaque gène est représenté par une flèche indiquant le sens de transcription. Les gènes *rhc* conservés sont représentés en rouge et les lettres capitales au dessus correspondent à l'identité du gène dans la nomenclature *Rhc*. Les gènes codant pour des composants spécifiques du T3SS des rhizobiums sont représentés par des flèches quadrillées en rouge. Les noms des gènes sous les flèches correspondent à ceux utilisés dans la littérature. Les flèches fines rouges et noires représentent respectivement les *nod* box et les *tts* box. Les flèches jaunes représentent des effecteurs putatifs dont des homologues chez d'autres rhizobiums sont connus alors que les flèches bleues représentent des effecteurs putatifs spécifiques de USDA110. La flèche verte correspond au gène codant pour l'inducteur (*ttsI*) du T3SS. Les flèches blanches et celles rayées noires représentent respectivement des gènes hypothétiques et des transposases. Enfin, les étoiles bleues indiquent la présence de régions riches en éléments mobiles.

(Adapté de Tampakaki, 2014)

clusters de type Rhcl ont montré leur fonctionnalité dans la sécrétion d'effecteurs (leur description fera l'objet de la partie suivante). Une seule étude fonctionnelle a été réalisée sur le cluster β -Rhc où il est démontré que sa mutation chez la souche *Cupriavidus taiwanensis* n'altère pas sa capacité de nodulation chez sa plante hôte *Mimosa pudica* mais lui confère la capacité de noduler *Leucaena leucocephala* (Saad *et al.*, 2012). Récemment, une étude menée sur *Mesorhizobium alhagi* CCNWXJ12-2 suggère que le cluster RhcII est impliqué dans la résistance de la bactérie en vie libre au stress environnementaux (Liu *et al.*, 2018). Cependant, et jusqu'à présent, aucune étude sur le rôle symbiotique des deux sous-groupes RhcII et RhcIII n'est disponible.

2.3. Le cluster Rhcl des rhizobiums

2.3.1. Structure et organisation génétique du cluster Rhcl

Chez les rhizobiums, la plupart des gènes qui codent pour les composants du T3SS sont retrouvés dans trois régions génétiques distinctes du cluster Rhcl : une région centrale (région I) et deux régions périphériques (région II et III) qui peuvent être à une distance variable de la région I en fonction des souches (Figure 31). La région I est la plus grande des trois et porte une grande partie des gènes qui codent pour le corps basal du T3SS. Ces gènes sont supposés appartenir à la même unité transcriptionnelle et l'on y retrouve, dans l'ordre de transcription, *nopB* (composant du pilus), *rhcJ*, *nolU*, *rhcLNZQSTU*, et le gène *rhcC1* en sens opposé. Cette région est la plus conservée des trois et elle est retrouvée à l'identique chez tous les rhizobiums qui possèdent un cluster Rhcl (Tampakaki *et al.*, 2014). Les régions II et III sont beaucoup plus variables, elles contiennent les autres gènes codant pour la seringue mais également certains effecteurs de type III et d'autres gènes de fonction inconnue dont la présence et l'organisation est souche-spécifique. La région II porte le gène codant pour le putatif translocon NopX ainsi qu'un second opéron contenant le gène *ttsI* (pour « *type three secretion* inducteur »), codant pour le régulateur transcriptionnel du T3SS, et les gènes *rhcC2* et *y4xK* (de fonction inconnue) (Viprey *et al.*, 1998, Marie *et al.*, 2001). La région III porte les composants de la seringue au sein d'un troisième opéron avec dans l'ordre *nopC* (un putatif effecteur), *nopA* (un composant du pilus), *rhcDV* et *y4yS*. Chez les *Bradyrhizobium*, cet opéron a la particularité de contenir, entre *rhcD* et *rhcV*, deux gènes supplémentaires de fonction inconnue (*bll1801* et *bll1802/nopAL* chez *B. diazoefficiens* USDA110) (Göttfert *et al.*, 2001; Okasaki *et al.*, 2009; Tampakaki *et al.*, 2014; Songwatana *et al.*, 2016).



Figure 32. Représentation WebLogo du consensus de 30 *tts* box différentes

Les 30 *tts* box ont été extraites des promoteurs de gènes codant pour des composants du T3SS et des effecteurs Nops chez *E. fredii* NGR234 (7 *tts* box), *E. fredii* USDA257 (4 *tts* box), *B. diazoefficiens* USDA110 (10 *tts* box) et *B. elkanii* USDA61 (9 *tts* box) (Marie *et al.*, 2004; Zehner *et al.*, 2008; Okazaki *et al.*, 2009). L'alignement a été réalisé en utilisant la plateforme en ligne Weblogo <https://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>. Les *tts* box contiennent les deux motifs conservés GTCAG et GN[A/C]AG toujours séparés de 6 nucléotides. Ce haut degré de conservation est utilisé pour la recherche de gènes candidats codant pour des effecteurs Nops (Kimbrel *et al.*, 2013; Songwattana *et al.*, 2017).

2.3.2. Régulation de l'expression des gènes du T3SS et des effecteurs chez les rhizobiums

L'expression des gènes du T3SS des pathogènes d'animaux et de plantes est influencée par de très nombreux facteurs environnementaux, tels que la température, le pH, l'osmolarité, la disponibilité en nutriments (et notamment en carbone) et en cations divalents (Francis *et al.*, 2002). Si la structure du T3SS des rhizobiums est probablement identique à celle des bactéries pathogènes, la régulation des gènes codant cette machinerie de sécrétion, ainsi que les effecteurs, sont différents. Elle implique l'activateur transcriptionnel TtsI qui, en se fixant sur le motif *tts* box (5'-GTCAgCT-N6-GacAG-N11-A-3') retrouvé dans la région promotrice des gènes du T3SS et des effecteurs, active leur expression (Krause *et al.*, 2002; Marie *et al.*, 2004; Wassen *et al.*, 2008; Zehner *et al.*, 2008). Une étude menée sur le régulateur TtsI d'*E. fredii* NGR234 a montré qu'il pouvait également participer à l'induction de l'expression de gènes qui ne sont pas reliés au T3SS, dont certains impliqués dans la synthèse de LPS (Marie *et al.*, 2004).

Du fait de sa très forte conservation, la séquence *tts* box est un marqueur génomique fort pour l'identification de gènes sous le contrôle de TtsI, et elle peut notamment être utilisée pour l'identification de nouveaux effecteurs de type III (Figure 32). TtsI appartient à la famille de régulateurs à double composants OmpR. L'activité régulatrice des protéines de cette famille dépend d'un second partenaire, une histidine kinase, qui s'auto-phosphoryle à la reconnaissance d'un signal environnemental. Le groupement phosphate est ensuite transféré sur un résidu aspartate du régulateur OmpR, ce qui induit un changement de conformation et libère son activité inductrice, lui permettant d'interagir avec un élément en *cis* dans les promoteurs des gènes à réguler (Stock *et al.*, 2000). Cependant, dans le cas de TtsI, un résidu glutamate remplace le résidu aspartate supposé recevoir la phosphorylation. Chez d'autres bactéries, ce type de substitution entraîne une activité constitutive du régulateur OmpR, qui ne nécessite plus l'intervention d'un partenaire (Delgado *et al.* 1993; Klose *et al.* 1993; Lan and Igo 1998). TtsI semble donc être constitutivement actif dès lors qu'il est exprimé et la régulation de son activité ne peut se faire qu'au niveau transcriptionnel (Marie *et al.*, 2004). L'expression de TtsI est dépendante de la reconnaissance de flavonoïdes par la protéine NodD, qui interagit directement sur la *nod* box retrouvée dans la région promotrice de l'opéron *ttsI/rhcC2/y4xK* (Krause *et al.*, 2002; Marie *et al.*, 2004; Kobayashi *et al.*, 2004; Bolzan de Campos *et al.*, 2011). Cette régulation du T3SS par la protéine NodD, initialement identifiée chez la souche *E. fredii* NGR234 (Viprey *et al.*, 1998), démontre une nouvelle fois l'importance jouée par le T3SS au cours du processus symbiotique (Deakin *et al.*, 2009). La régulation de l'expression du T3SS par NodD n'est pas si claire chez *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110. L'expression des gènes du T3SS et des effecteurs sont bien induits par un flavonoïde, la génistéine, cependant, le principal régulateur

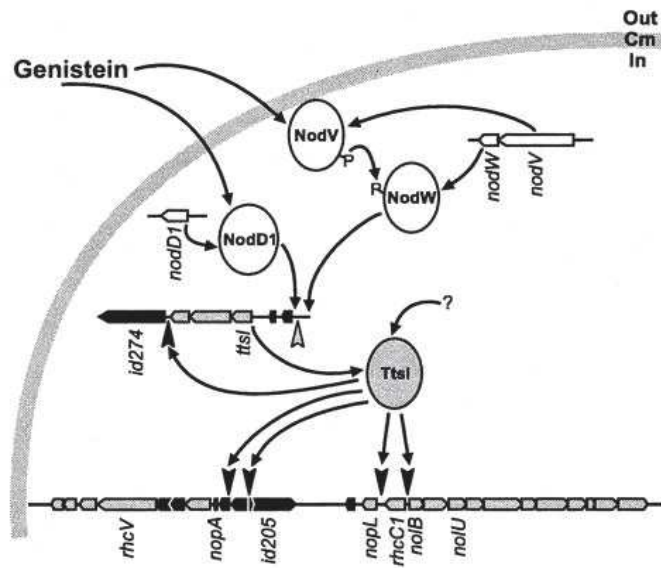


Figure 33. Modèle de la régulation transcriptionnelle du T3SS et des effecteurs Nops chez *B. diazoefficiens* USDA110

NodD1, mais également le système à deux composants NodVW est requis pour l'induction du T3SS d'USDA110 après reconnaissance des flavonoïdes. NodD et NodW peuvent interagir avec le promoteur du gène *ttsI*. Les têtes de flèche grises et noires représentent respectivement les *nod* box et les *tts* box. Cm : enveloppe bactérienne.

(Krause *et al.*, 2002)

ne semble pas être NodD mais le régulateur à double composant NodVW (Figure 33) (Krause *et al.*, 2002; Lang *et al.*, 2008). Deux autres cas particuliers ont été relevés chez deux souches de *Bradyrhizobium elkanii*. Bolzan de Campos et ses collaborateurs (2011) ont montré l'existence chez la souche *B. elkanii* SEMIA587 d'une *tts* box en amont du gène *ttsI*, mettant en évidence une boucle de rétroaction positive de TtsI sur sa propre expression. Le second cas a été rapporté par Okazaki et ses collaborateurs (2009) chez *B. elkanii* USDA61. Les auteurs démontrent que cette souche peut sécréter des effecteurs de type III dans le surnageant bactérien en l'absence d'inducteur connu. Aucune hypothèse n'est proposée par les auteurs mais cette observation suggère l'existence d'une voie alternative d'induction du T3SS, indépendante de la reconnaissance de flavonoïdes, chez certaines souches de *Bradyrhizobium*.

2.4. Les effecteurs de type III

2.4.1. Généralité sur les effecteurs de type III

Les effecteurs de type III ou T3Es sont par définition des protéines secrétées à travers le système de sécrétion de type III. Certaines protéines de la seringue ont initialement été considérées par certains auteurs comme des effecteurs, car retrouvées secrétées dans le surnageant bactérien. C'est le cas notamment des protéines constituant le pilus du T3SS. Dans cette partie du manuscrit, le mot « effecteur » ne fera référence qu'aux protéines qui sont secrétées dans les cellules de l'hôte et qui n'entrent pas dans la composition de la seringue.

Les T3Es ont principalement pour rôle de favoriser l'installation et la dissémination de la bactérie dans son hôte (Büttner, 2016). La sécrétion des T3Es est assurée par un peptide signal non clivable à l'extrémité N-terminale de la protéine (Dean *et al.*, 2011). Il est important de noter, que dans la plupart des cas, la sécrétion des effecteurs requiert l'assistance de protéines chaperonnes qui interagissent directement avec les T3Es et qui empêchent leur agrégation et/ou leur dégradation dans le cytoplasme bactérien. Plusieurs protéines chaperonnes ont été caractérisées chez les pathogènes de plantes et d'animaux mais aucun candidat n'a été identifié chez les rhizobiums (Lohou *et al.*, 2013). Après sécrétion, les effecteurs ciblent des processus cellulaires et physiologiques clés, souvent reliés au système immunitaire, et perturbent leur fonctionnement pour aider à la colonisation de la bactérie.

La structure des T3Es est extrêmement variée, et ils sont très souvent présentés comme des protéines modulaires multifonctionnelles. Ils peuvent être composés de motifs très différents tels que des sites actifs enzymatiques, des domaines d'interaction protéine-protéine, des domaines

d'interaction aux acides nucléiques, ou des motifs de localisation subcellulaire (Dean *et al.*, 2011; McCann et Guttman, 2007). La conservation de certains domaines fonctionnels a permis de définir des grandes familles d'effecteurs dont le rôle dans le processus d'infection a pu être démontré (Bastedo *et al.*, 2019). Pour plus d'informations sur les différents domaines fonctionnels des T3Es, j'invite les lecteurs à consulter les deux excellentes revues de Paul Dean (2011) et de Daniela Büttner (2016) qui présentent chacune un inventaire exhaustif sur cette thématique. Même si de nombreuses connaissances sur les effecteurs sont aujourd'hui disponibles, la fonction de la plupart d'entre eux reste encore inconnue et leur caractérisation représente souvent une tâche fastidieuse. Leur étude est souvent rendue difficile par l'existence d'une redondance fonctionnelle importante, si bien que l'inactivation d'un seul effecteur conduit rarement à une altération de la virulence de la bactérie (Vivian et Arnold, 2000; Noël *et al.*, 2003).

2.4.2. Identification des effecteurs Nops

Chez les rhizobiums, les effecteurs de type III ont été appelés initialement Nop pour «*n*odulation *o*uter *p*rotein» (Marie *et al.*, 2001). Historiquement, NopP et NopC ont été les deux premiers effecteurs Nops identifiés chez *Ensifer fredii* USDA201 en utilisant une technique de « promoteur trapping » inductible par des exsudats racinaires (Sadowsky *et al.*, 1988). Depuis l'identification du système de sécrétion de type III chez les rhizobiums, trois approches différentes ont été utilisées pour identifier spécifiquement de nouveaux effecteurs Nops : (I) La comparaison du sécrétome de la souche sauvage avec celui d'un mutant dans le T3SS (Marie *et al.*, 2004; Lorio *et al.*, 2004; Hempel *et al.*, 2009; Okazaki *et al.*, 2009; Okazaki *et al.*, 2010; Tsukui *et al.*, 2013); (II) la recherche du motif *tts* box dans les promoteurs des gènes (Marie *et al.*, 2004; Zehner *et al.*, 2008; Okazaki *et al.*, 2010; Kimbrel *et al.*, 2013; Songwattana *et al.*, 2017); (III) l'identification de gènes codant pour des facteurs d'incompatibilité d'hôte liée au T3SS en utilisant une banque de mutants d'insertion de transposon (Faruque *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2018; Nguyen *et al.*, 2017; 2018). Pour confirmer la sécrétion des effecteurs candidats identifiés par ces deux dernières techniques, une fusion traductionnelle du candidat avec à une adénylate-cyclase (CyaA) est exprimée chez la bactérie et chez un mutant dans le T3SS. L'activité du domaine CyaA requiert une calmoduline qui n'est retrouvée que chez les cellules eucaryotes. Ainsi, la sécrétion du candidat n'est confirmée qu'en cas d'augmentation significative de la concentration en AMP cyclique dans les tissus du nodule infecté par la bactérie sauvage (Chakravarthy *et al.*, 2017). Une autre méthode consiste à produire un anticorps spécifique du candidat et à comparer son profil de sécrétion dans les surnageants de la souche sauvage et de son mutant dans le T3SS en présence d'un flavonoïde inducteur (Staehelin et

Effecteur	Souche/accession	Fonction putative	Références de la sécrétion
NopM	NGR234/AAB91674	Novel E3 ligase	Kambara et al. 2009
NopT	NGR234/NP_444174	Cysteine protease	Kambara et al. 2009
NopL	NGR234/NGR_a00770	-	Kambara et al. 2009
NopE	USDA110/blr1649	-	Wenzel et al. 2010
NopP	NGR234/NGR_a00570	-	Kambara et al. 2009
NopJ	NGR234/NGR_a02610	Acetyltransferase	Kambara et al. 2009
NopD	HH103:SFHH103_psfHH103d_287	SUMO protease	Rodrigues et al. 2007
NopC	HH103/AAY33494	-	Jiménez-Guerrero et al. 2015
NopAA; GunA2	USDA110/blr1656	Endoglucanase	Süb et al 2009
NopAR	USDA110/blI1840	-	Tsukui et al. 2013
NopH	USDA110/BII1804	-	Hempel et al. 2009
NopAG; NopF	USDA110/blI1862	-	Süb et al 2009
BEL2-5	USDA61/AKS25901.1	SUMO protease	Faruque et al., 2015
InnB	USDA61/WP_018270178	-	Nguyen et al., 2018

Tableau 2. Liste des 14 *bona fide* effecteurs Nops

Krishnan, 2015). L'utilisation de ces différentes techniques a conduit à l'identification de 14 *bona fide* effecteurs Nops dont les caractéristiques sont résumées dans le Tableau 2.

En 2013, Kimbrel et ses collaborateurs ont publié une étude sur l'identification d'effecteurs Nops chez des souches de *Bradyrhizobium* et d'*Ensifer* en couplant une recherche de *tts box*, et une validation des candidats identifiés par l'utilisation d'un système de sécrétion hétérologue *Pseudomonas/Arabidopsis*, couramment utilisé pour la caractérisation d'effecteurs de pathogènes. En bref, la partie N-terminale de la protéine candidate, supposée contenir le peptide signal de sécrétion, est fusionnée à la partie C-terminale de l'effecteur AvrRpt2 qui est responsable de l'induction d'une HR sur *Arabidopsis*. Cette protéine fusion est exprimée dans un *Pseudomonas* qui est ensuite inoculé dans les feuilles d'*Arabidopsis*. Dans le cas d'une translocation, une HR est rapidement induite à l'endroit de l'inoculation. Étonnamment, certains composants du corps basal du T3SS (RhcJ, RhcQ, NolV et NolU) ont été considérés comme secrétés en utilisant cette approche. Ainsi, les gènes caractérisés en utilisant cette technique doivent être considérés comme des effecteurs putatifs qui demandent une validation complémentaire. Pour cette raison, ces candidats ne sont pas listés dans le Tableau 2.

Le nombre d'effecteurs peut varier considérablement d'une souche à l'autre. Jusqu'à présent, aucune étude de génomique comparative à grande échelle de la distribution de ces effecteurs au sein des rhizobiums n'est disponible. Il apparaît néanmoins que les *Bradyrhizobium* semblent posséder un effectome plus étendu que celui des souches d'*Ensifer* et *Mesorhizobium* qui ont été étudiées (Kimbrel *et al.*, 2013; Songwattana *et al.*, 2017; Piromyou *et al.*, 2019). De même, très peu d'études fonctionnelles ont été menées afin de caractériser les Nops connus. Sur les 14 *bona fide* Nops, seulement cinq (NopM, NopT, NopL, NopP, NopE) ont été caractérisés d'un point de vue fonctionnel. La partie suivante s'attachera à résumer les connaissances publiées sur ces cinq effecteurs.

2.4.3. Caractéristiques et fonctions de cinq effecteurs Nops

NopM appartient à la grande famille d'effecteurs IpaH qui ont tous la particularité de posséder un domaine NEL (pour «novel E3-ubiquitine ligase») du côté C-terminal de l'effecteur, précédé par un domaine LRR (Bastedo *et al.*, 2019). Les effecteurs appartenant à cette famille sont conservés aussi bien chez les rhizobiums que les pathogènes de plantes et d'animaux (Lin et Marchner, 2017). NopM est souvent retrouvé en multi-copie chez les rhizobiums et les homologues partagés entre tous ses homologues se limitent, parfois, uniquement au domaines LRR-NEL (Kimbrel *et al.*, 2013; Songwattana *et al.*, 2016). La fonction de ces effecteurs est similaire aux E3-ubiquitines ligases des eucaryotes et il est donc supposé que NopM exploite ou détourne le protéasome des

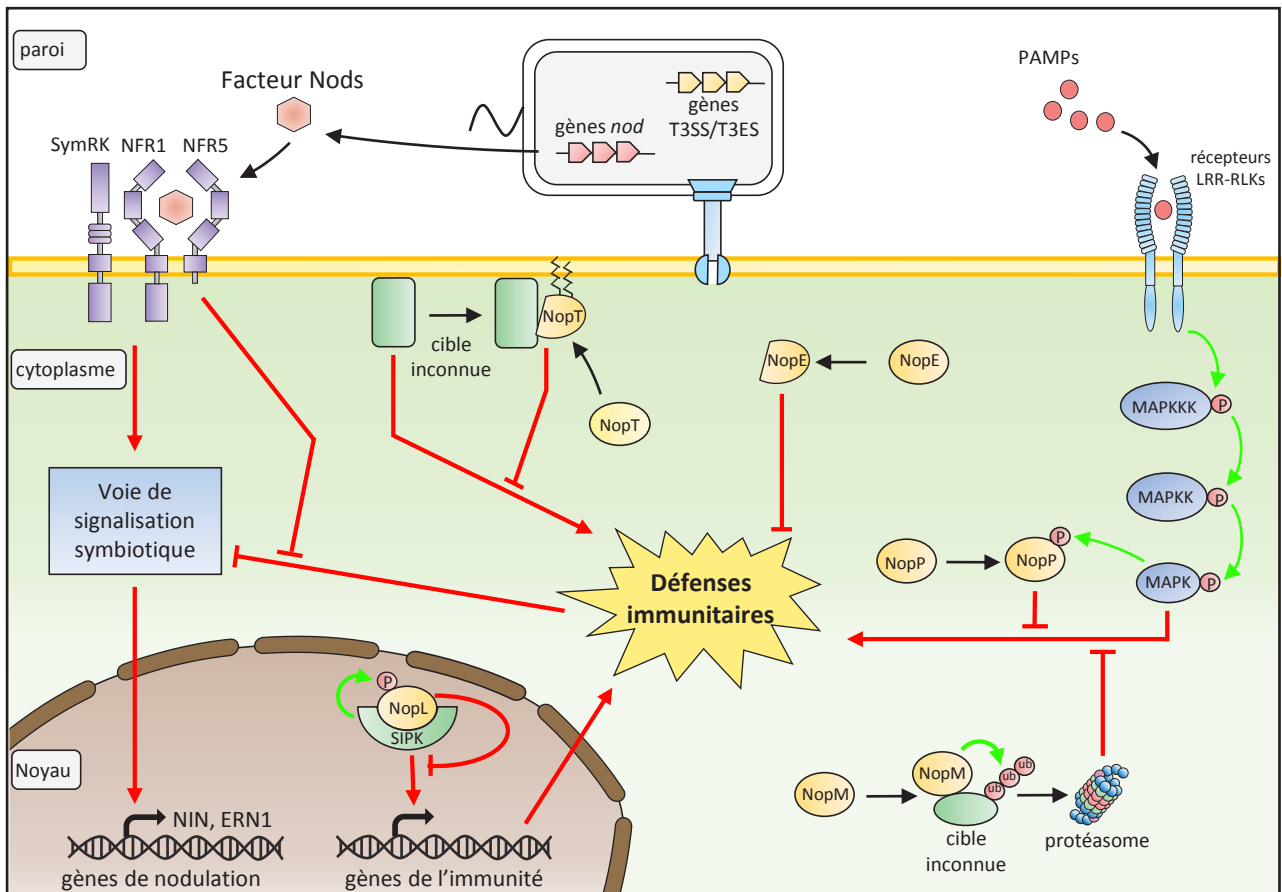


Figure 34. Fonctions cellulaires connues des effecteurs Nops

Les effecteurs Nops (en jaunes) sont sécrétés dans la cellule hôte tout au long du processus symbiotique (Gourion *et al.*, 2014). Seuls les effecteurs Nops dont une étude fonctionnelle a été réalisée sont représentés ici. Leurs activités sont déduites des différentes études publiées jusqu'à présent. La reconnaissance des facteurs Nods par les récepteurs spécifiques (en violets) active la voie de signalisation symbiotique conduisant à l'expression des gènes nécessaires à l'établissement de la nodulation (à gauche). En parallèle, la reconnaissance de PAMPs par des récepteurs LRR membranaires (en bleus) active les voies de signalisation MAPKs (ovales bleus) conduisant à l'activation du système immunitaire, ce qui peut alors interférer avec la mise en place de la nodulation. La modulation du système immunitaire par les effecteurs Nops est nécessaire à l'établissement de la symbiose. Les cibles de ces effecteurs (en vertes) sont encore largement inconnues mais il est cependant supposé que beaucoup d'entre elles participent aux voies de signalisation MAPKs. P, phosphorylation. Ub, ubiquitination.

cellules hôtes pour la dégradation spécifique de sa cible par l'ajout d'une ou plusieurs protéines d'ubiquitine (Figure 34). Les analyses fonctionnelles de NopM ont toutes été réalisées chez *Ensifer fredii* NGR234 où il a été confirmé que NopM possède une activité de poly-ubiquitination dépendante de la cystéine Cys³³⁸ (Xin *et al.*, 2012). Xu et ses collaborateurs (2018) ont démontré que NopM est phosphorylé *in planta* et *in vitro* par la MAPK NtSIPK (pour «salicylic acid-induced protein kinase») de *Nicotiana tabacum* sans que cela n'altère son activité E3-ubiquitine ligase. Le rôle de cette phosphorylation, reste encore aujourd'hui à déterminer. L'expression transitoire de NopM dans des feuilles de *N. benthamiana* réduit la production de ROS induite par la flagelline flg22, alors qu'elle induit une ETI conduisant à une HR chez *N. tabacum*. Toutes ces observations laissent supposer que NopM intervient dans la répression du système immunitaire de la plante. Son rôle symbiotique a été confirmé sur *Lablab purpureus* où la mutation de NopM chez *E. fredii* NGR234, ou celle de son site actif Cys³³⁸, réduit drastiquement le nombre de nodules induits (Kambara *et al.*, 2009; Xin *et al.*, 2012).

NopL est un effecteur spécifique des rhizobiums encodé par un gène de la région III du cluster Rhcl (Tampakaki *et al.*, 2014). Sa mutation chez la souche *Ensifer fredii* NGR234 entraîne l'induction de nodules nécrotiques sur *Phaseolus vulgaris* associée à une senescence précoce des bactéroïdes et son expression dans *N. tabacum* inhibe l'induction des protéines PR (pour «pathogenesis-related»), protéines à activité antimicrobienne produites lors de la reconnaissance d'un agent pathogène (Ge *et al.*, 2016; Bartsev *et al.*, 2004). Des analyses biochimiques ont montré que NopL est phosphorylé par la MAPK SIPK dans le noyau des cellules végétales et que cette phosphorylation est indispensable à son activité de répression du système immunitaire (Zhang *et al.*, 2011; Ge *et al.*, 2016). Récemment, une recherche de QTL réalisée sur *Glycine max* cv. Merr en réponse à un mutant dans *nopL* chez *Ensifer fredii* HH103 a permis l'identification de deux cibles putatives, une serine-thréonine phosphatase et une sérine-thréonine kinase (Zhang *et al.*, 2018). Le rôle de ces deux protéines dans la symbiose reste encore à déterminer mais ces observations semblent indiquer que NopL interagit avec la voie d'induction MAPK et réprime ainsi les mécanismes de défense des plantes (Figure 34).

NopT est une cystéine protéase C58 appartenant à la grande famille d'effecteurs YopT/AvrPphB (Stahelin et Krishnan, 2015). Comme toutes les protéines de cette famille, NopT s'auto-clive après translocation et deux modifications post-traductionnelles (une myristoylation et une palmitoylation) assurent son ancrage dans la membrane de la cellule hôte (Downen *et al.*, 2009). La mutation de NopT chez la souche NGR234 a un effet négatif sur l'interaction symbiotique avec *Tephrosia vogelii*. Enfin, l'expression de NopT de NGR234 et de NopT1 d'USDA110 dans le tabac induit des réactions hypersensibles qui sont abolies lorsque les acides aminés requis pour sa localisation membranaire sont mutés (Dai *et al.*, 2008; Fotiadis *et al.*, 2011). La cible de NopT est

encore inconnue mais il est supposé qu'elle est membranaire et qu'elle contient la séquence en acide aminé DKM requise pour l'activité de clivage de NopT (Downen *et al.*, 2009) (Figure 34).

NopE est un effecteur caractérisé chez *B. diazoefficiens* USDA110 où il y est retrouvé en deux copies. NopE possède une activité d'auto-clivage qui lui est conféré grâce à deux domaines MIIA (pour «metal ion-inducible autocleavage») récemment caractérisés (Schirromeister *et al.*, 2011; Wenzel *et al.*, 2010; Duran *et al.*, 2019). Seule la mutation des deux copies de NopE chez *B. diazoefficiens* USDA110 montre une réduction de la nodulation sur *G. max* et *Macroptilium atropurpureum* suggérant une redondance fonctionnelle des deux homologues (Wenzel *et al.*, 2010) (Figure 34). Le domaine MIIA est retrouvé chez d'autres effecteurs Nops putatifs de *Bradyrhizobium* (Duran *et al.*, 2019) mais il est également conservé chez certaines protéines identifiées dans d'autres genres bactériens, comme des *Burkholderia* et des *Vibrio* (Wenzel *et al.*, 2010). NopE pourrait donc appartenir à une nouvelle famille d'effecteurs de type III, caractérisée par la conservation du domaine MIIA, et dont la répartition au sein des bactéries reste encore à préciser.

L'effecteur **NopP**, tout comme NopL, est spécifique des rhizobiums et aucun domaine fonctionnel connu n'a pu être identifié dans sa séquence. Peu d'informations sont disponibles quant à sa fonction, néanmoins, tout comme NopL et NopM, il est phosphorylé *in vitro* par des kinases de plantes et *in planta* à l'intérieur des nodules (Skorpil *et al.*, 2005). L'une des hypothèses est que NopP participerait à la répression des mécanismes immunitaires au cours de l'interaction symbiotique en interférant avec la voie MAPK comme le fait NopL (Figure 34). Seul le double mutant *nopL/nopP* chez la souche *E. fredii* NGR234 montre une réduction de la nodulation sur *Tephrosia vogelii* et *Flemingia congesta* laissant supposer que NopP et NopL pourraient jouer un rôle synergique dans la répression des mécanismes de défenses de la plante au cours de l'interaction symbiotique.

2.4.4. Les effecteurs Nops : une épée à double tranchant

En 2009, Deakin et Broughton présentaient les symbiotes comme des pathogènes « intelligents ». Comme nous l'avons vu précédemment, et de manière similaire aux bactéries pathogènes, la plupart des Nops dont les fonctions ont été étudiées agissent en tant que répresseur du système immunitaire de leur hôte. Il apparaît alors évident que la suppression des mécanismes de défenses de la plante à un effet positif sur l'établissement et le maintien de la symbiose (Gourion *et al.*, 2014).

Cependant, en 2015, Stahelin et Krishnan qualifiaient les effecteurs Nops d'épée à double tranchant pour les rhizobiums. En effet, la mutation du T3SS, ou d'un Nop en particulier, peut avoir des effets aussi bien positifs que négatifs sur l'interaction symbiotique, conduisant à des variations du spectre d'hôtes de la bactérie. De nombreuses études rapportent des cas d'incompatibilités

d'hôtes liées à la sécrétion d'effecteurs Nops (Gourion *et al.*, 2014; Miwa *et al.*, 2017). C'est le cas de NGR234 où la mutation du T3SS restaure une capacité de nodulation sur *Pachyrhizus tuberosus* mais réduit drastiquement celle sur *Flemingia congesta* (Skorpil *et al.*, 2005). Plus récemment, l'analyse d'une banque de mutants Tn5 de *B. elkanii* USDA61 a conduit à l'identification de l'effecteur InnB responsable de l'incompatibilité de la souche avec *Vigna radiata* cv. KPS1 (Nguyen *et al.*, 2017; 2018). Une reconnaissance directe ou indirecte de certains Nops par des protéines de résistance Rj de la plante provoque la mise en place de mécanismes de défense similaires à l'ETI décrite dans les interactions plantes-pathogènes (Staelin et Krishnan, 2015). Jusqu'à présent, seulement trois gènes codant pour des protéines de résistances, *Rj2*, *Rfg1* et *Rj4*, ont été caractérisés chez les légumineuses, les trois chez le soja *G. max*. Les deux gènes *Rj2* et *Rfg1* sont alléliques et encodent des protéines de résistance « Toll-interleukin receptor/nucleotide-binding site/leucine-rich repeat » ou TIR-NBS-LRR (Yang *et al.*, 2010). Plus récemment, le gène *Rj4* a été identifié comme codant pour une protéine thaumatine-like appartenant à la famille des protéines PR5 (Hayashi *et al.*, 2014). Cette dernière empêche certains cultivars de soja d'être nodulés par les souches *B. elkanii* USDA61 et *B. japonicum* Is-34 et deux études indépendantes ont identifié l'effecteur BEL2-5 comme étant responsable de cette incompatibilité (Faruque *et al.*, 2015; Tsurumaru *et al.*, 2015).

Récemment, une étude réalisée sur NopP a montré qu'il était responsable de l'incompatibilité d'hôte de *B. diazoefficiens* USDA122 sur *Glycine max* cv. Hardee (*Rj2*) (Sugawara *et al.*, 2017). De manière surprenante, la souche *B. diazoefficiens* USDA110, compatible avec ce cultivar, présente un homologue de NopP qui ne diffère que de 3 acides aminés par rapport à celui d'USDA122. Cependant, seul le NopP d'USDA122 est reconnu par *Rj2*. De même, le changement de deux acides aminés de la protéine *Rj2* chez certains cultivars de soja restaure la capacité de nodulation avec la souche USDA122 (Yang *et al.*, 2010). Ces découvertes mettent en évidence que la reconnaissance des effecteurs Nop par les protéines de résistance relève d'une très haute spécificité.

La reconnaissance négative d'un symbiote efficient pour la nodulation comme USDA122 soulève de nombreuses questions quant à l'origine des gènes de résistance dirigés contre des effecteurs Nops. Ces gènes ont-ils initialement pour rôle de sélectionner des symbiotes ? Comme décrit précédemment, la protéine *Rj4* est une protéine thaumatine-like appartenant à la famille de protéines PR5, connues pour être induites lors de la reconnaissance d'agents pathogènes (van Loon *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2010; Hayashi *et al.*, 2014). Certains effecteurs Nops présentent un haut degré de similarité avec des effecteurs de type III retrouvés chez des bactéries pathogènes. C'est le cas notamment de BEL2-5 et de NopT qui appartiennent respectivement aux grandes familles d'effecteurs de type III XopD et YopT/AvrPphB (Downen *et al.*, 2009; Faruque *et al.*, 2015). Il est possible que ces gènes de résistance chez les légumineuses répondent, comme chez toutes les autres

plantes, à un besoin de contrôle des agents pathogènes et que la reconnaissance d'effecteurs Nops ne soit qu'une conséquence « collatérale ».

Très peu de choses sont connues sur les mécanismes de reconnaissance des effecteurs Nops. La caractérisation de nouveaux gènes de résistances chez les légumineuses permettra peut-être de mieux comprendre le rôle et l'aspect évolutif de l'incompatibilité entre les rhizobiums et les légumineuses.



3. Les symbioses FN-indépendantes dans le modèle symbiotique *Bradyrhizobium* / *Aeschynomene*

3.1. Le couple symbiotique *Bradyrhizobium* / *Aeschynomene*

Comme présenté dans la première partie, la plupart des mécanismes physiologiques et moléculaires de la symbiose entre les rhizobiums et les légumineuses ont été caractérisés chez les deux plantes modèles *M. truncatula* et *L. japonicus*. Ces modèles représentent les deux grands types de nodulation majoritairement retrouvés chez les légumineuses impliquant une infection intracellulaire via la formation d'un cordon d'infection et aboutissant à la formation de nodules de type déterminé (chez le lotier) ou indéterminé (chez la luzerne). Cependant, toutes les légumineuses ne présentent pas le même comportement symbiotique. C'est le cas des légumineuses tropicales du genre *Aeschynomene*, nodulées par des rhizobiums du genre *Bradyrhizobium*. Le couple symbiotique *Bradyrhizobium* / *Aeschynomene* présente de très nombreuses particularités qui font l'objet de cette troisième partie.

3.1.1. La diversité du genre *Bradyrhizobium*

Les *Bradyrhizobium* constituent l'un des principaux genres de rhizobiums capables d'induire des nodules sur les légumineuses. Ils ont initialement été caractérisés comme des rhizobiums à croissance lente (*Bradys* vient du grec ancien « βραδύς » qui signifie « lent ») et n'ont été reconnus comme formant un genre indépendant qu'en 1982 (Jordan, 1982). Récemment, une analyse du microbiote d'échantillons de sols provenant de multiples sites différents sur la surface du globe indique que les *Bradyrhizobium* sont les bactéries du sol les plus abondantes et ubiquitaires (VanInsberghe *et al.*, 2015, Delgado-Baquerizo *et al.*, 2018).

Les *Bradyrhizobium* interagissent symbiotiquement avec les principales légumineuses cultivées, dont le soja (*Glycine max*), l'arachide (*Arachis hypogaea*) et le Niébé (*Vigna unguiculata*), mais aussi avec de nombreuses autres légumineuses tropicales ou tempérées non cultivées (Xu *et al.*, 1995; Vinuesa *et al.*, 2005; Stepkowski *et al.*, 2007; Steenkamp *et al.*, 2008; Ramírez-Bahena *et al.*, 2009; López-López *et al.*, 2013; Delamuta *et al.*, 2013; Delamuta *et al.*, 2015). Ils sont par ailleurs capables de développer une interaction endophytique avec le riz, la première céréale mondiale pour l'alimentation humaine (Chaintreuil *et al.*, 2000; Songwattana *et al.*, 2017).

Le séquençage massif de génomes bactériens a permis de fournir à la communauté scientifique de nombreux génomes de référence de *Bradyrhizobium*. Leur génome est généralement composé d'un seul chromosome circulaire d'une taille allant de 7,8 à 10,1 Mpb. La présence d'un plasmide est rare et n'a été rapportée, à ce jour, que chez sept souches : BTai1, NK6, DOA9, G22,

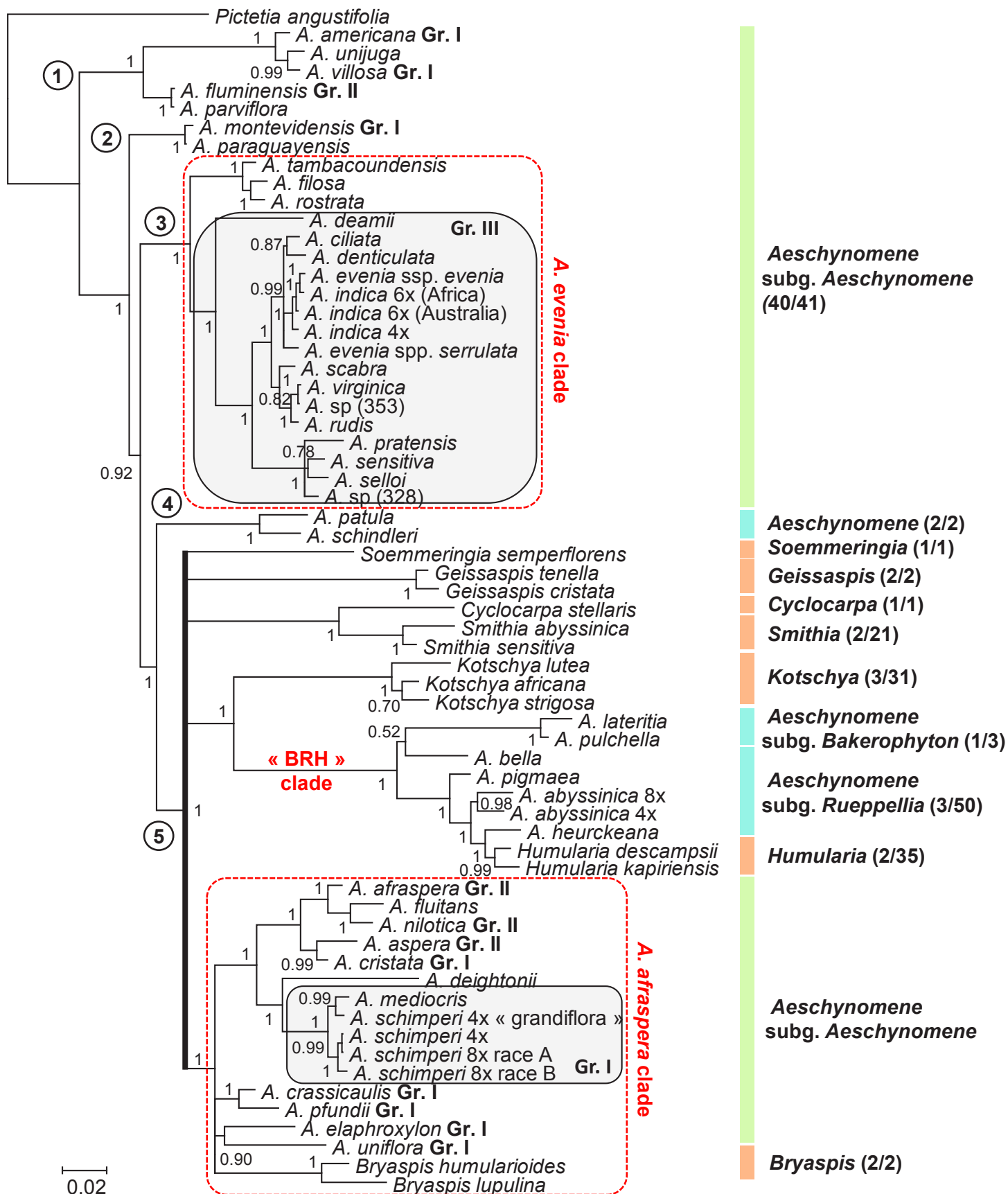


Figure 36. Phylogénie du genre *Aeschynomene* et des genres associés

L'arbre phylogénétique a été réalisé en utilisant une analyse bayésienne sur la combinaison des ITS et du gène *matK* (Brottier *et al.*, 2018). Les cinq principaux clades sont indiqués par des numéros encadrés. A droite sont indiqués les *Aeschynomene* du sous genre *Aeschynomene* (en vert), d'autres sous-genre d'*Aeschynomene* (en bleu) et les genres associés (en orange). (Gr.) Les différents groupes d'inoculations croisées (Gr. I, II ou III) présentés dans la partie 3.1.3 sont indiqués en gras. Les encarts gris représentent des accessions appartenant à un même groupe d'inoculations croisées. (Adapté de Chaintreuil *et al.*, 2013 et de Brottier *et al.*, 2018)

CCBAU51670, CCBAU51649, CCBAU53363 (Giraud *et al.*, 2007; Okazaki *et al.*, 2015; Iida *et al.*, 2015; Jones *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2019; Avontuur *et al.*, 2019). Cependant, une recherche récente des gènes *repABC* dans les génomes de *Bradyrhizobium* disponibles, spécifiquement impliqués dans la répllication des plasmides, suggère que le nombre de souches possédant au moins un plasmide serait plus important que les sept souches actuellement recensées (Ormeño-Orrillo et Martinez-Romero, 2019).

Beaucoup de *Bradyrhizobium* possèdent les gènes nécessaires à l'établissement d'une endosymbiose nodulaire efficace, à savoir les gènes de nodulation *nod*, les gènes de fixation d'azote *nif/fix*, mais également des gènes codant pour divers systèmes de sécrétion (T3SS, T4SS et T6SS) (Abby *et al.*, 2016; Hu *et al.*, 2017; Bernal *et al.*, 2018; Avontuur *et al.*, 2019). Ces gènes sont la plupart du temps retrouvés au sein d'un îlot symbiotique intégré dans le chromosome (Avontuur *et al.*, 2019). Certaines souches de *Bradyrhizobium* ont également la particularité de posséder des gènes permettant la synthèse d'un photosystème dont l'activité photosynthétique est requise pour une nodulation de tige efficace chez certaines légumineuses du genre *Aeschynomene* (voir la partie 3.1.3) (Giraud *et al.*, 2000; Giraud *et al.*, 2002).

En 2019, deux études indépendantes ont établi une phylogénie du genre *Bradyrhizobium* en se basant sur près de 150 génomes fragmentés ou entiers. À l'exception de quelques souches, les deux études aboutissent au même arbre phylogénétique (Avontuur *et al.*, 2019; Garrido-Sanz *et al.*, 2019) (Figure 35). L'étude d'Avontuur et ses collaborateurs (2019) découpe le genre *Bradyrhizobium* en sept super-groupes : I) le super-groupe *B. japonicum* comprenant 11 espèces ; II) le super-groupe *B. elkanii* comprenant 9 espèces ; III) le super-groupe *B. jicamae* comprenant 6 espèces ; IV) le super-groupe des *Bradyrhizobium* photosynthétiques contenant une seule espèce recensée ; et V) ; VI) et VII) les super-groupes Kakadu, Soil1 et Soil2 sans souche « type » recensée (Avontuur *et al.*, 2019). Il est à noter que le nombre d'espèces de *Bradyrhizobium* définies, bien qu'en pleine expansion ces dernières années, demeure réduit et non représentatif de la diversité observée au sein de ce genre (Ormeño-Orrillo *et al.*, 2019). Une analyse phylogénétique de 5678 gènes *recA* et de 3575 gènes *glnII* de *Bradyrhizobium* menée par Ormeño-Orrillo et ses collaborateurs (2019) a estimé que le nombre d'espèces de *Bradyrhizobium* dans la nature devrait s'approcher de 800. Ce nombre, obtenu seulement sur la diversité génétique de deux gènes, doit malgré tout être considéré avec précaution. Cependant, toutes les études actuellement menées sur la diversité génétique des *Bradyrhizobium* s'accordent sur le fait que le nombre d'espèces existantes est bien supérieur à celui recensé actuellement. La majorité des souches de *Bradyrhizobium*, dont le génome a été séquencé, a été isolée de nodules de légumineuses, en particulier du soja *G. max*. Cela a pour conséquence une disproportion du nombre de souches dans les différents super-groupes précédemment décrits et restreint également notre vision de la diversité génétique du genre (Figure 35).

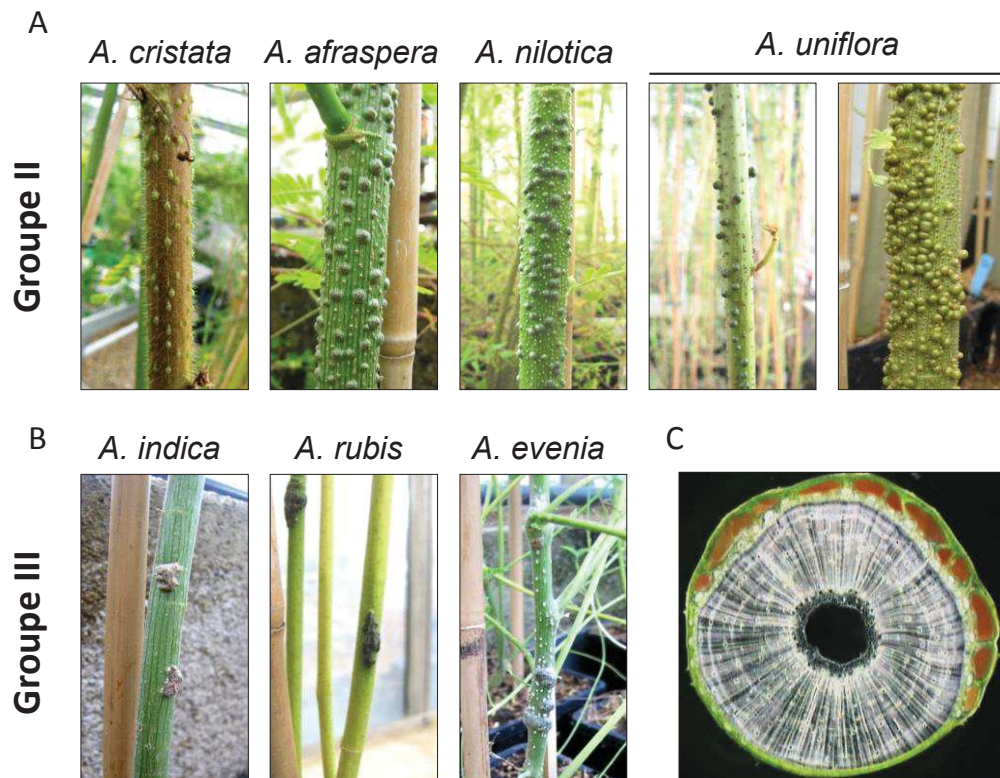


Figure 37. La nodulation de tige chez les *Aeschynomene*

A et **B**. Photographies de tiges nodulées de différentes espèces d'*Aeschynomene* du groupe II (A) et du groupe III (B) (voir la partie 3.1.3). La forme et la profusion des nodules peuvent varier en fonction de l'espèce (Photographies : JF Arrighi). **C**. Coupe transversale de nodule de tige d'*A. sensitiva* infecté par *Bradyrhizobium* sp. ORS278. La couleur rouge du tissu infectieux des nodules correspond à l'accumulation de leghémoglobine produit par la plante.

L'étude de Delgado-Baquerizo et de ses collaborateurs (2018), mettant en évidence l'abondance des *Bradyrhizobium* dans les sols du monde entier, soulève de nombreuses questions quant à leurs rôles écologiques. Cette découverte pourrait inciter la communauté scientifique à fournir plus d'efforts de recherche sur ce genre bactérien afin de mieux comprendre leurs impacts sur le fonctionnement des écosystèmes et les relations qu'ils entretiennent avec les autres bactéries dans la rhizosphère. En particulier, il serait important, à l'avenir, de séquencer un plus grand nombre de génomes de *Bradyrhizobium* isolés du sol et non principalement de nodules.

3.1.2. Les *Aeschynomene* : des légumineuses à nodulation caulinaire

Les plantes du genre *Aeschynomene* font parties de la sous-famille des *Papilionoideae* et appartiennent au clade des Dalbergioïdes. Le genre *Aeschynomene* comprend entre 175 et 180 espèces d'arbustes ou de plantes herbacées vivaces ou annuelles mais il est estimé que le nombre d'espèces pourrait dépasser les 250 (Klitgaard et Lavin, 2005) (Figure 36). On y trouve également des plantes semi-aquatiques se développant dans des marais, le long des cours d'eau ou des rizières (Lavin *et al.*, 2001; Arrighi *et al.*, 2013). Les plantes du genre *Aeschynomene* établissent des endosymbioses nodulaires exclusivement avec les bactéries du genre *Bradyrhizobium*.

L'intérêt initialement porté aux *Aeschynomene* concernait la capacité de certaines espèces semi-aquatiques à former des nodules sur la tige, en plus des nodules racinaires. Cette caractéristique est rare chez les légumineuses et a été pour la première fois rapportée en 1928 chez *Aeschynomene apsera* L. par Hagerup. La formation de nodules de tige ne concerne pas que les *Aeschynomene*, elle a également été observée chez quelques rares autres espèces de légumineuses semi-aquatiques, chez des *Papilionoideae* appartenant au genre *Discolobium*, et *Sesbania*, et chez une *Mimosoideae* du genre *Neptunia* (Boivin *et al.*, 1997; Allen et Allen, 1981). C'est au sein du genre *Aeschynomene* que cette caractéristique est la plus répandue, avec à ce jour 25 espèces rapportées comme étant capables de former des nodules de tige (Brottier *et al.*, 2018). Il a été observé chez certaines espèces (*A. afraspera* et *A. nilotica*) que cette nodulation caulinaire peut être profuse, conférant à ces plantes une capacité de fixation d'azote exceptionnelle (Figure 37) (Dreyfus et Dommergues, 1981; Alazard & Becker, 1987). Ainsi, la quantité d'azote atmosphérique fixée par certaines *Aeschynomene* peut atteindre 100 kg.ha⁻¹ (Alazard & Becker, 1987). Les *Aeschynomene* à nodules de tige ont été ainsi proposées par plusieurs ONG pour être utilisées en tant qu'engrais vert, notamment pour la culture du riz, où elles permettraient de fournir entre 25% et 35% de l'azote nécessaire à la culture (Alazard & Becker, 1987).

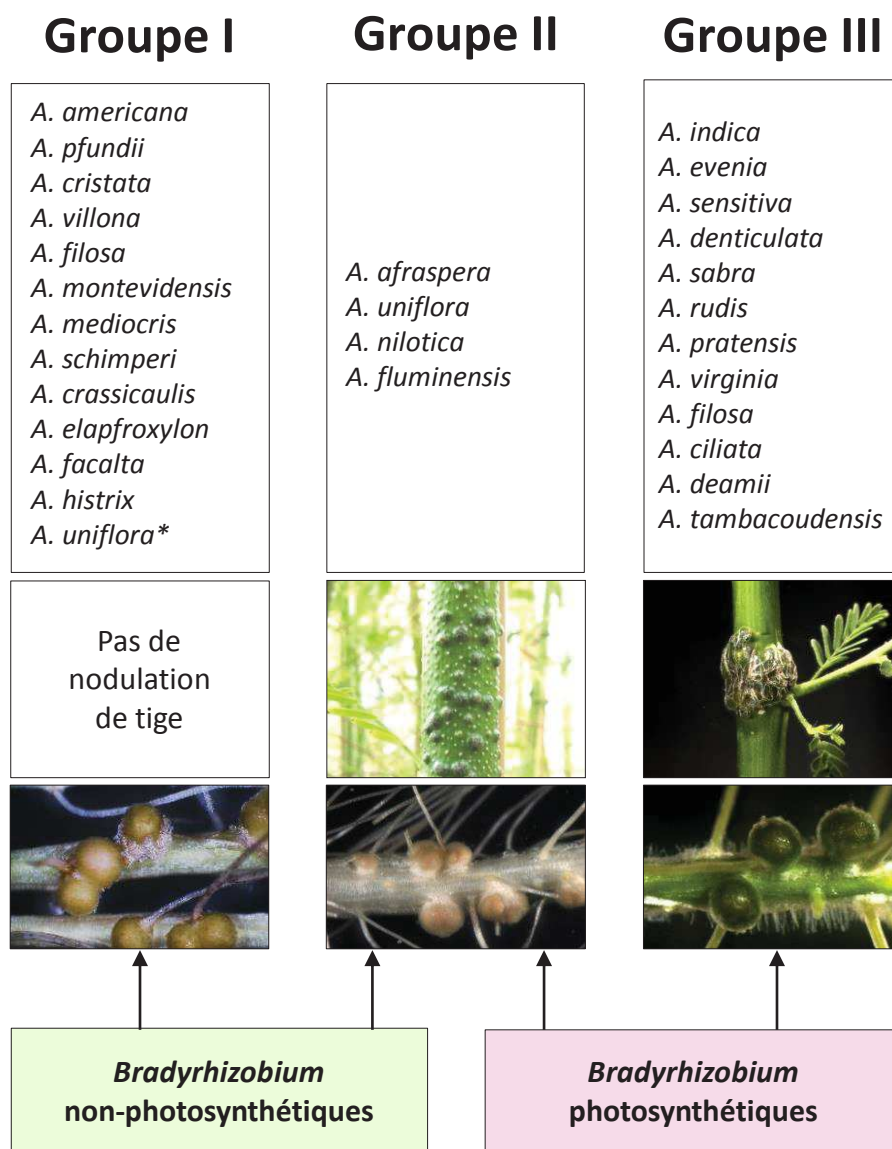


Figure 38. Les groupes d'inoculations croisées entre *Bradyrhizobium* et *Aeschynomene*

Les *Bradyrhizobium* non-photosynthétiques, telles que les souches USDA110, DOA9 ou ORS3257, peuvent former des nodules sur certaines espèces d'*Aeschynomene* des groupes I et II. Seules les *Aeschynomene* à nodules de tige du groupe II et III peuvent être nodulées par des *Bradyrhizobium* photosynthétiques. Certaines souches de *Bradyrhizobium* photosynthétiques ont un spectre d'hôte restreint aux *Aeschynomene* du groupe III, telles que S58, ORS278 ou BTAi1, alors que d'autres ont un spectre plus large qui peut s'étendre aux *Aeschynomene* du groupe II, c'est le cas de la souche ORS285. (*) *A. uniflora* représente une exception dans le groupe I puisqu'elle peut former des nodules de tige.

3.1.3. Les groupes d'inoculations croisées

L'étude du spectre d'hôtes des *Bradyrhizobium* isolés de nodules de racines et de tiges d'*Aeschynomene* a permis à Didier Alazard de définir trois groupes d'inoculations croisées (Alazard, 1985). Chacun de ces groupes correspond à un ensemble d'espèces d'*Aeschynomene* pouvant être nodulées par les mêmes souches de *Bradyrhizobium* (Figure 38).

Le premier groupe rassemble des espèces d'*Aeschynomene* à nodulation exclusivement racinaires et nodulées naturellement par des *Bradyrhizobium* non-photosynthétiques à large spectre d'hôtes. Ces mêmes souches ne sont pas restreintes à noduler *Aeschynomene* et peuvent présenter un spectre d'hôtes s'étendant à d'autres espèces de légumineuses. Pour exemple, on retrouve dans ce groupe *Aeschynomene americana*, pouvant être nodulée par la souche modèle *B. diazoefficiens* USDA110 dont l'hôte naturel est le soja *G. max* (Chaintreuil *et al.*, 2013).

Le troisième groupe d'*Aeschynomene* rassemble des espèces à nodulation de tiges et de racines ne pouvant être nodulées qu'avec certaines souches de *Bradyrhizobium* photosynthétiques, telles que ORS278 et BTAi1. A l'inverse du groupe I, les souches nodulant les *Aeschynomene* du groupe III ont un spectre d'hôtes très étroit et ne peuvent interagir qu'avec des espèces de ce même groupe. Le groupe III contient notamment les deux espèces modèles *A. evenia* et *A. indica*.

Le second groupe rassemble également des espèces d'*Aeschynomene* à nodules de tiges et de racines, dont *A. afraspera*. Ces espèces présentent un spectre d'hôtes plus large que celles du groupe III et peuvent être nodulées par des souches de *Bradyrhizobium* photosynthétiques, telle que la souche ORS285, ou par des *Bradyrhizobium* non-photosynthétiques nodulant des espèces du groupe I, telle que USDA110 (Chaintreuil *et al.*, 2013). Il est à noter que les *Bradyrhizobium* photosynthétiques isolées des espèces de ce groupe sont également capables de noduler les *Aeschynomene* du groupe III contrairement aux souches non-photosynthétiques. Il existe ainsi une corrélation très forte entre le caractère photosynthétique retrouvé chez certaines souches de *Bradyrhizobium* et leur capacité à noduler les *Aeschynomene* du groupe III.

Il a pu être montré en 2000, par Eric Giraud et ses collaborateurs que le caractère photosynthétique de certaines souches de *Bradyrhizobium* est requis pour l'établissement d'une nodulation caulinaire efficiente sur *A. sensitiva*. En effet, la mutation du photosystème d'ORS278 (mutations de certains gènes *puf*) entraîne une réduction importante de la nodulation caulinaire, ainsi que de la croissance des plantes sans pour autant affecter la nodulation racinaire. Il est supposé que la photosynthèse confère un avantage sélectif à la bactérie en condition de vie libre, où les ressources en carbone sont limitées, mais également en condition de vie symbiotique où l'énergie nécessaire à l'activité de fixation d'azote peut être apportée par l'activité photosynthétique de la

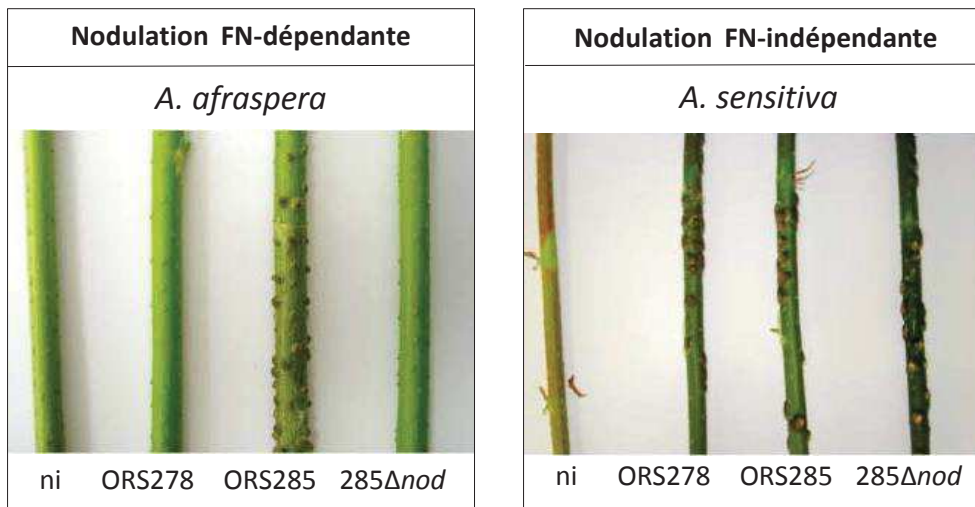


Figure 39. Au moins deux processus symbiotiques existent chez les légumineuses du genre *Aeschynomene*

A. afraspera ne peut être nodulée que via un processus dépendant des FNs par des souches de *Bradyrhizobium* qui produisent des FNs, telle qu'ORS285. Un mutant Δ *nod* perd sa capacité à noduler cette espèce. *A. sensitiva*, qui appartient au groupe d'inoculation III, est nodulée via un processus indépendant des FNs par des *Bradyrhizobium* photosynthétiques présentant (ORS285) ou pas (ORS278) des gènes *nod*. La mutation des gènes *nod* chez la souche ORS285 n'a aucun impact sur la capacité de cette souche à noduler cette espèce.

(Adapté de Giraud *et al.*, 2007)

bactérie dans les nodules de tiges limitant ainsi la contribution de la plante dans ce processus (Giraud *et al.*, 2000).

3.2. Le mécanisme symbiotique FN-indépendant entre les *Bradyrhizobium* photosynthétiques et les *Aeschynomene* du groupe III

3.2.1. La découverte du premier mécanisme symbiotique FN-indépendante

Pendant longtemps, les études menées sur tous les rhizobiums nodulant avaient conduit à l'identification systématique des gènes *nodABC* nécessaires à la synthèse du squelette carboné des facteurs Nods (FNs). Considérant le rôle essentiel des FNs dans l'induction de la nodulation (voir la partie 1.3), cela avait conduit au dogme selon lequel les interactions endosymbiotiques nodulaires entre les rhizobiums et les légumineuses ne pouvaient être initiées que par la production de FNs par la bactérie et leur reconnaissance par des récepteurs de la plante.

Les premiers travaux sur l'identification des gènes *nod* chez certaines souches de *Bradyrhizobium* photosynthétiques remontent à 2001 où Chaintreuil et ses collaborateurs caractérisent le gène *nodA* de la souche ORS285, qui nodule les *Aeschynomene* des groupes II et III. Dans la même publication, les auteurs soulignent le fait que malgré l'utilisation de nombreux couples d'amorces différents, aucun n'a permis l'amplification des gènes de nodulation *nodABC* chez les *Bradyrhizobium* photosynthétiques nodulant exclusivement les *Aeschynomene* du groupe III. En 2007, le séquençage du génome de deux de ces souches (ORS278 et BTAi1) révèle finalement qu'elles ne possèdent tout simplement pas les gènes *nodABC* nécessaires à la synthèse des FNs (Giraud *et al.*, 2007). Malgré l'absence de ces gènes de nodulation, ORS278 et BTAi1 induisent la formation de nodules de tiges et de racines parfaitement fonctionnels sur les espèces d'*Aeschynomene* du groupe III (notamment *A. sensitiva*, *A. evenia* et *A. indica*) (Figure 39). Cette découverte fut le premier exemple de l'existence d'un mécanisme symbiotique FN-indépendant.

Il est important de noter que l'absence des gènes de nodulation *nod* chez les *Bradyrhizobium* photosynthétiques n'est pas systématique, comme illustré précédemment avec la souche ORS285 (Chaintreuil *et al.*, 2001). Cette souche possède un spectre d'hôtes plus large, regroupant les espèces d'*Aeschynomene* à nodules de tiges du groupe II et du groupe III. La mutation du gène *nodB* de ORS285 lui fait perdre la capacité à noduler les *Aeschynomene* du groupe II mais n'altère pas la nodulation sur celles du groupe III (Giraud *et al.*, 2007). Ainsi, ces observations suggèrent qu'au moins deux processus symbiotiques co-existent dans le genre *Aeschynomene* : (I) un processus classique utilisant la reconnaissance des FNs, utilisé par les *Aeschynomene* du groupe I et II; (II) un processus FN-indépendant exclusivement utilisé par les *Aeschynomene* du groupe III.

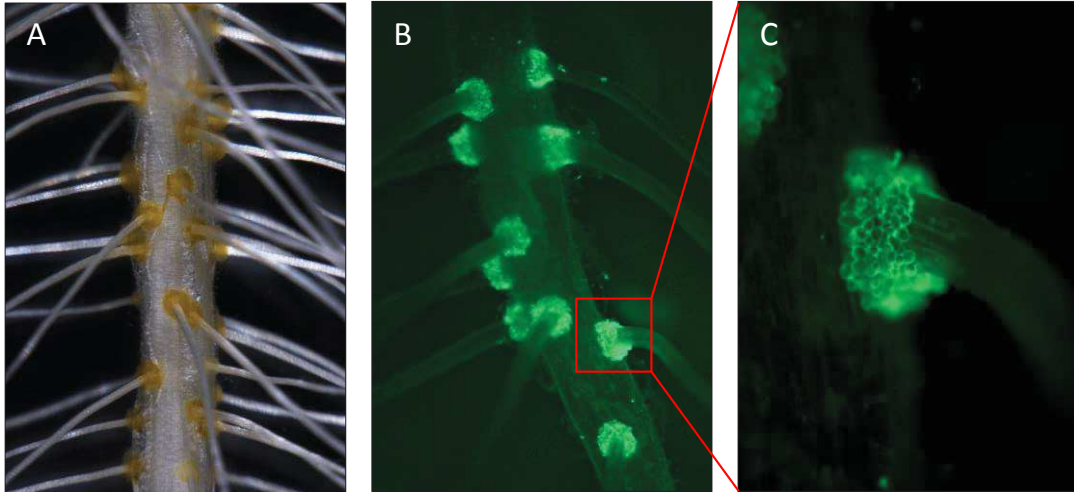


Figure 40. Observations des couronnes de poils axillaires et de leurs colonisations par ORS285 chez *A. indica*

A. Les couronnes de poils axillaires, en orange, se développent à l'aisselle des racines latérales. **B.** et **C.** L'inoculation d'une souche d'ORS285 marquée à la GFP montre que les couronnes de poils d'*A. indica* sont massivement colonisées par la bactérie. Les cracks de l'épiderme formés à l'émergence de la racine latérale constituent le point d'entrée de la plante pour la bactérie. (Adapté de Bonaldi *et al.*, 2011)

3.2.2. Organogenèse et infection des nodules racinaires chez les *Aeschynomene*

La symbiose entre les *Bradyrhizobium* et les *Aeschynomene* conduit à la formation de nodules racinaires ayant des caractéristiques particulières qui en font le troisième type nodulaire décrit chez les légumineuses, on parle de nodules de type aeshynoménoïde. Ces nodules ont une croissance déterminée et sont initiés à l'aisselle d'une racine latérale (Lavin *et al.*, 2001). Il est à noter que ce type de nodule est retrouvé chez d'autres plantes nodulantes du clade des Dalbergioïdes, dont les plantes du genre *Arachis*.

Les processus d'infection et d'organogénèse des nodules chez les *Aeschynomene* ont principalement été décrits pour la nodulation de racines chez les deux espèces *A. afraspera* (à nodulation FN-dépendante) et *A. indica* (à nodulation FN-indépendant) grâce à l'utilisation de la souche ORS285 marquée avec la GFP (pour « green fluorescent protein »). Quel que soit le processus symbiotique utilisé, la formation des nodules est rapide et ne nécessite que 5 à 6 jours depuis l'inoculation jusqu'à la formation d'un nodule fonctionnel. Le paragraphe suivant apporte un résumé de ces mécanismes, décrits en détails dans la publication de Bonaldi et ses collaborateurs (2011). Bien que le processus diffère par la nécessité ou pas d'une signalisation initiée par les FNs, les processus d'infection et d'organogénèse nodulaire chez *A. afraspera* et *A. indica* demeurent très similaires. Il existe néanmoins beaucoup de variations par rapport au processus précédemment décrit chez les légumineuses modèles (voir la partie 1.2).

Tout d'abord, le processus d'infection chez les *Aeschynomene* ne passe pas par la formation d'un cordon au niveau des poils absorbants mais par une colonisation des poils axillaires disposés en couronne autour des racines latérales. Cette couronne joue probablement un rôle d'attraction et elle est d'ailleurs massivement colonisée en surface par la bactérie chez *A. indica* (Figure 40). L'infection passe par une progression des bactéries dans les espaces intercellulaires entre les poils axillaires jusqu'à la zone de fissure ou « crack » formée par l'émergence de la racine latérale. Ce mécanisme d'infection initié intercellulairement, dit par « crack entry », est estimé être partagé par près de 25% des légumineuses tropicales dont l'arachide (Sprent, 1989; Boogerd et Van Rossum, 1997). Une fois dans la zone corticale sub-épidermale, l'internalisation des bactéries dans les cellules se fait par une invagination locale de la paroi végétale selon un processus similaire à une endocytose. De manière intéressante, la première cellule infectée montre tous les signes d'une mort cellulaire comparable à une réaction hypersensible (HR). Sous la pression de turgescence exercée par les cellules voisines, cette dernière se collapse et forme des diverticules qui transportent les bactéries plus profondément dans le cortex. Une seconde invagination permet l'entrée des bactéries dans les cellules voisines, lesquelles commencent alors leurs divisions successives. Ces cellules sont à l'origine de toutes les cellules du tissu infectieux du futur nodule, on parle alors de cellules fondatrices. Les nodules de type

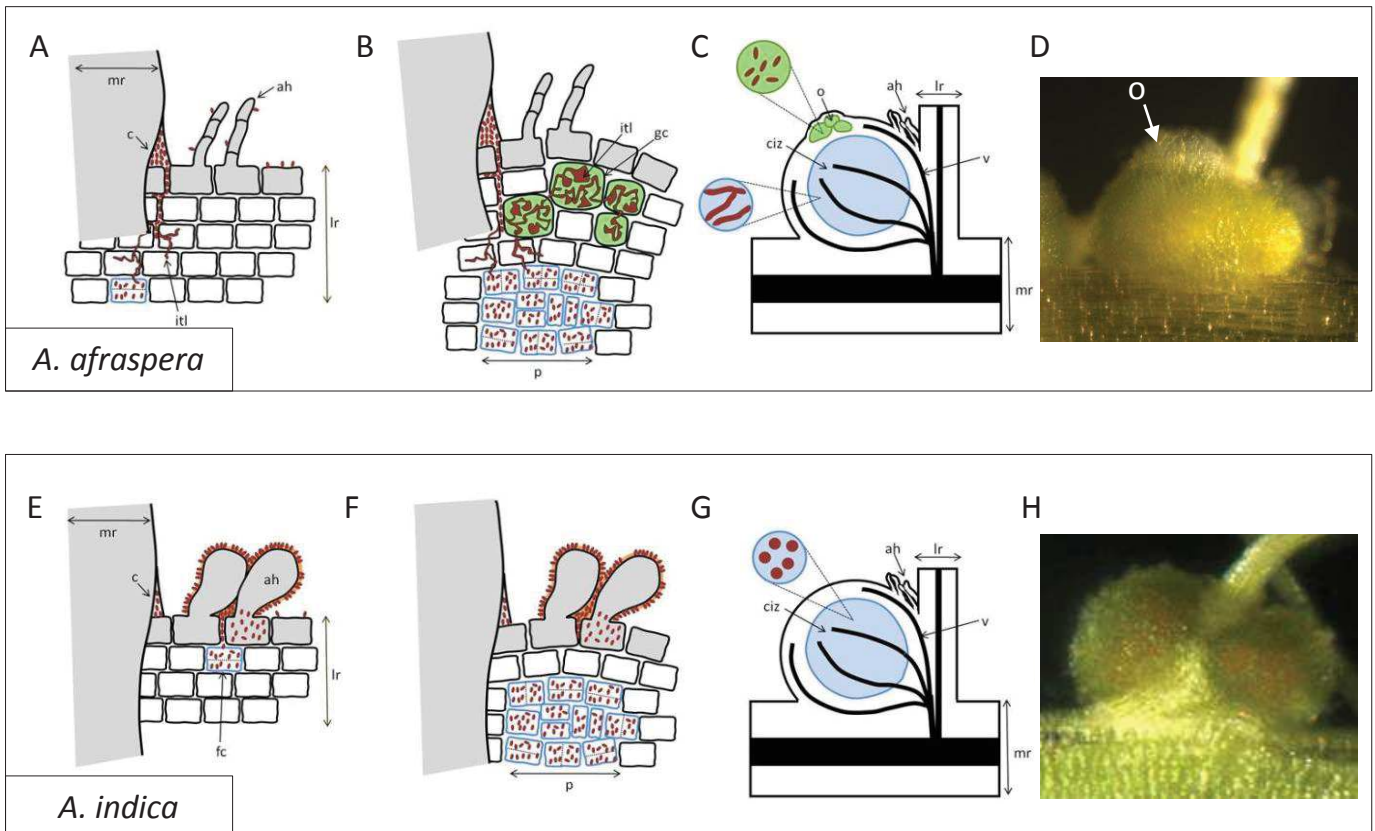


Figure 41. Comparaison du processus d'infection et d'organogénèse nodulaire chez *A. afraspera* (A à D) et chez *A. indica* (E à H) en interaction avec ORS285

A et E. L'infection d'*A. afraspera* débute par une progression des bactéries dans l'espace intercellulaire depuis une zone de « crack » formée à l'émergence des racines latérales (**A**). Chez *A. indica*, la colonisation de la couronne de poils est la première étape avant l'infection intercellulaire (**E**). **B et F.** L'infection des premières cellules est concomitante avec la reprise des divisions cellulaires dans le cortex interne chez *A. afraspera* (**B**) et externe chez *A. indica* (**F**). Chez *A. afraspera*, le cortex externe est colonisé par des bactéries contenues dans des tubulures formées à l'intérieur de cellules géantes (en vertes) (**B**). **C, D, G, et H.** Les nodules racinaires induits sont de type aeschynomenoïde et à la différence d'*A. indica* (**G et H**), les nodules d'*A. afraspera* possèdent une excroissance (en verte) contenant des bactéries indifférenciées dans les tubulures (**C et D**). Le processus de différenciation conduit à la formation de bactéroïdes sphériques chez *A. indica* (**G**) et allongés chez *A. afraspera* (**C**). racine principale; lr, racine latérale; c, crack; ah, poil racinaire; p, primordium; fc, cellules fondatrices; gc, cellules géantes; o, excroissance nodulaire; itl, tubulures similaires aux cordons d'infection; v, vascularisation; ciz, zone centrale infectée; les cellules épidermiques sont en gris et corticales en blanc.

(Adapté de Bonaldi *et al.*, 2011)

aeschynomenoïde sont sphériques et à croissance déterminée et puisque le tissu infectieux dérive d'une ou de quelques cellules précédemment infectées par la bactérie, la quasi-totalité des cellules du tissu central du nodule est infectée (Figure 41) (Bonaldi *et al.*, 2011). Les processus d'infection et d'organogénèse nodulaire chez les *Aeschynomene* apparaissent ainsi beaucoup moins complexes que ceux décrits chez les légumineuses modèles car ils n'impliquent pas la formation d'un cordon d'infection et le nodule peut résulter de la division successive d'une seule cellule corticale initialement infectée.

Il est à noter que des différences subtiles dans le processus d'infection ont été relevées entre *A. indica* et *A. afraspera* (Bonaldi *et al.* 2011). Chez *A. indica*, comme chez toutes les *Aeschynomene* du groupe III observées (E Giraud, communication personnelle), les poils axillaires entourant l'émergence des racines secondaires sont petits et profus alors qu'ils sont beaucoup plus longs et épars dans le cas d'*A. afraspera*. Ces poils axillaires sont recouverts d'un mucilage épais chez les *Aeschynomene* du groupe III et semblent jouer un rôle chimio-attractant ou stimulateur de la croissance bactérienne, on observe ainsi à leur niveau une forte population microbienne qui n'est pas retrouvée dans le cas d'*A. afraspera*. Une deuxième différence se situe au niveau de la première cellule infectée qui se trouve dans le cortex externe chez *A. indica* alors qu'elle est située plus profondément chez *A. afraspera*. Une autre différence entre les deux plantes est la présence d'un tissu infecté supplémentaire formant une excroissance à la surface de la majorité des nodules chez *A. afraspera* (Figure 41). A l'intérieur de ce tissu, les cellules végétales sont de très grande taille et les bactéries sont emprisonnées au sein de tubulures qui ressemblent à un cordon d'infection, mais qui ne dépassent pas les limites de la cellule. Ce tissu se forme au cours de la progression des bactéries dans l'espace intercellulaire et son rôle est encore incertain. Des analyses cytologiques ont montré qu'à la différence des bactéries contenues dans les cellules du tissu infectieux central, les bactéries des tubulures ne sont pas différenciées en bactéroïde et ont le même aspect que les bactéries en vie libre (Bonaldi *et al.*, 2011). Comme certains rhizobiums sont connus pour perdre leur viabilité après l'étape de différenciation (Gresshoff *et al.*, 1977; McRae *et al.*, 1989), ce tissu pourrait constituer un réservoir de bactéries viables capables de réinfecter la plante après senescence des nodules (Bonaldi *et al.*, 2011). En 2016, une étude menée sur le système de sécrétion de type III de la souche ORS285 a montré que l'induction de ce tissu dépend probablement de la sécrétion d'effecteurs de type III (Okazaki *et al.*, 2016, Annexe 1).

3.2.3. La différenciation en bactéroïde chez les *Aeschynomene*

Tout comme chez les légumineuses du clade des IRLC, auquel appartient *Medicago truncatula*, l'infection des bactéries dans les nodules d'*Aeschynomene* est suivie d'une étape de

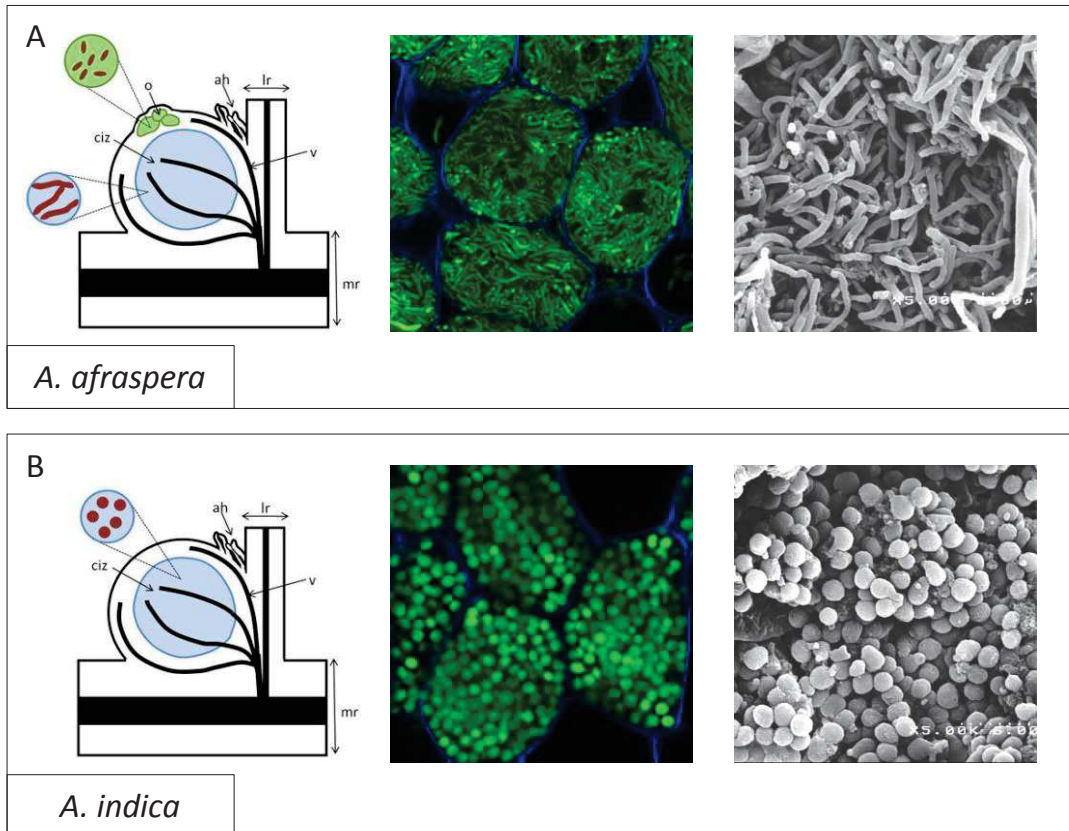


Figure 42. La morphologie des bactéroïdes d'ORS285 varie en fonction de la plante hôte

Les observations au microscope confocal (au centre) et au microscope électronique à transmission (à droite) des cellules du tissu infectieux des nodules permettent de distinguer deux morphologies différentes de bactéroïdes de la souche marquée ORS285-GFP. Chez *A. afraspera*, les bactéroïdes sont de type E allongés (A) alors qu'ils sont de type S sphériques chez *A. indica* (B).

(Adapté de Bonaldi *et al.*, 2011)

différenciation terminale en bactéroïde. A l'exception de bactéries contenues dans les tubulures de l'excroissance des nodules d'*A. afraspera*, les bactéries dans les cellules du tissu infectieux subissent toutes une différenciation terminale. En fonction de la plante hôte, les bactéroïdes présentent différentes morphologies (Bonaldi *et al.*, 2011). Chez les *Aeschynomene* des groupes I et II, à nodulation FN-dépendante comme *A. americana* et *A. afraspera*, les bactéroïdes sont de type E (pour « elongated », allongés) et montrent un niveau d'endoréplication pouvant aller jusqu'à 7C, c.-à-d sept copies du chromosome bactérien (Czernic *et al.*, 2015). Chez les espèces du groupe III, à nodulation FN-indépendante telles que *A. indica* et *A. evenia*, les bactéroïdes sont de type S (pour « spherical », arrondis) et leur niveau d'endoréplication est plus important, jusqu'à 16C (Figure 42). Une étude récente comparant l'efficacité de la fixation d'azote de ces deux types de bactéroïdes observés chez différentes espèces d'*Aeschynomene* suggère que les bactéroïdes de type S ont une performance symbiotique supérieure à celle des bactéroïdes de type E (Lamouche *et al.*, 2018).

De la même manière que chez *M. truncatula*, la différenciation en bactéroïde de type E et S chez les *Aeschynomene* est dépendante de la synthèse de peptides antimicrobiens ressemblant aux NCRs des IRLC. Une caractérisation des NCRs-like produits par les *Aeschynomene* a montré qu'ils sont majoritairement anioniques et phylogénétiquement distincts de ceux retrouvés chez *Medicago*, ce qui suggère une convergence évolutive des mécanismes de différenciation chez les légumineuses appartenant aux clades IRLC et des Dalbergioïdes (Czernic *et al.*, 2015). L'implication des NCRs-like dans la différenciation en bactéroïde chez les *Aeschynomene* a été testée par mutation du gène *DNF1* par RNAi (ARN-interférence). Ce gène assure la synthèse d'une enzyme impliquée dans le clivage du peptide signal des NCRs. Ce clivage est indispensable pour assurer l'adressage des NCRs à la membrane du symbiosome. Les bactéroïdes formés dans les nodules des lignées RNAi-*dnf1* chez *A. evenia* présentent un défaut de différenciation morphologique (Czernic *et al.*, 2015).

Du côté bactérien, des analyses *in silico* menées sur ORS285 et ORS278 ont permis l'identification du gène *bclA* (pour « bacA-like »), présentant une homologie faible avec *bacA* des *Ensifer* qui est impliqué dans la différenciation en bactéroïde chez *Medicago* (voir la partie 1.2.3). Comme *bacA*, le gène *bclA* code pour un transporteur ABC dont la mutation chez ORS285 et ORS278 perturbe l'étape de différenciation en bactéroïde chez *A. evenia* (Guefrachi *et al.*, 2015). De plus, *bclA* peut compléter le rôle de son homologue *bacA* chez une souche *E. meliloti* mutée. Comme pour les NCRs entre *Aeschynomene* et *Medicago*, l'homologie faible qui existe entre *bacA* et *bclA* laisse supposer que leur fonction résulte également d'une convergence évolutive plutôt que de l'acquisition d'un caractère ancestral (Guefrachi *et al.*, 2015).

L'ensemble de ces résultats permet de confirmer que les mécanismes de différenciation en bactéroïde chez les *Aeschynomene* sont comparables à ceux déjà décrits chez les légumineuses du clade IRLC.

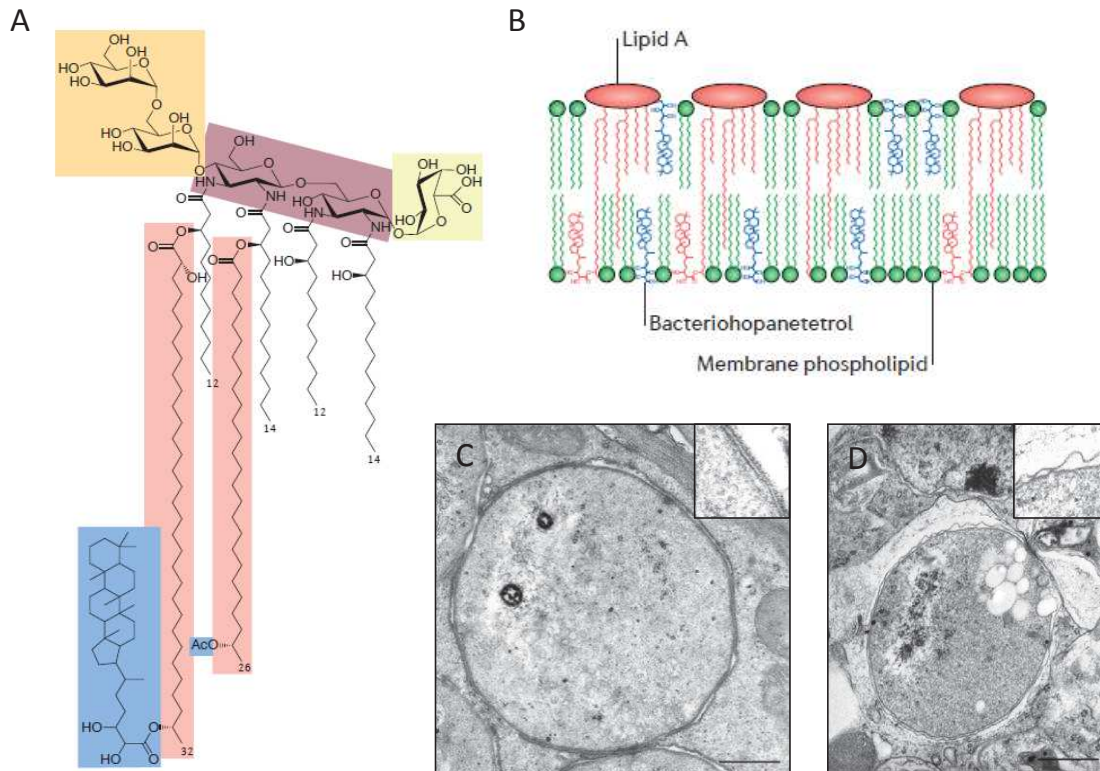


Figure 43. Structure et rôles des hopanoïdes de BTai1 en interaction avec *A. evenia*

A. Chez les *Bradyrhizobium*, les molécules d'hopanoïdes (en bleu) sont liées de manière covalente aux très longues chaînes d'acides gras (VLCFA, en rouge) du lipide A. On parle de molécules HoLA (pour « hopanoïd-lipidA »). Le lipide A est constitué d'un résidu d'acide galacturonique (en jaune) et d'un squelette polysaccharidique de 2,3-diaminoglucose (en violet) et de α -(1, 6)-mannose (en orange). **B.** La présence de molécules d'hopanoïdes liées aux VLCFAs confère aux membranes des *Bradyrhizobium* une grande rigidité. Les VLCFAs peuvent traverser les deux feuilletts membranaires, augmentant ainsi leur stabilité. **C** et **D.** Un mutant BTai1 Δ shc, affecté dans la voie de biosynthèse des hopanoïdes, est sévèrement affecté en condition de vie libre et symbiotique. Les observations au microscope électronique à transmission montrent une perte de l'intégrité membranaire du mutant BTai1 Δ shc (**D**) caractérisée par une séparation des deux membranes de l'enveloppe bactérienne qui n'est pas observée chez la souche sauvage (**C**).

(Adapté de Silipo *et al.*, 2014 et Belin *et al.*, 2018)

3.2.4. Adaptation des *Bradyrhizobium* à la vie libre et symbiotique : la composition de l'enveloppe bactérienne joue un rôle essentiel dans la résistance aux stress biotiques et abiotiques

L'espace pér bactéroidien, entre la membrane du symbiosome et l'enveloppe du bactéroïde, est un environnement drastiquement différent de celui rencontré par la bactérie en condition de vie libre. La bactérie doit faire face à des conditions environnementales particulièrement agressives, souvent nécessaire pour une fixation d'azote efficace, comme un pH acide qui permet de fournir des protons pour l'activité nitrogénase (Pierre *et al.*, 2013). D'autres stress résultent d'un contrôle de la bactérie par la plante hôte, comme la sécrétion de peptides antimicrobiens NCRs utilisés pour la différenciation en bactéroïde (Kondorosi *et al.*, 2013). L'espace pér bactéroidien contient également de nombreuses enzymes lytiques, normalement retrouvées dans les vacuoles des cellules végétales (Coba de la Pena *et al.*, 2018). L'enveloppe membranaire de la bactérie constitue la première barrière pour faire face à ces stress biotiques. Elle joue un rôle essentiel dans le processus d'adaptation à la vie symbiotique.

L'enveloppe membranaire des *Bradyrhizobium* présente de nombreuses particularités qui contribuent à l'adaptation de la bactérie à la vie dans les nodules. Tout d'abord, et à la différence de la majorité des autres rhizobiums, des molécules d'hopanoïdes sont retrouvées au sein des membranes de l'ensemble des souches de *Bradyrhizobium*. Certaines, de façon inédite, sont liées à l'une des très longues chaînes d'acides gras (VLCFA) présente sur le lipide A du LPS de ces bactéries (Kannenberg *et al.*, 1996) (Figure 43). Les hopanoïdes ont la même fonction que le cholestérol chez les cellules eucaryotes et forment une classe de lipides membranaires qui jouent un rôle important dans la rigidité et la stabilité des membranes (Belin *et al.*, 2018). La mutation d'un gène clé (*shc*), impliqué dans la synthèse des hopanoïdes chez la souche BTAi1 (BTAi1 Δ *shc*), ne perturbe pas l'induction nodulaire sur *A. evenia* mais altère sévèrement l'intégrité de la bactérie dans les symbiosomes des nodules qui sénescent alors prématurément (Silipo *et al.*, 2014). L'observation des bactéroïdes du mutant BTAi1 Δ *shc* au microscope électronique à transmission met en évidence une perte d'intégrité de l'enveloppe bactérienne parfois associée à une rupture de la membrane bactéroidienne (Silipo *et al.*, 2014) (Figure 43). De plus, des tests de résistances à différents stress abiotiques (H₂O₂, NaCl et SDS) ont montré que le mutant BTAi1 Δ *shc* est plus sensible que la souche sauvage. Ces observations démontrent que les hopanoïdes jouent un rôle essentiel dans la résistance aux stress biotiques et abiotiques et contribuent au maintien d'une infection chronique des *Bradyrhizobium* au sein des nodules. Il est ainsi proposé que les hopanoïdes constituent un élément clé du succès écologique des *Bradyrhizobium* (Belin *et al.*, 2018).

Des conclusions similaires ont été énoncées quant aux rôles des VLCFAs et des peptidoglycanes de l'enveloppe membranaire chez ORS278. En effet, l'étude des propriétés symbiotiques d'un mutant affecté dans le greffage de l'une des deux VLCFAs sur le lipide A des LPS montre une altération du maintien des bactéroïdes dans les nodules d'*A. evenia* et d'*A. indica* (Busset *et al.*, 2017). De la même manière, la mutation d'une enzyme de modification des peptidoglycanes, une DD-carboxypeptidase, conduit à la formation de bactéroïdes hypertrophiés et à l'induction de nodules nécrotiques (Gully *et al.*, 2016).

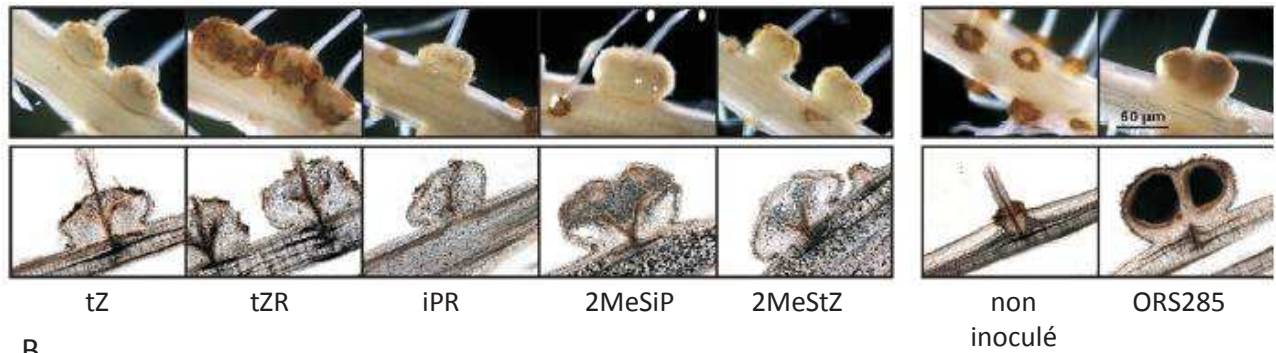
Tout comme les hopanoïdes, les VLCFAs et les peptidoglycanes jouent un rôle important dans le maintien de l'intégrité des membranes bactériennes en vie libre mais également en vie symbiotique.

3.3. Les bases moléculaires de l'interaction entre les *Bradyrhizobium* photosynthétiques et les *Aeschynomene* : à la recherche du signal « non-Nod »

3.3.1. La production de cytokinines par la bactérie contribue à l'organogenèse nodulaire

La découverte du processus symbiotique FN-indépendant chez les *Aeschynomene* a soulevé de nombreuses questions quant à la nature du signal bactérien permettant son déclenchement. Rapidement après la découverte de ce nouveau mécanisme symbiotique, l'équipe MSLT du LSTM s'est lancée à la recherche des gènes bactériens impliqués dans la synthèse de ce signal dit « non-Nod », considérant l'absence de gènes *nod* canoniques chez ces bactéries. Pour cela, une approche sans *a priori* a été utilisée et une banque de mutants Tn5 aléatoires de la souche ORS278 a été criblée sur *A. sensitiva* et *A. indica* (Giraud *et al.*, 2007; Bonaldi *et al.*, 2010). Au total, ce sont plus de 25 000 mutants qui ont été testés sur plante et près de 300 d'entre eux ont montré un phénotype allant d'une altération sévère du développement nodulaire (mutants Ndv-) à une déficience de l'activité fixatrice d'azote des nodules (mutants Fix-) (Giraud *et al.* 2007; Bonaldi *et al.*, 2010). Cependant, ce criblage n'a pas permis l'identification d'un mutant Nod- strict comparable à la mutation des gènes *nod* chez les autres rhizobiums et pour expliquer cela, plusieurs hypothèses ont été proposées : (I) l'existence d'une redondance fonctionnelle du ou des gènes impliqués dans la synthèse du signal « non-Nod » ou encore l'existence de multiples signaux redondants « non-Nod »; (II) la possibilité que les gènes impliqués dans la production du signal « non-Nod » sont indispensables à la survie de la bactérie ou bien; (III) que la mutagenèse n'a pas été saturante et que les gènes essentiels à la synthèse du signal « non-Nod » n'ont tout simplement pas été mutés (Bonaldi *et al.*, 2010).

A



B

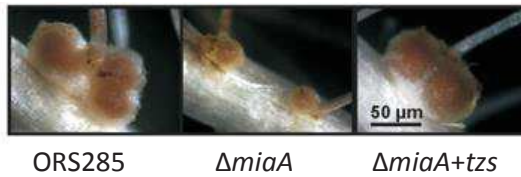


Figure 44. La synthèse de cytokinines par ORS285 contribue à l'interaction symbiotique avec *A. indica*
A. L'application de différentes molécules de cytokinines est suffisante pour induire des pseudo-nodules chez *A. indica*. tZ, *trans*-zeatin; tZR, *trans*-zeatin riboside; iPR, N6-isopentenyladenine riboside; 2MeSiP, 2-methylthiol N6-isopentenyladenine; 2MeStZ, 2-methylthiol *trans*-zeatin. **B.** La mutation du gène *miaA* ($\Delta miaA$) chez ORS285 perturbe la croissance des nodules. Ce phénotype peut être complémenté après l'ajout exogène de cytokinines (*tzs*).
(Adapté de Podlešáková *et al.*, 2013)

Malgré tout, l'analyse des mutants Ndv- a montré que 50% d'entre eux étaient affectés dans la voie de biosynthèse des purines (Giraud *et al.*, 2007; Bonaldi *et al.*, 2010), dont l'adénosine monophosphate (AMP) est un précurseur de la synthèse des cytokinines, une des hormones impliquées dans le développement des plantes. Considérant que l'ajout exogène de cytokinines est suffisant pour déclencher l'induction de pseudonodules chez certaines légumineuses (voir la partie 1.3.5), il a rapidement été proposé que la sécrétion de cytokinines par les *Bradyrhizobium* photosynthétiques puisse constituer un signal clé pour l'induction des nodules chez les *Aeschynomene* du groupe III. Partant de cette hypothèse, il a été démontré que la souche ORS285 produit et secrète un large spectre de cytokinines suffisantes, en l'absence de la bactérie, pour induire des pseudonodules sur les racines *A. indica* précisément au point d'émergence des racines secondaires, là où la nodulation se met normalement en place (Podlešáková *et al.*, 2013) (Figure 44). Chez ORS285, la synthèse de cytokinines passe majoritairement par la dégradation des ARNs de transferts (ARNt) modifiés par ajout d'un groupement isopentenyl- par l'enzyme MiaA (une ARNt isopentenyl-transferase). La mutation du gène *miaA* chez ORS285 réduit drastiquement la synthèse de cytokines. Cependant, l'inoculation de la souche mutante ORS285 Δ *miaA* provoque seulement un léger retard de nodulation et l'induction de nodules plus petits (Podlešáková *et al.*, 2013) (Figure 44). Ces analyses démontrent que les cytokines produites par les *Bradyrhizobium* photosynthétiques contribuent positivement au développement nodulaire mais ne représentent pas la molécule clé à l'origine du signal « non-Nod ». Aujourd'hui et malgré le développement de nombreuses approches moléculaires, le(s) molécule(s) signal(s) « non-Nod » synthétisées par les *Bradyrhizobium* photosynthétiques demeurent toujours inconnues.

3.3.2. Le processus symbiotique FN-indépendant recrute la voie symbiotique commune

L'étude du processus symbiotique FN-indépendant a principalement été menée sur l'espèce *A. evenia*. La taille raisonnable de son génome (environ 380 Mpb), ainsi que son caractère diploïde homozygote en fait un modèle idéal pour mener des analyses génétiques (Arrighi *et al.*, 2012; Chaintreuil *et al.*, 2016). Considérant l'importance et la conservation de la voie symbiotique commune (la CSSP) dans les processus de nodulation FN-dépendant et de mycorhization, il a rapidement été suggéré que les *Aeschynomene* utilisent également la CSSP pour l'induction de nodules indépendamment des FNs (Fabre *et al.*, 2015). Pour tester cette hypothèse, une analyse fonctionnelle des orthologues de trois gènes clés de la CSSP a été réalisée chez *A. evenia*. Par des approches de RNAi, les expressions des gènes *AeSYMRK*, *AeCCaMK* et *AeLHK1* ont été éteintes ou drastiquement réduites et l'inoculation de ces lignées RNAi avec la souche ORS278 montre une

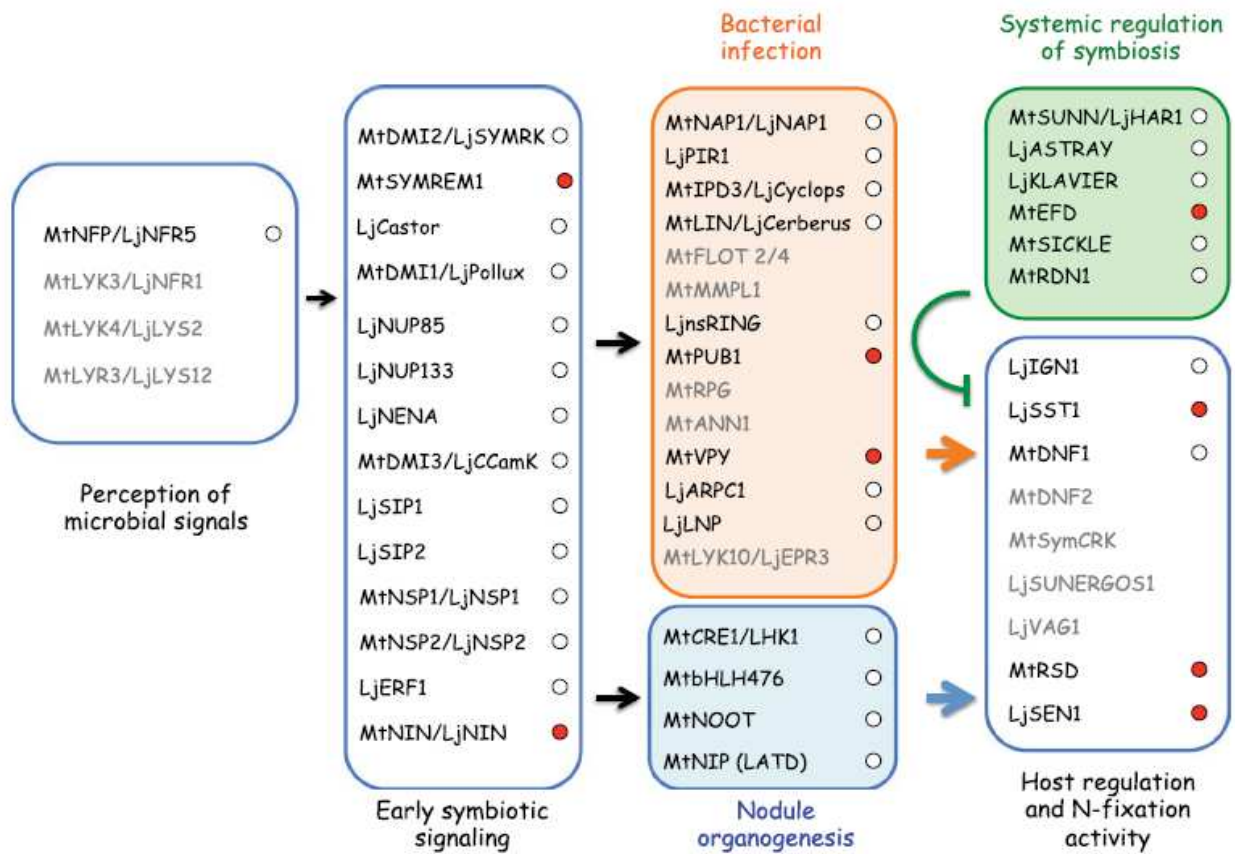


Figure 45. Représentation schématique de la cascade de gènes symbiotiques identifiés chez *M. truncatula* / *L. japonicus* et conservés chez *A. evenia*

Les gènes conservés dont des transcripts ont été détectés chez *A. evenia* sont en noirs et ceux dont aucun transcript n'a été détecté sont en gris. La régulation transcriptomique des gènes durant le processus symbiotique chez *A. evenia* est indiquée par des cercles : blancs pour une expression constitutive, et rouges pour une surexpression.

(Gully *et al.*, 2018)

réduction significative du nombre de nodules induits. Ces résultats ont permis de confirmer le recrutement de la CSSP dans le déclenchement de la nodulation FN-indépendant (Fabre *et al.*, 2015).

Récemment, des analyses transcriptomiques d'*A. evenia* en réponse à l'inoculation d'ORS278 ont été réalisées à différents pas de temps après inoculation. Ces analyses ont permis l'identification d'orthologues pour 39 gènes symbiotiques identifiés chez les deux légumineuses modèles *M. truncatula* et *L. japonicus* (Gully *et al.*, 2018). Parmi eux, 8 gènes sont surexprimés durant le processus symbiotique chez *A. evenia* (Figure 45). De plus, et comme chez les légumineuses modèles, de nombreux gènes impliqués dans le déclenchement des mécanismes immunitaires sont réprimés dans les premières étapes de l'interaction chez *A. evenia*. A l'inverse, plus de 80 gènes codant pour des peptides NCRs-like sont surexprimés dans les étapes tardives du processus symbiotique (Gully *et al.*, 2018). Ces analyses transcriptomiques ont également mis en évidence que 13 gènes clés de la symbiose conventionnelle FN-dépendante ne sont pas retrouvés exprimés (Figure 45). De manière cohérente, 9 de ces 13 gènes (*NFR1*, *LYS2*, *LYS12*, *EPR3*, *MtFLOT2*, *MtFLOT4*, *MtMMPL1*, *MtRPG*, *MtANN1*) sont impliqués dans des étapes qui n'ont pas lieu dans le modèle *Bradyrhizobium / Aeschynomene*, à savoir la reconnaissance des FNs et la formation et l'élongation du cordon d'infection (Gully *et al.*, 2018). Le séquençage du génome d'*A. evenia* (en cours de publication) a, par ailleurs, montré que sur les 13 gènes qui n'ont pas été retrouvés exprimés, 9 sont tout simplement absents du génome d'*A. evenia* (*MtFLOT2*, *MtFLOT4* ; *MtRPG*, *MtANN1*, *EPR3*, *MtDNF2*, *MtSYMCRK* ; *SUNERGOS1*, *VAG1*) (JF Arrighi, communication personnelle).

Considérant l'absence des gènes *nodABC* chez ORS278, on peut supposer que les étapes en amont de la CSSP chez *A. evenia* sont différentes de ce qui a été décrit chez les légumineuses modèles dans le cadre de la symbiose FN-dépendante. Le séquençage du génome d'*A. evenia* a mis en évidence la présence d'orthologues des deux récepteurs des FNs, *NFR5* (*MtNFP*) et *NFR1* (*MtLYK3*) (Gully *et al.*, 2018; JF Arrighi, communication personnelle). Cependant, l'étude transcriptomique menée par Gully et ses collaborateurs (2018) a démontré que seul l'orthologue de *NFR5* est exprimé chez la plante. Le fait qu'un orthologue de *NFR1* soit retrouvé présent dans le génome, mais non exprimé, va bien dans le sens que la perception des FNs n'est pas impliquée dans la mise en place de ce processus symbiotique. Quant à l'expression observée de l'orthologue *NFR5*, cela semble également cohérent étant donné qu'un orthologue de ce récepteur chez *Solanum lycopersicum* (*SILYK10*) est impliqué dans le processus de mycorhization et que les *Aeschynomene* sont également capables d'être mycorhizées (Buendia *et al.*, 2016; F Cartieaux, communication personnelle).

L'ensemble de ces analyses a confirmé que le processus symbiotique FN-indépendant utilise la CSSP et de nombreux autres gènes connus pour être impliqués dans le processus symbiotique FN-dépendant chez les légumineuses modèles. Elles ont également permis l'identification de gènes spécifiques d'*A. evenia* induits dans les premières phases de la symbiose. Ces gènes sont aujourd'hui

en cours d'étude pour essayer de développer un bioassay qui pourrait être utilisé comme marqueur pour la recherche de la molécule signal « non-Nod » produite par la bactérie, à l'instar d'*ENOD11* qui a été utilisé pour caractériser les facteurs Myc-LCOs (Maillet *et al.*, 2011).

3.3.3. Le développement d'une collection de mutants de nodulation : vers l'identification de nouveaux gènes symbiotiques chez *A. evenia*

Afin d'aller plus loin dans la dissection génétique des mécanismes symbiotiques mis en jeu au cours de la nodulation FN-indépendante, une approche de mutagenèse aléatoire par EMS (pour « ethyl methane sulfonate ») a été appliquée sur *A. evenia*. Ce type d'approche a été utilisée avec succès chez les légumineuses modèles *M. truncatula*, *L. japonicus* et *G. max* et a conduit à l'identification d'une grande partie des gènes de la CSSP ainsi que des récepteurs aux FNs (Szczyglowski *et al.*, 1998; Catoira *et al.*, 2000; Cooper *et al.*, 2008; Tagdege *et al.*, 2009). Ce projet, porté par Jean-François Arrighi et débuté à la fin de l'année 2014, a conduit au criblage en serre de 67 000 plantes de génération M2 pour isoler des mutants EMS altérés dans la nodulation. Au final, 260 mutants de nodulation ont été sélectionnés, répartis dans plusieurs grandes catégories phénotypiques : 51% sont Nod- (absence de nodule), 17% forment des petits nodules nécrotiques indiquant l'induction de réactions de défense, 28% sont Fix- (nodules non fixateurs) et les 4% restants sont Nod++ (phénotype hyper-nodulant) ou présentent des altérations du système racinaire. En parallèle à ce criblage, comme précédemment indiqué, le séquençage *de novo* en PacBio du génome d'*A. evenia* a été réalisé en collaboration avec C. Klopp, P. Leleu et L. Lamy sur la plateforme Bioinfo Génotoul de Toulouse. Ce génome de référence est utilisé pour déterminer la nature des gènes dont la mutation est responsable des phénotypes symbiotiques observés (JF Arrighi, communication personnelle).

Pour le moment, seuls les mutants Nod- sont en cours d'analyse et deux approches différentes ont été utilisées pour l'identification des gènes mutés : (I) une approche avec *a priori* par « Targeted Sequence Capture » qui permettra d'identifier les gènes connus et de distinguer ceux correspondant à des nouveaux gènes; (II) une approche sans *a priori* de re-séquençage dite de Mapping-by-Sequencing pour l'identification des SNPs responsables du phénotype observé. Ce travail est actuellement en cours dans l'équipe et entre dans le cadre du travail de thèse de Johan Quilbe (J Quilbe et JF Arrighi, communication personnelle).

Porté à terme, ce travail devrait permettre l'identification de nouveaux gènes symbiotiques et de progresser dans notre compréhension de la mise en place du mécanisme de nodulation FN-indépendant entre les *Bradyrhizobium* photosynthétiques et les *Aeschynomene* du groupe III.

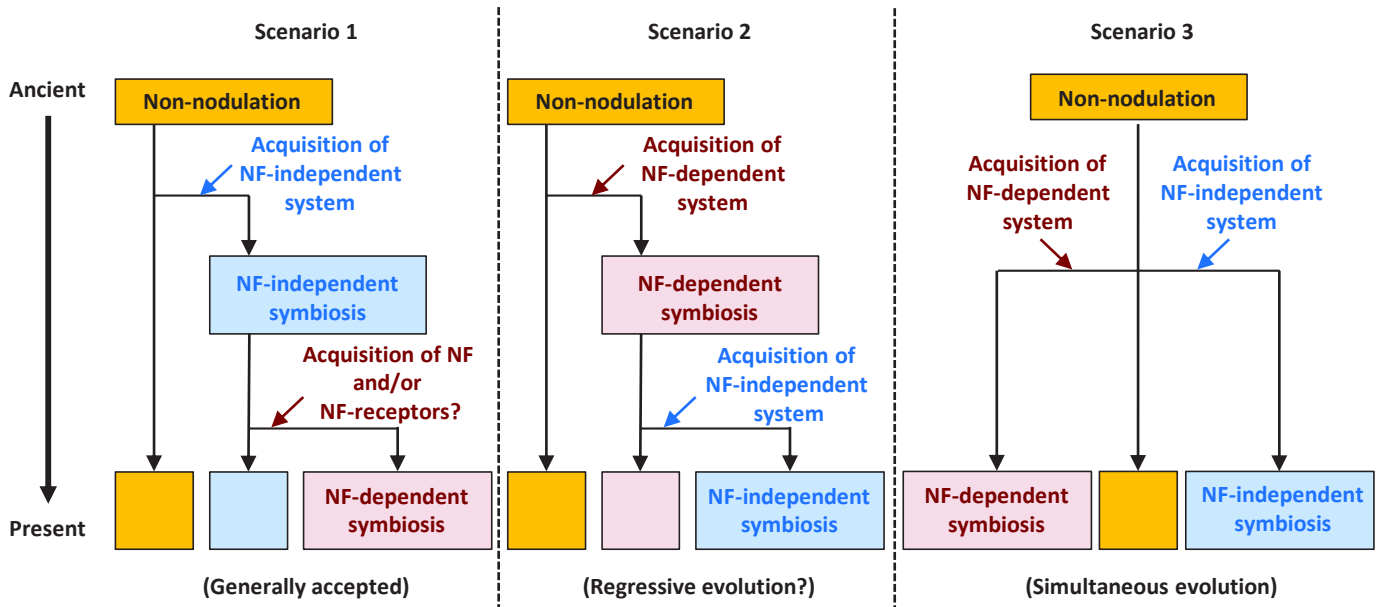


Figure 46. Trois scénarios possibles de l'émergence de la symbiose FN-indépendante

Les couleurs bleu et rouge correspondent respectivement aux processus symbiotiques FN-indépendant et FN-dépendant.

(Okubo *et al.*, 2012)

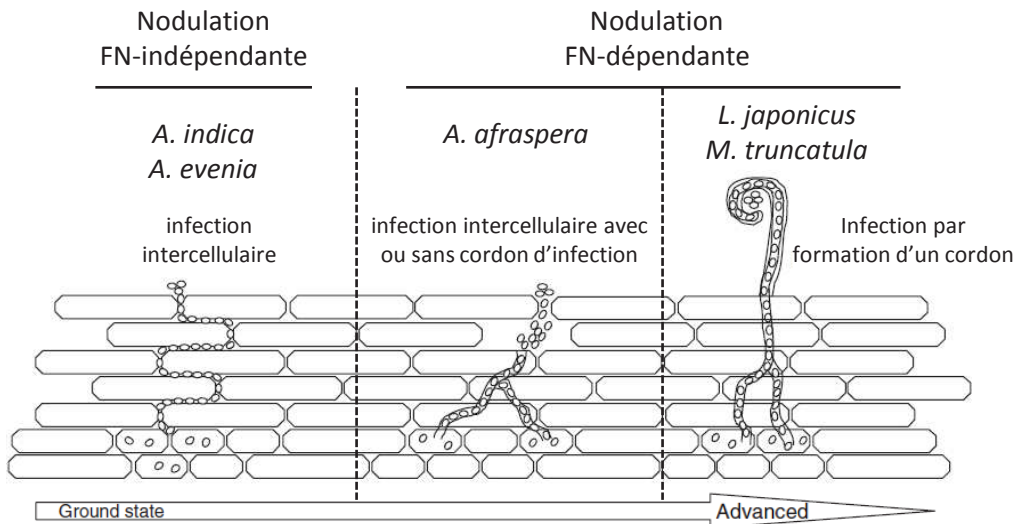


Figure 47. Modèle évolutif de la nodulation des légumineuses au cours du processus symbiotique

Il a été proposé par Madsen et ses collaborateurs (2010) que le processus d'infection intercellulaire n'impliquant pas une signalisation FN-dépendante représenterait un mécanisme symbiotique ancestral. Ce mécanisme serait conservé chez certaines légumineuses du genre *Aeschynomene* et masqué chez certaines légumineuses (*L. japonicus*) qui utilisent la reconnaissance des FNs et l'initiation d'un cordon d'infection pour la nodulation.

(Adapté de Madsen *et al.*, 2010)

3.3.4. Les différents scénarios évolutifs de la symbiose entre les *Bradyrhizobium* photosynthétiques et les *Aeschynomene*

Plusieurs scénarios évolutifs de l'apparition de la symbiose FN-indépendante chez les *Aeschynomene* ont été proposés (Figure 46).

Le premier scénario présente la symbiose FN-indépendante comme un processus de nodulation ancestral. Ce scénario se fonde initialement sur l'observation que les processus d'infection et d'organogénèse nodulaire chez les *Aeschynomene* semblent plus simples que ceux décrits chez les légumineuses modèles. La pertinence de ce scénario a été renforcée après la publication d'une étude menée par Madsen et ses collaborateurs (2010) sur des mutants du lotier. En effet, en utilisant un mutant gain-de-fonction de la CCaMK (*snf1*) formant des nodules spontanés sur le lotier, les auteurs ont montré que chez les doubles ou triples mutants *snf1-nfr1*, *snf1-nfr5* et *snf1-nfr1-nfr5*, où les récepteurs des FNs sont mutés dans un fond génétique *snf1*, les nodules formés spontanément peuvent être infectés intracellulairement à de faibles fréquences par un mutant dans les gènes *nod* de *Mesorhizobium loti* (Madsen *et al.*, 2010). Dans ce cas, aucun cordon d'infection, ni de courbure des poils absorbants, ne sont observés. De ce fait, l'infection des nodules par ce mutant *nod* bactérien passe par une voie intercellulaire de manière comparable aux *Bradyrhizobium* photosynthétiques sur *Aeschynomene* (Madsen *et al.*, 2010; Bonaldi *et al.*, 2011). Il a alors été proposé que le mécanisme symbiotique FN-indépendant, observé naturellement chez les *Aeschynomene* du groupe III, représenterait un processus symbiotique ancestral conservé chez certaines légumineuses, dont le lotier, mais masqué par l'acquisition d'un processus plus sophistiqué impliquant une signalisation FN-dépendante (Madsen *et al.*, 2010; Bonaldi *et al.*, 2011) (Figure 47). L'hypothèse est que la reconnaissance spécifique des FNs a offert une grande sécurité pour la plante puisqu'elle permet de sélectionner de manière plus spécifique les symbiotes avec lesquelles elle entre en interaction et ainsi d'éviter la colonisation des nodules par des bactéries opportunistes.

Le second scénario propose que le processus symbiotique FN-indépendant des *Aeschynomene* dérive de la voie FN-dépendante classique. En effet, les plantes du genre *Aeschynomene* utilisent majoritairement le processus FN-dépendant pour la nodulation et seules les *Aeschynomene* du groupe III, qui forment un groupe monophylétique, utilisent un processus FN-indépendant (Chaintreuil *et al.*, 2013). De plus, ces plantes ont un spectre d'hôtes bactériens restreint puisqu'elles entrent toutes en interaction symbiotique avec des souches de *Bradyrhizobium* qui appartiennent elles-mêmes à un même clade monophylétique (Miché *et al.*, 2010). Cette spécificité suggère une co-évolution très forte entre les deux partenaires. L'hypothèse est que l'apparition du mécanisme FN-indépendant pourrait avoir une origine récente et représenterait une voie symbiotique alternative qui aurait dérivée de la voie FN-dépendante au cours de l'évolution.

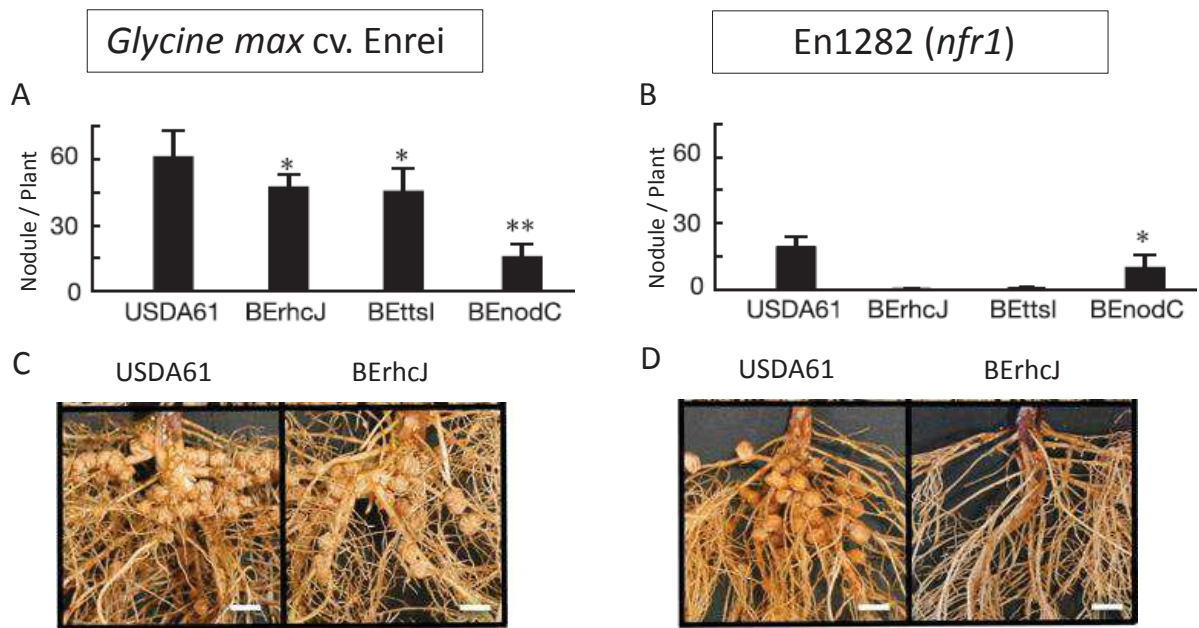


Figure 48. *B. elkanii* USDA61 est capable de noduler *G. max* cv. Enrei en l'absence de FNs

Capacité symbiotique de la souche USDA61 et ses mutants dérivés sur *G. max* cv Enrei (A et C) et sur son mutant En1282 dans le récepteur des FNs *NFR1* (B et D). La mutation chez USDA61 des gènes de nodulation (BEnodC) n'abolit pas sa capacité de noduler le cultivar Enrei sauvage et son mutant En1282 (*nfr1*). Seules les mutations du système de sécrétion de type III de la bactérie (BErhcJ) ou de son régulateur transcriptionnel (BETtsI) empêchent la formation de nodules sur le mutant de plante En1282 (*nfr1*).

(Adapté de Okazaki *et al.*, 2013)

Cette dérive pourrait être la conséquence d'une niche écologique particulière des *Aeschynomene* du groupe III, qui sont toutes semi-aquatiques. Les FNs sont des molécules diffusibles et ne représentent donc pas un signal moléculaire idéal dans un milieu aquatique. Les couples *Aeschynomene* du groupe III / *Bradyrhizobium* photosynthétiques se seraient alors adaptés, par modification des premières étapes de l'induction de la voie symbiotique, en développant un signal « non-Nod » plus adapté à l'environnement aquatique. Cette hypothèse est également appuyée par le fait qu'un orthologue de NFR1 (MtLYK3) est bien retrouvé dans le génome *A. evenia* même si celui-ci n'est pas exprimé (Gully *et al.*, 2018; JF Arrighi, communication personnelle).

Enfin, le troisième scénario propose que l'ancêtre des *Aeschynomene* du groupe III était une légumineuse non-nodulante qui aurait acquis la capacité de nodulation indépendamment des autres légumineuses.

Ainsi, l'origine évolutive du processus symbiotique FN-indépendant est encore incertaine et soumise à débat. Jusqu'à présent, aucun scénario n'est réfutable. Cependant, comme décrit ci-dessous, la découverte plus récente d'un nouveau processus symbiotique FN-indépendant chez une légumineuse, qui utilise classiquement un processus FN-dépendant (*Glycine max*) par des *Bradyrhizobium* non-photosynthétiques grâce à leur T3SS, apporte un nouvel éclairage évolutif et serait plus en faveur avec une origine ancestrale d'un processus symbiotique n'impliquant pas une signalisation FNs.

3.4. Le piratage de la voie symbiotique par des *Bradyrhizobium* non-photosynthétiques : le mécanisme symbiotique FN-indépendant T3SS-dépendant

3.4.1. Découverte d'un nouveau processus symbiotique FN-indépendant chez le soja *Glycine max*

En 2013, l'étude du système de sécrétion de type III (T3SS) d'une souche de *Bradyrhizobium* non-photosynthétique, *B. elkanii* USDA61, a permis la découverte d'un second mécanisme symbiotique indépendant des FNs sur le soja *Glycine max*. La souche *B. elkanii* USDA61 est un symbiote naturellement efficace sur les deux cultivars *G. max* cv. Enrei et cv. Clark-rj1. Cependant, malgré la mutation du gène *nodC* indispensable à la synthèse des FNs, la souche mutante BEnodC ne perd pas sa capacité à induire des nodules sur ces deux cultivars. Les mêmes observations ont été réalisées sur un mutant dans le récepteur des FNs *NFR1* du cultivar Enrei (En1282), qui peut toujours être nodulé par la souche USDA61 sauvage ou par son mutant BEnodC (Figure 48) (Okazaki *et al.*, 2013). De manière surprenante, les mutations du T3SS de la bactérie (BErhcJ) ou de son régulateur transcriptionnel TtsI (BEttsI) abolissent totalement la nodulation sur le mutant de plante *nfr1* (En1282) (Okazaki *et al.*, 2013).

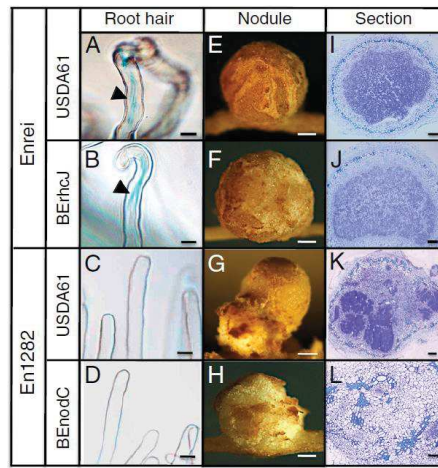


Figure 49. Le processus d'infection FN-indépendant T3SS-dépendant passe par la voie intercellulaire sur En1282 (*nfr1*)

A et B. Courbure du poil absorbant, et formation de cordons d'infection, induites sur Enrei par *B. elkanii* USDA61 (A) et le mutant T3SS BERhcJ (B). Aucune courbure des poils absorbants n'est observée chez le mutant En1282 (*nfr1*) inoculés avec *B. elkanii* USDA61 (C) et le mutant BE nodC (D) suggérant une infection intercellulaire. De E à H. Aspect des nodules induits par USDA61 sur Enrei (E) et En1282 (*nfr1*) (G), et de ses mutants dérivés BERhcJ sur Enrei (F) et BE nodC sur En1282 (*nfr1*) (H). De I à L. L'analyse cytologique de coupes de nodules montre une désorganisation du tissu infectieux dans les nodules induits sur En1282 (*nfr1*) par USDA61 (K) et BE nodC (L) qui n'est pas observée dans les nodules induits sur la plante sauvage Enrei par USDA61 (I) et BERhcJ (J). (Okazaki *et al.*, 2013)

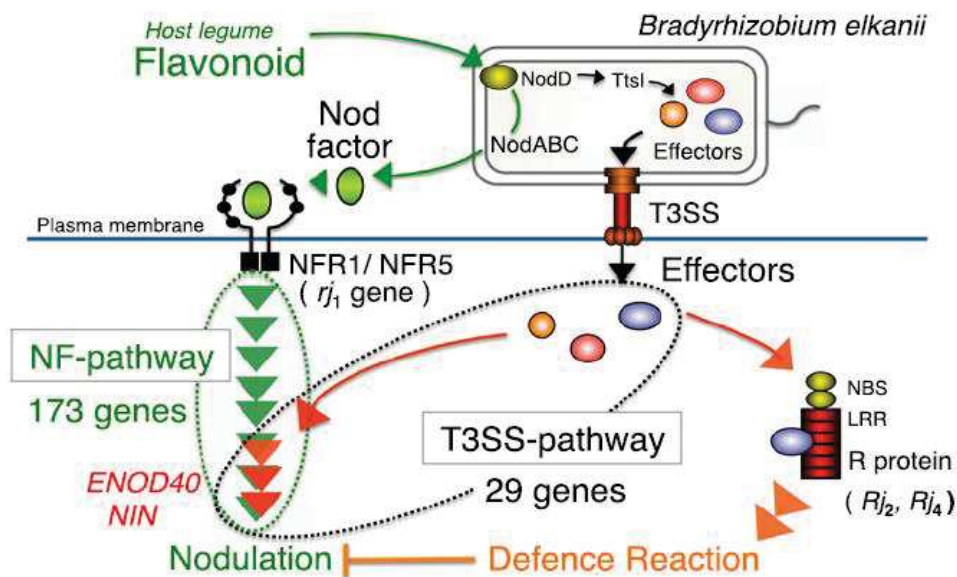


Figure 50. Modèle de la signalisation moléculaire utilisée par USDA61 pour l'induction de la nodulation FN-indépendante T3SS-dépendante sur *G. max*

La production de flavonoïdes par la plante hôte active l'expression des gènes de nodulation *nod* et du T3SS par l'intermédiaire de NodD (en haut). La reconnaissance des FNs par les récepteurs NFR1/NFR5 active la voie de signalisation symbiotique conduisant à la formation des nodules et à leur infection par la bactérie (à gauche). Certains effecteurs injectés dans les cellules de la plante hôte peuvent être reconnus par des protéines de résistance (Rj2, Rj4), ce qui active les mécanismes de défense de la plante et réprime la mise en place de la nodulation (à droite). Un ou plusieurs T3Es peuvent déjouer les premières étapes de la reconnaissance des FNs (au centre).

(Okazaki *et al.*, 2013)

L'analyse des nodules induits par le mutant *BE_{nodC}* sur les lignées *nfr1* a montré qu'environ 20% d'entre eux présentent une forme irrégulière et une zone d'infection segmentée. De plus, aucun cordon d'infection ou de courbure des poils absorbants n'a été observé ce qui suggère que l'infection des nodules passe par une voie intercellulaire (Figure 49) (Okazaki *et al.*, 2013). Enfin, une analyse transcriptomique par Microarray réalisée sur le mutant *nfr1* en réponse à USDA61 a montré une surexpression, entre autres, des deux gènes symbiotiques *NIN* et *ENOD40*. La surexpression de ces deux gènes est abolie lors de l'inoculation du mutant T3SS *BE_{rhcJ}* (Okazaki *et al.*, 2013). Cela suggère que la voie d'induction des nodules par le T3SS rejoint celle déclenchée par la reconnaissance des FNs. Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour déterminer si la CSSP est impliquée dans cette nodulation T3SS-dépendante (Figure 50).

Comme nous l'avons vu dans la partie 2, le T3SS des rhizobiums est initialement connu pour la sécrétion de protéines effectrices Nops qui ont essentiellement pour rôle de limiter les mécanismes de défense de la plante afin de favoriser l'infection des nodules. Cependant, la découverte faite par Okazaki et ses collaborateurs (2013) est la première démonstration que des effecteurs Nops peuvent directement déclencher le mécanisme de nodulation, probablement en court-circuitant la voie de reconnaissance des FNs (Figure 50). Toutes ces observations ont conduit à la découverte d'un mécanisme symbiotique FN-indépendant mais dépendant du T3SS de la bactérie.

3.4.2. Le mécanisme symbiotique FN-indépendant T3SS-dépendant chez *Aeschynoneme*

La découverte d'un processus FN-indépendant T3SS-dépendant était d'autant plus troublante que la majorité des *Bradyrhizobium* photosynthétiques sont dépourvus d'un cluster de gènes T3SS (Mornico *et al.*, 2012). Une collaboration entre le LSTM et l'équipe japonaise dirigée par Shin Okazaki a été ainsi initiée pour déterminer si la souche *B. elkanii* USDA61 était capable de noduler *A. indica* en suivant ce nouveau processus. J'ai pu initier ce travail au cours d'un stage de 3^{ème} année de licence au LSTM en 2014. Les résultats ont montré qu'USDA61 était capable d'induire un nombre de nodules comparable à celui induit par ORS278 sur *A. indica*. L'analyse des phénotypes symbiotiques des mutants dans les gènes *nod* et dans les gènes codant pour le T3SS de USDA61 a permis de montrer que, comme sur le soja, cette interaction symbiotique avec *A. indica* est exclusivement dépendante du T3SS (Figure 51) (Okazaki *et al.*, 2016). Cependant, malgré la présence de nodules, les plantes d'*A. indica* restent petites, chlorotiques et sont comparables aux plantes non inoculées. Des analyses cytologiques montrent que de nombreux nodules sont nécrotiques et que leur infection par USDA61 ne se limite qu'aux espaces intercellulaires. Ainsi, tout semble indiquer que la souche USDA61 est capable d'induire des nodules grâce à son T3SS sur *A. indica* mais que le processus d'infection est rapidement stoppé par la mise en place de réactions de défenses (Figure 51).

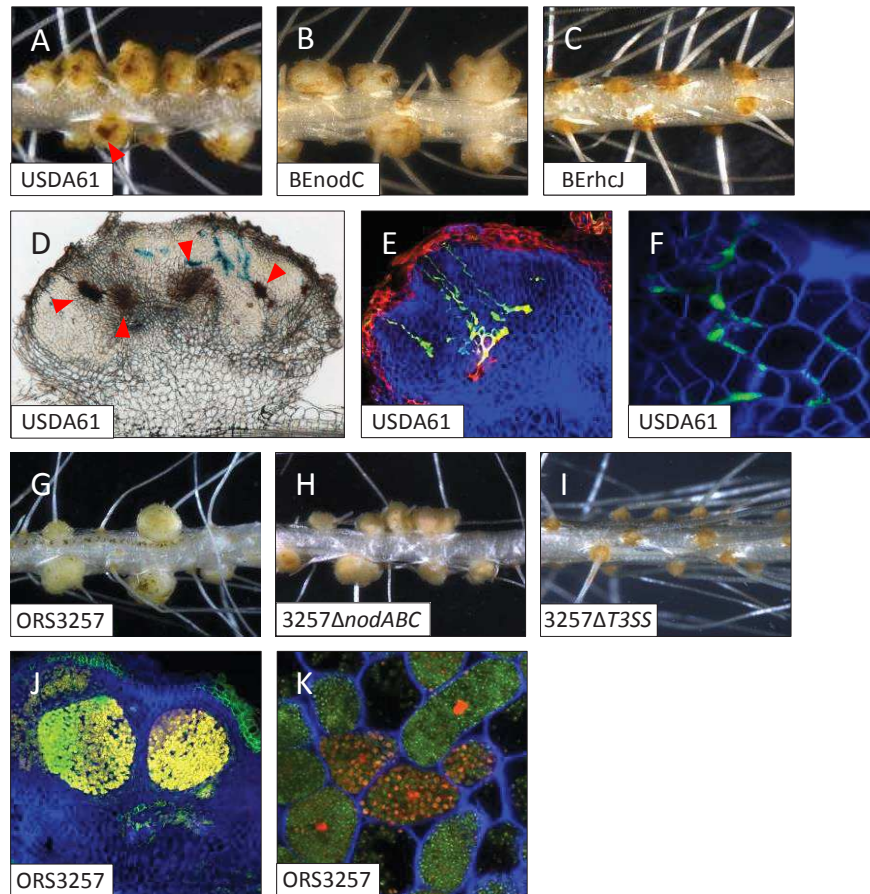


Figure 51. Propriétés symbiotiques de *B. elkanii* USDA61 et *Bradyrhizobium* sp. ORS3257 sur *A. indica*
 De **A** à **F**. Analyse des nodules induits sur *A. indica* après inoculation de USDA61 sauvage (**A**, **D**, **E** et **F**) et de ses mutants dérivés dans les gènes *nod* BENodC (**B**) et dans le T3SS BErhcJ (**C**). De **G** à **K**. Analyse des nodules induits sur *A. indica* après inoculation de ORS3257 sauvage (**G**, **J** et **K**) et de ses mutants dérivés dans les gènes *nod* 3257 Δ nodABC (**H**) et dans le T3SS 3257 Δ T3SS (**I**). Observation de racines d'*A. indica* inoculées avec les souches sauvages USDA61 (**A**) et ORS3257 (**G**), et de leurs mutants dérivés BENodC (**B**), BErhcJ (**C**), 3257 Δ nodABC (**H**) et 3257 Δ T3SS (**I**). **D**, **E** et **F**. Observation de l'infection intercellulaire dans les nodules d'*A. indica* induits par USDA61. **D**. Analyse en microscopie diascopique d'une coupe de nodule induit par une souche USDA61 marquée GUS. **E** et **F**. Analyse en microscopie confocale d'un nodule induit par une souche USDA61 marquée GFP. Les triangles rouges indiquent les zones de nécroses induites au moment de l'infection. **J** et **K**. Observation en microscopie confocale de l'infection intracellulaire de ORS3257. Un début de différenciation en bactéroïdes sphériques est observable en **K**.
 (Adapté de Okazaki *et al.*, 2016)

Considérant que chaque souche de *Bradyrhizobium* qui possède un T3SS est susceptible d'injecter un cocktail différent d'effecteurs, une large collection de *Bradyrhizobium* non-photosynthétiques a été testée pour déterminer si certaines souches pouvaient aller plus loin que la souche USDA61 dans ce processus symbiotique T3SS-dépendant sur *A. indica*. La moitié des souches testées a induit la formation de nodules et des tests réalisés par PCR ont montré qu'elles possèdent toutes un T3SS. Certaines d'entre elles, comme la souche *Bradyrhizobium* sp. ORS3257 (anciennement STM6978), peuvent induire des nodules infectés intracellulairement pour lesquels une faible activité nitrogénase est détectée par des tests ARA (pour « acetylene reduction assay »). Cependant, et à la différence des nodules induits par la souche de *Bradyrhizobium* photosynthétique ORS278, la différenciation terminale en bactéroïde dans les nodules induits par ORS3257 est rare. Lorsqu'elle est observée, les bactéroïdes sont de forme sphérique (de type S) mais sont colorés en rouge par le propidium iodure, ce qui suggère une perturbation de l'enveloppe bactérienne et sûrement la mort des bactéroïdes (Figure 51).

Cette capacité à être nodulée via le T3SS n'est pas restreinte à *A. indica*, puisque huit autres *Aeschynomene* du groupe III peuvent être nodulées par ORS3257 ou USDA61. Cependant, et comme chez *A. indica*, la souche USDA61 n'induit que des nodules dont l'infection est intercellulaire alors que la plupart des nodules induits par la souche ORS3257 montre une infection intracellulaire accompagnée d'une faible activité nitrogénase. Ainsi, un gradient dans l'efficacité symbiotique des *Bradyrhizobium* en interaction avec les *Aeschynomene* du groupe III peut être mis en évidence en fonction de la souche inoculée. Tout d'abord, et malgré la présence d'un T3SS fonctionnel, certaines souches de *Bradyrhizobium* non-photosynthétiques, comme *B. diazoefficiens* USDA110 et *Bradyrhizobium* sp. DOA9, n'induisent pas de nodules (Krause *et al.*, 2002; Okazaki *et al.*, 2015; Songwattana *et al.*, 2017). Comme *B. elkanii* USDA61, certains *Bradyrhizobium* peuvent induire la formation de nodules dont l'infection est exclusivement intercellulaire et souvent associée à des nécroses, alors que d'autres, comme la souche *Bradyrhizobium* sp. ORS3257, peuvent induire des nodules présentant une infection intracellulaire où une faible activité nitrogénase peut être détectée. Enfin, l'efficacité symbiotique la plus élevée est obtenue en interaction avec les *Bradyrhizobium* photosynthétiques, selon le processus FN-indépendant T3SS-indépendant qui conduit à une différenciation terminale en bactéroïde et à une forte activité nitrogénase. (Okazaki *et al.*, 2016) (Figure 52).

L'étude d'Okazaki et ses collaborateurs (2016) a permis de mettre en évidence l'existence de deux mécanismes de nodulation indépendante des FNs au sein des *Aeschynomene* : un mécanisme FN-indépendant T3SS-indépendant, utilisé par les *Bradyrhizobium* photosynthétiques, et un mécanisme FN-indépendant T3SS-dépendant, utilisé par les *Bradyrhizobium* non-photosynthétiques.

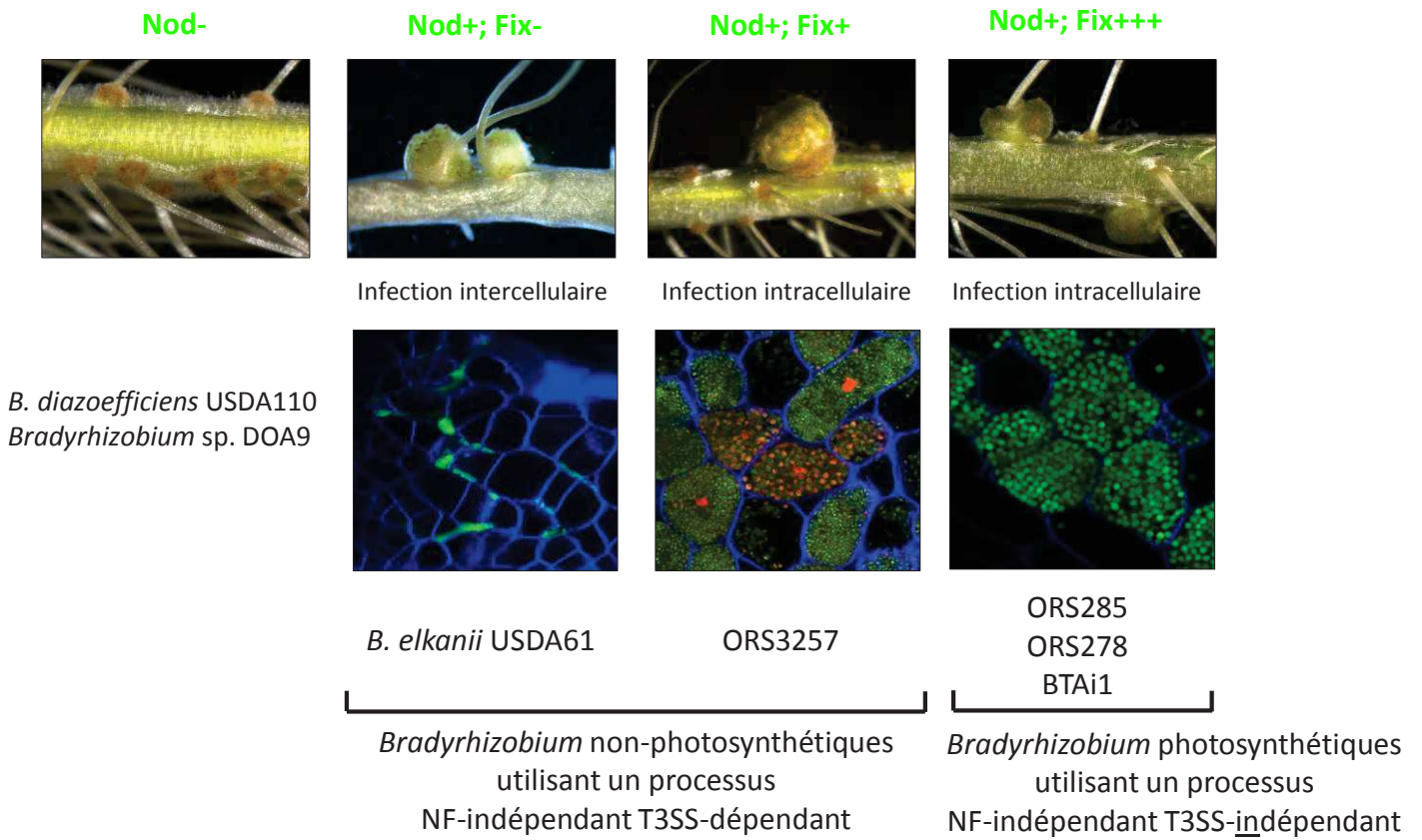


Figure 52. Certaines *Aeschynomene* sont nodulées par des souches de *Bradyrhizobium* selon deux processus symbiotiques FN-indépendant différents
(Adapté de Okazaki *et al.*, 2016)

Elle a donné lieu à une publication dans *The ISME Journal* à laquelle j'ai été associée en tant que co-auteur (Okazaki *et al.*, 2016). Cette publication est donnée en annexe.

4. Présentation du sujet de thèse

La mise en évidence en 2013 qu'une souche de *Bradyrhizobium* pouvait déclencher un processus symbiotique grâce à son T3SS indiquait l'existence d'un second mécanisme d'interaction symbiotique n'impliquant pas une signalisation déclenchée par les FNs. A la différence de la symbiose FN-indépendante T3SS-indépendante, identifiée en 2007 chez les *Bradyrhizobium* photosynthétiques et dont l'origine du signal clé « non-Nod » demeure encore inconnue, il pouvait être admis que le déclenchement de la symbiose T3SS-dépendante passe par l'activité d'un ou plusieurs effecteur(s) de type III secrété(s) dans les cellules de la plante. Jusqu'alors, la majorité des études menées sur les effecteurs de type III des rhizobiums concernait leur capacité à moduler le spectre d'hôtes de la bactérie en interférant avec le système immunitaire de l'hôte. Le rôle parfois dispensable de beaucoup de ces effecteurs dans l'interaction symbiotique FN-dépendante n'avait pas fait de leur étude une priorité pour la communauté scientifique et de ce fait, très peu d'effecteurs ont été caractérisés à ce jour. La découverte de l'existence d'un mécanisme de nodulation T3SS-dépendant, sur le soja, puis sur *Aeschynomene*, a mis en lumière une nouvelle caractéristique fonctionnelle insoupçonnée que pouvait présenter certains effecteurs : celle de déclencher chez la plante hôte le programme de nodulation. Mais alors, quelle est la nature de ces effecteurs ? Comment agissent-ils pour le déclenchement de la nodulation ? Quelle est leur distribution parmi les rhizobiums ? L'objectif principal de ce travail de thèse a visé à répondre à ces questions.

L'étude menée par Okazaki et ses collaborateurs (2016), auquel j'ai pu contribué au cours d'un stage de L3 en 2014, a permis de poser les bases de mon travail de thèse en sélectionnant le couple ORS3257 / *A. indica* comme le couple modèle pour l'étude de ce nouveau processus symbiotique. En effet, la souche ORS3257 montre l'efficacité symbiotique la plus élevée en interaction avec *A. indica*. De plus, et à la différence du soja en interaction avec *B. elkanii* USDA61, la synthèse des FNs par ORS3257 n'interfère pas avec la nodulation T3SS-dépendante sur *A. indica*. Ainsi, le phénotype symbiotique T3SS-dépendant est directement observable sans avoir besoin de travailler avec des mutants bactériens dans les gènes *nod* ou des mutants de plante dans les récepteurs des FNs. Une recherche *in silico* dans le génome de la souche ORS3257 a été réalisée afin d'établir une liste d'effecteurs candidats potentiellement secrétés à travers son T3SS. Une mutagenèse systématique de ces effecteurs a ensuite été réalisée et les propriétés symbiotiques sur *A. indica* de chacun des mutants ont été déterminées afin d'identifier le ou les effecteurs indispensables à l'établissement de la nodulation. Ce travail, débuté il y a plus de quatre ans dans l'équipe MLST dirigée par Eric Giraud et qui s'inscrit directement dans mon objectif de thèse, a notamment conduit à l'identification d'un nouvel effecteur de type III jouant un rôle déterminant

dans le déclenchement du processus symbiotique. Cet effecteur, appelé ErnA, pour “effector required for nodulation A”, est largement conservé chez les *Bradyrhizobium* et j’ai pu initier au cours de ma dernière année de thèse, en collaboration avec l’équipe de Laurent Deslandes (LIPM, Toulouse), le début de sa caractérisation fonctionnelle.

La recherche des homologues d’ErnA nous a fait entrevoir que de nombreux génomes de *Bradyrhizobium* avaient été séquencés ces dernières années. Jusqu’alors, aucune étude n’était disponible sur la distribution du T3SS et des Nops chez ces bactéries. Ainsi, l’ensemble des génomes de *Bradyrhizobium* disponibles nous a offert l’opportunité d’étudier l’origine du T3SS et la diversité des Nops au sein de ce genre. En collaboration avec Florent Lassalle et le Génoscope d’Evry, nous avons réalisé une analyse génomique comparative sur près de 150 génomes de *Bradyrhizobium* isolés d’environnement très variés et comprenant beaucoup de souches nodulantes. Parallèlement, cette analyse nous a motivé à collecter le maximum de ces souches auprès des différents laboratoires qui les avaient isolées et/ou séquencées afin de réaliser des tests symbiotiques sur *Aeschynomene*. Le but de ce travail, réalisé par Alicia Camuel au cours de son stage de M1 que j’ai encadré, a été d’identifier les souches nodulant *A. indica* en utilisant le processus FN-indépendant T3SS-dépendant et de comparer leurs propriétés symbiotiques aux données de génomique comparative alors disponibles. Cette analyse a conduit à l’identification de nouveaux effecteurs candidats, différents d’ErnA, et probablement impliqués dans le déclenchement de la nodulation sur *A. indica*.

En parallèle de mon travail de thèse, un objectif secondaire a été d’étendre notre compréhension du rôle joué par le T3SS et les Nops des *Bradyrhizobium* en interaction avec des légumineuses d’intérêt agronomique. Ainsi, dans le cadre d’une collaboration avec l’équipe thaïlandaise dirigée par Neung Teaumroong de l’Université de Technologie de Suranaree, j’ai travaillé sur deux études fonctionnelles du T3SS de la souche modèle *Bradyrhizobium sp.* DOA9, est capable de noduler plusieurs espèces d’intérêt agronomique en Thaïlande.

Chapitre I

1. Contexte de l'étude

L'objectif principal de mon travail de thèse a été d'avancer dans la compréhension de la mise en place du mécanisme symbiotique FN-indépendant T3SS-dépendant. Le choix de la souche à utiliser pour mener cette étude s'est porté sur *Bradyrhizobium* sp. ORS3257. Cette souche est celle qui a émergé comme étant la plus performante dans l'interaction T3SS-dépendante sur *A. indica* (Okazaki *et al.*, 2016). De plus, elle présentait l'avantage d'être facilement transformée par conjugaison bactérienne.

Dès le début de l'étude, le génome d'ORS3257 était disponible au LSTM, d'abord sous forme de génome « draft », puis sous forme complet grâce à un séquençage PacBio suivi d'un assemblage effectué par Djamel Gully (Le Quéré *et al.*, 2019; Chapitre 3). Contrairement aux *Bradyrhizobium* photosynthétiques, pour lesquels aucun *a priori* sur la nature des signaux « non-Nod » ne peut être fait, dans le cas du processus T3SS-dépendant, on pouvait considérer que l'établissement de la symbiose repose sur un ou plusieurs effecteurs de type III. Ainsi, nous avons privilégié une approche de génétique inverse pour identifier ces effecteurs « symbiotiques » permettant la formation de nodules infectés sur *Aeschynomene*.

En combinant deux recherches *in silico* complémentaires sur le génome d'ORS3257 - une recherche par HMM de *tts* box, correspondant au motif de fixation de TtsI, le régulateur transcriptionnel du T3SS et des T3Es; et une recherche par *tblastn* des effecteurs Nop connus - une liste de 27 gènes candidats a été établie.

Rapidement après l'identification des premiers gènes candidats, une mutagénèse dirigée a été réalisée. Pour cela, deux approches différentes ont été privilégiées : une mutagénèse insertionnelle pour les gènes candidats retrouvés isolés; et une mutagénèse par délétion de régions complètes du génome contenant plusieurs gènes candidats retrouvés proches les uns des autres. Ce travail, mené sur plusieurs années, a été en très grande partie effectué par Joël Fardoux, Clémence Chaintreuil et Eric Giraud. Au cours de mon stage de M2 et de ma première année de thèse, les propriétés symbiotiques de chacun des mutants ont été déterminées sur *A. indica*, conduisant à l'identification d'au moins cinq effecteurs jouant des rôles majeurs dans la limitation des mécanismes de défense de la plante, ainsi que dans l'organogénèse et l'infection des nodules.

Plus particulièrement, et dès le début de mon stage de M2, le gène 7701 a émergé comme codant pour un acteur majeur de l'induction de la nodulation. Sa nature en tant qu'effecteur de type III a été démontrée par Nicolas Busset et Peter Mergaert à l'I2BC (Paris-Saclay). De plus, nous avons démontré, en collaboration avec l'équipe dirigée par Laurent Deslandes au LIPM (Castanet-Tolosan), que cet effecteur se localise spécifiquement dans le noyau des cellules végétales où il interagit avec

les acides nucléiques. Le gène 7701 a ainsi été renommé *ernA*, pour « effector required for nodulation-A ». Enfin, de manière surprenante, la surexpression ectopique d'*ernA* dans les racines d'*A. indica* induit le développement de nouveaux organes comparables à des racines secondaires ou à des pseudo-nodules.

Jusqu'à présent, aucune fonction putative ne peut être attribuée à *ernA* mais les premières analyses fonctionnelles réalisées suggèrent qu'un domaine situé à l'extrémité C-terminale de l'effecteur, le CM2, joue un rôle essentiel dans cette activité inductrice de la nodulation.

2. Article 1 : The rhizobial type III effector ErnA confers the ability to form nodules in legumes



The rhizobial type III effector ErnA confers the ability to form nodules in legumes

Albin Teulet^a, Nicolas Busset^b, Joël Fardoux^a, Djamel Gully^a, Clémence Chaintreuil^a, Fabienne Cartieaux^a, Alain Jauneau^c, Virginie Comorge^d, Shin Okazaki^e, Takakazu Kaneko^f, Frédéric Gressent^a, Nico Nouwen^a, Jean-François Arrighi^a, Ralf Koebnik^g, Peter Mergaert^b, Laurent Deslandes^d, and Eric Giraud^{a,1}

^aInstitut de Recherche pour le Développement, Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes, UMR Institut de Recherche pour le Développement/SupAgro/Institut National de la Recherche Agronomique/Université de Montpellier/Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement, 34398 Montpellier Cedex 5, France; ^bInstitute for Integrative Biology of the Cell, UMR 9198, CNRS/Université Paris-Sud/Commissariat à l'Énergie Atomique, 91198 Gif-sur-Yvette, France; ^cCNRS, Plateforme Imagerie-Microscopie, Fédération de Recherche FR3450, 31326 Castanet-Tolosan, France; ^dLIPM, Université de Toulouse, INRA, CNRS, 31326 Castanet-Tolosan, France; ^eDepartment of International Environmental and Agricultural Science, Graduate School of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, Tokyo 183-8509, Japan; ^fFaculty of Life Sciences, Kyoto Sangyo University, Motoyama, Kamigamo, Kyoto 603-8555, Japan; and ^gInstitut de Recherche pour le Développement, Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement, Université de Montpellier, Interactions Plantes–Microorganismes–Environnement, 34394 Montpellier, France

Edited by Graham C. Walker, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA, and approved August 28, 2019 (received for review March 14, 2019)

Several *Bradyrhizobium* species nodulate the leguminous plant *Aeschynomene indica* in a type III secretion system-dependent manner, independently of Nod factors. To date, the underlying molecular determinants involved in this symbiotic process remain unknown. To identify the rhizobial effectors involved in nodulation, we mutated 23 out of the 27 effector genes predicted in *Bradyrhizobium* strain ORS3257. The mutation of *nopAO* increased nodulation and nitrogenase activity, whereas mutation of 5 other effector genes led to various symbiotic defects. The *nopM1* and *nopP1* mutants induced a reduced number of nodules, some of which displayed large necrotic zones. The *nopT* and *nopAB* mutants induced uninfected nodules, and a mutant in a yet-undescribed effector gene lost the capacity for nodule formation. This effector gene, widely conserved among bradyrhizobia, was named *ernA* for “effector required for nodulation-A.” Remarkably, expressing *ernA* in a strain unable to nodulate *A. indica* conferred nodulation ability. Upon its delivery by *Pseudomonas fluorescens* into plant cells, ErnA was specifically targeted to the nucleus, and a fluorescence resonance energy transfer–fluorescence lifetime imaging microscopy approach supports the possibility that ErnA binds nucleic acids in the plant nuclei. Ectopic expression of *ernA* in *A. indica* roots activated organogenesis of root- and nodule-like structures. Collectively, this study unravels the symbiotic functions of rhizobial type III effectors playing distinct and complementary roles in suppression of host immune functions, infection, and nodule organogenesis, and suggests that ErnA triggers organ development in plants by a mechanism that remains to be elucidated.

Bradyrhizobium | T3SS | symbiosis | nodulation | legume

Bradyrhizobia are Gram-negative soil bacteria that are widely used in agriculture. They are applied as biofertilizers to sustain the production of crops of agronomic importance (e.g., soybean, peanut, cowpea), thus circumventing the need to add chemical nitrogen fertilizers. Their agronomic interest results from their ability to interact symbiotically with some leguminous plants. This interaction leads to the formation of a new organ, the nodule, in which the bacteria fix nitrogen for the plant's benefit and where, in exchange, the plant provides a protective niche and carbon sources.

The symbiotic process is initiated when the plant perceives specific lipochitooligosaccharide signal molecules, called Nod factors (NFs), which are synthesized and secreted after activation of bacterial nodulation (*nod*) genes by specific plant flavonoids (1). The perception of NFs activates a genetic program leading to 2 coordinated processes, the formation of a nodule and its intracellular infection by the bacteria (2). Beyond these first stages initiated by NF perception, the development of a functional nodule and maintenance of a chronic infection of the nodule cells by

bacteria largely relies on the ability of the bacteria to suppress the plant immune system (3). Different strategies have evolved in rhizobia to escape plant immunity (4, 5), but one of the most remarkable is the type III secretion system (T3SS), which is a common and well-described weapon used by bacterial plant pathogens (6).

The T3SS apparatus is a nanosyringe or “injectisome” that traverses the bacterial and eukaryotic cell envelope for direct delivery of type III effector (T3E) proteins into the eukaryotic host cell (7). Like pathogenic bacteria, some rhizobia possess a T3SS encoded by the *rhc* (rhizobium conserved) gene cluster, and secrete T3Es, also named “Nop” (for nodulation outer protein), during the nodulation process (8). These effectors are Janus-faced depending on the host plant (9, 10). On the one hand, they promote symbiosis by suppressing specific plant defense responses, while on the other hand, they trigger activation of plant immune responses called ETI (effector-triggered immunity) upon specific recognition by plant immune receptors (resistance [R] proteins). ETI is often associated with a hypersensitive cell

Significance

Legumes have a tremendous ecological and agronomic importance due to their ability to interact symbiotically with nitrogen-fixing rhizobia. In most of the rhizobial–legume symbioses, the establishment of the interaction requires the plant perception of the bacterial lipochitooligosaccharide Nod factor signal. However, some bradyrhizobia can activate the symbiosis differently, thanks to their type III secretion system, which delivers effector proteins into the host cell. Here, we demonstrate that this symbiotic process relies on a small set of effectors playing distinct and complementary roles. Most remarkably, a nuclear-targeted effector named ErnA conferred the ability to form nodules. The understanding of this alternative pathway toward nitrogen-fixing symbiosis could pave the way for designing new strategies to transfer nodulation into cereals.

Author contributions: A.T., R.K., P.M., L.D., and E.G. designed research; A.T., N.B., J.F., D.G., C.C., F.C., A.J., V.C., S.O., T.K., F.G., N.N., J.-F.A., and E.G. performed research; A.T., N.B., J.F., D.G., C.C., F.C., A.J., V.C., S.O., T.K., F.G., N.N., J.-F.A., P.M., L.D., and E.G. analyzed data; and A.T., P.M., L.D., and E.G. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

This open access article is distributed under Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives License 4.0 (CC BY-NC-ND).

¹To whom correspondence may be addressed. Email: eric.giraud@ird.fr.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1904456116/-DCSupplemental.

death response, which halts the infection and renders the interaction incompatible (11, 12).

It was recently shown that the role of the T3SS in the symbiosis was not restricted to the modulation of plant immunity. Indeed, the nodulation of the *Glycine max* cv. Enrei and its *nfr* mutant affected in NF perception can be induced in a T3SS-dependent manner by a *Bradyrhizobium elkanii* USDA61 mutant strain unable to produce NFs (13). This shows that, besides interfering with the plant immune system, some Nop effectors also trigger nodulation by bypassing the NF signal. This T3SS-dependent symbiosis is widespread among bradyrhizobia since a diverse range of nonphotosynthetic *Bradyrhizobium* strains are able to elicit nodules on some *Aeschynomene* species, including *A. indica*, in the absence of NFs (14). Interestingly, depending on the *Bradyrhizobium* strain concerned, a gradient in the outcome of the symbiotic interaction has been observed. The plant response ranged from the induction of nodules which are only infected intercellularly (e.g., *B. elkanii* USDA61) to the induction of nodules in which the host cells are intracellularly invaded and display weak nitrogenase activity (e.g., *Bradyrhizobium* sp. ORS3257, previously named STM6978) (14). This new type of symbiosis is an NF-independent and T3SS-dependent process, as opposed to the one used by some photosynthetic *Bradyrhizobium* strains (ORS278 and BTAi1) that are able to induce functional nodules on some *Aeschynomene* species despite the absence of *nod* and *T3SS* genes (15).

The aim of this study was to better understand the molecular bases of this alternative NF-independent, T3SS-dependent symbiotic process. To identify the effectors controlling the symbiosis, we mutated most of the predicted *nop* effector genes in the genome of strain ORS3257 and analyzed the symbiotic properties of the mutant strains on *A. indica*. We found that this nodulation relies on a restricted set of T3Es playing distinct roles. Remarkably, among the T3Es, we identified the nuclear targeted ErnA effector, which confers the ability to nodulate *A. indica*.

Results

Prediction of the T3E Repertoire in ORS3257. In rhizobia, expression of both *T3SS* and *T3E* genes is controlled by the regulator TtsI, which binds to a highly conserved DNA sequence (the *tts* box) found in the promoter region of target genes to activate their transcription (16, 17). To predict the T3E repertoire of strain ORS3257, we combined 2 *in silico* searches: 1) a TblastN search of the genome for effectors previously identified in other rhizobia, and 2) a HMMER search for the *tts* box motif using a hidden Markov model (*SI Appendix*, Table S1 and Fig. S1). This analysis retrieved 27 putative effector genes (*SI Appendix*, Table S2), all of which were located in the symbiotic island and distributed in 2 distinct regions, one containing genes encoding the T3SS machinery and the other one containing the *nod* genes (Fig. 1). Among these 27 candidate effector genes, some are commonly found in rhizobia (*nopP*, *nopT*, *nopM*, *nopL*, and *nopC*), some are specifically found in *Bradyrhizobium* strains (*nopAB*, *nopAC*, *nopAD*, *nopAL*, *nopAJ*, *nopAO*, *nopAR*, and *nopBW*), and 9 encode putative new effectors (*SI Appendix*, Table S2).

Several T3Es Are Required for the Establishment of a Functional NF-Independent, T3SS-Dependent Symbiosis on *A. indica*. To identify T3Es involved in the establishment of the symbiosis between strain ORS3257 and *A. indica*, we mutated most of the candidate genes. To optimize the number of mutants to generate, 1 of 2 strategies was used depending on the genetic organization of the candidate genes: 1) “isolated” genes were inactivated by inserting the non-replicative plasmid pVO155, or 2) genomic regions with several clustered effector genes were deleted using double crossing-over. Altogether, 10 mutants (5 insertion and 5 deletion mutants) covering 23 out of the 27 putative effectors were constructed (Fig. 1A). Four candidate genes were excluded from this mutagenesis

(*nopAM*, which is located directly upstream of *ttsI* and *rhcC2*, and *nopC*, *nopAL*, and *Brad3257_7768*, which belong to an operon that encodes several T3SS components) (Fig. 1A). These genes were not considered during this mutagenesis because it is not yet clear if they encode bona fide effectors or accessory components of the T3SS machinery and because their mutation could have polar effects leading to misinterpretation of nodulation phenotypes.

As previously observed (14), mutation of the secretion machinery (in the $\Delta T3SS$ mutant) prevented nodulation (Fig. 1B and C). Out of the 10 mutants affected in putative effector genes, 6 behaved like the wild-type (WT) strain in terms of the number of nodules, nitrogenase activity, and nodule features (Fig. 1B). Interestingly, the symbiotic properties of the 4 remaining mutants ($\Delta regA$, $\Delta regB$, $\Delta regD$, and $\Omega 7701$) were altered (Fig. 1B and C).

The $\Delta regA$ mutant was significantly impacted in its ability to induce nodules (Fig. 1B and *SI Appendix*, Fig. S2). Furthermore, the nodules showed large necrotic zones and very weak nitrogenase activity (Fig. 1B and C). Live–dead staining of nodule sections revealed that many of the intracellularly infecting bacteria were dead, as shown by the red propidium iodide staining (Fig. 1D). These observations suggest that the region deleted in the $\Delta regA$ mutant plays an important role in the suppression of plant immunity. Region A encodes 2 putative effectors, NopM1 and NopP1, which, in other rhizobia, have been suggested to interfere with the activation of plant defense responses (18, 19). To identify which one plays a symbiotic role, individual insertional mutants were generated. As shown in *SI Appendix*, Fig. S2, both $\Omega nopM1$ and $\Omega nopP1$ mutants displayed a symbiotic phenotype intermediate between the WT strain and the $\Delta regA$ mutant. This finding suggests that the phenotype of the $\Delta regA$ mutant results from the cumulative effect of the lack of these 2 effectors, each of which makes an incremental contribution to immune suppression.

The second mutant, $\Delta regB$, led to the formation of slightly more nodules than the WT strain but the nodules did not fix nitrogen (Fig. 1B). Furthermore, most of the nodules had no central infected tissue and only intercellular bacteria were observed (Fig. 1C and D and *SI Appendix*, Fig. S3E). Region B contains 2 putative effector genes, *nopT* and *nopAO*, 1 of which is preceded by a *tts* box (*nopT*), and 2 additional *tts* boxes without a clearly defined downstream coding sequence (Fig. 1 and *SI Appendix*, Fig. S3). To better understand the phenotype of the $\Delta regB$ mutant, 4 additional mutants were studied. Two insertion mutations were generated in *nopT* and *nopAO* ($\Omega nopT$ and $\Omega nopAO$) and 2 deletion mutations ($\Delta regB-1$ and $\Delta regB-2$) were constructed, encompassing the region surrounding the 2 *tts* boxes (*SI Appendix*, Fig. S3). Two of these mutants displayed distinct phenotypes. The plants inoculated with the $\Omega nopAO$ mutant had more nodules and increased nitrogenase activity (*SI Appendix*, Fig. S3B), suggesting that NopAO can have a negative effect on symbiotic efficiency. On the other hand, the $\Omega nopT$ mutant led to a phenotype similar to that of the $\Delta regB$ mutant, since no nitrogenase activity was detected and most of the formed nodules were not infected (*SI Appendix*, Fig. S3B and D). This observation shows that the phenotype of $\Delta regB$ was mainly due to the absence of *nopT*, which is required for efficient nodule infection.

The phenotype of the third mutant, $\Delta regD$, was very similar to that of $\Delta regB$ (Fig. 1B–D). This region contains 2 predicted effector genes, *nopAB* and *Brad3257_7707*. Individual mutation of *nopAB* ($\Omega nopAB$) led to the same phenotype as observed for the $\Delta regD$ mutant, whereas the other mutation ($\Omega 7707$) had no particular symbiotic defect (*SI Appendix*, Fig. S4). These findings show that, like NopT, NopAB is required for efficient nodule infection.

Finally, the most drastic phenotype was observed with the $\Omega 7701$ insertional mutant in which the predicted effector gene *Brad3257_7701* was disrupted. This mutant displayed an apparent Nod[−] phenotype (absence of nodule formation); microscopic examination revealed only the formation of rare uninfected bump-like

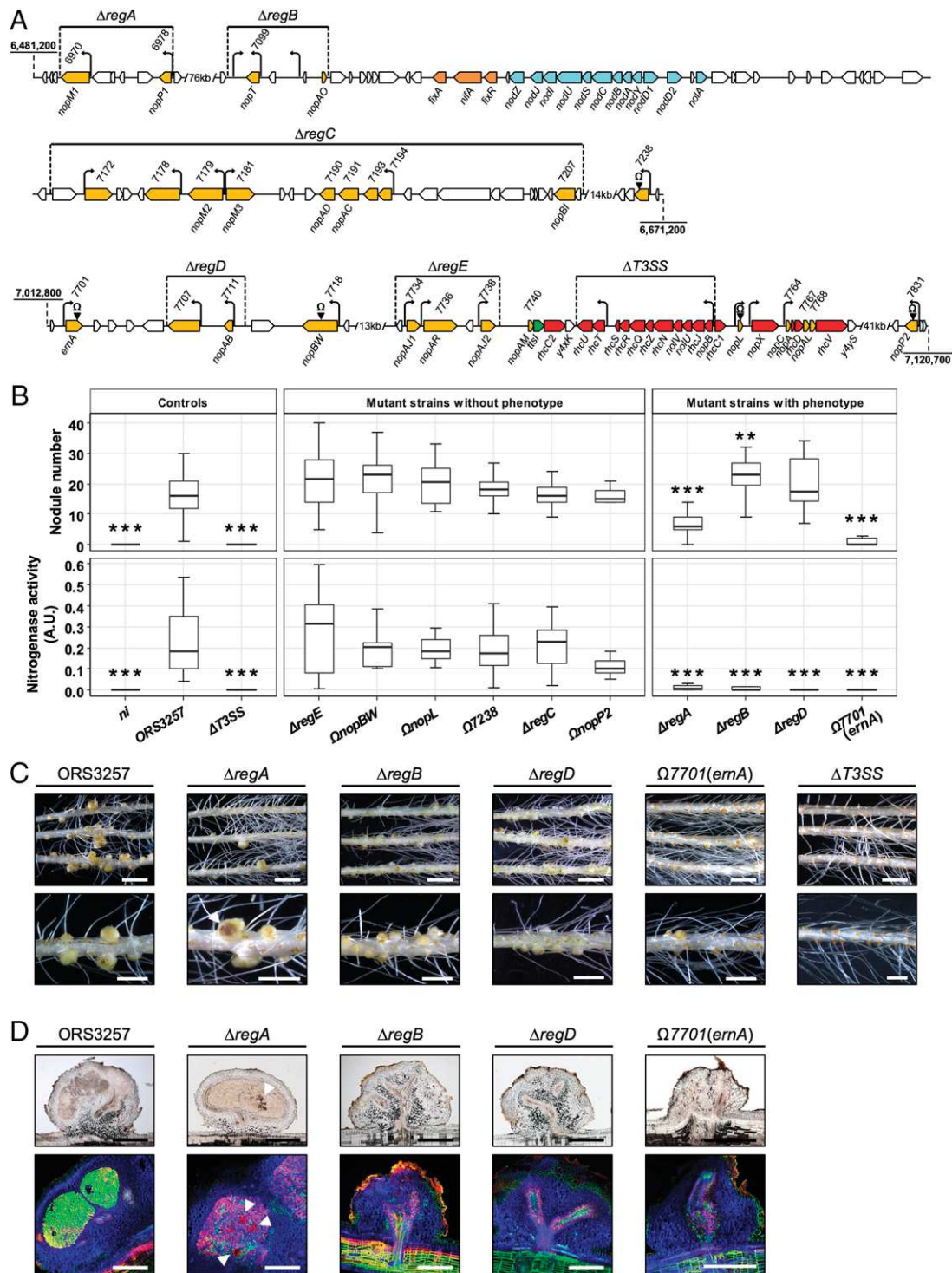


Fig. 1. Identification of T3Es in *Bradyrhizobium* strain ORS3257 that play a symbiotic role in the interaction with *Aeschynomene indica*. (A) Genetic organization of putative effector genes identified in strain ORS3257. Deleted regions in the mutants are indicated by horizontal lines. Insertion mutants are indicated by black arrowheads carrying the Ω sign. In yellow, putative effector genes; in orange, *nif* and *fix* genes; in blue, *nod* genes; in red, genes encoding components of the T3SS apparatus; in green, the *ttsI* gene encoding the T3SS transcriptional regulator; black arrows, *tts* boxes. (B) Number of nodules formed and nitrogen fixation activity of *A. indica* plants at 21 d after inoculation with strain ORS3257 and its mutant derivatives. Nitrogen fixation activity was measured by the acetylene reduction assay; A.U., arbitrary unit. Box plots show results of 1 representative experiment out of at least 2 independent experiments per strain (18 plants each). The central rectangle spans the first quartile to the third quartile; the bold segment inside the rectangle shows the median; and the whiskers above and below the box show the locations of the maximum and minimum value, respectively. $**P < 0.01$, and $***P < 0.001$, significant differences between WT ORS3257 and each mutant strain using a nonparametric Kruskal–Wallis test. (C) View of the root and the nodules induced by strain ORS3257 and its mutant derivatives. (Scale bars: *Upper*, 1.5 cm; *Lower*, 4 mm.) (D) Cytological analysis of the nodules induced by strain ORS3257 and its mutant derivatives observed by light (*Upper*) and confocal microscopy (*Lower*) after staining with SYTO 9 (green; live bacteria), calcofluor (blue; plant cell wall), and propidium iodide (red; infected plant nuclei and dead bacteria or bacteria with compromised membranes). (Scale bars, 500 μm.) In C and D, the white arrowheads indicate necrotic zones.

structures on a few plants (Fig. 1 *B–D* and *SI Appendix*, Fig. S5 *A* and *B*). To confirm that the phenotype of the $\Omega 7701$ mutant was due to the inactivation of *Brad3257_7701* and not because of a polar effect, a complete deletion mutant was constructed ($\Delta 7701$) into which the WT gene was subsequently reintroduced ($\Delta 7701::7701$). As shown in *SI Appendix*, Fig. S5, the phenotype of $\Delta 7701$ was similar to that of $\Omega 7701$, whereas $\Delta 7701::7701$ displayed a WT phenotype, confirming that the *Brad3257_7701* effector gene is necessary for nodule formation.

This mutagenesis analysis indicates that at least 5 effectors (NopP1, NopM1, NopAB, NopT, and *Brad3257_7701*) are required for the establishment of the NF-independent, T3SS-dependent symbiosis. Given its importance for nodulation, we next focused on the functional characterization of the *Brad3257_7701* effector, hereafter referred to as “ErnA” for “effector required for nodulation-A.”

ErnA Is a Bona Fide Type III Effector. The *ernA* gene was predicted to encode a T3E because of the presence of a *tts* box in its upstream coding region. To investigate the regulation of *ernA* in more detail, its expression was monitored in the absence and presence of genistein, a flavonoid known to induce *nod* and T3SS genes in *Bradyrhizobium* strains (16). qRT-PCR analysis showed that expression of *ernA* was 3-fold higher in the presence of genistein and that this up-regulation required the presence of the TtsI regulator (Fig. 2*A*), similarly to what was observed for the 2 T3SS genes (*rhcJ* and *nopX*) that had been included as controls in this experiment.

Homologs of *ernA* are found in several *Bradyrhizobium* strains (see below), but to our knowledge a possible role as a T3E has

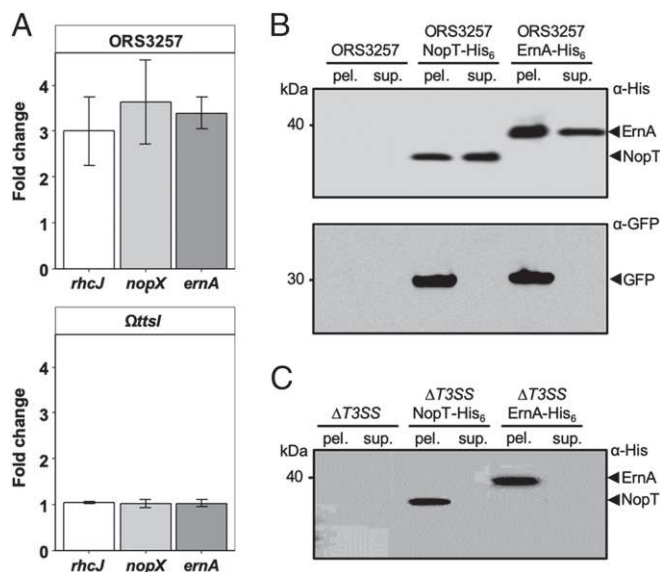


Fig. 2. The *ernA* gene encodes a bona fide T3E, and its expression is under the control of TtsI. (A) Fold change expression of *ernA* (*Brad3257_7701*) and 2 T3SS genes (*nopX* and *rhcJ*) used as controls in ORS3257 and the Ω ttsI mutant after induction with genistein. Bacteria cultivated in the absence of genistein but in presence of DMSO were used as reference. The expression levels were normalized using *adhB* (*Brad3257_3749*) transcripts. The level of expression was measured using qRT-PCR. Values represent mean \pm SD ($n = 3$). (B) ErnA of ORS3257 is secreted in the supernatant. Secreted proteins from culture supernatants (sup.) or proteins from cell pellets (pel.) of the indicated strains were subjected to immunoblot analysis with the anti-His₆ (α -His) or anti-GFP (α -GFP) antibodies. (C) ErnA of ORS3257 is secreted via the T3SS. Secreted proteins from culture supernatants (sup.) or proteins from cell pellets (pel.) of the ORS3257 Δ T3SS mutant strains were subjected to immunoblot analysis with the anti-His₆ antibody (α -His). The artifacts observed in panel C are not the result of an image treatment.

not been reported to date. To demonstrate that ErnA is secreted via the T3SS machinery, a His₆-tagged version of ErnA (ErnA-His₆) was expressed in ORS3257, thanks to the introduction of a pVO155-npt2-GFP plasmid carrying the tagged gene, which also constitutively expressed a cytosolic green fluorescent protein (GFP), used here as a control to detect cell lysis. For the purpose of comparison, a His₆-tagged version of the well-known NopT effector was also generated (20, 21). Immunoblot analysis of ErnA-His₆ and NopT-His₆ with an anti-His₆ antibody (α -His) led to the detection of ErnA and NopT in both the culture supernatant and in the cell pellet, while cytosolic GFP, detected with an anti-GFP antibody (α -GFP), was only observed in the cell pellet, confirming the absence of cytosolic proteins in the culture supernatant due to cell lysis (Fig. 2*B*). When expressed in a Δ T3SS mutant of ORS3257, ErnA-His₆ and NopT-His₆ were only detected in the cell pellet (Fig. 2*C*). Together, these data confirm that, like the previously characterized NopT protein (20, 21), ErnA is a type III-secreted protein.

ErnA Homologs Are Widespread among Bradyrhizobia and Play a Key Role in *A. indica* Nodulation. Considering the importance of ErnA in the nodulation of *A. indica* and the fact that a diverse range of nonphotosynthetic *Bradyrhizobium* strains was found to induce the formation of a nodule-like structure on this plant (14), we investigated the prevalence of ErnA homologs among available bradyrhizobial genomes. Among the 148 sequenced *Bradyrhizobium* strains, 92 were found to possess a T3SS, among which 53, i.e., more than half, have a ErnA homolog (Fig. 3*A*). Conversely, no homolog was found in *Bradyrhizobium* strains without T3SS, nor in other genera of rhizobia, except for 3 T3SS-containing *Ensifer* strains (strains BJ1, TW10, and PC2) (*SI Appendix*, Fig. S6). This finding indicates that the *ernA* gene is widespread among the *Bradyrhizobium* strains with a T3SS and its presence is rather specific to this group. Notably, the ErnA amino acid sequences are highly conserved among these strains, with an identity ranging from 55 to 100% (*SI Appendix*, Fig. S6).

The high level of conservation of this effector in a wide range of bradyrhizobia prompted us to investigate whether ErnA effectors from other bradyrhizobia may also play a role in the establishment of the NF-independent, T3SS-dependent symbiosis. To test this hypothesis, we inactivated the corresponding gene (accession number LC460804, annotated *ernA₆₁*) in the *B. elkanii* USDA61 strain, which has been shown to nodulate *A. indica* in the absence of NF synthesis (14). As previously observed (14), the WT USDA61 strain induced a high number of uninfected nodules on *A. indica*, whereas the derived T3SS mutant (USDA61 Ω *rhcJ*) had a strict Nod⁻ phenotype (Fig. 3*B*), thus confirming that the T3SS is required for nodule induction. The USDA61 Ω *ernA₆₁* mutant also displayed a nearly Nod⁻ phenotype (Fig. 3*B* and *C*), similar to that observed with the *ernA* mutant of strain ORS3257 (Fig. 1 and *SI Appendix*, Fig. S5). These findings demonstrate that ErnA homologs found in other bradyrhizobia have a similar nodulation-conferring function during the symbiotic interaction with *A. indica*.

The Introduction of *ernA* Enables the *Bradyrhizobium* Strain DOA9 to Nodulate *A. indica*. To further demonstrate the importance of ErnA for nodule formation, we used a gain-of-function approach. For this purpose, we used the *Bradyrhizobium* DOA9 strain, which is unable to nodulate *Aeschynomene* species in an NF-independent manner (14, 22), despite the presence of a functional T3SS. Consistent with this nodulation defect, *ernA* was found to be missing in DOA9 (Fig. 3*A*).

To check whether ErnA could complement a nodulation-defective rhizobial strain, we introduced the *ernA* gene from ORS3257 (*ernA₃₂₅₇*) into DOA9 and its T3SS mutant (DOA9 Ω *rhcN*). As shown in Fig. 3*B* and *C*, the DOA9::*ernA₃₂₅₇* strain was able to induce nodules on *A. indica* unlike the WT strain containing the empty vector (DOA9-pMG103) or the T3SS mutant strain expressing

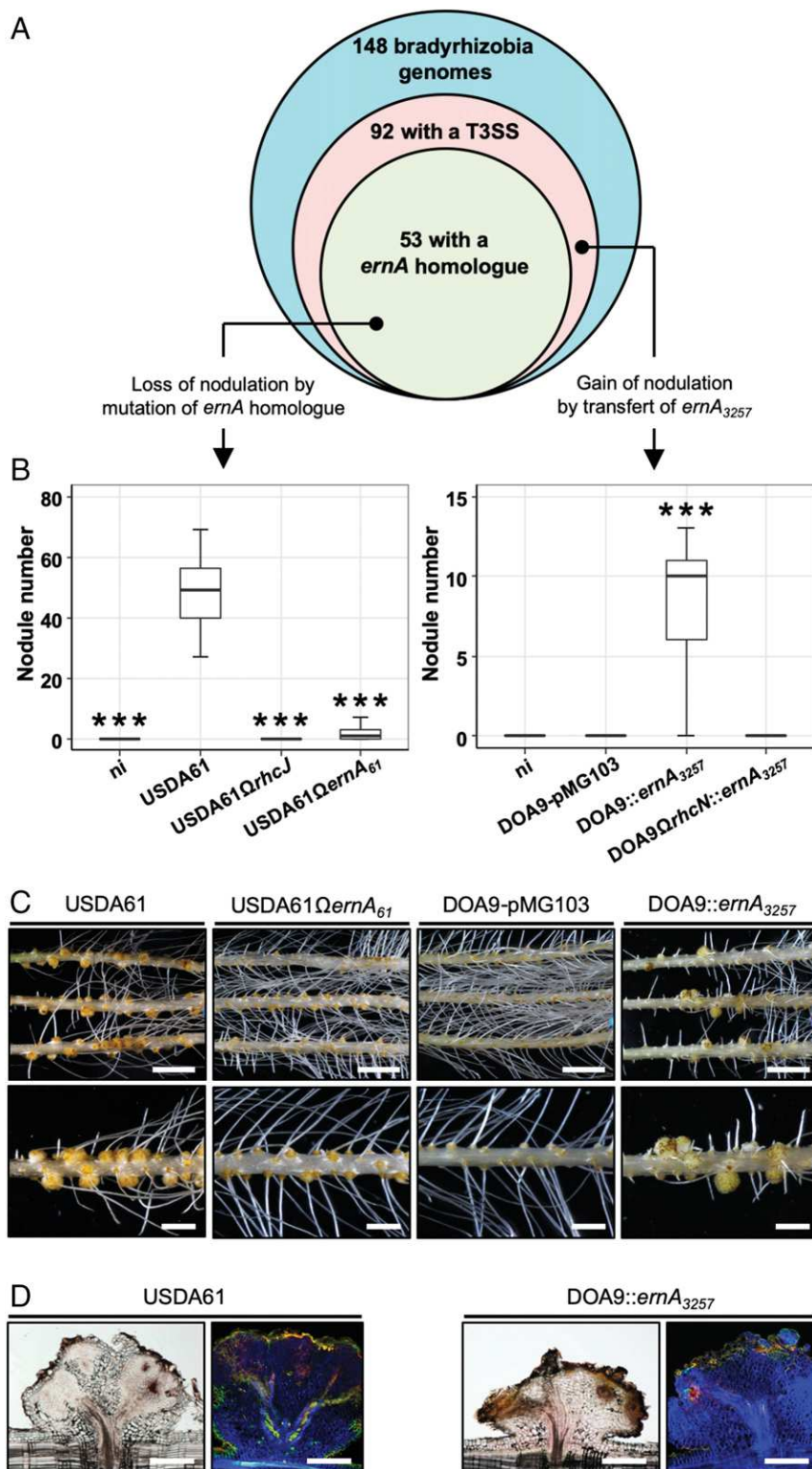


Fig. 3. Distribution of *ernA* genes among bradyrhizobia and symbiotic role in other strains after mutation or transfer. (A) Venn diagram representing the number of *Bradyrhizobium* strains with an available genome sequence and the proportion with a T3SS as well as a homolog of *ernA*. (B–D) Symbiotic properties on *A. indica* of 1) *B. elkanii* strain USDA61 and its mutant derivatives affected in the T3SS apparatus (USDA61ΩrhcJ) and the *ernA* homolog (USDA61ΩernA₆₁), and 2) *Bradyrhizobium* sp. strain DOA9 derivatives (WT and the T3SS mutant DOA9ΩrhcN) containing the empty vector pMG103 or *ernA*₃₂₅₇ cloned into pMG103. (B) Number of nodules formed on *A. indica* plants at 21 d after inoculation with the indicated strains. Box plots show results of 1 representative experiment out of at least 2 independent experiments per strain (18 plants each). The central rectangle spans the first quartile to the third quartile; the bold segment inside the rectangle shows the median; and the whiskers above and below the box show the locations of the maximum and minimum value, respectively. ****P* < 0.001, significant differences between the WT strain and each mutant strain using a nonparametric Kruskal–Wallis test. (C) View of the roots and nodules elicited by the indicated strains. (Scale bars: Upper, 1.5 cm; Lower, 4 mm.) (D) Cytological analysis of the nodules elicited by the various strains tested. (Scale bars, 500 μm.)

*ernA*₃₂₅₇ (DOA9 Ω *rhcN::ernA*₃₂₅₇). However, most of the nodules looked similar to those induced by the USDA61 strain, i.e., had no infected central tissue but did have some necrotic zones (Fig. 3D). These observations show that the introduction of *ernA* into DOA9 confers the ability to nodulate *A. indica*, but the symbiotic process remains incomplete, probably due to the presence of incompatibility factors and/or to the lack of certain factors that are needed to complete the infection process. Taken together, all these different experiments confirm that ErnA confers to bacteria the ability to form nodules on *Aeschynomene*.

ErnA Is Targeted to the Plant Nucleus. Alignment of the deduced amino acid sequences of ErnA homologs revealed the existence of 2 ErnA versions that differ in the presence or absence of an 80-amino acid domain at the N-terminal end of the protein (*SI Appendix*, Fig. S6). Both versions seem to play a similar role in triggering nodulation since mutation of the short (in strain ORS3257) and long form (in strain USDA61) led to the same Nod⁻ phenotype in *A. indica*. A close examination of the 2 versions did not enable us to identify homology with known functional domains. However, a nuclear localization signal (NLS) present in the conserved N-terminal part of all ErnA homologs (*SI Appendix*, Fig. S6) was predicted using NLS mapper (23).

To investigate the subcellular localization of ErnA in plant cells, ErnA was C-terminally fused with enhanced GFP (ErnA-eGFP) and transiently expressed in *Nicotiana benthamiana* leaf cells upon *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. The GFP fluorescence was analyzed by laser-scanning confocal microscopy 48 h after infiltration. Consistent with the identification of a putative NLS motif, ErnA-eGFP was found to accumulate exclusively in the plant nucleus (Fig. 4A). The function of the NLS domain was verified by generating an ErnA Δ NLS mutant C-terminally fused with eGFP (ErnA Δ NLS-eGFP), which was found to display a nucleocytoplasmic distribution when transiently expressed in *N. benthamiana* cells (Fig. 4A). The fact that the ErnA Δ NLS-eGFP version is still partially maintained in the nucleus might be explained by passive diffusion across the nucleus membrane given the relatively small size of the ErnA-eGFP protein (67 kDa).

Whether ErnA could also be targeted to the plant nucleus via secretion and injection through a T3SS was investigated using the GFP-strand complementation system that enables direct visualization of the bacterial delivery of effectors into host cells (24). Briefly, GFP is composed of 11 beta strands; when split into 2 parts consisting of strands 1 to 10 (GFP₁₋₁₀) and strand 11 (GFP₁₁), both (poly)peptide chains spontaneously reassemble into a functional GFP protein, provided that they are localized in the same cellular compartment. In this system, GFP₁₋₁₀ is constitutively expressed in stably transformed plant cells. When a bacterial effector tagged with the 11th strand of GFP (effector-GFP₁₁) is delivered *in planta*, GFP₁₋₁₀ and effector-GFP₁₁ reconstitute a fluorescent GFP molecule whose subcellular localization can be monitored. A construct containing ErnA fused with GFP₁₁ (ErnA-GFP₁₁) was introduced into *Pseudomonas fluorescens* (Pfo-1) cells, allowing T3SS-dependent delivery of the tagged effector. Twelve hours after infiltration of Pfo-1(*ernA-gfp*₁₁) cells into *Arabidopsis thaliana* Col-0 leaves constitutively expressing GFP₁₋₁₀, GFP fluorescence was detected in almost 90% of the observed host cell nuclei (Fig. 4B), confirming the localization deduced from the transient expression assay performed in *N. benthamiana* (Fig. 4A). As a negative control, when the ErnA effector lacking the GFP₁₁ (ErnA-3HA) was delivered by Pfo-1 cells in the GFP₁₋₁₀ transgenic line, no fluorescence could be detected (Fig. 4B). Collectively, these data demonstrate that the ErnA effector is translocated into the host cell and specifically targeted to the plant nucleus.

ErnA Binds Nucleic Acids in Plant Cell Nuclei. To better understand the mode of action of ErnA in the nucleus, we investigated whether it can interact with nuclear nucleic acids. To this end, we performed a FRET-FLIM (fluorescence resonance energy transfer with fluorescence lifetime imaging microscopy) assay dedicated to the detection of protein–nucleic acid interactions *in planta* (25). The nuclear targeted ErnA-eGFP fusion protein (Fig. 4A) was used as the donor fluorophore. Nuclear nucleic acids were converted into FRET acceptors with a DNA-binding fluorescent dye (SYTOX Orange). In the absence of SYTOX Orange treatment, an average GFP lifetime of 2.30 ns was measured (Fig. 4C and *SI Appendix*, Table S3). A significant decrease in the ErnA-eGFP lifetime was observed (1.94 ns) in SYTOX Orange-treated samples due to FRET, indicating a close association between the ErnA-eGFP partner (donor) and the stained nuclear nucleic acids (acceptor) (Fig. 4C and *SI Appendix*, Table S3). To verify that the detection of such FRET was not due to the overaccumulation of ErnA-eGFP in SYTOX Orange-stained nuclei, we used as a negative control a variant of the *Arabidopsis* RRS1 immune receptor (RRS1-KR) whose ability to interact with DNA is abolished by a mutation in its DNA-binding domain (26). As expected, no FRET could be detected in SYTOX-treated leaf samples expressing RRS1-KR-eGFP (*SI Appendix*, Table S3). Together, these data support the idea that ErnA-eGFP is closely associated with nucleic acids in the plant nucleus.

The Ectopic Expression of ErnA in *A. indica* Roots Activates Organogenesis of Root- and Nodule-Like Structures. In order to obtain further evidence for the ability of ErnA to trigger nodule organogenesis, transgenic hairy root lines of *A. indica* overexpressing *ernA* under the control of the 35S promoter and expressing DsRed as a marker for transformation were generated and grown in the absence of bradyrhizobia. The production of the effector was verified by immunoblot analysis with an ErnA-specific antibody (α -ErnA) (*SI Appendix*, Fig. S7). As early as 3 wk after transformation, some roots expressing *ernA* displayed a succession of small bumps highlighted by strong DsRed fluorescence (Fig. 5B). After 7 wk of growth, a pronounced change in the root architecture was observed in 105 out of 135 *ernA*-overexpressing plants. This change was characterized by a large number of closely spaced swellings or protrusions all along the apical–basal axis of the root (Fig. 5C and D). In root sections, 2 different types of protrusions were distinguishable. In the first type, the protrusions looked like emerging lateral roots whose development was interrupted (Fig. 5E–H). This type of protrusion was located all around the transformed roots and contained central vascularization (Fig. 5H). In rare cases, new meristems were visible all along these lateral root-like structures (Fig. 5I). The second type of protrusion resembled nodule primordia (Fig. 5J–N). These protrusions were generally located on one side of the root and were often associated with an accumulation of brownish compounds, suggesting the occurrence of a plant defense response (Fig. 5J and K). These protrusions were also more round in shape and were associated with central tissue composed of small dividing cells (Fig. 5L–N). Occasionally, large tumor-like structures were also observed on plants overexpressing *ernA* (Fig. 5O and P). Staining the nuclei with propidium iodide revealed that the structures were composed of an agglomeration of meristems (Fig. 5P). None of these phenotypes were observed in the 93 plants that were transformed with the empty vector (Fig. 5A). Altogether, these results demonstrate that, in the absence of bradyrhizobia, ErnA alone is capable of inducing cell divisions, ultimately leading to the initiation of new meristems.

Discussion

The knowledge that certain bradyrhizobia can activate the nodulation process in some legume plants in the absence of NF signaling but in a T3SS-dependent manner has only recently emerged (13, 14). Here, we significantly advanced our understanding

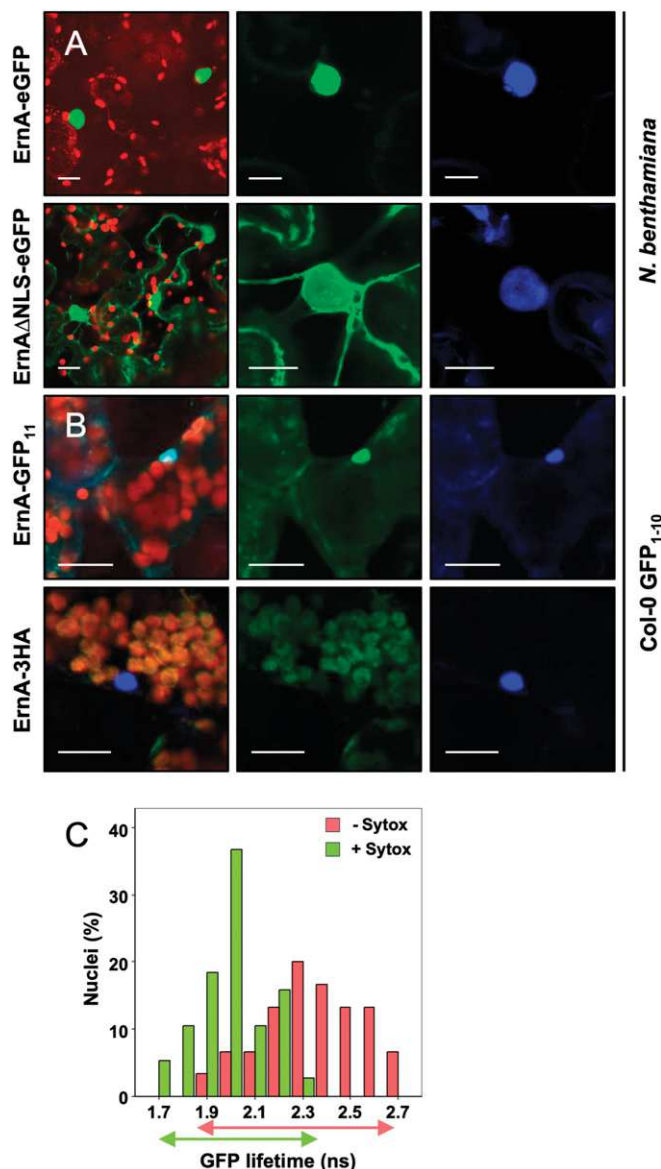


Fig. 4. ErnA is targeted to the plant cell nucleus and interacts with nucleic acids. (A) GFP fluorescence observed in *N. benthamiana* leaves transiently expressing ErnA-eGFP or ErnA Δ NLS-eGFP. GFP was visualized by confocal microscopy 48 h after *Agrobacterium* infiltration of the leaves. From *Left to Right*: an overlay of GFP and chlorophyll fluorescence from transformed leaf cells, and the GFP and DAPI fluorescence spectrum of a representative nucleus from a transformed cell. Staining with DAPI was used to visualize nuclei. At least 10 nuclei were observed, and all of them showed the same distribution pattern of DAPI staining and GFP fluorescence. (Scale bars, 15 μ m.) (B) Visualization of ErnA-GFP₁₁ in *Arabidopsis* cells after its secretion and injection by *P. fluorescens*. Three-week-old *Arabidopsis* Col-0 plants expressing GFP₁₋₁₀ were infiltrated with *P. fluorescens* expressing either ErnA-GFP₁₁ or ErnA-3HA. Reconstituted GFP was visualized by confocal microscopy 12 h postinfiltration. From *Left to Right*: an overlay of GFP, DAPI, and chlorophyll fluorescence spectrum, and the GFP and DAPI fluorescence spectrum, respectively. Staining with DAPI was used to visualize nuclei. (Scale bars, 15 μ m.) (C) GFP lifetime distribution of nuclear ErnA-eGFP in presence or in absence of SYTOX Orange. FRET-FLIM measurements (SI Appendix, Table S3) were performed as described in *Methods*. Histograms show the distribution of nuclei (in percentage) according to classes of GFP lifetime value (in nanoseconds) in the absence (red bars) or in the presence (green bars) of the SYTOX Orange acceptor. The measured lifetimes of ErnA-eGFP were clearly shifted to lower values in the presence of SYTOX Orange compared to samples without the acceptor (indicated by partial overlap between green and orange arrows spanning relative GFP lifetime classes).

of this alternative symbiotic process by showing that it relies on a subtle mixture of at least 5 effectors playing synergistic and complementary roles (Fig. 6). The effectors NopM1 and NopP1 most probably act together to suppress the plant immune responses and are required to maintain a chronic intracellular infection. The NopAB and NopT effectors appear to play a role in early steps of the symbiotic process and are required for efficient nodule infection. Finally, we identified the effector ErnA as a key factor to form nodules.

Three of these 5 effectors (NopM1, NopP1, and NopT) have already been characterized in other rhizobia. NopM and NopP play a positive role during the interaction between *Ensifer fredii* NGR234 and several legumes species, as mutants in these genes induced fewer nodules (20, 27). Both are thought to suppress plant defense reactions. NopM, which has an E3 ubiquitin ligase domain, reduces the production of flagellin elicitor-induced reactive oxygen species when transiently expressed in *N. benthamiana* (19). NopP is phosphorylated by plant kinases, but so far it is not known whether this phosphorylation interferes with plant defense signaling (18). NopT also plays a positive role in *E. fredii* NGR234 during the interaction with *Phaseolus vulgaris* and *Tephrosia vogelii* (28). NopT effectors are cysteine proteases belonging to the YopT-AvrPphB effector family, which localize at the cytoplasmic membrane of the host cell, but their modes of action remain unknown. Interestingly, the NopT homolog in *Yersinia pestis*, named YopT, has been reported to affect the actin cytoskeleton of the host cell by modulating the function of Rho GTPases (29). Considering that assembly of actin filament networks is critical during the endocytotic uptake of rhizobia in symbiosomes (30), NopT probably plays a direct role in the infection process. The 2 other effectors, NopAB and ErnA, have never been reported to play a symbiotic role even though both have homologs in a diverse range of bradyrhizobia. The NopAB and ErnA effectors do not show homology with known functional domains.

Here, we provide evidence that ErnA localizes in the host nucleus and binds nucleic acids. From these data, it is tempting to hypothesize that ErnA associates with nuclear nucleic acids to manipulate host gene expression. Further experiments are necessary to determine whether the function of ErnA depends on this nuclear localization and whether its nucleic acid binding properties are linked with transcriptional programming. Interestingly, transformed roots of *A. indica* expressing ErnA displayed numerous meristem-like structures all along the root, a phenotype reminiscent of the one observed in *Arabidopsis* root explants grown on medium containing auxin (31). It is therefore possible that ErnA positively influences plant cell division by modulating the cytokinin/auxin balance, 2 key phytohormones governing nodule and root meristem induction (32). Interestingly, similar structures have also been observed in *Lotus japonicus* overexpressing the NIN or NF-Y transcription factors, which are key components of the NF signaling pathway controlling nodule organogenesis (33, 34). However, the nature of the organs induced by the expression of *ernA* remains unclear, and the question whether ErnA-mediated organogenesis activates the common symbiosis signaling pathway needs to be addressed.

To our knowledge, ErnA is the only rhizobial effector reported to play a direct role in nodule development. Interestingly, a parallel can be drawn with some pathogenic T3Es reported to induce gall formation, such as HsvG or HsvB identified in *Pantoea agglomerans* or to induce cytokinin signaling such as the *Pseudomonas syringae* HopQ1 effector (35, 36). To better understand the mode of

Values were obtained from 8 different foliar discs collected 48 h post-infection and obtained from 2 independent experiments. Notably, upon transient expression of *ernA* in *N. benthamiana* leaves, no callus development or any other morphological changes were observed.

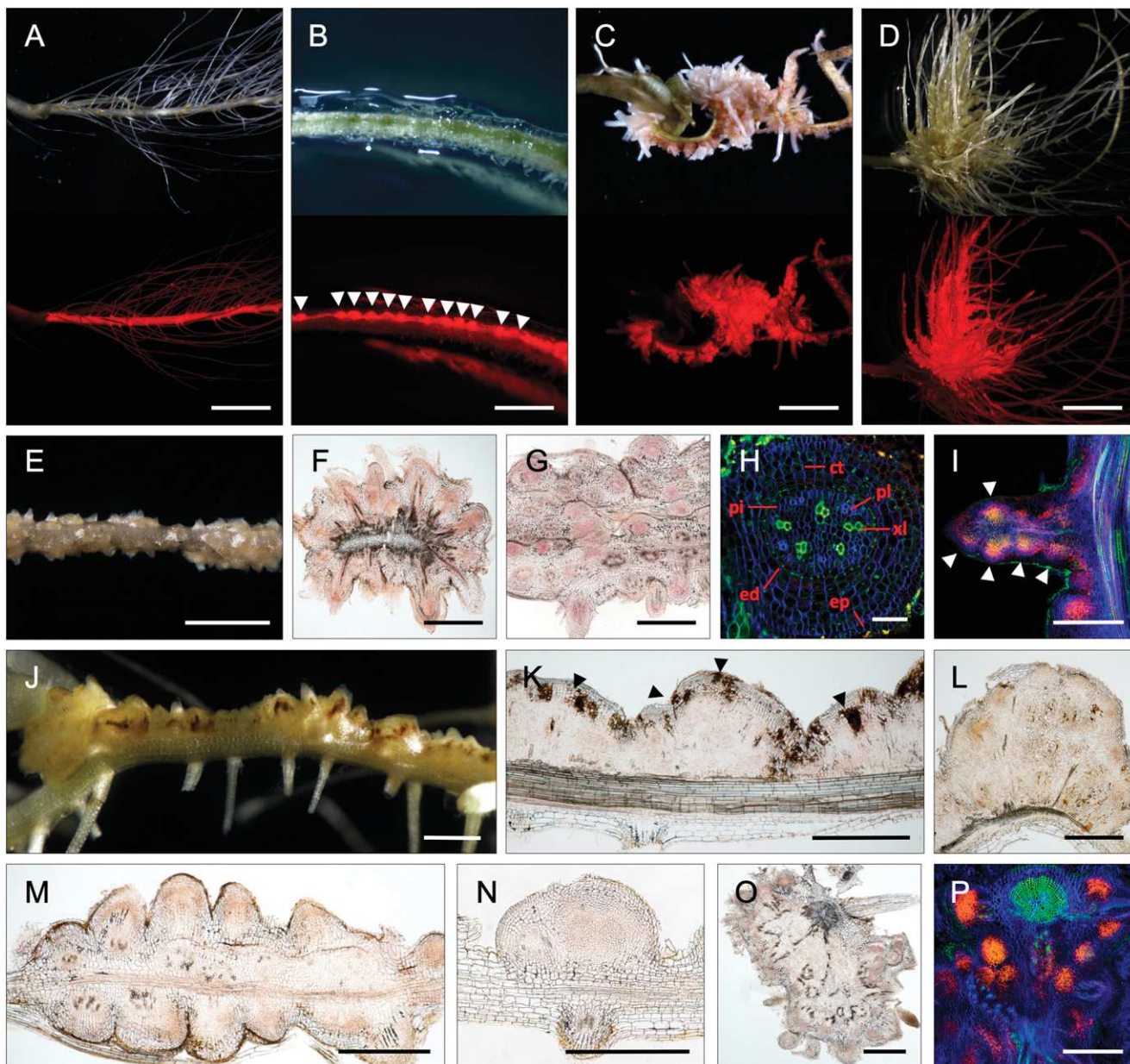


Fig. 5. ErnA induces meristematic protuberances. (A–D) *A. indica* roots transformed with either the empty vector containing the DsRed marker (A) or *p35S-ernA* (B–D) and observed by a light (Upper) or a fluorescent (Lower) stereomicroscope equipped with a DsRed filter. Observations were made at 3 wk (B) or 7 wk (A, C, and D) after transformation in the absence of bradyrhizobia. White arrowheads in B indicate the formation of small bumps. (E–I) Lateral root-like structures induced by *p35S-ernA* observed 7 wk after transformation. View of lateral root-like structures (E). Cross-sections of transformed roots forming lateral root-like structures (F and G). (H and I) Confocal microscopy of lateral root-like structures using staining with SYTO 9 (green; xylem vessels), calcofluor (blue; plant cell wall), and propidium iodide (red; plant nuclei). In H, abbreviations: ct, cortical cells; ed, endoderm; ep, epiderm; pi, pericycle; pl, phloem; xl, xylem vessels. In I, white arrowheads indicate new meristems. (J–N) Root nodule-like primordia structures induced by *p35S-ernA*. View of the root nodule-like primordia (J). Longitudinal sections of root nodule-like primordia (K–N). In K, black arrowheads indicate necrotic zones. (O and P) Cross-sections of tumor-like structures observed either by light (O) or by confocal microscopy (P) after staining as in H and I. (Scale bars: A, C, and D, 1.5 cm; B, E, and J, 2 mm; F, G, I, and K–P, 500 μ m; H, 50 μ m.)

action of ErnA, our next challenge is to identify its target(s) and to investigate whether there is a link between ErnA and the NF-dependent signaling pathway.

The key role of ErnA in nodule formation is strengthened by the observation that the 2 *ernA* mutants in USDA61 and ORS3257 strains lost their ability to nodulate *A. indica*. Moreover, introducing *ernA* in the nodulation-defective *Bradyrhizobium* strain DOA9 made it capable of inducing nodules. It should be noted that several *Bradyrhizobium* strains containing *ernA*, such as *B. diazoefficiens* USDA110, and USDA122, and *B. japonicum* USDA124, are un-

able to induce nodules on *A. indica* (14). This suggests that, besides ErnA, other factors have to act in concert to establish NF-independent, T3SS-dependent nodulation. Moreover, we cannot exclude the possibility that these strains deliver effectors that activate host immune responses, thereby rendering the interaction incompatible. Finally, it is possible that despite the high conservation of the proteins in the bradyrhizobia, some ErnA variants have different nodule-inducing abilities.

In most bradyrhizobia, the T3SS gene cluster colocalizes with the *nod* gene cluster. This indicates that the T3SS is an integral

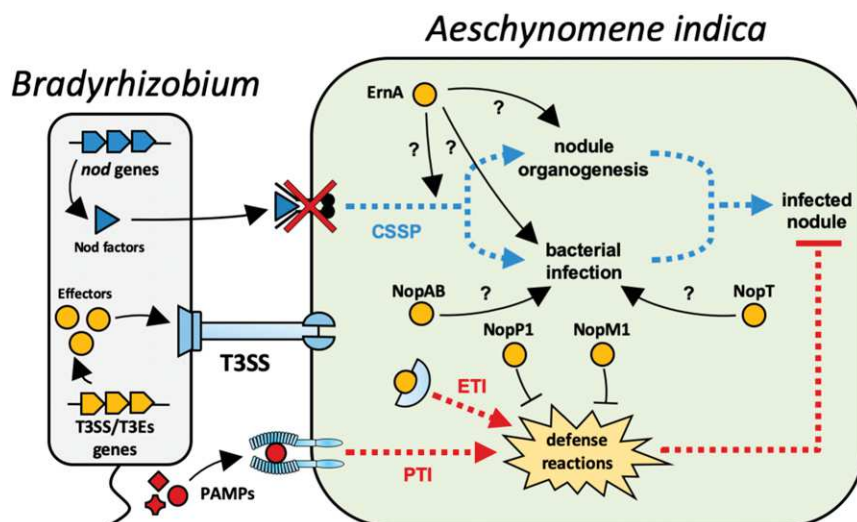


Fig. 6. Proposed model for the NF-independent, T3SS-dependent symbiotic process between *Bradyrhizobium* ORS3257 and *A. indica*. The symbiosis between ORS3257 and *A. indica* does not involve NFs but depends on a mixture of T3Es delivered into the host cell where they act in concert for nodulation. NopP1 and NopM1 suppress plant defense responses resulting from the activation of PTI and/or ETI. Both NopAB and NopT effectors promote bacterial infection of the nodule, directly or indirectly. The ErnA effector triggers organ development either by activating the common symbiosis signaling pathway (CSSP) or by a yet-unknown mechanism. Moreover, we cannot exclude that ErnA is also involved, directly or indirectly, in the infection process.

part of the arsenal of tools available to the bacteria to enable a symbiotic interaction with legumes. Until now, this T3SS machinery was viewed as accessory equipment that modulates the host spectrum of the bacteria by interfering with plant immune responses. The discovery that a single effector protein, widely distributed among bradyrhizobia, is capable of inducing nodule organogenesis, suggests that legume nodulation programs, which until now were considered to be under the (almost) exclusive control of NFs and the common symbiosis signaling pathway, can also be regulated by T3SS effectors in a wide range of rhizobium–legume interactions. This is a major breakthrough in the field that could pave the way for designing strategies to transfer nodulation to nonleguminous plants.

Methods

Bacterial Strains and Growth Conditions. *Bradyrhizobium* strains ORS3257, DOA9, and USDA61 and their derivatives (*SI Appendix, Table S4*) were grown in yeast mannitol medium (37) at 34 °C. *Escherichia coli* strains were grown at 37 °C in Luria–Bertani (LB) medium (38). *Agrobacterium rhizogenes* Arqua1 and *A. tumefaciens* GV3101 were grown at 28 °C in arabinose–gluconate medium (39) and *P. fluorescens* was grown in King’s B medium (40). When required, the media were supplemented with the appropriate antibiotics at the following concentrations: 50 µg/mL kanamycin, 20 µg/mL nalidixic acid, 20 µg/mL cefotaxime (Cefo), and 100 µg/mL spectinomycin.

Plasmid Construction, Mutagenesis, and Complementation. Standard molecular biology techniques were used for all cloning procedures. All constructions made in this study are listed in *SI Appendix, Table S4*, which also includes the primers and the cloning strategies. For the construction of insertional mutants (obtained by single crossing-over), a 250- to 350-bp internal fragment of the target gene was amplified by PCR and cloned into the nonreplicative plasmid pVO155-npt2-GFP-npt2-Cefo (14). For the construction of deletion mutants (obtained by double crossing-over), 750- to 1,000-bp PCR fragments corresponding to the upstream and downstream flanking regions of the locus of interest were merged by overlap extension PCR and cloned into pNPTS129, which carries the *sacB* gene (41). Subsequently, a Cefo resistance cassette was introduced between the upstream and downstream flanking regions previously cloned into the pNPTS129 plasmid. The resulting plasmids were then transferred by conjugation into *Bradyrhizobium* strains as described previously (42). Single recombinant mutants were obtained by growing the bacteria on plates containing a selective antibiotic and subsequently verified by diagnostic PCR. Deletion mutants were selected in a subsequent step in which bacteria were grown on sucrose–Cefo plates. Sucrose- and Cefo-resistant clones were checked for loss of kanamycin re-

sistance from the pNPTS129 plasmid, and kanamycin-sensitive clones were screened by PCR for the deletion of the corresponding genomic DNA region.

For complementation experiments of the ORS3257Δ7701 mutant, a PCR fragment encompassing the *Brad3257_7701* gene including the 500-bp upstream promoter region was cloned into pVO155-npt2-GFP (14) and reintroduced into the Δ7701 mutant by single crossing-over. The same DNA region was also cloned into pMG103-npt2-cefo-npt2-GFP and transferred into DOA9 by electroporation as previously described (43).

Plant Cultivation and Symbiotic Analysis. *A. indica* plants were grown and inoculated as previously described (14). Eighteen plants per condition were taken at 21 d postinoculation for nodulation and nitrogen fixation assays, and the number of nodules and nitrogenase activity were analyzed as previously described (44). The experiments were carried out at least in duplicate. For microscopic analysis, nodules and transformed roots were harvested and observed directly or upon embedding in agarose (4%), and then freshly sliced into 30-µm sections with a Leica VT1200S vibratome (Leica Microsystems). The nodule sections were incubated for 15 min in live/dead staining solution (LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit; Molecular Probes) and then analyzed as previously described (14).

Expression Analyses. *Bradyrhizobium* WT strain ORS3257 and its *ΩttsI* mutant were cultivated in BNM-B minimal medium (45). When the OD₆₀₀ reached ~0.4, 5 µM genistein dissolved in DMSO or DMSO alone was added, and the cultures were harvested after 24 h. Total RNA was extracted using the Ribopure Bacteria kit (Ambion) and treated with DNase I (Qiagen). One hundred nanograms of total RNA per sample were reverse transcribed using SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen) and random hexamer primers, following the supplier’s protocol. Real-time qPCR was performed using the Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies). Transcript levels were normalized to the expression of the *adhB* gene (*Brad3257_3749*). Primers used to amplify *adhB*, *rhcN*, *nopX*, and *ernA* transcripts are listed in *SI Appendix, Table S5*.

Production of Anti-ErnA Antibody. An *E. coli* BL21 strain expressing His₆-tagged ErnA from strain ORS3257 was constructed. A PCR fragment of the *ernA* gene from the start to the last codon before the stop was amplified using a reverse primer containing an in-frame His₆-tag sequence and a stop codon. The PCR product was cloned into the pET-29b vector (Merck) (*SI Appendix, Table S4*), and the resulting construct was introduced into the *E. coli* strain BL21.

The *E. coli* BL21 ErnA-His₆ strain was grown for 3 h at 37 °C in LB medium supplemented with 5 mM IPTG to induce the expression of the ErnA-His₆ protein. Cells were harvested by centrifugation, resuspended in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 20 mM imidazole, 500 mM NaCl buffer, and disrupted by sonication. After centrifugation at 20,000 × g at 4 °C for 30 min, His₆-tagged

protein was purified as described by Marty et al. (46). Purified protein was used for the production of rabbit polyclonal antibodies (Agro-Bio). Two rabbits were immunized by injecting 1 mg of purified protein and exsanguinated after 42 d to collect antiserum.

Immunoblot Analysis. Six hundred milliliters of BNM-B minimal medium were inoculated with 3-mL precultures of the ORS3257 and $\Delta T355$ strains containing a His₆-tagged version of *ernA* or *nopT* (see *SI Appendix, Table S4* for the constructions). Bacteria were cultivated at 28 °C for 48 h in the presence of genistein (5 μ M) at 200 rpm. To prepare proteins from the culture supernatant, bacterial cells and exopolysaccharides were separated from the supernatant in 2 centrifugation steps (first step: 1 h, 4,000 \times g, 4 °C; second step: 30 min, 8,000 \times g, 4 °C). Proteins in the supernatant were precipitated using trichloroacetic acid as previously described (47) and resuspended in 75 μ L of NuPAGE LDS Sample Buffer (#NP0007; Thermo Fisher) for SDS/PAGE analysis. For analysis of cellular proteins, bacterial cells were resuspended in 5 mL of solubilization buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 20 mM imidazole, and 300 mM NaCl) and lysed by 5 freeze–thaw cycles in liquid nitrogen. After centrifugation (30 min, 8,000 \times g, 4 °C), 4 \times LDS Sample Buffer was added to the supernatant corresponding to the soluble proteins of the cell. Protein solutions (25 μ L) from bacterial cells and culture supernatants were separated on 12.5% SDS/PAGE gels and transferred to polyvinylidene difluoride membranes. The membranes were then blocked for 1 h in PBSTM buffer (PBS, 0.1% Tween 20, 5% nonfat milk). The appropriate antibodies were added to the PBSTM and the membranes were incubated for 2 h at room temperature. Mouse antibodies were used at the following dilutions: anti-His₆-tag (#SAB1305538; Merck), 1:1,000, and anti-GFP (#SAB4200681; Merck), 1:2,000. The membranes were then incubated for 2 h with peroxidase-conjugated anti-mouse IgGs (1:500; #A9044; Merck). Immunoblotted proteins were detected by chemiluminescence using the Pierce ECL Plus Western Blotting Substrate (#32132; Thermo Fisher) according to the manufacturer's protocols.

To confirm expression of *ernA* in transformed roots of *Aeschynomene*, total protein extracts from 200 mg of roots were obtained using the Plant Total Protein Extraction Kit (#PE0230; Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's protocols. Approximately 10 mg of protein were used for Western blot analysis as described above using the anti-ErnA antibody diluted at 1:1,000 and an anti-rabbit antibody (#AP132P; Merck) diluted at 1:500.

Effector Delivery in *Arabidopsis thaliana*. The *ernA-gfp₁₁* DNA fragment constructed as described in *SI Appendix, Table S4*, was cloned into the pBBR-GWY-3HA (26) destination vector, thus allowing the expression of *ernA-gfp₁₁* in *Pseudomonas fluorescens* (Pfo-1) cells. The effector delivery assay using syringe infiltration was performed on 3-wk-old plants of *Arabidopsis* Col-0 *GFP₁₋₁₀* using *Pfo-1(ernA-gfp₁₁)* cells resuspended in 10 mM MgCl₂ (OD₆₀₀ = 0.2). Discs (6 mm) of infiltrated leaves were collected 12 h post-inoculation, mounted on a glass slide, and covered with a coverslip. Images were acquired with a confocal microscope (Leica; SP2 AOBs) using a 40 \times water-immersion lens (numerical aperture [N.A.] 0.8). For excitation, a 405-nm ray line of a diode laser and the 488-nm ray line of an argon laser were used and the emitted fluorescence collected in the blue range between 410 and 470 nm and in the green range between 500 and 530 nm.

***Agrobacterium tumefaciens* Infiltration Assays in *Nicotiana benthamiana*.** Plasmid *p35S-ernA-gfp* expressing ErnA-eGFP under the control of the 35S promoter (*SI Appendix, Table S4*) was introduced into *A. tumefaciens* strain GV3101 by electroporation (48). Leaves from 4-wk-old *N. benthamiana* plants were infiltrated using a needleless syringe containing bacteria resuspended in infiltration buffer (10 mM MgCl₂; 10 mM MES-KOH, pH 5.6; 150 μ M acetosyringone) and adjusted to OD₆₀₀ = 0.5.

After 48 h following *A. tumefaciens* infiltration, *N. benthamiana* leaf samples were incubated in 5 μ g/mL DAPI solution (4',6-diamidino-2-phenylindole; Sigma) for 30 min. Localization of fluorescently labeled ErnA was observed with a confocal microscope (Leica SP2 AOBs) using the 488-nm ray line of an argon laser for excitation, the green (GFP) and the blue (DAPI) emitted fluorescence being collected between 510/550 nm and 410/470 nm, respectively.

Preparation of Leaf Samples for FRET-FLIM Assays. Leaf samples were prepared as previously described (26). *A. tumefaciens*-infiltrated *N. benthamiana* leaf disk samples (8 mm in diameter, harvested 48 h after infiltration) were vacuum-infiltrated with a TBS buffer (Tris-HCl, 25 mM, pH 7.5; NaCl, 140 mM; KCl, 3 mM) containing 4% (wt/vol) paraformaldehyde and incubated for 20 min at 4 °C. The fixed samples were permeabilized by incubation in proteinase K solution (Tris-HCl, 50 mM, pH 7.5; NaCl, 100 mM; EDTA, 1 mM; SDS, 0.5%; 200 μ g/mL of proteinase K [Invitrogen]) for 10 min at 37 °C. Nucleic acid staining was performed by vacuum-infiltrating a 5 μ M SYTOX Orange (Invitrogen) solution in TBS buffer and incubating samples for 30 min at room temperature in the dark. Fixed leaf discs were washed with and mounted on TBS buffer before observations on an inverted microscope (Eclipse TE2000E; Nikon).

FRET-FLIM Measurements. Fluorescence lifetime measurements were performed with a FLIM system based on a time domain approach using a streak camera, as previously described (26). The light source was a laser picosecond pulse source (PLP 481 nm, pulse duration of 70 ps, 340-mW peak pulse power; Hamamatsu Photonics) with a fundamental frequency of 20 MHz. All images were acquired with a 60 \times oil-immersion lens (Plan APO, 1.4 N.A., IR) mounted on an inverted microscope (Eclipse TE2000E; Nikon). The pulse laser emission was directed back into the detection unit through a dichroic mirror (495/25 nm) and a bandpass filter (520/25 nm). The detector was a 20-MHz streak camera (Streakscope C10627; Hamamatsu Photonics) coupled to a fast and high-sensitivity CCD camera (model C8800-53C; Hamamatsu Photonics). For each nucleus, average fluorescence decay profiles were plotted and lifetimes were estimated by fitting data with exponential function using a nonlinear least-squares estimation procedure (25). Fluorescence lifetime of the donor (GFP) was experimentally measured in the presence and absence of the acceptor (SYTOX Orange). FRET efficiency (E) was calculated by comparing the lifetime of the donor in the presence (τ_{DA}) or absence (τ_D) of the acceptor: $E = 1 - (\tau_{DA}/\tau_D)$. Statistical comparisons between control (donor) and assay (donor + acceptor) lifetime values were performed by Student's *t* test. For each experiment, 8 leaf discs obtained from 4 *A. tumefaciens*-infiltrated leaves were used to collect data.

Hairy Root Transformation with *Agrobacterium rhizogenes*. Plasmid *p35S-ernA* containing *ernA* under the control of the 35S promoter (see *SI Appendix, Table S4*, for the construction) and the empty vector pJCV51 with the DsRed marker (<https://gateway.psb.ugent.be>) were introduced by electroporation into the *A. rhizogenes* ARqua1 strain used for hairy root transformations. *A. indica* roots were transformed following previously described procedures (39). The plant roots were observed at 3 and 7 wk posttransformation.

ACKNOWLEDGMENTS. We thank Dr. Gitta Coaker for providing the Col-0 35S-GFP₁₋₁₀ plants. This work was supported by grants from the French National Research Agency (Grant "SymEffectors"; ANR-16-CE20-0013) and from the Franco-Japanese Cooperation Program (Partenariat Hubert Curien SAKURA 2017; Grant 35920RL). L.D. is supported by the ANR Project RADAR (ANR15-CE20-0016-01) and the French Laboratory of Excellence Project TULIP (ANR-10-LABX-41; ANR-11-IDEX-0002-02). A.T. was supported by a PhD fellowship from the French Ministry of National Education, Higher Education and Research.

- P. Lerouge et al., Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature* **344**, 781–784 (1990).
- G. E. Oldroyd, J. D. Murray, P. S. Poole, J. A. Downie, The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annu. Rev. Genet.* **45**, 119–144 (2011).
- F. Berrabah, P. Ratet, B. Gourion, Legume nodules: Massive infection in the absence of defense induction. *Mol. Plant Microbe Interact.* **32**, 35–44 (2019).
- B. Gourion, F. Berrabah, P. Ratet, G. Stacey, Rhizobium-legume symbioses: The crucial role of plant immunity. *Trends Plant Sci.* **20**, 186–194 (2015).
- Y. Cao, M. K. Halane, W. Gassmann, G. Stacey, The role of plant innate immunity in the legume-rhizobium symbiosis. *Annu. Rev. Plant Biol.* **68**, 535–561 (2017).
- W. J. Deakin, W. J. Broughton, Symbiotic use of pathogenic strategies: Rhizobial protein secretion systems. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 312–320 (2009).
- R. Q. Notti, C. E. Stebbins, The structure and function of type III secretion systems. *Microbiol. Spectr.* **4**, VMBF-0004-2015 (2016).
- A. P. Tampakaki, Commonalities and differences of T35Ss in rhizobia and plant pathogenic bacteria. *Front. Plant Sci.* **5**, 114 (2014).
- C. Staehelin, H. B. Krishnan, Nodulation outer proteins: Double-edged swords of symbiotic rhizobia. *Biochem. J.* **470**, 263–274 (2015).
- H. Miwa, S. Okazaki, How effectors promote beneficial interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.* **38**, 148–154 (2017).
- S. Yang, F. Tang, M. Gao, H. B. Krishnan, H. Zhu, *R* gene-controlled host specificity in the legume-rhizobia symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 18735–18740 (2010).
- M. Sugawara et al., Variation in bradyrhizobial NopP effector determines symbiotic incompatibility with Rj2-soybeans via effector-triggered immunity. *Nat. Commun.* **9**, 3139 (2018).
- S. Okazaki, T. Kaneko, S. Sato, K. Saeki, Hijacking of leguminous nodulation signaling by the rhizobial type III secretion system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, 17131–17136 (2013).
- S. Okazaki et al., Rhizobium-legume symbiosis in the absence of Nod factors: Two possible scenarios with or without the T35S. *ISME J.* **10**, 64–74 (2016).
- E. Giraud et al., Legumes symbioses: Absence of *Nod* genes in photosynthetic bradyrhizobia. *Science* **316**, 1307–1312 (2007).

16. A. Krause, A. Doerfel, M. Göttfert, Mutational and transcriptional analysis of the type III secretion system of *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **15**, 1228–1235 (2002).
17. R. Wassem *et al.*, TtsI regulates symbiotic genes in *Rhizobium* species NGR234 by binding to tts boxes. *Mol. Microbiol.* **68**, 736–748 (2008).
18. P. Skorpil *et al.*, NopP, a phosphorylated effector of *Rhizobium* sp. strain NGR234, is a major determinant of nodulation of the tropical legumes *Flemingia congesta* and *Tephrosia vogelii*. *Mol. Microbiol.* **57**, 1304–1317 (2005).
19. D. W. Xin *et al.*, Functional analysis of NopM, a novel E3 ubiquitin ligase (NEL) domain effector of *Rhizobium* sp. strain NGR234. *PLoS Pathog.* **8**, e1002707 (2012).
20. K. Kambara *et al.*, Rhizobia utilize pathogen-like effector proteins during symbiosis. *Mol. Microbiol.* **71**, 92–106 (2009).
21. J. Hempel, S. Zehner, M. Göttfert, T. Patschkowski, Analysis of the secretome of the soybean symbiont *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Biotechnol.* **140**, 51–58 (2009).
22. R. Noisangiam *et al.*, Genetic diversity, symbiotic evolution, and proposed infection process of *Bradyrhizobium* strains isolated from root nodules of *Aeschynomene americana* L. in Thailand. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 6236–6250 (2012).
23. S. Kosugi, M. Hasebe, M. Tomita, H. Yanagawa, Systematic identification of cell cycle-dependent yeast nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 10171–10176 (2009). Correction in: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 13142 (2009).
24. E. Henry, T. Y. Toruño, A. Jauneau, L. Deslandes, G. Coaker, Direct and indirect visualization of bacterial effector delivery into diverse plant cell types during infection. *Plant Cell* **29**, 1555–1570 (2017).
25. L. Camborde *et al.*, Detection of nucleic acid-protein interactions in plant leaves using fluorescence lifetime imaging microscopy. *Nat. Protoc.* **12**, 1933–1950 (2017).
26. C. Le Roux *et al.*, A receptor pair with an integrated decoy converts pathogen disabling of transcription factors to immunity. *Cell* **161**, 1074–1088 (2015).
27. C. Marie *et al.*, Characterization of Nops, nodulation outer proteins, secreted via the type III secretion system of NGR234. *Mol. Plant Microbe Interact.* **16**, 743–751 (2003).
28. W. J. Dai, Y. Zeng, Z. P. Xie, C. Staehelin, Symbiosis-promoting and deleterious effects of NopT, a novel type 3 effector of *Rhizobium* sp. strain NGR234. *J. Bacteriol.* **190**, 5101–5110 (2008).
29. I. Sorg, U. M. Goehring, K. Aktories, G. Schmidt, Recombinant *Yersinia* YopT leads to uncoupling of RhoA-effector interaction. *Infect. Immun.* **69**, 7535–7543 (2001).
30. T. Coba de la Peña, E. Fedorova, J. J. Pueyo, M. M. Lucas, The symbiosome: Legume and rhizobia co-evolution toward a nitrogen-fixing organelle? *Front. Plant Sci.* **8**, 2229 (2018).
31. R. Atta *et al.*, Pluripotency of *Arabidopsis* xylem pericycle underlies shoot regeneration from root and hypocotyl explants grown *in vitro*. *Plant J.* **57**, 626–644 (2009).
32. S. Boivin, C. Fonouni-Farde, F. Frugier, How auxin and cytokinin phytohormones modulate root microbe interactions. *Front. Plant Sci.* **7**, 1240 (2016).
33. T. Soyano, M. Hayashi, Transcriptional networks leading to symbiotic nodule organogenesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* **20**, 146–154 (2014).
34. T. Soyano, H. Kouchi, A. Hirota, M. Hayashi, Nodule inception directly targets NF-Y subunit genes to regulate essential processes of root nodule development in *Lotus japonicus*. *PLoS Genet.* **9**, e1003352 (2013).
35. G. Nissan *et al.*, The type III effectors HsvG and HsvB of gall-forming *Pantoea agglomerans* determine host specificity and function as transcriptional activators. *Mol. Microbiol.* **61**, 1118–1131 (2006).
36. D. R. Hann *et al.*, The *Pseudomonas* type III effector HopQ1 activates cytokinin signaling and interferes with plant innate immunity. *New Phytol.* **201**, 585–598 (2014).
37. J. M. Vincent, *A Manual for the Practical Study of Root-Nodule Bacteria* (Blackwell Scientific Publications, Oxford-Edinburgh, UK, 1970), p. 164.
38. J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. A. Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, ed. 2, 1989), p. 1659.
39. K. Bonaldi *et al.*, The Nod factor-independent symbiotic signaling pathway: Development of *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation for the legume *Aeschynomene indica*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **23**, 1537–1544 (2010).
40. J. F. Mac Faddin, *Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria* (Williams and Wilkins, Baltimore, MD, 1985), vol. 1, p. 966.
41. J. W. Tsai, M. R. Alley, Proteolysis of the McpA chemoreceptor does not require the *Caulobacter* major chemotaxis operon. *J. Bacteriol.* **182**, 504–507 (2000).
42. E. Giraud, J. Lavergne, A. Verméglio, Characterization of bacteriophytochromes from photosynthetic bacteria: Histidine kinase signaling triggered by light and redox sensing. *Methods Enzymol.* **471**, 135–159 (2010).
43. J. Wongdee *et al.*, *nifDK* clusters located on the chromosome and megaplasmid of *Bradyrhizobium* sp. strain DOA9 contribute differently to nitrogenase activity during symbiosis and free-living growth. *Mol. Plant Microbe Interact.* **29**, 767–773 (2016).
44. K. Bonaldi *et al.*, Large-scale transposon mutagenesis of photosynthetic *Bradyrhizobium* sp. strain ORS278 reveals new genetic loci putatively important for nod-independent symbiosis with *Aeschynomene indica*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **23**, 760–770 (2010).
45. A. Renier *et al.*, Photosynthetic *Bradyrhizobium* sp. strain ORS285 synthesizes 2-O-methylfucosylated lipochitooligosaccharides for *nod* gene-dependent interaction with *Aeschynomene* plants. *Mol. Plant Microbe Interact.* **24**, 1440–1447 (2011).
46. L. Marty *et al.*, Structural basis for high specificity of amadori compound and mannopine opine binding in bacterial pathogens. *J. Biol. Chem.* **291**, 22638–22649 (2016).
47. N. Flaugnatti, L. Journet, Identification of effectors: Precipitation of supernatant material. *Methods Mol. Biol.* **1615**, 459–464 (2017).
48. D. Mattanovich *et al.*, Efficient transformation of *Agrobacterium* spp. by electroporation. *Nucleic Acids Res.* **17**, 6747 (1989).

Supplementary Information for

The rhizobial type III effector ErnA confers the ability to form nodules in legumes

Albin Teulet¹, Nicolas Busset², Joël Fardoux¹, Djamel Gully¹, Clémence Chaintreuil¹, Fabienne Cartieaux¹, Alain Jauneau³, Virginie Comorge⁴, Shin Okazaki⁵, Takakazu Kaneko⁶, Frédéric Gressent¹, Nico Nouwen¹, Jean-François Arrighi¹, Ralf Koebnik⁷, Peter Mergaert², Laurent Deslandes⁴ and Eric Giraud¹

* Corresponding author: Eric Giraud

Email: eric.giraud@ird.fr

This PDF file includes:

Figs. S1 to S7
Tables S1 to S5
References for SI reference citations

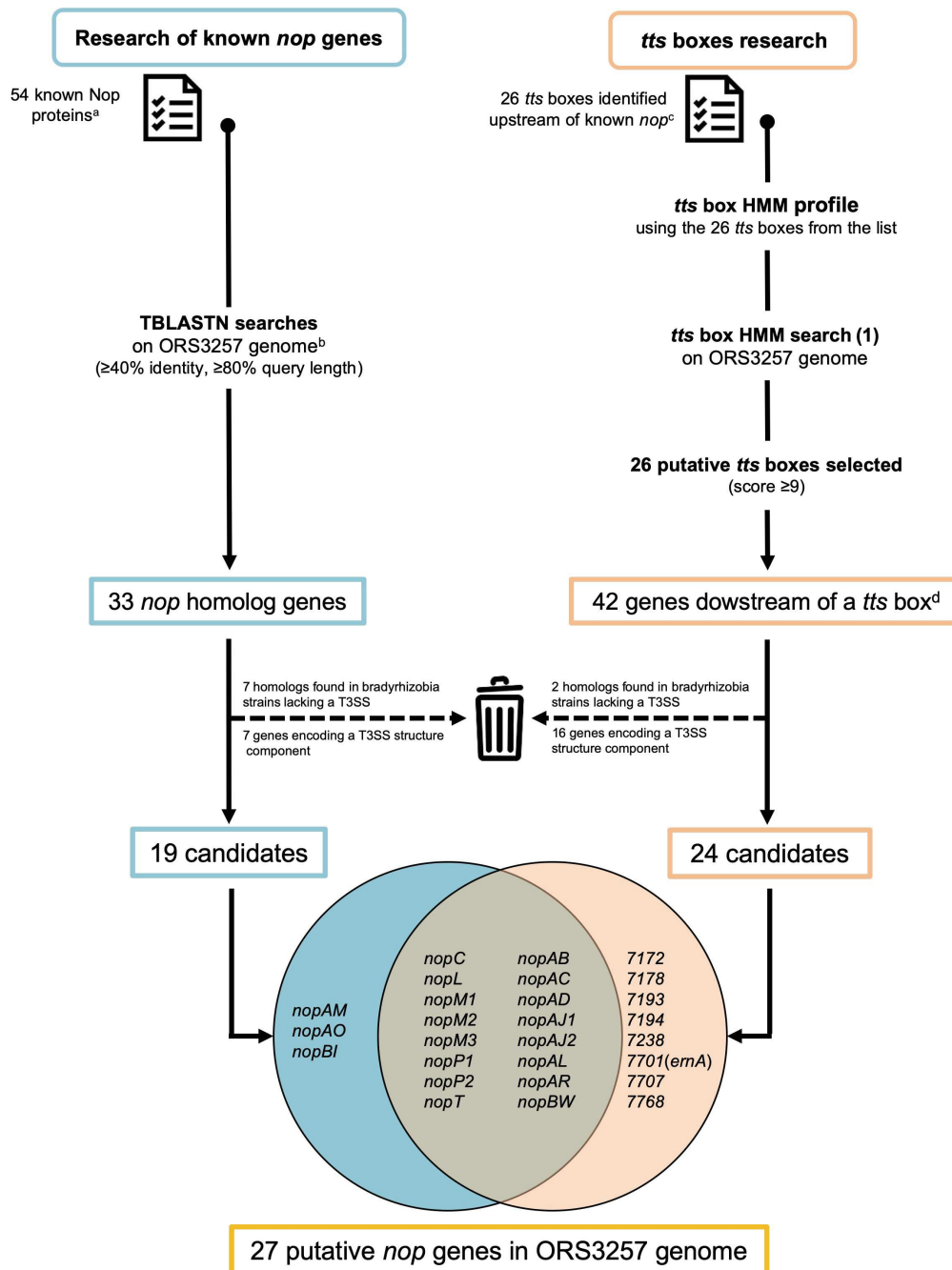


Figure S1. Flowchart for identification of effectors in *Bradyrhizobium* ORS3257 strain.

a. The list of known Nops was derived from the literature (2, 3).

b. The genome sequence accession number is LS398110.

c. See SI APPENDIX Table S1.

d. The different genes assumed to belong to the same operon in which a *tts* box was identified in the upstream region were considered as candidates.

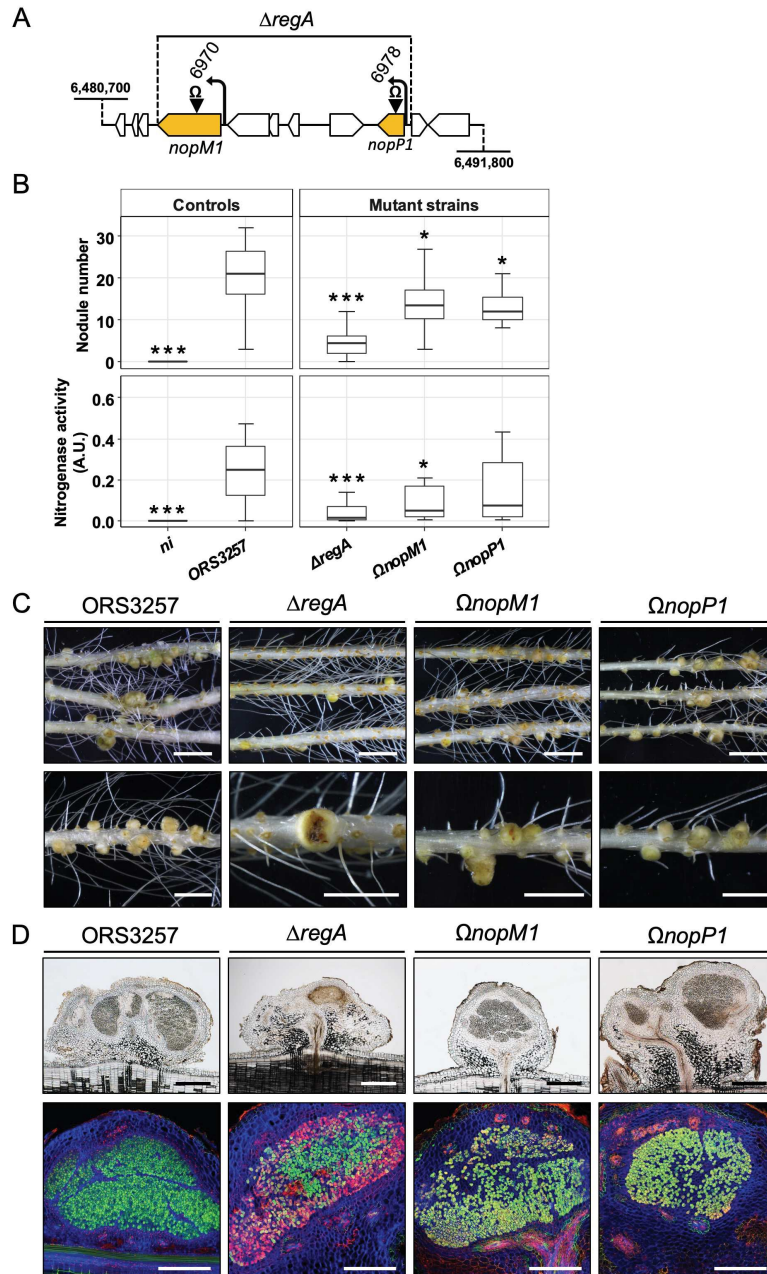


Figure S2. Symbiotic properties of the ORS3257 mutants in the different effectors identified in region A.
A. Genetic organisation of the putative effectors identified in region A. **B.** Number of nodules formed and nitrogen fixation activity of *Aeschynomene indica* plants at 21 days after inoculation with ORS3257 and its mutant derivatives. A.U., arbitrary unit. Box plots show results of one representative experiment out of at least two independent experiments per strain (18 plants each). The central rectangle spans the first quartile to the third quartile, the bold segment inside the rectangle shows the median, and the whiskers above and below the box show, respectively, the locations of the maximum and minimum value. * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$, significant differences between WT ORS3257 and each mutant strain using a non-parametric Kruskal-Wallis test. **C.** View of the root and the nodules induced by strain ORS3257 and its mutant derivatives. Scale bars, 1.5 cm (upper panels) and 4 mm (lower panels). **D.** Cytochemical analysis of the nodules induced by strain ORS3257 and its mutant derivatives observed by light and confocal microscopy after staining with Syto9 (green; live bacteria), calcofluor (blue; plant cell wall), and propidium iodide (red; infected plant nuclei and dead bacteria or bacteria with compromised membranes); Scale bars, 500 μ m.

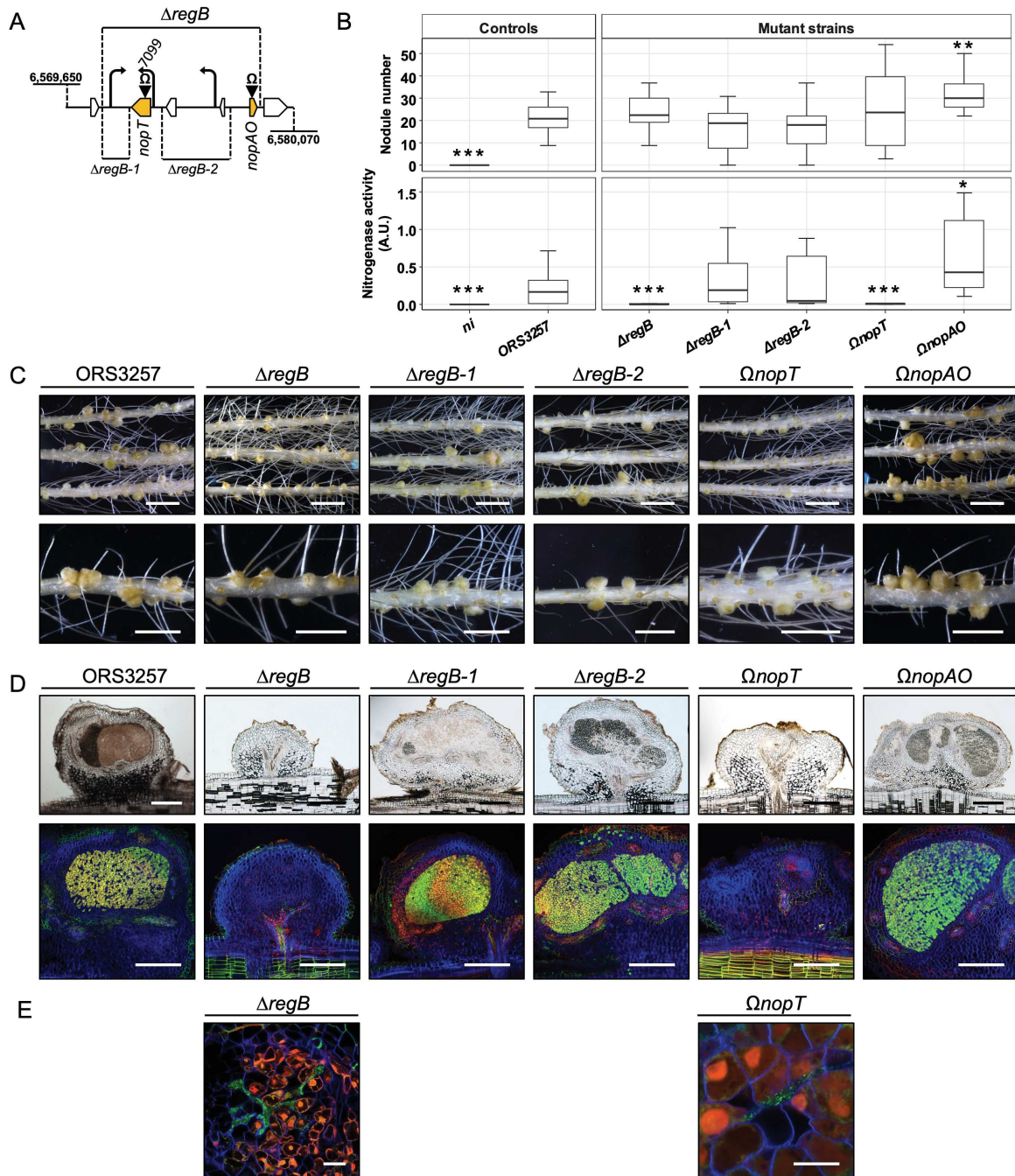


Figure S3. Symbiotic properties of the ORS3257 mutants in the different effectors and the regions encompassing the *tts* boxes identified in region B.
A. Genetic organisation of the putative effectors and *tts* boxes identified in region B. **B.** Number of nodules formed and nitrogen fixation activity of *Aeschynomene indica* plants at 21 days after inoculation with ORS3257 and its mutant derivatives. A.U., arbitrary unit. Box plots show results of one representative experiment out of at least two independent experiments per strain (18 plants each). The central rectangle spans the first quartile to the third quartile, the bold segment inside the rectangle shows the median, and the whiskers above and below the box show, respectively, the locations of the maximum and minimum value. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$, significant differences between WT ORS3257 and each mutant strain using a non-parametric Kruskal-Wallis test. **C.** View of the root and the nodules induced by strain ORS3257 and its mutant derivatives. Scale bars, 1.5 cm (upper panels) and 4 mm (lower panels). **D.** Cytological analysis of the nodules induced by strain ORS3257 and its mutant derivatives observed by light and confocal microscopy after staining with Syto9 (green; live bacteria), calcofluor (blue; plant cell wall), and propidium iodide (red; infected plant nuclei and dead bacteria or bacteria with compromised membranes); Scale bars, 500 μm . **E.** Higher magnification of nodules observed by light and confocal microscopy showing intercellular infection of $\Delta regB$ and $\Omega nopT$ mutants; Scale bars, 20 μm .

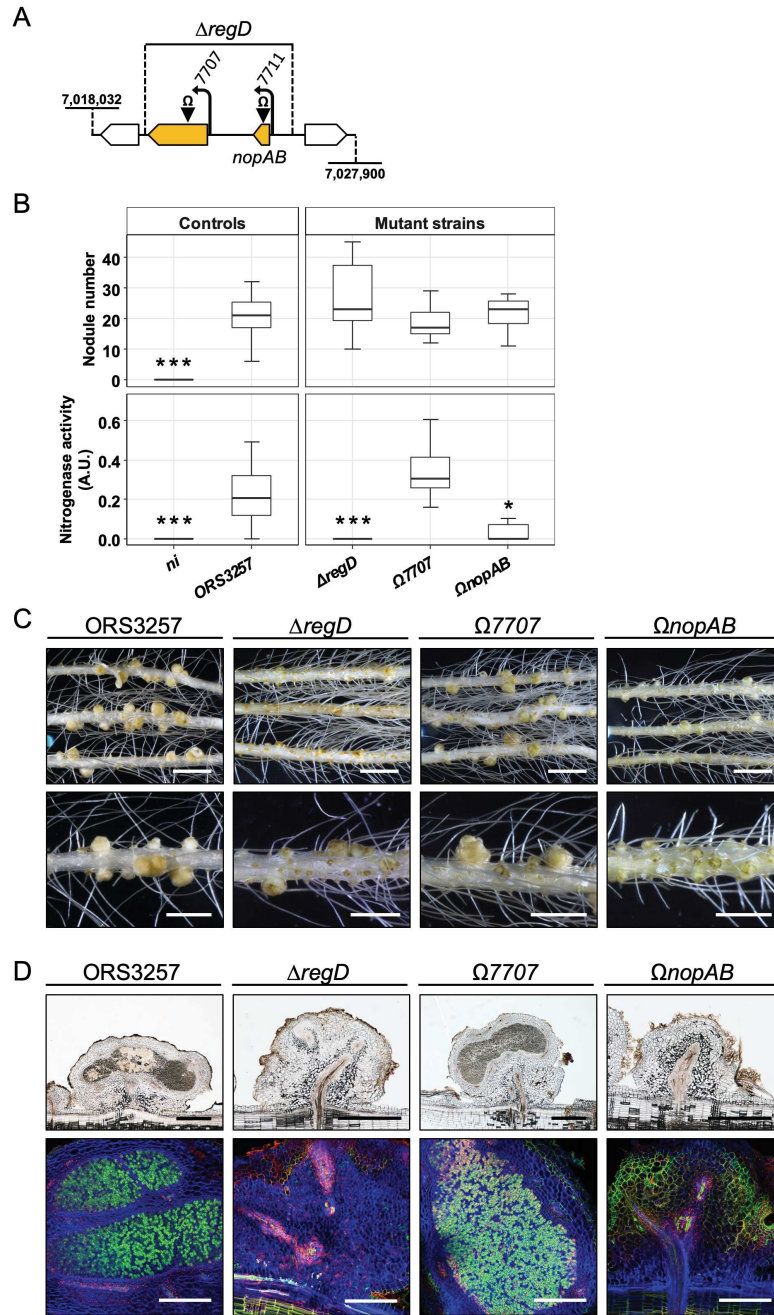


Figure S4. Symbiotic properties of the ORS3257 mutants in the different effectors identified in region D.

A. Genetic organisation of the putative effectors identified in region D. **B.** Number of nodules formed and nitrogen fixation activity of *Aeschynomene indica* plants at 21 days after inoculation with ORS3257 and its mutant derivatives. A.U., arbitrary unit. Box plots show results of one representative experiment out of at least two independent experiments per strain (18 plants each). The central rectangle spans the first quartile to the third quartile, the bold segment inside the rectangle shows the median, and the whiskers above and below the box show, respectively, the locations of the maximum and minimum value. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, significant differences between ORS3257 and each mutant strain using a non-parametric Kruskal-Wallis test. **C.** View of the root and the nodules induced by strain ORS3257 and its mutant derivatives. Scale bars, 1.5 cm (upper panels) and 4 mm (lower panels). **D.** Cytological analysis of the nodules induced by strain ORS3257 and its mutant derivatives observed by light and confocal microscopy after staining with Syto9 (green; live bacteria), calcofluor (blue; plant cell wall), and propidium iodide (red; infected plant nuclei and dead bacteria or bacteria with compromised membranes); Scale bars, 500 μm .

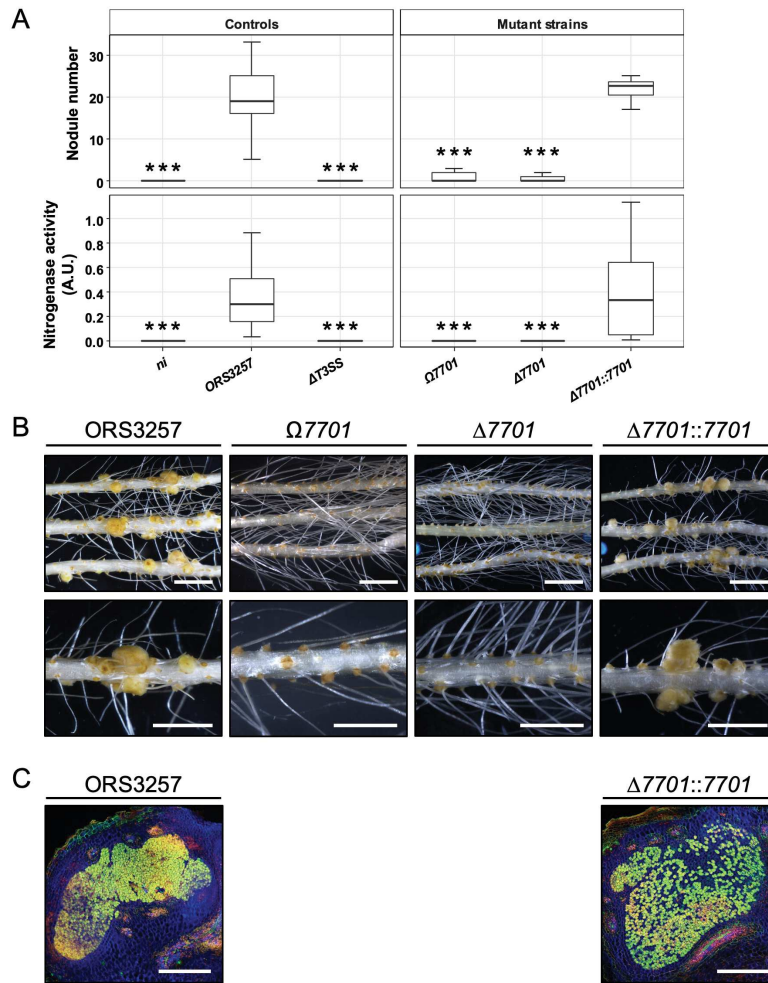


Figure S5. Symbiotic properties of the different mutants of *Brad3257_7701* (*ernA*).

A. Number of nodules formed and nitrogen fixation activity of *Aeschynomene indica* plants at 21 days after inoculation with strain ORS3257 and its mutant derivatives. Ω7701, insertional mutant; Δ7701, deletion mutant; Δ7701::7701, deletion mutant in which the *Brad3257_7701* gene was re-introduced. Box plots show results of one representative experiment out of at least two independent experiments per strain (18 plants each). The central rectangle spans the first quartile to the third quartile, the bold segment inside the rectangle shows the median, and the whiskers above and below the box show, respectively, the locations of the maximum and minimum value. A.U., arbitrary unit. *** $P < 0.001$, significant differences between ORS3257 and each mutant strain using a non-parametric Kruskal-Wallis test. **B.** View of the root and the nodules induced by strain ORS3257 and its mutant derivatives. Scale bars, 1.5 cm (upper panels) and 4 mm (lower panels). **C.** Cytological analysis of the nodules induced by strain ORS3257 and its mutant derivative (Δ7701::7701) observed by light and confocal microscopy after staining with Syto9 (green; live bacteria), calcofluor (blue; plant cell wall), and propidium iodide (red; infected plant nuclei and dead bacteria or bacteria with compromised membranes); Scale bars, 500 μm.


```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
CRS3257 MDPFRINIFF DPEFAAYVAA VQADPQQA FEPLYDEVDP LQTSVAIEDP VSAMPYYPHL SEEGLRLAAY LGLRHVADG SPSERAVTGR -----
err11 MDPFRINIFF DPEFAAYVAA VQADPQQA FEPLYDEVDP LQTSVAIEDP VSAMPYYPHL SEEGLRLAAY LGLRHVADG SPSERAVTGR -----
Gvrl MDPFRINIFF DPEFAAYVAA VQADPQQA FEPLYDEVDP LQTSVAIEDP VSAMPYYPHL SEEGLRLAAY LGLRHVADG SPSERAVTGR -----
INRA54B MDPFRINIFF DPEFAAYVAA VQADPQQA FEPLYDEVDP LQTSVAIEDP VSAMPYYPHL SEEGLRLAAY LGLRHVADG SPSERAVTGR -----
Re5b MDPFRINIFF DPEFAAYVAA VQADPQQA FEPLYDEVDP LQTSVAIEDP VSAMPYYPHL SEEGLRLAAY LGLRHVADG SPSERAVTGR -----
CB756 MDPFRINIFF DPEFAAYVAA VQADPQQA FEPLYDEVDP LQTSVAIEDP VSAMPYYPHL SEEGLRLAAY LGLRHVADG SPSERAVTGR -----
USDA3384 MDPFRINIFF DPEFAAYVAA VQADPQQA FEPLYDEVDP LQTSVAIEDP VSAMPYYPHL SEEGLRLAAY LGLRHVADG SPSERAVTGR -----
LM626795 MDPFRINIFF DPEFAAYVAA VQADPQQA FEPLYDEVDP LQTSVAIEDP VSAMPYYPHL SEEGLRLAAY LGLRHVADG SPSERAVTGR -----
R5 MDPFRINIFF DPEFAAYVAA VQADPQQA FEPLYDEVDP LQTSVAIEDP VSAMPYYPHL SEEGLRLAAY LGLRHVADG SPSERAVTGR -----
Ia-34 MDPFRINIFF DPEFAAYVAA VQADPQQA FEPLYDEVDP LQTSVAIEDP VSAMPYYPHL SEEGLRLAAY LGLRHVADG SPSERAVTGR -----
Ia-1 MDPFRINIFF DPEFAAYVAA VQADPQQA FEPLYDEVDP LQTSVAIEDP VSAMPYYPHL SEEGLRLAAY LGLRHVADG SPSERAVTGR -----
CBM015616 MDPFRINIFF DPEFAAYVAA VQADPQQA FEPLYDEVDP LQTSVAIEDP VSAMPYYPHL SEEGLRLAAY LGLRHVADG SPSERAVTGR -----
CBM012679 MDPFRINIFF DPEFAAYVAA VQADPQQA FEPLYDEVDP LQTSVAIEDP VSAMPYYPHL SEEGLRLAAY LGLRHVADG SPSERAVTGR -----
CBM015616 MDPFRINIFF DPEFAAYVAA VQADPQQA FEPLYDEVDP LQTSVAIEDP VSAMPYYPHL SEEGLRLAAY LGLRHVADG SPSERAVTGR -----
USDA4 MDPFRINIFF DPEFAAYVAA VQADPQQA FEPLYDEVDP LQTSVAIEDP VSAMPYYPHL SEEGLRLAAY LGLRHVADG SPSERAVTGR -----
USDA110 MDPFRINIFF DPEFAAYVAA VQADPQQA FEPLYDEVDP LQTSVAIEDP VSAMPYYPHL SEEGLRLAAY LGLRHVADG SPSERAVTGR -----
USDA124 MDPFRINIFF DPEFAAYVAA VQADPQQA FEPLYDEVDP LQTSVAIEDP VSAMPYYPHL SEEGLRLAAY LGLRHVADG SPSERAVTGR -----
CBM015638 MDPFRINIFF DPEFAAYVAA VQADPQQA FEPLYDEVDP LQTSVAIEDP VSAMPYYPHL SEEGLRLAAY LGLRHVADG SPSERAVTGR -----
USDA122 MDPFRINIFF DPEFAAYVAA VQADPQQA FEPLYDEVDP LQTSVAIEDP VSAMPYYPHL SEEGLRLAAY LGLRHVADG SPSERAVTGR -----
SEM1A080 MDPFRINIFF DPEFAAYVAA VQADPQQA FEPLYDEVDP LQTSVAIEDP VSAMPYYPHL SEEGLRLAAY LGLRHVADG SPSERAVTGR -----
CBM025438 MDPFRINIFF DPEFAAYVAA VQADPQQA FEPLYDEVDP LQTSVAIEDP VSAMPYYPHL SEEGLRLAAY LGLRHVADG SPSERAVTGR -----
USDA38 MDPFRINIFF DPEFAAYVAA VQADPQQA FEPLYDEVDP LQTSVAIEDP VSAMPYYPHL SEEGLRLAAY LGLRHVADG SPSERAVTGR -----
CBM015354 MDPFRINIFF DPEFAAYVAA VQADPQQA FEPLYDEVDP LQTSVAIEDP VSAMPYYPHL SEEGLRLAAY LGLRHVADG SPSERAVTGR -----
E109 MDPFRINIFF DPEFAAYVAA VQADPQQA FEPLYDEVDP LQTSVAIEDP VSAMPYYPHL SEEGLRLAAY LGLRHVADG SPSERAVTGR -----
CBM043298 MDPFRINIFF DPEFAAYVAA VQADPQQA FEPLYDEVDP LQTSVAIEDP VSAMPYYPHL SEEGLRLAAY LGLRHVADG SPSERAVTGR -----
SEM1A079 MDPFRINIFF DPEFAAYVAA VQADPQQA FEPLYDEVDP LQTSVAIEDP VSAMPYYPHL SEEGLRLAAY LGLRHVADG SPSERAVTGR -----
CBM015517 MDPFRINIFF DPEFAAYVAA VQADPQQA FEPLYDEVDP LQTSVAIEDP VSAMPYYPHL SEEGLRLAAY LGLRHVADG SPSERAVTGR -----
CBM085623 MDPFRINIFF DPEFAAYVAA VQADPQQA FEPLYDEVDP LQTSVAIEDP VSAMPYYPHL SEEGLRLAAY LGLRHVADG SPSERAVTGR -----
USDA123 MDPFRINIFF DPEFAAYVAA VQADPQQA FEPLYDEVDP LQTSVAIEDP VSAMPYYPHL SEEGLRLAAY LGLRHVADG SPSERAVTGR -----
CBM015544 MDPFRINIFF DPEFAAYVAA VQADPQQA FEPLYDEVDP LQTSVAIEDP VSAMPYYPHL SEEGLRLAAY LGLRHVADG SPSERAVTGR -----
USDA135 MDPFRINIFF DPEFAAYVAA VQADPQQA FEPLYDEVDP LQTSVAIEDP VSAMPYYPHL SEEGLRLAAY LGLRHVADG SPSERAVTGR -----
J5 MDPFRINIFF DPEFAAYVAA VQADPQQA FEPLYDEVDP LQTSVAIEDP VSAMPYYPHL SEEGLRLAAY LGLRHVADG SPSERAVTGR -----
FNI MDPFRINIFF DPEFAAYVAA VQADPQQA FEPLYDEVDP LQTSVAIEDP VSAMPYYPHL SEEGLRLAAY LGLRHVADG SPSERAVTGR -----
NK6 MDPFRINIFF DPEFAAYVAA VQADPQQA FEPLYDEVDP LQTSVAIEDP VSAMPYYPHL SEEGLRLAAY LGLRHVADG SPSERAVTGR -----
WSM2793 MDPFRINIFF DPEFAAYVAA VQADPQQA FEPLYDEVDP LQTSVAIEDP VSAMPYYPHL SEEGLRLAAY LGLRHVADG SPSERAVTGR -----
Rc2d MDPFRINIFF DPEFAAYVAA VQADPQQA FEPLYDEVDP LQTSVAIEDP VSAMPYYPHL SEEGLRLAAY LGLRHVADG SPSERAVTGR -----
SEM1A208 MDPFRINIFF DPEFAAYVAA VQADPQQA FEPLYDEVDP LQTSVAIEDP VSAMPYYPHL SEEGLRLAAY LGLRHVADG SPSERAVTGR -----
UFLA03-321 MDPFRINIFF DPEFAAYVAA VQADPQQA FEPLYDEVDP LQTSVAIEDP VSAMPYYPHL SEEGLRLAAY LGLRHVADG SPSERAVTGR -----
USDA61 MDPFRINIFF DPEFAAYVAA VQADPQQA FEPLYDEVDP LQTSVAIEDP VSAMPYYPHL SEEGLRLAAY LGLRHVADG SPSERAVTGR -----
USDA76 MDPFRINIFF DPEFAAYVAA VQADPQQA FEPLYDEVDP LQTSVAIEDP VSAMPYYPHL SEEGLRLAAY LGLRHVADG SPSERAVTGR -----
BR10280 MDPFRINIFF DPEFAAYVAA VQADPQQA FEPLYDEVDP LQTSVAIEDP VSAMPYYPHL SEEGLRLAAY LGLRHVADG SPSERAVTGR -----
TW10 MDPFRINIFF DPEFAAYVAA VQADPQQA FEPLYDEVDP LQTSVAIEDP VSAMPYYPHL SEEGLRLAAY LGLRHVADG SPSERAVTGR -----
PC2_2 MDPFRINIFF DPEFAAYVAA VQADPQQA FEPLYDEVDP LQTSVAIEDP VSAMPYYPHL SEEGLRLAAY LGLRHVADG SPSERAVTGR -----
PC2_1 MDPFRINIFF DPEFAAYVAA VQADPQQA FEPLYDEVDP LQTSVAIEDP VSAMPYYPHL SEEGLRLAAY LGLRHVADG SPSERAVTGR -----
BR3267 MDPFRINIFF DPEFAAYVAA VQADPQQA FEPLYDEVDP LQTSVAIEDP VSAMPYYPHL SEEGLRLAAY LGLRHVADG SPSERAVTGR -----
BR3262 MDPFRINIFF DPEFAAYVAA VQADPQQA FEPLYDEVDP LQTSVAIEDP VSAMPYYPHL SEEGLRLAAY LGLRHVADG SPSERAVTGR -----
L2 MDPFRINIFF DPEFAAYVAA VQADPQQA FEPLYDEVDP LQTSVAIEDP VSAMPYYPHL SEEGLRLAAY LGLRHVADG SPSERAVTGR -----
B31 MDPFRINIFF DPEFAAYVAA VQADPQQA FEPLYDEVDP LQTSVAIEDP VSAMPYYPHL SEEGLRLAAY LGLRHVADG SPSERAVTGR -----
WSM2783 MDPFRINIFF DPEFAAYVAA VQADPQQA FEPLYDEVDP LQTSVAIEDP VSAMPYYPHL SEEGLRLAAY LGLRHVADG SPSERAVTGR -----
CBM010071 MDPFRINIFF DPEFAAYVAA VQADPQQA FEPLYDEVDP LQTSVAIEDP VSAMPYYPHL SEEGLRLAAY LGLRHVADG SPSERAVTGR -----
CBM025021 MDPFRINIFF DPEFAAYVAA VQADPQQA FEPLYDEVDP LQTSVAIEDP VSAMPYYPHL SEEGLRLAAY LGLRHVADG SPSERAVTGR -----
CBM035157 MDPFRINIFF DPEFAAYVAA VQADPQQA FEPLYDEVDP LQTSVAIEDP VSAMPYYPHL SEEGLRLAAY LGLRHVADG SPSERAVTGR -----
SEM1A148 MDPFRINIFF DPEFAAYVAA VQADPQQA FEPLYDEVDP LQTSVAIEDP VSAMPYYPHL SEEGLRLAAY LGLRHVADG SPSERAVTGR -----
USDA743 MDPFRINIFF DPEFAAYVAA VQADPQQA FEPLYDEVDP LQTSVAIEDP VSAMPYYPHL SEEGLRLAAY LGLRHVADG SPSERAVTGR -----
SUTN92 MDPFRINIFF DPEFAAYVAA VQADPQQA FEPLYDEVDP LQTSVAIEDP VSAMPYYPHL SEEGLRLAAY LGLRHVADG SPSERAVTGR -----
Consistency 999.99 999.86 878.63 900.11 105.63 939.86 999.99 999.83 878.63 977.48 754.85 987.75 878.55 78.67 857.58 75.44 678.66 999.86 45.57 77.47

```

```

      110      120      130      140      150      160      170      180      190      200
CRS3257 -----
err11 -----
Gvrl -----
INRA54B -----
Re5b -----
CB756 -----
USDA3384 -----
LM626795 -----
R5 -----
Ia-34 -----
Ia-1 -----
CBM015616 -----
CBM012679 -----
CBM015616 -----
USDA4 -----
USDA110 -----
USDA124 -----
CBM015638 -----
USDA122 -----
SEM1A080 -----
CBM025438 -----
USDA38 -----
CBM015354 -----
E109 -----
CBM043298 -----
SEM1A079 -----
CBM015517 -----
CBM085623 -----
USDA123 -----
CBM015544 -----
USDA135 -----
J5 -----
FNI -----
NK6 -----
WSM2793 -----
Rc2d -----
SEM1A208 -----
UFLA03-321 -----
USDA61 -----
USDA76 -----
BR10280 -----
TW10 -----
PC2_2 -----
PC2_1 -----
BR3267 -----
BR3262 -----
L2 -----
B31 -----
WSM2783 -----
CBM010071 -----
CBM025021 -----
CBM035157 -----
SEM1A148 -----
USDA743 -----
SUTN92 -----
Consistency 654.10 646.66 656.85 766.66 654.45 756.66 657.43 447.44 445.67 448.66 546.45 644.55 774.67 24.46 448.67 77.76 999.86 22.97 66.66 99.44 68

```

Additional domain of about 80 amino acids Predicted nuclear localisation signal

Figure S6. Alignment of the ErnA amino acid sequences identified in *Bradyrhizobium* and *Ensifer* strains. Amino acid sequence alignment of 57 ErnA homologues (53 from *Bradyrhizobium* strains and four from *Ensifer* strains) using the Praline multiple sequence alignment program (<http://www.ibi.vu.nl>).

Unconserved 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 Conserved

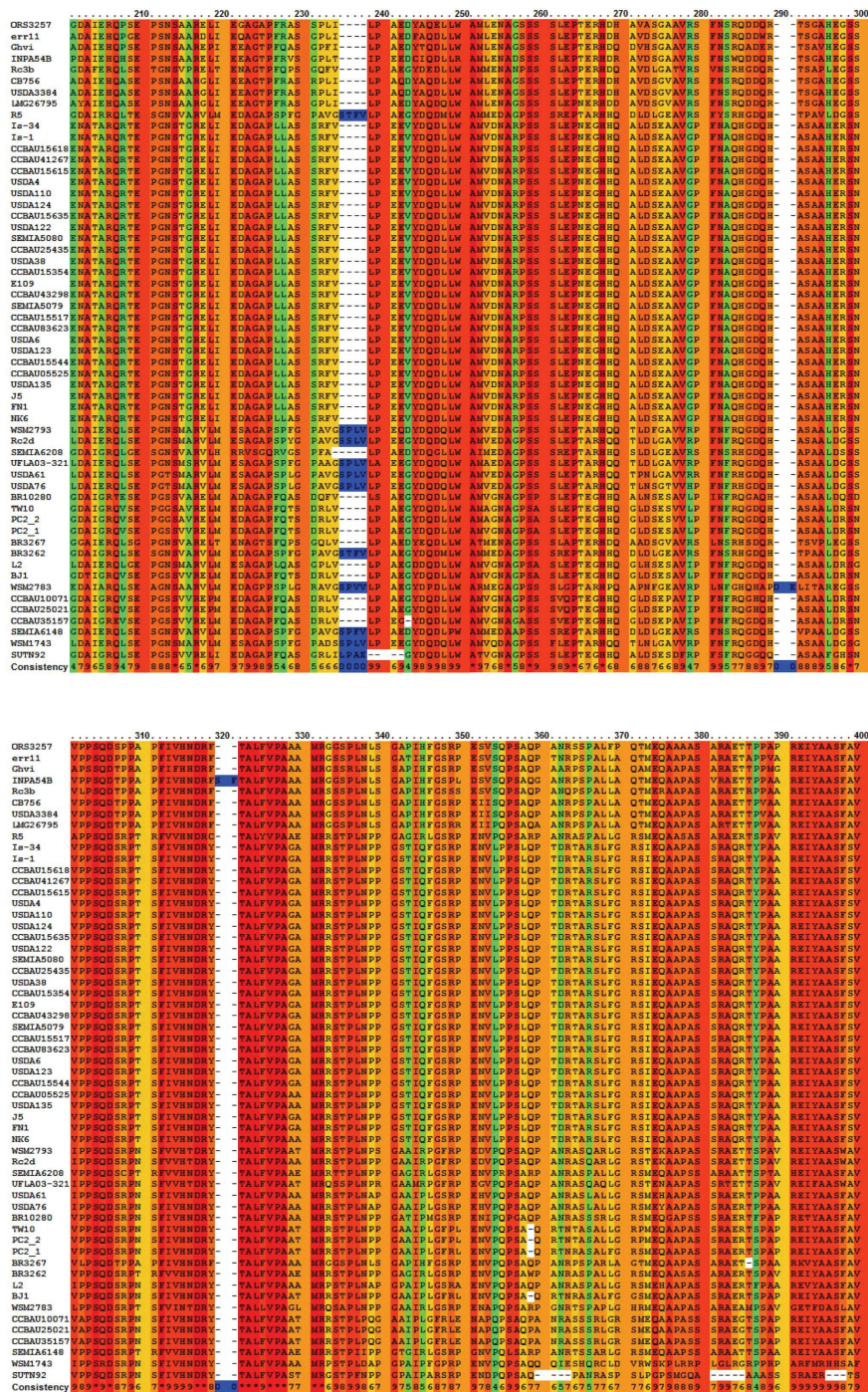


Figure S6. Alignment of the ErnA amino acid sequences identified in *Bradyrhizobium* and *Ensifer* strains. Amino acid sequence alignment of 57 ErnA homologues (53 from *Bradyrhizobium* strains and four from *Ensifer* strains) using the Praline multiple sequence alignment program (<http://www.ibi.vu.nl>).

Unconserved 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 Conserved

	410	420	430	440	450	460	470
ORS3257	PKGFSRGTQP	API TMI SKLG	RWG LLDAAQ	PKQVD IRGE	RYTAL LCPGG	PNDVRL IHEP	-----
at11	PKGFSRGTQP	API TMI SKLG	RWG LLDAAQ	PKQVD IRGE	RYTAL LCPGG	PNDVRL IHEP	-----
Ghv1	PKGFSRGTQP	API TMI SKLG	RWG LLDAAQ	PKQVD IRGE	RYTAL LCPGG	PNDVRL IHEP	QM-----
INPA54B	PKGFSRGTQP	API TMI SKLG	RWG LLDAAQ	PKQVD IRGE	RYTAL LCPGG	PNDVRL IHEP	QM-----
Rc3b	PKGFSRGTQP	API TMI SKLG	RWG LLDAAQ	PKQVD IRGE	RYTAL LCPGG	PNDVRL IHEP	-----
CB756	PKGFSRGTQP	API TMI SKLG	RWG LLDAAQ	PKQVD IRGE	RYTAL LCPGG	PNDVRL IHEP	QM-----
USDA3384	PKGFSRGTQP	API TMI SKLG	RWG LLDAAQ	PKQVD IRGE	RYTAL LCPGG	PNDVRL IHEP	QU-----
LMG26795	PKGFSRGTQP	API TMI SKLG	RWG LLDAAQ	PKQVD IRGE	RYTAL LCPGG	PNDVRL IHEP	QU-----
R5	PKDFSRGTQP	APD TML SKLG	RWG LLDAAQ	PKQVD IRGE	RYTAL LCPGG	PNDVRL IHEP	-----
Te-34	PKDFSRGTQP	APD TML SKLG	RWG LLDAAQ	PKQVD IRGE	RYTAL LCPGG	PNDVRL IHEP	-----
Te-1	PKDFSRGTQP	APD TML SKLG	RWG LLDAAQ	PKQVD IRGE	RYTAL LCPGG	PNDVRL IHEP	-----
CCBAU15618	PKDFSRGTQP	APD TML SKLG	RWG LLDAAQ	PKQVD IRGE	RYTAL LCPGG	PNDVRL IHEP	-----
CCBAU15619	PKDFSRGTQP	APD TML SKLG	RWG LLDAAQ	PKQVD IRGE	RYTAL LCPGG	PNDVRL IHEP	-----
USDA4	PKDFSRGTQP	APD TML SKLG	RWG LLDAAQ	PKQVD IRGE	RYTAL LCPGG	PNDVRL IHEP	-----
USDA110	PKDFSRGTQP	APD TML SKLG	RWG LLDAAQ	PKQVD IRGE	RYTAL LCPGG	PNDVRL IHEP	-----
USDA124	PKDFSRGTQP	APD TML SKLG	RWG LLDAAQ	PKQVD IRGE	RYTAL LCPGG	PNDVRL IHEP	-----
CCBAU15635	PKDFSRGTQP	APD TML SKLG	RWG LLDAAQ	PKQVD IRGE	RYTAL LCPGG	PNDVRL IHEP	-----
USDA122	PKDFSRGTQP	APD TML SKLG	RWG LLDAAQ	PKQVD IRGE	RYTAL LCPGG	PNDVRL IHEP	-----
SEMI45080	PKDFSRGTQP	APD TML SKLG	RWG LLDAAQ	PKQVD IRGE	RYTAL LCPGG	PNDVRL IHEP	-----
CCBAU25435	PKDFSRGTQP	APD TML SKLG	RWG LLDAAQ	PKQVD IRGE	RYTAL LCPGG	PNDVRL IHEP	-----
USDA38	PKDFSRGTQP	APD TML SKLG	RWG LLDAAQ	PKQVD IRGE	RYTAL LCPGG	PNDVRL IHEP	-----
CCBAU15354	PKDFSRGTQP	APD TML SKLG	RWG LLDAAQ	PKQVD IRGE	RYTAL LCPGG	PNDVRL IHEP	-----
E19	PKDFSRGTQP	APD TML SKLG	RWG LLDAAQ	PKQVD IRGE	RYTAL LCPGG	PNDVRL IHEP	-----
CCBAU43298	PKDFSRGTQP	APD TML SKLG	RWG LLDAAQ	PKQVD IRGE	RYTAL LCPGG	PNDVRL IHEP	-----
SEMI45079	PKDFSRGTQP	APD TML SKLG	RWG LLDAAQ	PKQVD IRGE	RYTAL LCPGG	PNDVRL IHEP	-----
CCBAU15517	PKDFSRGTQP	APD TML SKLG	RWG LLDAAQ	PKQVD IRGE	RYTAL LCPGG	PNDVRL IHEP	-----
CCBAU36239	PKDFSRGTQP	APD TML SKLG	RWG LLDAAQ	PKQVD IRGE	RYTAL LCPGG	PNDVRL IHEP	-----
USDA6	PKDFSRGTQP	APD TML SKLG	RWG LLDAAQ	PKQVD IRGE	RYTAL LCPGG	PNDVRL IHEP	-----
USDA123	PKDFSRGTQP	APD TML SKLG	RWG LLDAAQ	PKQVD IRGE	RYTAL LCPGG	PNDVRL IHEP	-----
CCBAU15544	PKDFSRGTQP	APD TML SKLG	RWG LLDAAQ	PKQVD IRGE	RYTAL LCPGG	PNDVRL IHEP	-----
CCBAU05525	PKDFSRGTQP	APD TML SKLG	RWG LLDAAQ	PKQVD IRGE	RYTAL LCPGG	PNDVRL IHEP	-----
USDA135	PKDFSRGTQP	APD TML SKLG	RWG LLDAAQ	PKQVD IRGE	RYTAL LCPGG	PNDVRL IHEP	-----
J5	PKDFSRGTQP	APD TML SKLG	RWG LLDAAQ	PKQVD IRGE	RYTAL LCPGG	PNDVRL IHEP	-----
FN1	PKDFSRGTQP	APD TML SKLG	RWG LLDAAQ	PKQVD IRGE	RYTAL LCPGG	PNDVRL IHEP	-----
NK6	PKDFSRGTQP	APD TML SKLG	RWG LLDAAQ	PKQVD IRGE	RYTAL LCPGG	PNDVRL IHEP	-----
MSM2793	PKGFSRGTQP	API TMI SKLG	RWG LLDAAQ	PKQVD IRGE	RYTAL LCPGG	PNDVRL IHEP	-----
Rc2d	PKGFSRGTQP	API TMI SKLG	RWG LLDAAQ	PKQVD IRGE	RYTAL LCPGG	PNDVRL IHEP	-----
SEMI46208	PKDFSRGTQP	APD TML SKLG	RWG LLDAAQ	PKQVD IRGE	RYTAL LCPGG	PNDVRL IHEP	-----
UFLA03-321	PKDFSRGTQP	APD TML SKLG	RWG LLDAAQ	PKQVD IRGE	RYTAL LCPGG	PNDVRL IHEP	-----
USDA1	PKDFSRGTQP	APD TML SKLG	RWG LLDAAQ	PKQVD IRGE	RYTAL LCPGG	PNDVRL IHEP	-----
USDA76	PKDFSRGTQP	APD TML SKLG	RWG LLDAAQ	PKQVD IRGE	RYTAL LCPGG	PNDVRL IHEP	-----
BR10280	PKDFSRGTQP	APD TML SKLG	RWG LLDAAQ	PKQVD IRGE	RYTAL LCPGG	PNDVRL IHEP	-----
TM10	PKDFSRGTQP	APD TML SKLG	RWG LLDAAQ	PKQVD IRGE	RYTAL LCPGG	PNDVRL IHEP	-----
PC1_2	PKDFSRGTQP	APD TML SKLG	RWG LLDAAQ	PKQVD IRGE	RYTAL LCPGG	PNDVRL IHEP	-----
PC1_1	PKDFSRGTQP	APD TML SKLG	RWG LLDAAQ	PKQVD IRGE	RYTAL LCPGG	PNDVRL IHEP	-----
BR3267	PKDFSRGTQP	APD TML SKLG	RWG LLDAAQ	PKQVD IRGE	RYTAL LCPGG	PNDVRL IHEP	-----
BR3262	PKDFSRGTQP	APD TML SKLG	RWG LLDAAQ	PKQVD IRGE	RYTAL LCPGG	PNDVRL IHEP	-----
L2	PKDFSRGTQP	APD TML SKLG	RWG LLDAAQ	PKQVD IRGE	RYTAL LCPGG	PNDVRL IHEP	-----
B31	PKDFSRGTQP	APD TML SKLG	RWG LLDAAQ	PKQVD IRGE	RYTAL LCPGG	PNDVRL IHEP	-----
MSM2783	PKDFSRGTQP	APD TML SKLG	RWG LLDAAQ	PKQVD IRGE	RYTAL LCPGG	PNDVRL IHEP	-----
CCBAU10071	PKDFSRGTQP	APD TML SKLG	RWG LLDAAQ	PKQVD IRGE	RYTAL LCPGG	PNDVRL IHEP	-----
CCBAU25021	PKDFSRGTQP	APD TML SKLG	RWG LLDAAQ	PKQVD IRGE	RYTAL LCPGG	PNDVRL IHEP	-----
CCBAU35157	PKDFSRGTQP	APD TML SKLG	RWG LLDAAQ	PKQVD IRGE	RYTAL LCPGG	PNDVRL IHEP	-----
SEMI46148	PKDFSRGTQP	APD TML SKLG	RWG LLDAAQ	PKQVD IRGE	RYTAL LCPGG	PNDVRL IHEP	-----
MSM1743	PKDFSRGTQP	APD TML SKLG	RWG LLDAAQ	PKQVD IRGE	RYTAL LCPGG	PNDVRL IHEP	-----
SUTN92	PKDFSRGTQP	APD TML SKLG	RWG LLDAAQ	PKQVD IRGE	RYTAL LCPGG	PNDVRL IHEP	-----
Consistency	85.9739	85.9739	85.9739	85.9739	85.9739	85.9739	85.9739

Figure S6. Alignment of the ErnA amino acid sequences identified in *Bradyrhizobium* and *Ensifer* strains. Amino acid sequence alignment of 57 ErnA homologues (53 from *Bradyrhizobium* strains and four from *Ensifer* strains) using the Praline multiple sequence alignment program (<http://www.ibi.vu.nl>).

Unconserved 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 Conserved

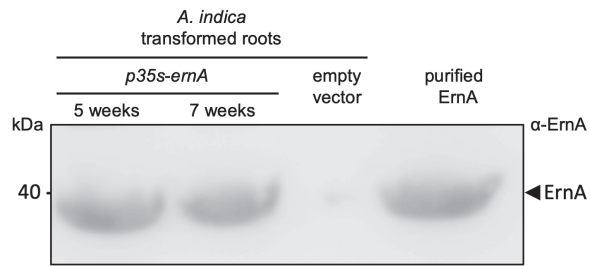


Figure S7. *ernA* is expressed in *A. indica* roots transformed with the *p35S-ernA* vector. Total protein extract (corresponding to 10 mg root tissue) from *A. indica* roots transformed either with the empty vector containing the DsRed marker or *p35S-ernA* (5 weeks and 7 weeks after transformation) were subjected to Western blot analysis with anti-ErnA antibodies (α-ErnA). The purified ErnA protein was used as positive control.

Table S1. List of the *tts* boxes used in the hidden Markov model profile^a.

<i>nop</i> gene	<i>tts</i> box sequences
<i>Ensifer fredii</i> NGR234 strain	
<i>nopB</i>	GTAGTCAGCGTGTTCGTCAGCTCGCCTCGCTAGAG
<i>nopC</i>	ATTGTCAGCTTTTTCGAAAGCTGGAGCTCATAAGT
<i>nopL</i>	ATTGTCAGCTTCTCGAAAGGTATGTCTCTTAACA
<i>nopM</i>	ATCGTCAGTTTATTGACAGCTAAGCCTTGTAGAA
<i>nopP</i>	CTAGTCAGCTGAACGTCAGTTGTGCGCGTCTATC
<i>nopT</i>	GCCGTCAGCTTAACGAAGCATCGTGCGAAGCGCG
<i>nopX</i>	CTCGTCAGTTTCTCGAAAGCTAAACCGCTCATGA
<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> USDA110 strain	
<i>nopB</i>	TCCGTCAGGTTTTTCGTCAGCTCGGCAGCCTATGA
<i>nopC</i>	TCCGTCAGGTTTTTCGTCAGCTCGGCAGCCTATGA
<i>nopE1</i>	ATCGTCAGCTTTTTCGACAGGTGTTCCGGGCTACCG
<i>nopE2</i>	GTCGTCAGCTTTTTCGACAGGTGCTGCAGGTAGAG
<i>nopL</i>	ATCGTCAGCTTTTTCGAAAGCTAAAGCCCCCAGCA
<i>nopM1</i>	CTCGTCAGCTCGACGTAAGCTAAATGTCTTAGAG
<i>nopM2</i>	TTCGTCAGCTTATCGACAGGTAGGCCTGCTAAGG
<i>nopP1</i>	TAGGTCAGGTTGTGGTCAGTTAGGTTGTATATTA
<i>nopT1</i>	TCCGTCAGCTCGCCATCAGCTTGTCCGGGTATCC
<i>nopT2</i>	CTCGTCAGTTTGCCGCGATATCGGTCGCAGGCAA
<i>Bradyrhizobium elkanii</i> USDA61 strain	
<i>nopB</i>	CTCGTCAGGTTTTTCGTCAGCTCACCGTACTACGA
<i>nopC</i>	CTCGTCAGCTTGTGCGAAAGCTAATGCTTCCATAG
<i>nopL</i>	CTCGTCAGCTTCTCGAAAGCTAACTCTCTTAGCA
<i>nopM1</i>	CCCGTCAGCTTATCGACAGCTACGTCTCGTAGCA
<i>nopM3</i>	CTCGTCAGCTTCTCGAAAGCCAAGCCTTGTAGCG
<i>nopM3</i>	CTCGTCAGCTGATCGACAGGTAGGCCTGCAAAGG
<i>nopP1</i>	CTAGTCAGCTTACGGTCAGTTTTCGCCTGGCTACT
<i>nopP2</i>	TGGGTCAGCTTGCGGTAAGCTAGGCTGTGTATTC
<i>nopT</i>	GCCGTCAGCTTGC GGCAATATCCTTCAGAGGCAG

a. The sequences of 26 confirmed *tts* boxes from *Ensifer fredii* strain NGR234 (4), *B. diazoefficiens* USDA110 (5), and *B. elkanii* USDA61 (6) were used.

Table S2. The inventory of putative type III effectors in the *Bradyrhizobium* sp. ORS3257 strain.

Gene Id	<i>nop</i> gene homology ^a	<i>tts</i> box sequence ^b	Characteristics of encoded proteins	Mutation ^c
<i>Brad3257_6970</i>	<i>nopM1</i>	GTCAGCTTATAGACAGCTGAGCTTCCTA	Novel E3 ubiquitin ligase	Δ <i>regA</i> , Ω <i>nopM1</i>
<i>Brad3257_6978</i>	<i>nopP1</i>	GTCAGCTTACGGACAGCTAAGCTGCTTA	unknown	Δ <i>regA</i> , Ω <i>nopP1</i>
<i>Brad3257_7099</i>	<i>nopT</i>	GTCAGCTCGTCGTCAGCTTGCCGCGAAT	cysteine protease	Δ <i>regB</i> , Ω <i>nopT</i>
<i>CDS6578292D</i>	<i>nopAO</i>	ni.	unknown	Δ <i>regB</i> , Ω <i>nopAO</i>
<i>Brad3257_7172</i>	-	GTCAGGTTCTCGAAAGCTTGCTCGACTA	unknown	Δ <i>regC</i>
<i>Brad3257_7178</i>	-	GTCAGCTTTTCGAAAGTTGCGGCTACA	InnB (Incompatible nodulation B)	Δ <i>regC</i>
<i>Brad3257_7179</i>	<i>nopM2</i>	GTCAGCTGATCGACAGGTAGGCCTGCTA	Novel E3 ubiquitin ligase	Δ <i>regC</i>
<i>Brad3257_7181</i>	<i>nopM3</i>	GTCAGCTTATCGAAAGCTAAGTCTCTTA	Novel E3 ubiquitin ligase	Δ <i>regC</i>
<i>Brad3257_7190</i>	<i>nopAD</i>	<i>tts</i> box upstream of <i>Brad3257_7194</i>	putative pectinesterase	Δ <i>regC</i>
<i>Brad3257_7191</i>	<i>nopAC</i>	<i>tts</i> box upstream of <i>Brad3257_7194</i>	putative endo-polygalacturonase	Δ <i>regC</i>
<i>Brad3257_7193</i>	-	<i>tts</i> box upstream of <i>Brad3257_7194</i>	unknown	Δ <i>regC</i>
<i>Brad3257_7194</i>	-	GTCAGCTTCTGGAAAGCTTCTCCGAATA	unknown	Δ <i>regC</i>
<i>Brad3257_7207</i>	<i>nopBl</i>	ni.	putative serine/threonine-protein kinase	Δ <i>regC</i>
<i>Brad3257_7238</i>	-	GTCAGCTTCCGGAAAGCTGAACCTGCCA	putative trehalose-6-phosphate synthase	Ω 7238
<i>Brad3257_7701</i>	-	GTCAGCTTGTCGACAGCTGATCCTAATA	ErnA (Effector required for nodulation)	Ω 7701, Δ 7701
<i>Brad3257_7707</i>	-	GTCAGGTTTGAGACCGACGTTCAAAGT	putative peptidase	Δ <i>regD</i> , Ω 7707
<i>Brad3257_7711</i>	<i>nopAB</i>	GTCAGCTTCTCGAAAGCCAACCTCCTTA	unknown	Δ <i>regD</i> , Ω <i>nopAB</i>
<i>Brad3257_7718</i>	<i>nopBW</i>	GTCAGCTAGTCGTCAGTCAGGCGGTCTA	unknown	Ω <i>nopBW</i>
<i>Brad3257_7734</i>	<i>nopAJ1</i>	GTCAGCTATTGACAGCTAAGCCCTTTA	unknown	Δ <i>regE</i>
<i>Brad3257_7736</i>	<i>nopAR</i>	GTCAGGTTTGGAAAGCTAACGTGAATA	unknown	Δ <i>regE</i>
<i>Brad3257_7738</i>	<i>nopAJ2</i>	GTCAGCTTCCGGAAAGCTGGAGCTGCAA	unknown	Δ <i>regE</i>
<i>Brad3257_7740</i>	<i>nopAM</i>	ni.	unknown	not mutated
<i>Brad3257_7759</i>	<i>nopL</i>	GTCAGCTTTTCGAAAGCTACTGCTGCCA	unknown	Ω <i>nopL</i>
<i>Brad3257_7764</i>	<i>nopC</i>	GTCAGCTTGTCGAAAGCTAATCCTTGCA	unknown	not mutated
<i>Brad3257_7767</i>	<i>nopAL</i>	<i>tts</i> box upstream of <i>nopC</i>	unknown	not mutated
<i>Brad3257_7768</i>	-	<i>tts</i> box upstream of <i>nopC</i>	unknown	not mutated
<i>Brad3257_7831</i>	<i>nopP2</i>	GTCAGGTTGTGGTCAGCTAGGAATTTTA	unknown	Ω <i>nopP2</i>

a. Homologies determined from *nop* genes described in Kimbrel et al. (2) and Staehelin and Krishnan (3).

b. ni., *tts* box not identified in the upstream region of the gene. In bold are the nucleotides indicated that are conserved with the consensus *tts* box motif described in Zehner et al. (5).

c. Δ , deletion mutants. Ω , insertional mutants.

Table S3. FRET-FLIM measurements showing that ErnA binds to nuclear nucleic acids *in planta*.

Donor	Acceptor	τ^a	SE	Δt^b	n ^c	FRET ^d	p ^e
ErnA-eGFP	-sytox	2,3067	0,03748983	359	30	15,6	1,9484E-12
ErnA-eGFP	+sytox	1,9468	0,02230802		38		
RRS1-S-KR-eGFP	-sytox	2,0931	0,0310181	0,36	25	1,7	0,99316508
RRS1-S-KR-eGFP	+sytox	2,0928	0,02802933		25		

a. Mean lifetime (in nanoseconds). For each nucleus, average fluorescence decay profiles were plotted and fitted with exponential functions using a nonlinear square estimation procedure. Mean lifetime was calculated according to $\tau = \sum \alpha_i \tau_i^2 / \sum \alpha_i \tau_i$ with $I(t) = \sum \alpha_i e^{-t/\tau_i}$.

b. $\Delta t = \tau_D - \tau_{DA}$ (in nanoseconds).

c. Total number of measured nuclei.

d. Percentage of FRET efficiency: $E = 1 - (\tau_{DA}/\tau_D)$.

e. P value of the difference between the donor lifetimes in the presence and absence of acceptor (Student's *t* test).

Table S4. Constructions made in this study.

Construction	Primers	Sequences (5' → 3')	Relevant characteristics
3257ΔT3SS	Up-3257-T3SSg.f/ Up-3257-T3SSg.r	CGCTGGAGGATCCCCGAACAGCATCAAAC / CCTTGGACTCAAGCTTGCACAAACAAGATGGAGGAAATC	Amplification of the upstream and downstream flanking DNA regions of the T3SS main operon (from <i>nopB</i> to <i>rhcU</i>). The PCR fragments were merged by overlap extension PCR and cloned into pNPTS129 at the BamHI/XbaI sites. The cefotaxime resistance cartridge was then cloned in the HindIII site between the upstream and downstream fragments. This construction was used to obtain the 3257ΔT3SS mutant by double crossing over.
	Dw-3257-T3SSg.f/ Dw-3257-T3SSg.r	CTTGTGGCAAGCTTGTAGTCCAAGGAACAGGATGGTAATC / GCCGACTCTAGACGCGCCATGGGTGTGCCAATTAC	
3257ΔregA	Up-3257-RegA.f/ Up-3257-RegA.r	GGCCGAATTCACGATACGTCAGATTAATC / TCGCATCGTCGACTCTAGACCATGGCGACCACACTCCTATG	Amplification of the upstream and downstream flanking DNA of the RegA region. The PCR fragments were merged by overlap extension PCR and cloned into pNPTS129 at the EcoRI/KpnI sites. The cefotaxime resistance cartridge was then cloned in the Sall site between the upstream and downstream fragments. This construction was used to obtain the 3257ΔregA mutant by double crossing over.
	Dw-3257-RegA.f/ Dw-3257-RegA.r	GCCATGGTCTAGAGTCGACGATCGCATCGCCGCCGATCATG / GCCGTCGGTACCGACGACGGCCTTGCCGATTAAC	
3257ΔregB	Up-3257-RegB.f/ Up-3257-RegB.r	TCTTCGGATCCCACCTCGAAGGTGCGGACTATAC / AGTACGTCTGAGCTTGGGAAGTGCTTAGATCGATCATC	Amplification of the upstream and downstream flanking DNA of the RegB region. The PCR fragments were merged by overlap extension PCR and cloned into pNPTS129 at the BamHI/XbaI sites. The cefotaxime resistance cartridge was then cloned in the HindIII site between the upstream and downstream fragments. This construction was used to obtain the 3257ΔregB mutant by double crossing over.
	Dw-3257-RegB.f/ Dw-3257-RegB.r	AGCACTTCCAAGCTTCAGACGTAAGTGCACCAAGTCTAAG / CCCTTGCTAGACTATCCAGGTGCGAGCCTCTTATG	
3257ΔregC	Up-3257-RegC.f/ Up-3257-RegC.r	GCGCAGGATCCCGGAGCAACCGCCATAGAATATG / TCAGACCAAGAGCTTAAAGTTACTGAGCGGAAACATTTG	Amplification of the upstream and downstream flanking DNA of the RegC region. The PCR fragments were merged by overlap extension PCR and cloned into pNPTS129 at the BamHI/XbaI sites. The cefotaxime resistance cartridge was then cloned in the HindIII site between the upstream and downstream fragments. This construction was used to obtain the 3257ΔregC mutant by double crossing over.
	Dw-3257-RegC.f/ Dw-3257-RegC.r	TCAGTAACTTAAAGCTTCTGGTCTGAAATTGAAAGAAAC / GACAGTCTAGAGTTGAAGCGAGGTCCCGGCTTTC	
3257ΔregD	Up-3257-RegD.f/ Up-3257-RegD.r	GAATGAGAAITCACTCGTGCCTGAATAAG / TGCTGACGCCAGCTTGTAGAGGCCAAGTTCGAATGTTAAG	Amplification of the upstream and downstream flanking DNA of the RegD region. The PCR fragments were merged by overlap extension PCR and cloned into pNPTS129 at the EcoRI/XbaI sites. The cefotaxime resistance cartridge was then cloned in the HindIII site between the upstream and downstream fragments. This construction was used to obtain the 3257ΔregD mutant by double crossing over.
	Dw-3257-RegD.f/ Dw-3257-RegD.r	TTGGCCTCTAAAGCTTGGCTGCAGCATCGCATGAAAC / CATGCACTCTAGAGTCTTGGTTGACGTGAGAAATG	
3257ΔregE	Up-3257-RegE.f/ Up-3257-RegE.r	CGCATTTGAATTCGACGAAGTACCCAGCAGGATATC / TGTTTTCTCAAGCTTGTCAATGTATCGAGCAAAGTTG	Amplification of the upstream and downstream flanking DNA of the RegE region. The PCR fragments were merged by overlap extension PCR and cloned into pNPTS129 at the EcoRI/XbaI sites. The cefotaxime resistance cartridge was then cloned in the HindIII site between the upstream and downstream fragments. This construction was used to obtain the 3257ΔregE mutant by double crossing over.
	Dw-3257-RegE.f/ Dw-3257-RegE.r	TGACATTGACAAAGCTTGAAGAAAACACGAGCGCAATATC / GGGCGTCTAGACAACACATCCAAGATGCAAGGATG	
3257Δ7701	Up-3257-7701.f/ Up-3257-7701.r	CTTCTGGGATCCACGACGACGCGCAACTTAATG / GTCCCTGGTGAAGCTTCTCTCTCGTCTCGCTATTAG	Amplification of the upstream and downstream flanking DNA regions of Brad3257_7701. The PCR fragments were merged by overlap extension PCR and cloned into pNPTS129 at the BglII/XbaI sites. The cefotaxime resistance cartridge was then cloned in the HindIII site between the upstream and downstream fragments. This construction was used to obtain the 3257Δ7701 mutant by double crossing over.
	Dw-3257-7701.f/ Dw-3257-7701.r	AACGAGAGAGAAAGCTTACCAGGGACAGTGCCTACATG / GATCGGTCTAGAAATCCAACACTAACGACCCCTTATG	
3257ΔregB-1	Up-3257-RegB-1.f/ Up-3257-RegB-1.r	GGCTGAGAAITCCCTGCGCACTGCCAGCTTAAAG / GCAACAGACGAAAGCTTGTGCGTATCATCGTCAGCATAATG	Amplification of the upstream and downstream flanking DNA of the RegB-1 region. The PCR fragments were merged by overlap extension PCR and cloned into pNPTS129 at the EcoRI/XbaI sites. The cefotaxime resistance cartridge was then cloned in the HindIII site between the upstream and downstream fragments. This construction was used to obtain the 3257ΔregB-1 mutant by double crossing over.
	Dw-3257-RegB-1.f/ Dw-3257-RegB-1.r	TGATCACGACAAAGCTTCTGTTGCAACCTCCCAAAC / CGCCACTCTAGACTACTGCGTCCGGAATTGCAAAG	
3257ΔregB-2	Up-3257-RegB-2.f/ Up-3257-RegB-2.r	GTGGGGCAATTCGGTCTGTTGCAACCTCCCAAAC / GGCATGAATCAAGCTTGTACTGCGTCCGGAATTGCAAAG	Amplification of the upstream and downstream flanking DNA of the RegB-2 region. The PCR fragments were merged by overlap extension PCR and cloned into pNPTS129 at the EcoRI/XbaI sites. The cefotaxime resistance cartridge was then cloned in the HindIII site between the upstream and downstream fragments. This construction was used to obtain the 3257ΔregB-2 mutant by double crossing over.
	Dw-3257-RegB-2.f/ Dw-3257-RegB-2.r	GACGCAGTACAAGCTTGTATTCATGCCGAGAGCATGCAATTC / GTTCTCTCTAGAGAAGCGCAACATGACCTGTCAATC	
3257Ω7701	3257-7701.f / 3257-7701.r	GCGCGGTGACGCGCAACCCGACGCAAGCGGAGTTTG / GCTCCTCTAGATAGTCTTCCGACGGAAGGATCAATG	Amplification of an internal DNA region of Brad3257_7701 and cloning into pVO155-ntp2-GFP-ntp2-Cefo at the Sall/XbaI sites. This construction was used to obtain the 3257Ω7701 mutant by single crossing over.
3257ΩnopM1	3257-nopM1.f / 3257-nopM1.r	GCAGCGGTGACGCGGACGGGCAAGGGGAGAATAG / GATGGCATCTAGACCGGACGGCTGACCAACTCGTTG	Amplification of an internal DNA region of <i>nopM1</i> (Brad3257_6970) and cloning into pVO155-ntp2-GFP-ntp2-Cefo at the Sall/XbaI sites. This construction was used to obtain the 3257ΩnopM1 mutant by single crossing over.

3257ΩnopP1	3257-nopP1.f / 3257-nopP1.r	GAGCTCGTCGACGACAGGAATGCTGACTATTC/ TCGGCGTCTAGACTAGCTCTTTCGGATACAAATTC	Amplification of an internal DNA region of <i>nopP1</i> (Brad3257_6978) and cloning into pVO155-npt2-GFP-npt2-Cefo at the Sall/XbaI sites. This construction was used to obtain the 3257 Ω nopP1 mutant by single crossing over.
3257ΩnopAO	3257-nopAO.f / 3257-nopAO.r	ATGACTGTCGACCAAAACACTCAGTTCACCTC/ GGCGGAATCTAGAAATCCATGCAAGCCTCTTTTTC	Amplification of an internal DNA region of <i>nopAO</i> (Brad3257_CDS6578292D) and cloning into pVO155-npt2-GFP-npt2-Cefo at the Sall/XbaI sites. This construction was used to obtain the 3257 Ω nopAO mutant by single crossing over.
3257ΩnopT	3257-nopT.f / 3257-nopT.r	GGCTCAGTCGACGAGTGCGCCATCTGGGGATTG/ GCTGCTTCTAGATTGCCGCTGAGCTGTGATTTG	Amplification of an internal DNA region of <i>nopT</i> (Brad3257_7099) and cloning into pVO155-npt2-GFP-npt2-Cefo at the Sall/XbaI sites. This construction was used to obtain the 3257 Ω nopT mutant by single crossing over.
3257Ω7707	3257-7707.f / 3257-7707.r	TTGAGGTCGACGAAGTCCGCGCGCATTGGATTG/ GCTCTTCTAGAGGAAGGCGCTCACCCTTTAAG	Amplification of an internal DNA region of Brad3257_7707 and cloning into pVO155-npt2-GFP-npt2-Cefo at the Sall/XbaI sites. This construction was used to obtain the 3257 Ω 7707 mutant by single crossing over.
3257ΩnopAB	3257-nopAB.f / 3257-nopAB.r	ATCACCCTGACGACAGCTGACACAGGAAGATC/ CCAAATCTAGAGTGATGCGGTGACCTCGGATTTC	Amplification of an internal DNA region of <i>nopAB</i> (Brad3257_7711) gene and cloned into pVO155-npt2-GFP-npt2-Cefo at the Sall/XbaI sites. This construction was used to obtain the 3257 Ω nopAB mutant by single crossing over.
USDA61ΩernA₆₁	USDA61-ernA.f / USDA61-ernA.r	GGTGACGTCGACGCAACAGCAGCAAGCGGAGTTG/ GTCGCTAGACTGGATCCGCTGCTCCAATTG	Amplification of an internal DNA region of <i>ernA₆₁</i> gene (homolog of Brad3257_7701) and cloning into pVO155-npt2-GFP-npt2-Cefo at the Sall/XbaI sites. This construction was used to obtain the USDA61 Ω ernA ₆₁ mutant by single crossing over.
3257ΩttsI	3257-ttsI.f / 3257-ttsI.r	GATCACTCGAGCTTTGGCCGCGCGTGAAGAAAC/ GCGAGCTCTAGATTGCTGCATAGACACTGGCTTTG	Amplification of an internal DNA region of <i>ttsI</i> (Brad3257_7742) and cloning into pVO155-npt2-GFP-npt2-Cefo at the Sall/XbaI sites. This construction was used to obtain the 3257 Ω ttsI mutant by single crossing over.
3257Δ7701::7701 DOA9::ernA₃₂₅₇ DOA9ΩrhcN::ernA₃₂₅₇	3257-comp7701.f / 3257-comp7701.r	GCAACCTCTAGAAGTAGTCGACCGCACCAGAAGCTTTG/ CTCATGTTCTAGAGTCCCTGGTGCTACATCTATG	Amplification of a fragment of 1650-bp encompassing the complete Brad3257_7701 gene and its upstream promoter region and cloning into the XbaI site of pVO155-npt2-GFP or pMG103-npt2-cefo-npt2-GFP. These constructions were used respectively to complement the 3257 Δ 7701 mutant or to transfer the Brad3257_7701 gene into DOA9 or DOA9 Ω rhcN strains.
3257::ernA-His₆ 3257ΔT3SS::ernA-His₆	3257-6his-7701.f 3257-6his-7701.f	GCATGTCTAGAGCAAGGCTTCAACGTCGATC/ GTCCTCTAGACTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGATGAT GGATGAGCCG	Amplification of a fragment of 1497-bp encompassing the complete Brad3257_7701 gene and its upstream promoter region and cloning into the XbaI site of pVO155-npt2-GFP. These constructions were used to express an His-tagged ErnA in ORS3257 WT and 3257 Δ T3SS strains.
3257::nopT-His₆ 3257ΔT3SS::nopT-His₆	3257-6his-nopT.f 3257-6his-nopT.f	CTCGTTCTAGACTTCCCGAATATCATC/ GACATCTAGACTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGCATTC TTTGTGTG	Amplification of a fragment of 971-bp encompassing the complete <i>nopT</i> (Brad3257_7099) gene and its upstream promoter region and cloning into the XbaI site of pVO155-npt2-GFP. These constructions were used to express an His-tagged NopT protein in ORS3257 WT and 3257 Δ T3SS.
GV3101::p35S-ernA- egfp	7701+atg.f 7701-stop.r	ATGGACCCATTTAACCAGCATCAAC/ TGGATGATGGATGAGCCGAAC	Amplification of Brad3257_7701 gene from the start to the codon before the stop and cloning into the Gateway entry vector pCR8/GW/TOPO vector (ThermoFisher). The PCR product was recombined into the destination vector pB7FWG2.0 (https://gateway.psb.ugent.be) with a C-terminal GFP tag and downstream of a 35S promoter. This vector contains the spectinomycin resistance gene for bacteria selection and was used to determine the sub-cellular localization of ErnA into <i>N. benthamiana</i> leaf cells.
GV3101::p35S- ernAΔNLS-egfp	7701 Δ NLS.f 7701 Δ NLS.r	CCGTCTGGCTTAGTGTGCGCTGCGCCCGCAGCGCCAA CTGGCCGGTGTAGT/ ACTACACCGCCAGTTGGCGCTGCGGGGGCGCAGGCGA CACTAAGCCAGACGG	From the pB7FWG2.0 plasmid containing <i>ernA</i> previously constructed (see above) the NLS motif (RPAKRQRTL) was changed into (APAGAQAATL) using the QuikChange lightning site-directed mutagenesis kit (Agilent) and the primers (7701 Δ NLS.f/7701 Δ NLS.r).
ARqua1::p35S-ernA	7701+atg.f 7701+stop.r	ATGGACCCATTTAACCAGCATCAAC/ CTATGGATGATGGATGAGCCGAAC	Amplification of Brad3257_7701 gene from the start to the stop codon and cloning into the Gateway entry vector pCR8/GW/TOPO vector (ThermoFisher). The PCR product was recombined into the destination vector pICV51 (https://gateway.psb.ugent.be) downstream of a 35S promoter. This vector contains the spectinomycin resistance gene for bacteria selection and was used to overexpress <i>ernA</i> (Brad3257_7701) in transformed roots of <i>A. indica</i> .
Pfo-1::ernA-gfp₁₁	ErnA-Fw ErnA-GFP11-rev ErnA-GFP11-Fw AttB1-ErnA AttB2-ErnA GFP11-rev	ATGGACCCATTTAACCAGCATCAACCATTGCA/ GCTGCCGCGTCCGCTGGATGATGGATGAGCCGAACGT TCATCCATCATCCAGCGCAGCGCGGCGGGCGGGCGGCA GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGGACCCA TTTAACCGCA GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTGGATGATG GATGAGCCGAA/ TCATGTGATGCCGCGGCGGTTCACGTACTC	The <i>ernA-gfp₁₁</i> insert was generated by two-step PCR using PrimeStar HS DNA polymerase from Takara Bio Inc. (Otsu, Japan). Fragment 1 was generated using primers ErnA-Fw and ErnA-GFP11-rev, Fragment 2 used primers ErnA-GFP11-Fw and GFP11-Rev. PCR fragment 3, generated by mixing fragments 1 and 2 in presence of primers AttB1-ErnA and AttB2-GFP11 was recombined into pDONR207 (Invitrogen) to generate the pENTR- <i>ernA-gfp₁₁</i> entry clone. The <i>ernA-gfp₁₁</i> insert was recombined into the pBBR-P2pm-GWY-3HA47 destination vector allowing the expression of <i>ernA-gfp₁₁</i> in <i>Pseudomonas fluorescens</i> (Pfo-1) cells.

Pfo-1::ernA-3HA	AttB1-ErnA AttB2-ErnA	GGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTAATGGACCC ATTTAACCGCA/ GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTGGATGAT GGATGAGCCGAA	The <i>ernA</i> insert was generated by PCR using PrimeStar HS DNA polymerase from Takara Bio Inc. (Otsu, Japan), using primers AttB1-ErnA and AttB2-ErnA; The AttB1-ErnA-AttB2 fragment was recombined into pDONR207 (Invitrogen) to generate the pENTR-ernA entry clone. The <i>ernA</i> insert was recombined into the pBBR-P2pm-GWY-3HA destination vector allowing the expression of <i>ernA-3HA</i> in <i>Pseudomonas fluorescens</i> (Pfo-1) cells.
------------------------	--------------------------	---	--

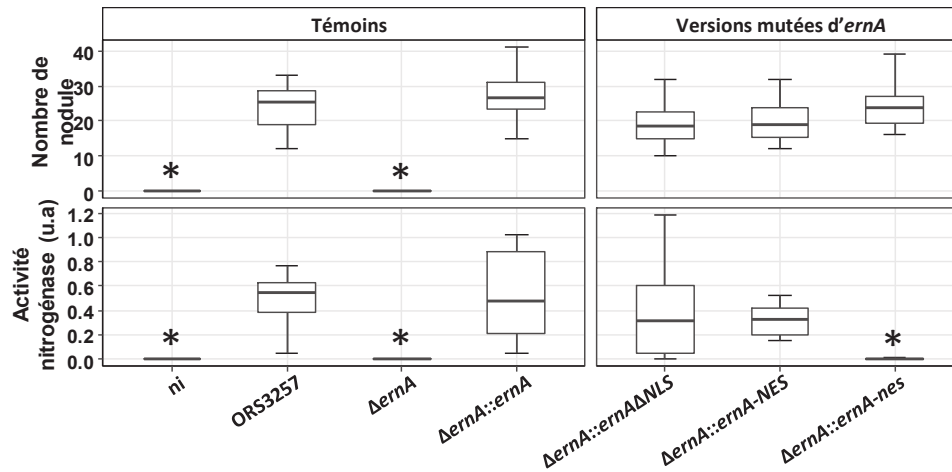
Table S5. List of the primers used for RT-qPCR experiments.

gene	Primers	Sequences (5' → 3')
<i>rhcN</i>	rhcN-QPCR. f	GTTCTGATGATGGATTCGCTGACG
	rhcN-QPCR. R	CGCAAAGACGGAAGGAGGAAAG
<i>nopX</i>	nopX-QPCR. f	AAGTTGGCTCTAAGGTATTC
	nopX-QPCR. R	GGCAGTGTGAAGAAGATT
<i>ernA</i>	ernA-QPCR.f	TCCTTTCATAGTTCATAATG
	ernA-QPCR.f	GATAGATTGAGTGGAGAG
<i>adhB</i>	adhB-QPCR.f	GAGGTGATCGTCAATTCC
	adhB-QPCR.f	GCAGGCTTTTCAGATACA

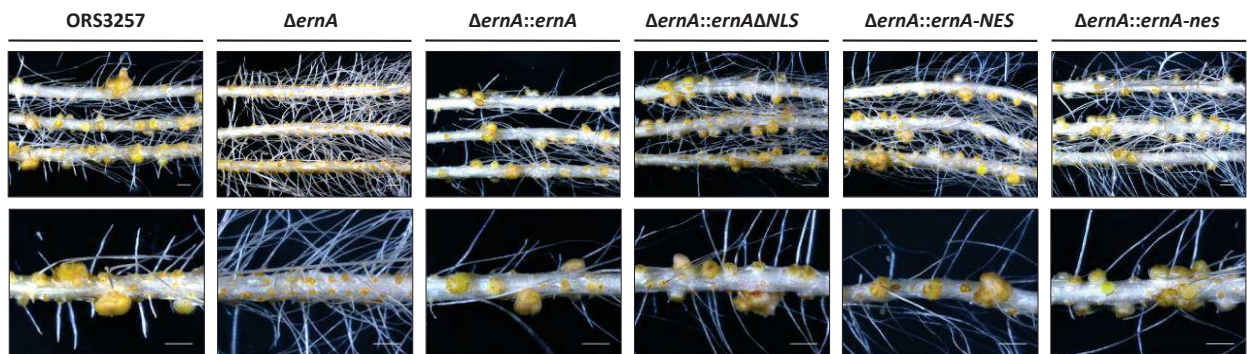
Supplementary references:

1. Eddy SR (1998) Profile hidden Markov models. *Bioinformatics* 14:755-763
2. Kimbrel JA et al. (2013) Mutualistic co-evolution of type III effector genes in *Sinorhizobium fredii* and *Bradyrhizobium japonicum*. *PLOS Pathog* 9, e1003204. doi: 10.1371.
3. Staehelin C, Krishnan HB (2015) Nodulation outer proteins: double-edged swords of symbiotic rhizobia. *Biochem J* 470:263–274.
4. Marie C et al. (2004) TtsI, a key regulator of *Rhizobium* species NGR234 is required for type III-dependent protein secretion and synthesis of rhamnose- rich polysaccharides. *Mol. Plant Microbe Interact* 9:958–966.
5. Zehner S, Schober G, Wenzel M, Lang K, Göttfert M (2008) Expression of the *Bradyrhizobium japonicum* type III secretion system in legume nodules and analysis of the associated *tts*-box promoter. *Mol Plant-Microbe Interact* 21:1087–1093
6. Okazaki S, Zehner S, Hempel J, Lang K, Gottfert M. (2009) Genetic organization and functional analysis of the type III secretion system of *Bradyrhizobium elkanii*. *FEMS Microbiol Lett* 295: 88–95.

A



B



C

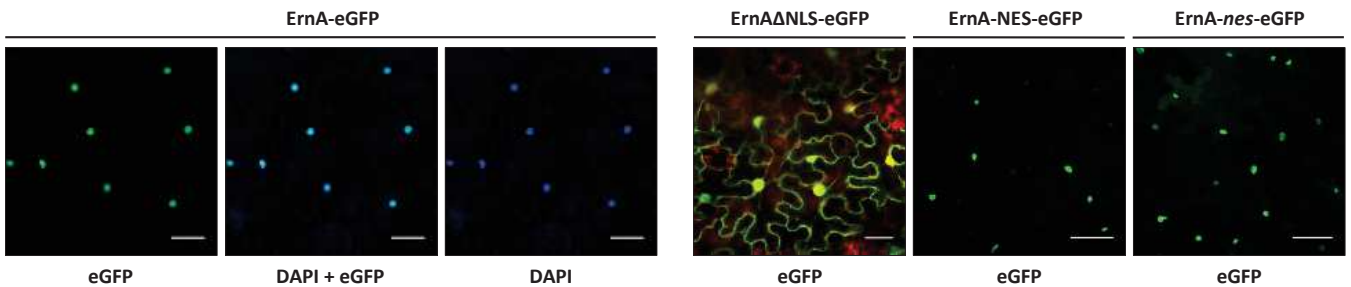


Figure 53. Analyse de la localisation nucléaire d'ErnA chez la souche *Bradyrhizobium* sp. ORS3257 lors de son interaction avec *A. indica*

A. Nombre de nodules formés et activité nitrogénase des plantes d'*A. indica* 21 jours après inoculation de la souche ORS3257 et de ses mutants dérivés. L'activité nitrogénase a été mesurée par analyse de la réduction de l'acétylène (ARA); u.a., unité arbitraire. Les box plots montrent les résultats d'une à deux expériences indépendantes par souche (12 plantes par test). Le rectangle central recouvre les données du premier quartile au troisième, le segment en gras indique la médiane. * $p < 0,005$, La significativité de la série de données par rapport à celle d'ORS3257 est déterminée par un test non-paramétrique de Kruskal-Wallis. **B.** Comparaison du phénotype symbiotique induit par la souche sauvage ORS3257 et par les différents mutants. Barre : 1,5 cm. **C.** Localisation subcellulaire des fusions traductionnelles d'*ernA* sur des cellules épidermiques de *N. benthamiana* observées au microscope confocal. Barre : 50 μm.

3. Résultats complémentaires sur l'étude fonctionnelle d'ErnA

L'un des objectifs de ma troisième année de thèse a été d'avancer dans la compréhension de la fonction moléculaire d'ErnA. Une grande partie des résultats qui vont être présentés ici ont été obtenus avec l'aide de Joël Fardoux, qui a réalisé les clonages et les mutations de la souche ORS3257, mais également avec l'aide d'Alicia Camuel au cours d'un stage M1 qu'elle a effectué dans notre équipe et que j'ai encadré.

3.1. Etude complémentaire de la localisation nucléaire d'ErnA

Comme présenté dans l'Article 1, ErnA est un effecteur qui se localise spécifiquement dans les noyaux des cellules végétales grâce à la présence d'un motif NLS conservé dans la partie N-terminale de la protéine, et dont la fonctionnalité dans l'adressage au noyau a pu être démontrée grâce à sa mutation. Cette observation nous amène à nous demander si la fonction d'ErnA dépend de son adressage dans les noyaux. Considérant que la mutation du motif NLS d'ErnA n'abolit pas totalement la localisation nucléaire de la protéine (voir l'Article 1), deux autres formes mutées d'ErnA ont été construites : (I) l'ajout en C-terminal d'un domaine d'exclusion NES (pour « nuclear export signal). Ce domaine est constitué d'un motif de 10aa (LALKLAGLDI) riche en leucines, responsable de la prise en charge de la protéine par les exportines. Cette modification devrait ainsi conduire à une localisation cytoplasmique d'ErnA en forçant son exclusion du noyau; et (II) l'ajout en C-terminal d'un domaine NES altéré (noté nes: LALKAAGADA). Cette dernière construction, utilisée comme contrôle, a été réalisée pour s'assurer que l'ajout de quelques acides aminés en C-terminal d'ErnA n'altère pas sa fonction. Ces deux constructions ont été insérées dans le mutant $\Delta ernA$ (ORS3257 $\Delta ernA$) pour tester la complémentation du phénotype symbiotique sur *A. indica*. Elles ont également été fusionnées à l'eGFP et mises sous contrôle d'un promoteur p35S pour déterminer leur localisation subcellulaire dans les cellules épidermiques de *N. benthamiana* après agroinfiltration.

L'analyse des propriétés symbiotiques du mutant $\Delta ernA::ernA-NES$ montre que celui-ci possède un phénotype similaire à celui de la souche sauvage, tant sur le nombre de nodules induits que sur l'activité fixatrice d'azote des plantes, mesurée en tests ARA (Figure 53A). L'aspect des nodules est également identique à celui du WT et des analyses réalisées en microscopie confocale (non-montrées ici) démontrent qu'ils sont correctement infectés par la bactérie (figure 53B). Ce résultat pourrait suggérer que la fonction d'ErnA ne dépend pas de sa localisation. D'autre part, et de manière inattendue, l'inoculation du mutant $\Delta ernA::ernA-nes$ conduit à la formation d'un nombre de nodules comparable à celui du WT mais ces derniers sont nécrotiques et ne sont pas ou très peu infectés, et donc non fonctionnels pour la fixation d'azote (Figure 53A et 53B). L'addition en C-

Nom de l'effecteur	Souches	Fonction putative	CM1	CM2	CM3
NopM	ORS3257; USDA110; NGR234; USDA76	novel E3-ubiquitine ligase	-	-	-
NopP	ORS3257; USDA110; NGR234; USDA76	-	-	-	-
NopT	ORS3257; USDA110; NGR234; USDA76	cystéine protéase	-	-	-
InnB	ORS3257; USDA61	-	-	1	1
ErnA (version courte)	ORS3257	-	1	2	1
ErnA (version longue)	USDA110; USDA61; USDA76	-	2	2	1
NopAB	ORS3257; USDA110	-	1	2	0
NopBW	ORS3257; USDA110	-	-	-	-
NopAJ	ORS3257; USDA110	-	-	-	-
NopAR	ORS3257; USDA110	-	-	3	2
NopL	ORS3257; USDA110; NGR234; USDA76	-	-	-	-
NopC	ORS3257; USDA110; NGR234; USDA76	-	-	-	-
NopE	USDA110	-	-	-	-
NopAA (GunA2)	USDA110; USDA76	-	1	-	-
NopAG (NopF)	USDA110	-	-	-	-
BEL2-5	USDA61; USDA76	SUMO protéase	5	1	-
NopD	HH103, MAFF303099	SUMO protéase	2	1	-
NopBV	MAFF303099	shikimate kinase	-	-	-
NopBX	MAFF303099	shikimate kinase	-	-	-
NopJ	NGR234	acetyltransférase	-	-	-

Tableau 3. Liste des effecteurs utilisés pour la recherche de motifs conservés en utilisant le logiciel MEME

45 séquences de 20 effecteurs différents ont été utilisées pour la prédiction par MEME de motifs conservés chez ErnA. Les colonnes CM1, CM2 et CM3 indiquent le nombre de répétition du motif correspondant dans la séquence protéique de chacun des effecteurs.

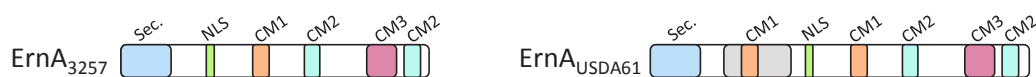


Figure 54. Représentation schématique de l'organisation des trois motifs identifiés par MEME dans les séquences protéiques de la version courte (à gauche) et longue (à droite) d'ErnA

Les trois motifs CM1, CM2 et CM3 sont représentés par des rectangles de couleur orange, bleu clair et rouge, respectivement. La position du motif NLS, prédit par NSL-Mapper, est représentée par un rectangle vert alors que celle du putatif motif de sécrétion (non prédit par MEME) est représentée par un rectangle bleu foncé du côté N-terminal de chaque protéine. La version longue d'ErnA (comme chez USDA61, à droite) possède un second motif CM1 conservé dans la région supplémentaire de 80aa (rectangle gris) non présente dans la forme courte d'ErnA.

terminal du motif nes a pu altérer, pour une raison qui demeure encore inconnue, l'interaction d'ErnA avec sa cible ou d'autres acteurs impliqués dans l'infection ou la répression des mécanismes de défense de la plante. Cette information est malgré tout importante, car pour l'identification des cibles d'ErnA, il est envisagé, entre autres, de rajouter un Tag du côté C-terminal de la protéine pour la purifier ou l'isoler avec ses interactants par immunoprécipitation (Tag-6His ou Tag-HA). Il sera donc important de vérifier que l'ajout de ces Tags ne perturbe pas le fonctionnement d'ErnA.

Les observations faites sur *N. benthamiana* après expression transitoire des constructions p35S permettent de mieux comprendre les phénotypes symbiotiques observés sur *A. indica*. En effet, il apparaît que les deux protéines fusions ErnA-NES-eGFP et ErnA-nes-eGFP ne présentent aucune modification de leur adressage nucléaire (Figure 53C). Cela nous amène à penser que le domaine NES n'a pas eu l'effet escompté, ce qui explique la complémentation du phénotype symbiotique chez ce mutant. Cela pourrait éventuellement s'expliquer par la position du domaine NES (intercalé entre la partie C-terminale d'ErnA et N-terminale de l'eGFP) qui n'est peut-être pas propice à sa fonction d'exclusion. Une alternative serait alors, en ce qui concerne les expériences de localisation, de fusionner ErnA à un Tag eGFP-NES de sorte que le domaine d'exclusion soit plus facilement accessible et pris en charge par les exportines. Néanmoins, peu de doutes sont émis quant au fait que la fonction symbiotique d'ErnA soit directement liée à sa localisation nucléaire. En effet, comme présenté dans l'Article 1, il a été démontré qu'ErnA interagit avec les acides nucléiques et que le motif NLS est parfaitement conservé chez l'ensemble de ses homologues. C'est pourquoi aujourd'hui, l'équipe s'oriente vers l'identification des cibles potentielles d'ErnA plutôt que de dépenser trop d'énergie et de temps sur des expériences visant à relier sa fonction et sa localisation.

3.2. Analyse *in silico* comparative de la séquence protéique d'ErnA

La première analyse *in silico* réalisée sur la séquence protéique d'ErnA a été menée en interrogeant les bases de données couramment utilisées pour l'identification de domaines fonctionnels (InterProScan, Prosite, Uniprot, Swiss-Prot...), mais aucun résultat clair n'en est ressorti. Afin de nous fournir des pistes pour progresser dans la compréhension de la fonction moléculaire d'ErnA, le logiciel MEME (<http://meme-suite.org/tools/meme>) a été utilisé pour identifier des motifs présents sous forme de répétitions internes ou partagés par différentes protéines pouvant révéler des groupes fonctionnels encore inconnus (Bailey *et al.*, 2009). Pour cela, les séquences en acides aminés de quatre homologues d'ErnA ont été comparées à celles des nombreux homologues d'effecteurs connus, tous listés dans le Tableau 3.

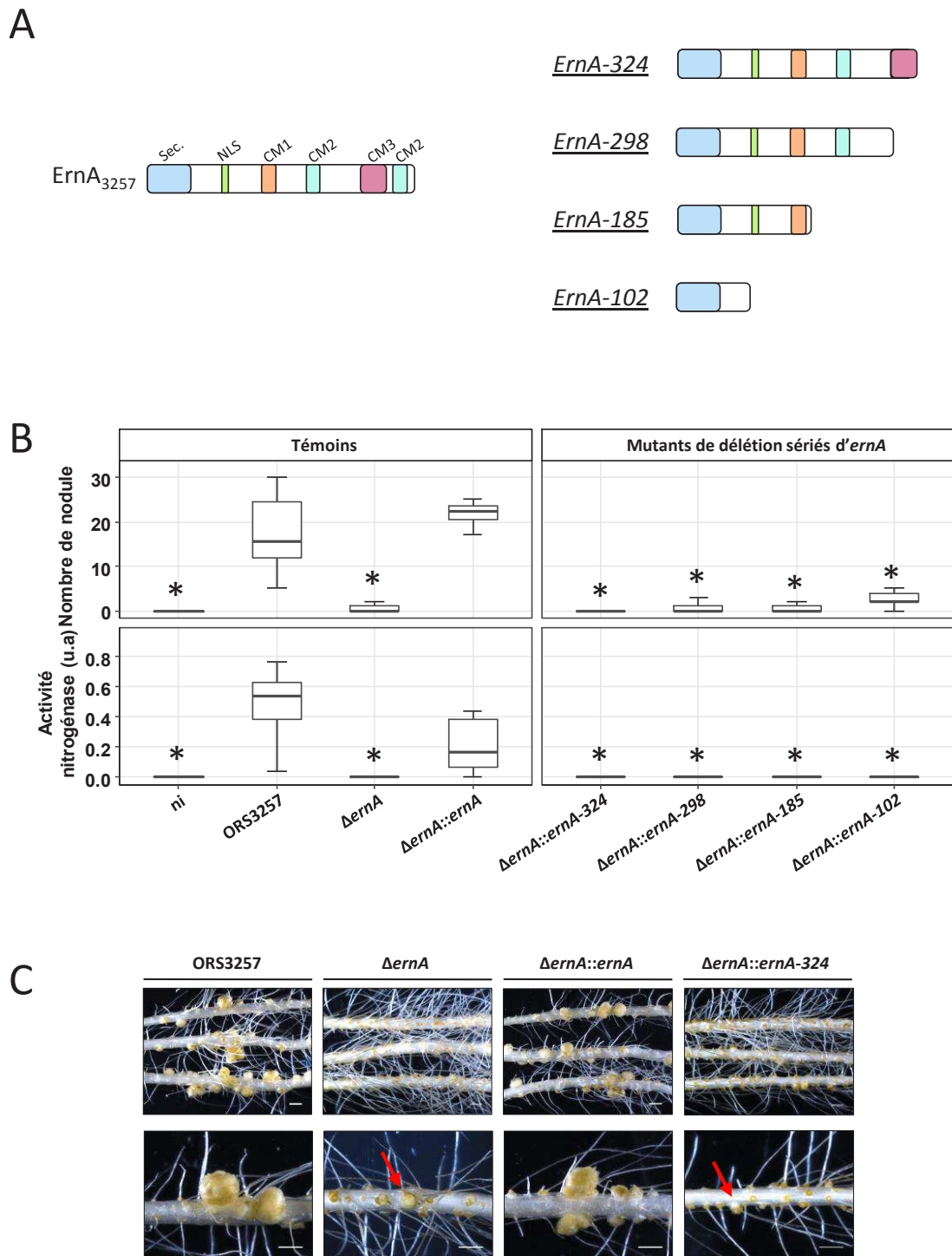


Figure 55. Rôle de l'extrémité C-terminale d'ErnA chez la souche *Bradyrhizobium* sp. ORS3257 lors de son interaction avec *A. indica*

A. Représentation schématique d'ErnA et de ses différentes formes mutées pour la complémentation du mutant de délétion $\Delta ernA$. **B.** Nombre de nodules formés et activité nitrogénase des plantes d'*A. indica* 21 jours après inoculation avec la souche ORS3257 et ses mutants dérivés. L'activité nitrogénase a été mesurée par analyse de la réduction de l'acétylène (ARA); u.a., unité arbitraire. Les box plots montrent les résultats d'une à deux expériences indépendantes par souche (12 plantes par test). Le rectangle central recouvre les données du premier quartile au troisième, le segment en gras indique la médiane. * $p < 0,005$, La significativité de la série de données par rapport à celle d'ORS3257 est déterminée par un test non-paramétrique de Kruskal-Wallis. **C.** Comparaison du phénotype symbiotique induit par la souche sauvage ORS3257 et par les différents mutants. Barre : 1,5 cm.

Trois motifs différents, nommés arbitrairement CM1 (pour « conserved motif 1 »), CM2 et CM3, ont été identifiés par MEME dans les séquences protéines des quatre homologues d'ErnA. Ces trois motifs sont organisés dans les deux versions, longue et courte, d'ErnA comme représenté dans la Figure 54. Les deux versions d'ErnA partagent les mêmes motifs conservés aux mêmes endroits de la protéine, à l'exception de la prédiction d'un deuxième CM1 dans le domaine de 80aa spécifique de la version longue d'ErnA. Ces trois motifs ont également été prédits chez six autres effecteurs de la liste où la nature des motifs conservés et le nombre de répétitions varient en fonction des protéines (Tableau 3). La conservation de ces motifs chez d'autres effecteurs suggère qu'ils pourraient remplir un rôle fonctionnel important. A l'exception de BEL2-5 et de NopD, qui sont supposés agir en tant que SUMO protéase, ces trois motifs sont retrouvés la plupart du temps chez des effecteurs dont la fonction est encore inconnue (Tableau 3).

3.3. L'extrémité C-terminale joue un rôle essentiel dans la fonction symbiotique d'ErnA

Pour déterminer le niveau d'implication de ces motifs dans l'établissement de la nodulation, quatre délétions sériées de l'extrémité 3' d'*ernA* ont été construites et introduites dans le mutant $\Delta ernA$ sous contrôle du promoteur endogène. Ces différentes formes mutées ont été obtenues par PCR en modifiant le positionnement de l'amorce reverse pour amplifier le gène. Ces constructions conduisent à la traduction de quatre formes tronquées d'ErnA telles que représentées sur la Figure 55A. Les propriétés symbiotiques des quatre mutants complémentés ont été analysées sur *A. indica* et comparées à la souche sauvage ORS3257 et aux deux mutants $\Delta ernA$ et $\Delta ernA::ernA$.

Comme présenté dans la Figure 55, les phénotypes symbiotiques de la souche sauvage et des mutants $\Delta ernA$ et $\Delta ernA::ernA$ sont en adéquation avec les résultats publiés dans l'Article 1. La souche sauvage et le mutant de délétion complémenté par l'allèle sauvage d'ErnA présentent bien des nodules infectés et fixateurs d'azote (Figure 55B et 55C). Pour les mutants complémentés avec des délétions sériées d'ErnA, il apparaît que dès la première délétion sériée (*ernA-324*), une altération drastique du phénotype est observée - *c.-à-d.* une quasi-absence de nodules et une fixation d'azote résiduelle - (Figure 55B et 55C). Ce phénotype est comparable à celui observé pour le mutant $\Delta ernA$. Les trois autres mutants de délétions ont un phénotype symbiotique similaire. Dans la forme mutée *ernA-324*, l'un des deux motifs CM2, celui de la partie C-terminale de l'effecteur, est délété. Ainsi, ces résultats suggèrent que la partie C-terminale d'ErnA, et plus particulièrement le CM2, joue un rôle essentiel dans l'organogénèse nodulaire.

A

Souches	Origine	Résistances	Caractéristiques
<i>ΔernA</i>	LSTM	Cefotaxime (20 µg/mL)	Mutant de délétion du gène BRAD3257_v2_7701
<i>ΔernA::ernA</i>	LSTM	Cefotaxime (20 µg/mL) + Kanamycine (50 µg/mL)	Complémentation du mutant <i>ΔernA</i> avec <i>ernA</i>
<i>ernAΔNLS</i>	LSTM	Cefotaxime (20 µg/mL) + Kanamycine (50 µg/mL)	Complémentation du mutant <i>ΔernA</i> avec <i>ernAΔNLS</i>
<i>ernA-NES</i>	LSTM	Cefotaxime (20 µg/mL) + Kanamycine (50 µg/mL)	Complémentation du mutant <i>ΔernA</i> avec <i>ernA-NES</i>
<i>ernA-nes</i>	LSTM	Cefotaxime (20 µg/mL) + Kanamycine (50 µg/mL)	Complémentation du mutant <i>ΔernA</i> avec <i>ernA-nes</i>
<i>ernA-324</i>	LSTM	Cefotaxime (20 µg/mL) + Kanamycine (50 µg/mL)	Complémentation du mutant <i>ΔernA</i> avec <i>ernA-324</i>
<i>ernA-298</i>	LSTM	Cefotaxime (20 µg/mL) + Kanamycine (50 µg/mL)	Complémentation du mutant <i>ΔernA</i> avec <i>ernA-298</i>
<i>ernA-185</i>	LSTM	Cefotaxime (20 µg/mL) + Kanamycine (50 µg/mL)	Complémentation du mutant <i>ΔernA</i> avec <i>ernA-185</i>
<i>ernA-102</i>	LSTM	Cefotaxime (20 µg/mL) + Kanamycine (50 µg/mL)	Complémentation du mutant <i>ΔernA</i> avec <i>ernA-102</i>

B

Nom de l'amorce	Séquence
7701-Fw	ATGGACCCATTTAACCGCATCAACCCATTCGA
NES-Rev	AATATCAAGTCCAGCCAACCTTAAGAGCAAGCCCACCTCCTGGATGATGGATGAGCCGAAC
nes-Rev	AGCATCAGCTCCAGCCGCCTTAAGAGCAAGCCCACCTCCTGGATGATGGATGAGCCGAAC
Nop7701-stop	TGGATGATGGATGAGCCGAAC
Nop7701.ATG	ATGGACCCATTTAACCGCATCAAC
6978-CpNopABR324.r	CCGAGCTCTAGACATCACGAAATTGGGGCGGGTTG
6978-CpNopABR298.r	AAATCTTCTAGAGTCAGGGCGGCGTCTGTTTCAGCTCTG
6978-CpNopABR185.r	CGCTCTTAGACTCAGGCGTGGTCATGACGCTCGGTC
6978-CpNopABR102.r	AGGCCTTAGACTCAGGTGTAGTCTCGCCATCAG

Tableau 4. Liste des mutants et des amorces utilisées dans le complément d'information de l'Article 1

A. Liste des différents mutants *ernA* de la souche *Bradyrhizobium* sp. ORS3257 utilisés dans ce complément d'information. **B.** Liste des amorces utilisées pour la construction des différents mutants.

La construction de versions tronquées d'*ernA* du côté C-terminal présente l'avantage de pouvoir tester l'importance du CM2 dans la fonction d'ErnA. Cependant, cette technique ne nous permet pas de conclure sur un éventuel rôle joué par les autres domaines conservés (CM1 et CM3). Ces derniers sont pourtant fréquemment retrouvés chez des effecteurs de type III (Tableau 3) et pourraient donc avoir un rôle fonctionnel. C'est pourquoi, un des moyens de mieux comprendre leur importance est d'identifier les acides aminés plus conservés au sein de ces domaines. Ce travail est actuellement en cours dans l'équipe, où l'utilisation d'un modèle HMM, spécifiquement entraîné pour la reconnaissance de ces motifs, est envisagée. Par la suite, la mutation ponctuelle des principaux acides aminés conservés serait une possibilité pour mieux comprendre leur rôle. L'ensemble de cette étude permettra, *in fine*, de mieux comprendre le mode d'action d'ErnA.

3.4. Matériels et Méthodes complémentaires

Les constructions des différentes versions mutées d'ErnA ont été réalisées par PCR en couplant l'amorce 7701-Fw (pour les complémentations du mutant $\Delta ernA$) ou l'amorce Nop7701.ATG (pour les expressions transitoires dans *N. benthamiana*) avec l'amorce reverse correspondante (Tableau 4). Le clonage et les transformations des différentes souches utilisées pour la construction des mutants ont été réalisés comme décrit dans la partie Matériel et Méthode de l'Article 1. De la même manière, l'observation des phénotypes présentés dans cette partie a été réalisée comme décrit dans l'Article 1.

Chapitre II

1. Contexte de l'étude

Le genre *Bradyrhizobium* est connu pour être le plus large et le plus diversifié des genres de rhizobium. Il rassemble des souches isolées d'environnements très variés et aux styles de vie très diversifiés. Les *Bradyrhizobium* sont abondants dans les sols du monde entier (Delgado-Baquerico *et al.*, 2018) et peuvent entrer en interaction symbiotique avec de nombreuses plantes. Beaucoup de souches de *Bradyrhizobium* sont fixatrices d'azote (Avontuur *et al.*, 2019) et sont les principales symbiotes de légumineuses d'intérêts agronomiques majeurs tels que le soja (*Glycine max*), l'arachide (*Arachis hypogaea*) ou le niébé (*Vigna unguiculata*). L'expansion du nombre de génomes séquencés de *Bradyrhizobium* a offert récemment la possibilité à plusieurs équipes de recherche de réviser la phylogénie du genre (Garrido-Sanz *et al.*, 2019, Avontuur *et al.*, 2019, Ormeño-Orrillo *et al.*, 2019). Ainsi, le genre *Bradyrhizobium* se sub-divise en sept phylogroupes différents, dont le Supergroupe *B. japonicum* qui rassemble une majorité de souches séquencées, une grande partie étant isolées de nodules de sojas (Avontuur *et al.*, 2019).

C'est au cours de notre analyse de la répartition d'ErnA au sein du genre *Bradyrhizobium* que nous avons découvert que de nombreux génomes de *Bradyrhizobium* avaient été récemment séquencés et étaient disponibles dans les bases de données publiques. L'analyse de ces génomes nous a notamment révélé qu'un grand nombre de souches de *Bradyrhizobium* possèdent un T3SS et que, parmi eux, deux tiers possèdent également un homologue d'*ernA* (voir l'Article 1). Une telle distribution du T3SS et d'*ernA* nous suggère que beaucoup de souches de *Bradyrhizobium* pourraient également avoir la capacité d'établir une interaction symbiotique T3SS-dépendante sur *A. indica*. Afin de tester cette hypothèse, une collecte d'un maximum de ces souches a été initiée par Eric Giraud il y a près de deux ans. Les deux objectifs de cette collecte étaient : de déterminer la capacité symbiotique de ces souches sur *A. indica*, puis de les comparer par une analyse de génomique comparative, centrée sur le T3SS, pour identifier des déterminants communs ou spécifiques des souches nodulantes.

Cette analyse de génomique comparative a constitué une partie de mon travail de thèse. En collaboration avec Florent Lassalle (Sanger Institute, UK), le Géoscope (LABGeM, Paris) et Ralf Koebnik (IPME, Montpellier), nous avons mis en évidence l'existence d'au moins six clusters T3SS dans le genre *Bradyrhizobium*. Deux d'entre eux, nommés RhclA et RhclB conservés chez 92 souches sur les 146 étudiées, sont systématiquement associés à la présence des gènes de nodulation *nod* et correspondent par ailleurs aux clusters Rhcl-T3SS fonctionnels déjà caractérisés chez plusieurs souches de rhizobiums. Une telle association nous suggère que le T3SS des *Bradyrhizobium* pourrait bien jouer un rôle dans l'interaction symbiotique plus important que celui connu jusqu'à présent. Cette analyse a été complétée par une recherche *in silico* des *bona fide* effecteurs sur l'ensemble des

génomomes de *Bradyrhizobium* utilisés dans cette étude. Il est notamment apparu que deux familles d'effecteurs en particulier, NopM et les effecteurs à domaine SUMO protéase, sont surreprésentées et très diversifiées soulevant ainsi de nombreuses questions quant à leurs rôles au cours de l'interaction symbiotique.

En parallèle de cette étude, des tests symbiotiques sur *A. indica* d'une partie de ces souches de *Bradyrhizobium* ont été réalisés par Alicia Camuel au cours d'un stage de M1 que j'ai encadré. Jusqu'à présent, 50 souches ont pu être testées et nous avons mis en évidence que certaines souches possédant un T3SS peuvent noduler *A. indica* alors qu'elles ne possèdent pas d'homologue d'*ernA*. Ces résultats ont motivé la recherche de nouveaux effecteurs candidats ayant les mêmes propriétés inductrices de la nodulation qu'ErnA. Plusieurs candidats ont été identifiés et certains sont en cours d'étude dans l'équipe.

Dans ce chapitre 2, l'analyse génomique comparative est entièrement présentée sous forme d'un article ayant été soumis dans la revue internationale *Microbial Genomics*. Les tests symbiotiques des différentes souches de *Bradyrhizobium* réalisés sur *A. indica*, ainsi que l'identification de nouveaux effecteurs candidats inducteurs de la nodulation, sont présentés en tant que résultats complémentaires de l'analyse génomique comparative. Ce travail d'inoculation est toujours en cours dans l'équipe et fera l'objet, à terme, d'une seconde publication.

2. Article 2 : Phylogenetic distribution and evolutionary dynamics of *nod* and T3SS genes in the genus *Bradyrhizobium*

Phylogenetic distribution and evolutionary dynamics of *nod* and T3SS genes in the genus *Bradyrhizobium*

Albin Teulet¹, Djamel Gully¹, Zoe Rouy², Ralf Koenig³, Eric Giraud^{1*+} and Florent Lassalle^{4*}

1- IRD, Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes (LSTM), UMR IRD/SupAgro/INRA/ Université de Montpellier /CIRAD, TA-A82/J – Campus de Baillarguet 34398 Montpellier cedex 5, France.

2- CEA, Institut de Biologie François Jacob - Genoscope - Laboratoire d'Analyses Bioinformatiques pour la Génomique et le Métabolisme, UMR - CNRS 8030 Génomique

3- IRD, CIRAD, Université de Montpellier, IPME, Montpellier, France

4-Department of Infectious Disease Epidemiology. Imperial College London, St Mary's Hospital Campus, Praed Street, London W2 1NY, United Kingdom.

⁺ Corresponding author: eric.giraud@ird.fr

* Both authors contributed equally and should be considered co-senior authors.

Keywords : Symbiosis, Legume, rhizobium, Effector, nodulation, Type three secretion system

ABSTRACT

Bradyrhizobium are abundant soil bacteria and the major symbiont of legumes. The recent availability of *Bradyrhizobium* genome sequences provided a large source of information for analysis of symbiotic traits. In this study, we have undertaken a groundwork aimed to better understand the evolutionary dynamics of the *nod* and T3SS genes and the distribution of known effectors among bradyrhizobia. Based on the comparative analysis of 146 genome sequences, we identified six different T3SS gene clusters. The two predominant clusters, designated RhcIa and RhcIb, which both belong to the RhcI family described in other rhizobia, are found in 92/146 strains, most of them also containing *nod* genes. These two clusters notably differ in the gene complement associated with them: while the translocon-encoding gene *nopX* is systematically found in strains containing RhcIb, the *nopE* and *nopH* genes are specifically conserved in strains containing RhcIa, suggesting that these last two genes might functionally substitute *nopX* and play a role related to effector translocation. Phylogenetic distribution analysis suggests that bradyrhizobia simultaneously gained *nod* and RhcI-T3SS gene clusters, via vertical inheritance or horizontal transfer of a symbiotic island containing both of them. Sequence similarity searches for known Nop effectors revealed the absence of a so-called core effectome that would be conserved among the majority of *Bradyrhizobium* strains. Yet, NopM and SUMO proteases were found to constitute the two major effector families in this genus. This study indicates that bradyrhizobial T3SSs might play a more significant symbiotic role than previously anticipated and provides new candidates among T3SS proteins and effectors for future functional investigations.

DATA SUMMARY: All the sequence genomes used in this study were downloaded from the NCBI RefSeq or GenBank databases. These genomes which were annotated *de novo* by the MicroScope pipeline are also publicly available in the MicroScope platform (<http://www.genoscope.cns.fr/agc/microscope>).

INTRODUCTION

A recent analysis of microbial communities across the globe indicated that rhizobia of the *Bradyrhizobium* genus are the most ubiquitous and abundant bacteria in soils [1]. They thus appear at the top list of the “most wanted” bacteria to investigate to better understand the contribution of microbes in the functioning of the soil ecosystems. Additionally, these bacteria are most widely used in agriculture due to their ability to interact symbiotically with legumes of high agronomic importance, including staple crops such as soybean, peanut, cowpea. This symbiosis leads to the formation a new organ, the nodule, generally found on the root system, in which the bacteria fix dinitrogen for the plant benefit and receive in return a carbon source. Bradyrhizobia therefore play a very important role in the preservation of the environment by limiting the use of nitrogen fertilizers for promoting the growth of legume crops and by contributing to nitrogen enrichment of terrestrial ecosystems.

Not all bradyrhizobia are able to nodulate legumes, as some strains isolated from soils or other environments lack the symbiotic *nod* genes that are necessary for the synthesis of Nod factors (NFs) that governs nodulation [2, 3]. Upon recognition by the plant, this key signal molecule triggers the genetic program leading to nodule formation and its intracellular infection by the bacteria [4]. However, some bradyrhizobia have evolved alternative strategies to interact symbiotically with legumes in the absence of the NF signal. This is the case for some photosynthetic *Bradyrhizobium* strains (including ORS278 and BTAi1), which lack the canonical *nodABC* genes necessary for the synthesis of NFs but are able to induce the formation of nitrogen fixing nodules on the root and the stem of some legume species of the *Aeschynomene* genus [5]. The bacterial signal(s) necessary for the establishment of this NF-independent symbiosis remain to be discovered.

The *nod* genes, which remain the main determinants conferring to rhizobia the ability to nodulate plants, can be transferred from strain to strain by lateral gene transfer [6, 7]. While

these symbiotic genes are typically harbored by a plasmid in other rhizobial genera, these genes are generally found in a chromosomal region of *Bradyrhizobium* strains, called the symbiotic island. In addition, this region generally harbors the *nif* and *fix* genes, which are necessary for the formation and the functioning of the nitrogenase complex. This region can be easily recognized, as it is characterized by a lower G+C content, a different codon usage for the identified protein-coding sequences (CDS) and the presence of numerous transposases and insertion sequences that strongly promote genomic rearrangements in this region and incidentally, the selection of symbiotically adapted bacteria [8]. The presence of genes that code for the type III secretion system (T3SS) has also been frequently reported within this region of *Bradyrhizobium* genomes [9-12].

The T3SS, which has initially been found in pathogenic bacteria, is a complex secretory machinery composed of more than twenty conserved proteins which form a syringe-like structure and enable bacteria to deliver type III effector proteins (T3Es) into eukaryotic cells [13]. These T3Es are highly diverse in their structure and mode of action and play a crucial role in bacteria-host interaction by modulating key host cell functions, in most cases related to the suppression of host immunity [14]. Functional T3SS encoded by “Rhizobium conserved” (*rhc*) genes cluster have been reported in several rhizobia species [15, 16]. However, only a few rhizobial T3Es, called Nop for “Nodulation outer proteins”, have been characterized and their mode of action generally remains to be determined [16]. The rhizobial T3SS machinery contains most of the core components described for pathogens’ T3SS but the genetic organization of the *rhc* cluster and its transcriptional regulation are different from its pathogenic counterpart [17]. Notably the expression of both *rhc* and *nop* genes is controlled by the regulator TtsI, which is itself under the control of the *nod* gene regulator, NodD [18, 20].

While the virulence of plant pathogenic bacteria largely depends on the functioning of the T3SS [14], the importance of rhizobial T3SS on symbiosis remains unclear. Indeed, the

presence of the T3SS among nodulating rhizobia is not a rule, indicating that the T3SS is dispensable for the establishment of the symbiosis. Furthermore, the T3SS can play a neutral, a positive or a negative role depending on the host plant [16, 21]. On one hand, some of the secreted Nops may repress the plant immune system favoring the establishment of the infection and the nodulation. On the other hand, the same effectors can be recognized, in other plant contexts, by receptor proteins [resistant (R) proteins] activating an effector-triggered immunity (ETI), which blocks the infection and renders the interaction incompatible [22, 23]. More recently, it has been reported that the T3SS can play a more prominent symbiotic role by directly activating the nodulation in the absence of NFs [24]. This NF-independent, T3SS-dependent symbiotic process was initially discovered between *Bradyrhizobium elkanii* USDA61 and *Glycine max* cv. *Enrei*. This function of the T3SS could be more widespread than originally thought, given that a large and diverse number of non-photosynthetic bradyrhizobia strains were shown to nodulate *Aeschynomene indica* thanks to their type III secretion system [25]. A recent study conducted on the ORS3257 strain using *A. indica* as host plant unraveled that this T3SS-dependent symbiotic process relies on a cocktail of at least five effectors playing distinct and complementary roles in nodule organogenesis, infection and repression of host immune functions [26]. Among these effectors, a new one named ErnA (Effector required for nodulation-A), was shown to act as a key factor to form nodules.

A large number of *Bradyrhizobium* genomes have been sequenced, including those from strains isolated from nodules of several legume species but also from various ecological niches. In this study, we took advantage of this wealth of genome sequences to obtain new insight into the significance of the T3SS in the symbiotic adaptation of bradyrhizobia. We examined the phylogenetic distribution of T3SS and *nod* genes as well as some *nop* genes reported to have a symbiotic role to answer to the following questions: What is the distribution of the *nod* and T3SS genes among the strains isolated from nodules or other environments? What are the

different events of acquisition or loss of the T3SS that occurred during the evolutionary history of bradyrhizobia? Is the acquisition of the T3SS systematically associated with the acquisition of *nod* genes through lateral transfer of the symbiotic island? How congruent are the evolution of the *nod* and T3SS genes? How widespread are the Nop effectors reported to have a symbiotic role?

METHODS

Phylogenomic analysis of all *Bradyrhizobium* genomes used in this study

A custom set of 155 genomes was gathered covering 28 different *Bradyrhizobium* species, as well as selected genomes from the genera *Nitrobacter* and *Rhodopseudomonas* as outgroups. Genomes listed in Table S1 were downloaded from NCBI RefSeq or GenBank databases and used as input for the bioinformatic pipeline Pantagruel [27] to build a phylogenomic database. In short, coding sequences (CDS) and the corresponding protein sequences were extracted from the RefSeq or GenBank annotation and then clustered into homologous gene families using MMSeqs2 [28]. Homologues were aligned with ClustalOmega [29] and reverse-translated into CDS alignment with PAL2NAL [30]. 453 single-copy core gene families were selected based on the presence in at least 153 out of the 155 genomes, thus allowing for rare losses or incomplete genome sequences. CDS alignment for these families were concatenated, resulting in 378,951 aligned nucleotide positions. From this core alignment, a maximum-likelihood tree was inferred using RAxML (v8.2.4) [31] under the GTRCATX model, with branch lengths then refined under the GTRGAMMAX model and branch supports estimated from 200 rapid bootstrap trees. Bayesian samples of gene trees were inferred from CDS alignments with MrBayes (v 3.2.6) [32] using a Metropolis-coupled Monte-Carlo Markov chain (MCMCMC) approach, with two independent sets of four chains (one cold, three heated) running for 2,000,000 generations and sampled every 500; presented trees are majority-rule consensus trees, discarding the first 25%

of the chain as burn-in. Consensus gene trees for RhcI cluster gene families are available in Supplemental Data online on Figshare data repository at <https://figshare.com/s/cd63d7f4d42023bf2347>.

Prediction of *nod* and T3SS clusters

All genome sequences used in this study (Table S1) were downloaded on the MicroScope platform (<http://www.genoscope.cns.fr/agc/microscope>). Genome annotations were performed *de novo* by the MicroScope pipeline [33]. The screen of *nod* and T3SS clusters in each genome was done by the search of *nodA* and *rhcN* genes, from *B. diazoefficiens* USDA110^T as reference (blr2025 and blr1816, respectively), using the BLASTN algorithm as implemented on the MicroScope platform with the followed parameters: query coverage $\geq 70\%$, identity $\geq 40\%$. The syntenic organizations of regions surrounding *nodA* and *rhcN* homologues found in bradyrhizobial genomes were then compared with each other using the MaGe genomic visualization system available on the MicroScope platform.

Prediction of known Nops repertoires

The Nop effectors known to be secreted through the T3SS or to affect the symbiotic interaction were extracted from the literature (Table S2) and then searched in all strains using the BLASTP algorithm as implemented on the MicroScope platform with the same similarity constraints as described above. The absence of *nopX* and *nopE/nopH* genes in RhcIa- and RhcIb-containing genomes, respectively, were confirmed by TBLASTN search of the NopX proteins from USDA61 strain and NopE/NopH proteins from USDA110. The search of genes containing known functional domains conserved in some Nop effectors was performed by interrogating the pre-computed InterProScan annotations hosted by the MicroScope platform for each strain genome, using as query the InterPro identifier of the functional domain.

Phylogenetic analysis

The concatenated NodABC and RhcC2NV amino acid sequences were aligned with ClustalW using the MEGA X software [34]. From resulting alignments, phylogenetic trees were constructed using the maximum-likelihood method as implemented in the MEGA X software. Branch support was also estimated using MEGA X by performing bootstrap analyses of 500 replicates. Final editing was carried out using Figtree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) and further edited with graphics software. The same procedure was used to construct the SctN phylogenetic tree using the SctN homologues from other T3SS-containing bacteria (*Rhizobiales*, *Enterobacteriales*, *Aeromonadales*, *Pseudomonadales*, *Rhodobacterales*, *Burkholderiales*, *Oceanospirillales*, *Xanthomonadales* and *Chlamydiales*) that are available in the NCBI database.

Prediction of RhcI-T3SS clusters gain and loss events

Evolution analyses of the presence/absence of RhcIa- and RhcIb-T3SS clusters were inferred using the program Gloome [35]. We used Mixture model allowing difference both gain and loss probabilities. The expectations and probabilities of both gain and loss events were estimated using stochastic mapping and a predicted event was considered as valid if the probability was at least 0.5.

RESULTS AND DISCUSSION

General features of *Bradyrhizobium* genomes and phylogenomic analysis of the genus

In this study we considered 146 bradyrhizobial genome sequences that were released in the public data bases. A large proportion (106 out of 146) of the strains sequenced was isolated from nodules of various legumes species. The plants from which the most isolates were sequenced are: i) *Glycine max* (36 strains), ii) *Vigna unguiculata* (12 strains), iii) *Aeschynomene* spp. (9 strains), iv) *Phaseolus* spp. (9 strains), and v) *Lupinus* spp. (7 strains). The other strains originated from various environments (different types of soils, water, biofilm, plant or animal

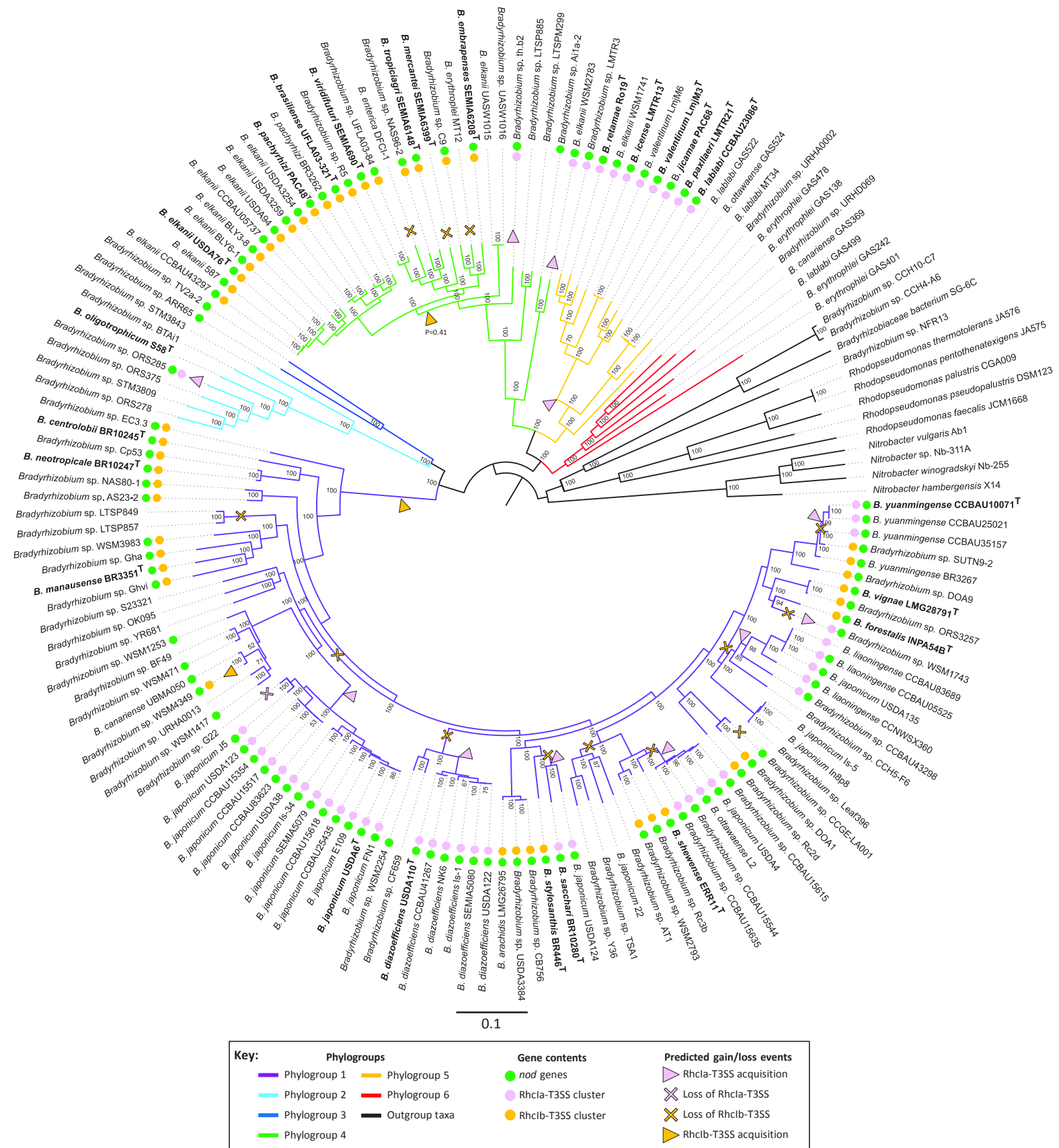


Figure 1: Phylogenomic tree and RhcI-T3SS cluster gain-loss prediction inferred for the *Bradyrhizobium* genus and its close relatives

The phylogeny was inferred from 453 single-copy core genes for 146 bradyrhizobia strains, and several species of the neighboring genus *Rhodopseudomonas* and *Nitrobacter*. Node support values are indicated at each branches. The phylogroup to which each strain belongs is indicated by the color of the branch according to the key provided. The presence of *nod* or RhcI-T3SS clusters in each strain is shown by color circles referenced in the key. Probable RhcI-T3SS cluster acquisition and loss events are represented by a color coded arrowhead and a cross, respectively, according to the key provided. For all these predicted events, the probability was at least 0.5 except for the gain event of the phylogroup 4 for which the probability was 0.41. The scale bar indicates the number of nucleotide changes per site.

tissue...) (Table S1). The majority of bradyrhizobial genomes have sizes ranging from 7 to 10 Mb, with an average of 8.5 Mb. However, a few strains (CCH10-C7, CCH4-A6, NFR13 et SG-6C) have smaller genomes with sizes between 4 to 6 Mb. Among the 33 strains with a complete or near-complete (i.e. less than ten contigs) genome sequence, four strains (BTAi1, NK6, DOA9, G22) contain one or several plasmids. Remarkably, strain DOA9 is the only *Bradyrhizobium* strain carrying a symbiotic plasmid harboring *nod*, *nif* and T3SS genes [36] and strain NK6 contains four plasmids [37].

To better understand the evolutionary origins of *nod* and T3SS genes in bradyrhizobia, we first aimed at establishing a robust phylogeny of these organisms, which may later be used as a reference to infer evolutionary scenarios for gain and loss of symbiotic genes. We built a phylogenetic tree based on the core genome, which we rooted using several representatives from the neighboring genera *Nitrobacter* and *Rhodopseudomonas* as an outgroup. This analysis yielded six phylogroups within *Bradyrhizobium*, each supported by 100% bootstrap values (Figure 1). Phylogroup 1 clustered more than half of the studied genomes. A large proportion of the bradyrhizobia belonging to this phylogroup was isolated from soybean, which is the most important legume crop in the world, thus explaining the over-representation of this phylogroup. Phylogroup 1 gathers strains from the species *B. japonicum* and *B. diazoefficiens*, as well as strains assigned to various other taxa: *B. yuanmingense* CCBAU10071^T, *B. vignae* LMG28791^T, *B. forestalis* INPA54B^T, *B. shewense* ERR11^T, *B. sacchari* BR10280^T, *B. stylosanthis* BR446^T, *B. manausense* BR3351^T, *B. neotropiale* BR10247^T, *B. centrolobii* BR10245^T. Phylogroup 2 clustered six photosynthetic bradyrhizobia strains, including *B. oligotrophicum* S58^T, as well as the non-photosynthetic strain STM3843. All seven strains in Phylogroup 2 were reported to nodulate some *Aeschynomene* species in an NF-independent manner; they lack *nod* genes, with the exception of strain ORS285, which is able to use both NF-dependent or NF-independent strategies depending on the host plant [5, 38, 39]. Phylogroup

3 only included two strains, ARR65 and Tv2a-2, which were isolated from nodules of *Stylosanthes viscosa* and *Tachigali versicolor*, respectively [40, 41]. These two strains notably differ from their closest relatives in Phylogroup 2 by the presence of *nod* genes. Phylogroup 4 gathered 29 strains from various species, including the type strains *B. elkanii* USDA76^T, *B. pachyrhizi* PAC48^T, *B. brasilense* UFLA03-321^T, *B. viridifuturi* SEMIA690^T, *B. tropiciagri* SEMIA6148^T, *B. mercantii* SEMIA6399^T, and *B. embrapense* SEMIA6208^T. Similarly, Phylogroup 5 gathered 14 strains from several species, such as *B. retamae* Ro19^T, *B. icense* LMTR13^T, *B. valentinum* LmjM13^T, *B. jcamae* PAC68^T, *B. paxllaeri* LMTR21^T and *B. lablabi* CCBAU23086^T. Phylogroup 6 contained six strains, all of which were isolated from soils. Finally, the four strains with the smallest genome (CCH10-C7; CCH4-A6, NFR13 et SG-6C) formed a clade that branches with representatives of the genus *Rhodopseudomonas*. These groupings were all supported by whole genome-to-genome distances (Figure S1).

According to this phylogenetic analysis, the taxonomic classification of several strains needs to be revised. Firstly, the branching of the four small-genome strains with *Rhodopseudomonas* indicates that they do not belong to the genus *Bradyrhizobium* and rather suggests that they belong to another genus within the *Bradyrhizobiaceae* family. With this in mind, the genome size of these four strain genomes appears to fit well within the range of sizes observed for *Rhodopseudomonas* (3.7-5.4 Mbp) and *Nitrobacter* (3.6-5.0 Mbp) genomes (NCBI Genome database, last accessed September 2019), rejecting the idea that they would have undergone some recent genome reduction event. Within the *Bradyrhizobium* genus, several strains do not belong to the species to which they were assigned. This is the case for several strains of *B. japonicum* (USDA4; USDA124; USDA135; 22; is5, in8P8) and *B. elkanii* (UASWS1015; WSM2783; WSM1747), which were found outside of the clade containing the type strain of their respective species. In Phylogroup 6, strain GAS499 was wrongly assigned to *B. lablabi*, the type strain of which belongs to another phylogroup. Other strains in this phylogroup are

named *B. erythropei* or *B. canariense*; their type strains which genome sequence was not yet available are not covered by this study but have representatives in other phylogroups, suggesting a revision is needed for the taxonomy of either Phylogroup 6 strains or the distant strains sharing their name. The incorrect naming of some strains was based on their 16S rRNA and/or the internally transcribed spacer (ITS) sequences, while for the strains belonging to the Phylogroup 6 and for WSM2783 and WSM1747 the criteria for their taxonomic classification remain elusive [42-44]. It is now recognized that these two genetic markers are not sufficiently discriminating to distinguish *Bradyrhizobium* strains due to limited sequence polymorphisms in this group. It was therefore proposed to use an alternative molecular method based on multilocus sequence analysis (MSLA) for taxonomic assignments [45]. Our phylogenetic analysis implements a genome-based taxonomy approach, which can be seen as a “super MSLA” which is not limited to a few partial sequences of housekeeping genes but comprises several hundred conserved genes, as recommended by taxonomic authorities [46, 47].

Notably, during the redaction of this paper, two phylogenomic analyses focusing on the *Bradyrhizobium* genus were published, which however did not include exactly the same taxa as our study. One study was as well based on the core genome [48], whereas the second study was based on the Genome-to-Genome Blast Distance Phylogeny (GBDP) [49]. The phylogenetic trees of these two studies show a very similar topology than the one presented here (Figure 1), which confirms the robustness of these different phylogenomic analyses. In our tree, the four “non-*Bradyrhizobium*”, small-genome strains form a clade that groups together with the *Rhodopseudomonas* and *Nitrobacter* genomes we used as outgroups. In the study by Avontuur et al. [48], which include a wider diversity of outgroup, CCH10-C7 is found to be associated with *Afipia* genus while NFR13 belongs to *Tardiphaga*. We explored the phylogenetic position of these strains using the Type Strain Genome Server (<https://tygs.dsmz.de/>) based on the GBDP distances, which suggests that the strains CCH4-16,

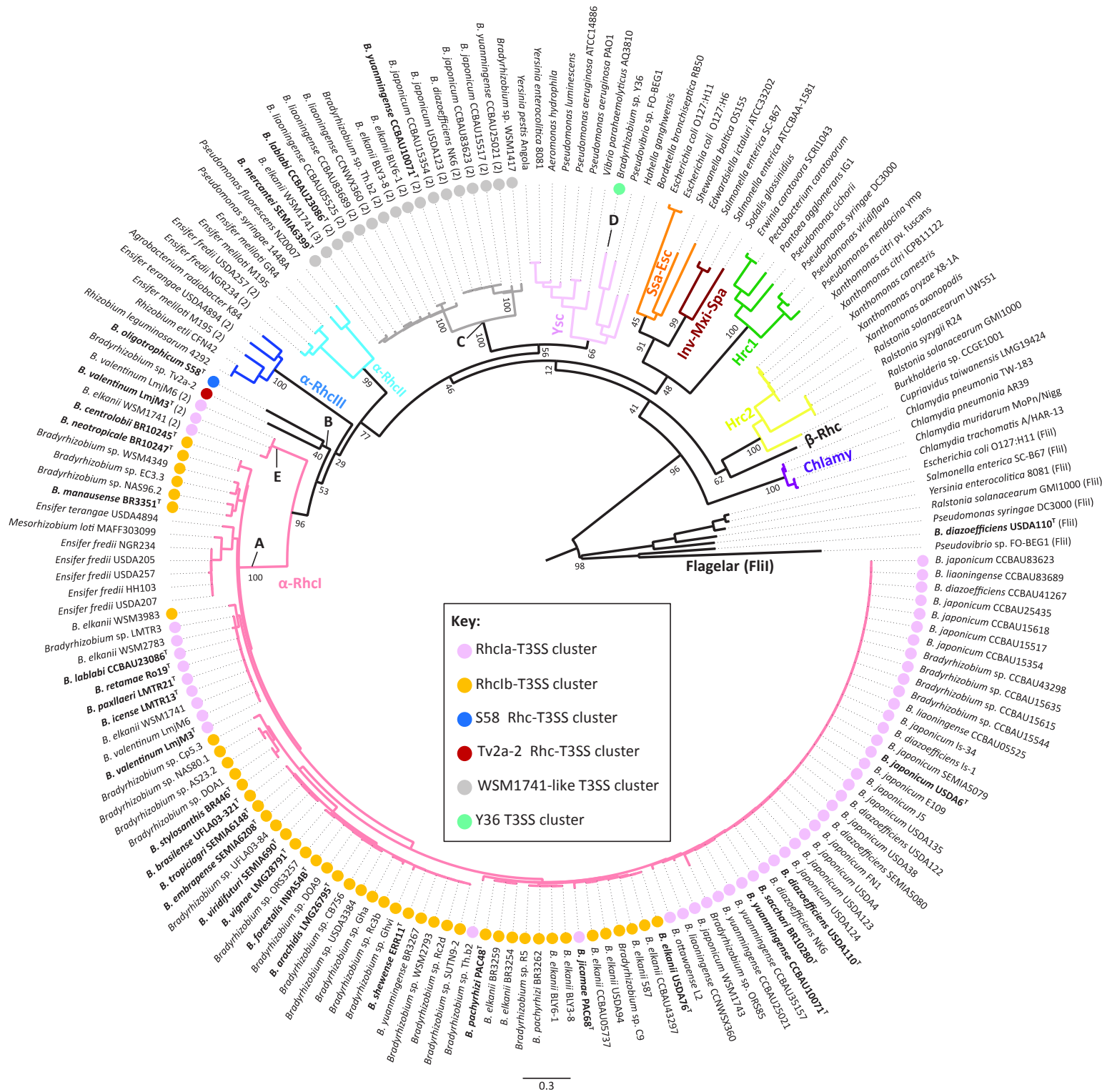


Figure 2: Maximum likelihood phylogenetic tree of the SctN/RhcN proteins from Bradyrhizobia and several representatives of symbiotic, pathogenic and plant-associated bacteria.

The Maximum-likelihood analysis was performed using Mega X and 500 bootstrap replicates. The different SctN families defined according to Troisfontaine and Cornelis (2005) are differently colored. For the *Bradyrhizobium* strains, the different colored circles (see the key provided) correspond to the distinct genetic organisation of the T3SS cluster to which the *sctN* gene belongs (See Fig. 3). The scale bar indicates the number of amino acid changes per site.

CCH10-C7 and SG-6C belong to the genus *Afipia*. A detailed taxonomic study is needed to delineate a formal taxonomic name for these mis-typed strains, but this is beyond the scope of this study.

Presence of multiple and diverse T3SS clusters among bradyrhizobia

The *rhcN* gene was used in BLAST searches to survey for the presence of a T3SS among our bradyrhizobial genome collection. This gene encoding an ATPase, which is essential for the function of the secretion machinery, is one of the most conserved core T3SS genes and has often been used for phylogenetic analyses [50, 51].

Among the 146 bradyrhizobial genomes analyzed, 96 contain at least one RhcN homologue and among them, 16 contain one additional homologue, and two additional homologues are only found in the genome of strain WSM1741 (Figure 2). This single-gene search analysis suggests that a large proportion (66%) of the bradyrhizobia strains may contain a T3SS gene cluster, and that some of them may even carry several such clusters – a situation already observed in *Ensifer fredii* strains NGR234, HH103 and USDA257, which each contain two T3SS clusters borne on separate plasmids [52-54].

Previous phylogenetic analyses based on various T3SS core proteins, including RhcN, indicated that the T3SS evolved into seven distinct families that spread between Gram-negative bacteria by horizontal gene transfer [50, 55]. So far, the characterized T3SS from the different rhizobia all clustered in the same family, named Rhc, which were further sub-divided into four sub-groups (annotated as α -RhcI to α -Rhc-III and β -Rhc, which includes the T3SS from the β -rhizobium *Cupriavidus taiwanensis*) [17]. To better understand how the different bradyrhizobial RhcN homologues are distributed among these different families, a ML tree was constructed including representatives of all the families and sub-groups which were previously defined. The great majority of bradyrhizobial RhcN homologues clustered in sub-group I of the Rhc family (α -RhcI) forming a large clade (annotated A on Figure 2), which also contains

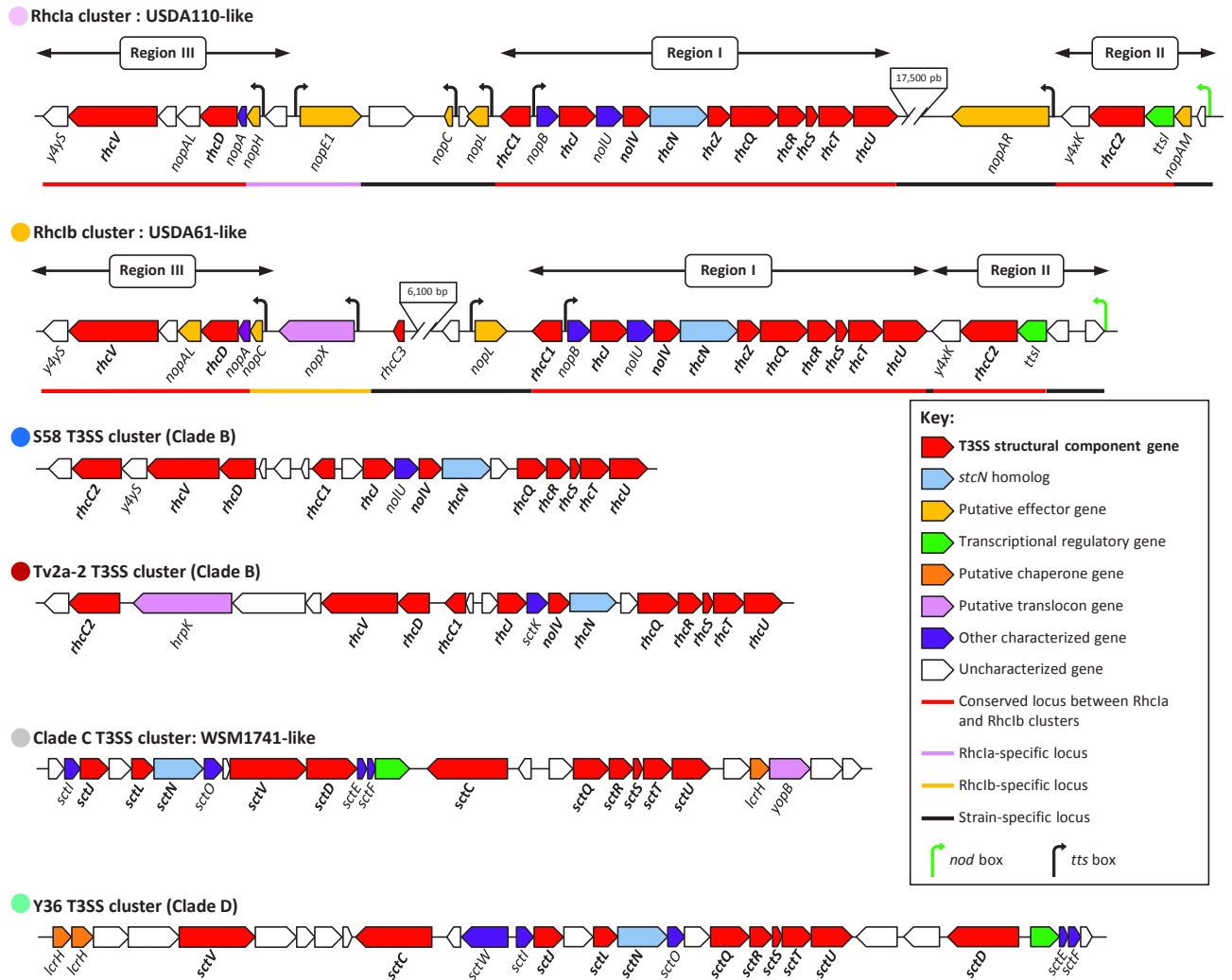


Figure 3: Genetic organisation of the different T3SS gene clusters identified in the *Bradyrhizobium* genus.

The six different T3SS gene clusters identified are designated by the same color circles used in the figure 2 and the name of a representative strain in which the corresponding T3SS cluster is identified. ORFs are represented by colored arrows according to the key provided and showing the sense of transcription. The *nod* and *tts* boxes are represented by green and black arrows, respectively. The two-way arrows above the RhcIa and RhcIb-T3SS clusters represent the three genetic regions defined by Tampakaki (2014). The most common names previously used to characterize T3SS gene cluster in rhizobia was applied for the T3SS gene cluster found to belong to the Rhc-family (according to the Figure 2) while for both WSM1741-like and Y36-like T3SS clusters which do not belong to the Rhc-family, the *sct* gene nomenclature is used.

homologues from *Ensifer* and *Mesorhizobium*. Other RhcN homologues seem to be related to the α -RhcI group but are different from previously defined subgroups [17]; they branch at the base of the α -RhcI group and form a distinct clade, annotated B grouping genes found in strains S58 and Tv2a-2. In addition, genes from SEMIA6399 and WSM1417 strains form a separate clade (annotated C) that branched to the Ysc family which include animal pathogenic and symbiotic bacteria, while the gene from strain Y36 (annotated D) clearly fall inside this Ysc family. When a genome carries several RhcN homologues, at least one copy systematically belongs to the α -RhcI group, the others are associated to the clade C or formed one additional new clade (annotated E) linked to the α -RhcI family (represented by LmjM3, LmjM6, WSM1741). To distinguish the RhcN homologues that do not fall in one of the Rhc families already defined but are related to the Ysc family (clade C and D), we choose to name them SctN, with respect to the unified nomenclature for T3SS proteins (the Sct prefix referring to secretion) [56].

To further refine the classification of the T3SS systems in bradyrhizobia, we analyzed the genetic organization of the gene clusters that encode the T3SS machinery. In total, we identified six different arrangements of T3SS genes among the bradyrhizobial strains (Figure 3). The majority of T3SS gene clusters belong to the α -RhcI family, with two sub-families named RhcIa and RhcIb, which correspond to the gene clusters already described for *B. diazoefficiens* USDA110 and *B. elkanii* USDA61, respectively (Figure 3), [9, 57]. In both sub-families, all genes encoding the core components of the T3SS machinery are arranged in three distinct regions (Figure 3). The main central region (I) contains in the following order the *rhcCI* gene in one direction and the *nopB*, *rhcJ*, *nolU*, *nolV*, *rhcN*, *rhcZ*, *rhcQ*, *rhcR*, *rhcS*, *rhcT* and *rhcU* genes, which are transcribed in the opposite direction. This central region is perfectly conserved in the two sub-families, whereas two additional conserved regions at the extremities of the gene clusters (region II and region III) differ in the details of their gene contents. Notably, in region

II, the predicted CDSs between the *nod* box and the *ttsI* regulator differ and are strain specific. In USDA110, the RhcIa cluster starts with a CDS (bsl1845) encoding a protein of unknown function, followed by the putative effector gene *nopAM* [58], while in USDA61, the RhcIb clusters are predicted to contain two divergently transcribed CDS encoding hypothetical proteins. Region III starts with two different small genes encoding secreted proteins of unknown function: *nopC* (RhcIb cluster) or *nopH* (RhcIa cluster) [59, 60]. Notably, the region upstream of the RhcIb cluster codes for the NopX protein, which is homologous to the putative translocon HrpF in *Xanthomonas* [61]; the corresponding gene is absent in all the strains with a RhcIa cluster, such as strain USDA110.

One of these two gene arrangements is systematically found in all the strains containing a *rhcN* gene of the α -RhcI family, but some minor variations occur among strains: i) gene predictions in the region upstream of the *ttsI* gene are often ambiguous, sometimes with a prediction of a CDS showing some similarities with the *nopAM* gene identified in USDA110; ii) a rearrangement of the region II provoked by transposase insertions and leading to a separation of the *ttsI* and *rhcC2* genes (observed only in ORS285 strain) and iii) the occasional presence of an intergenic region of around 650 bp between *rhcS* and *rhcT*. Interestingly, this “intergenic” region is predicted to contain a *tts* box, suggesting that the genes of such a region I might be transcribed in two distinct operons.

Notably, the T3SS gene clusters from the clade E, share the same genetic organization than RhcIb and should be therefore considered as *bonafide* RhcI-T3SS cluster. In contrast, strains S58 and Tv2a-2 from clade B have a T3SS gene cluster with another genetic organization; these T3SS gene clusters therefore constitute a new type of Rhc cluster (Figure 2 and 3).

The analysis of the regions surrounding the *rhcN/sctN* homologs of strain Y36 (clade D) or of the strains belonging to clade C revealed additional types of T3SS gene clusters, suggesting a distinct origin of these unconventional T3SSs (Figure 2 and 3). Whether or not these atypical

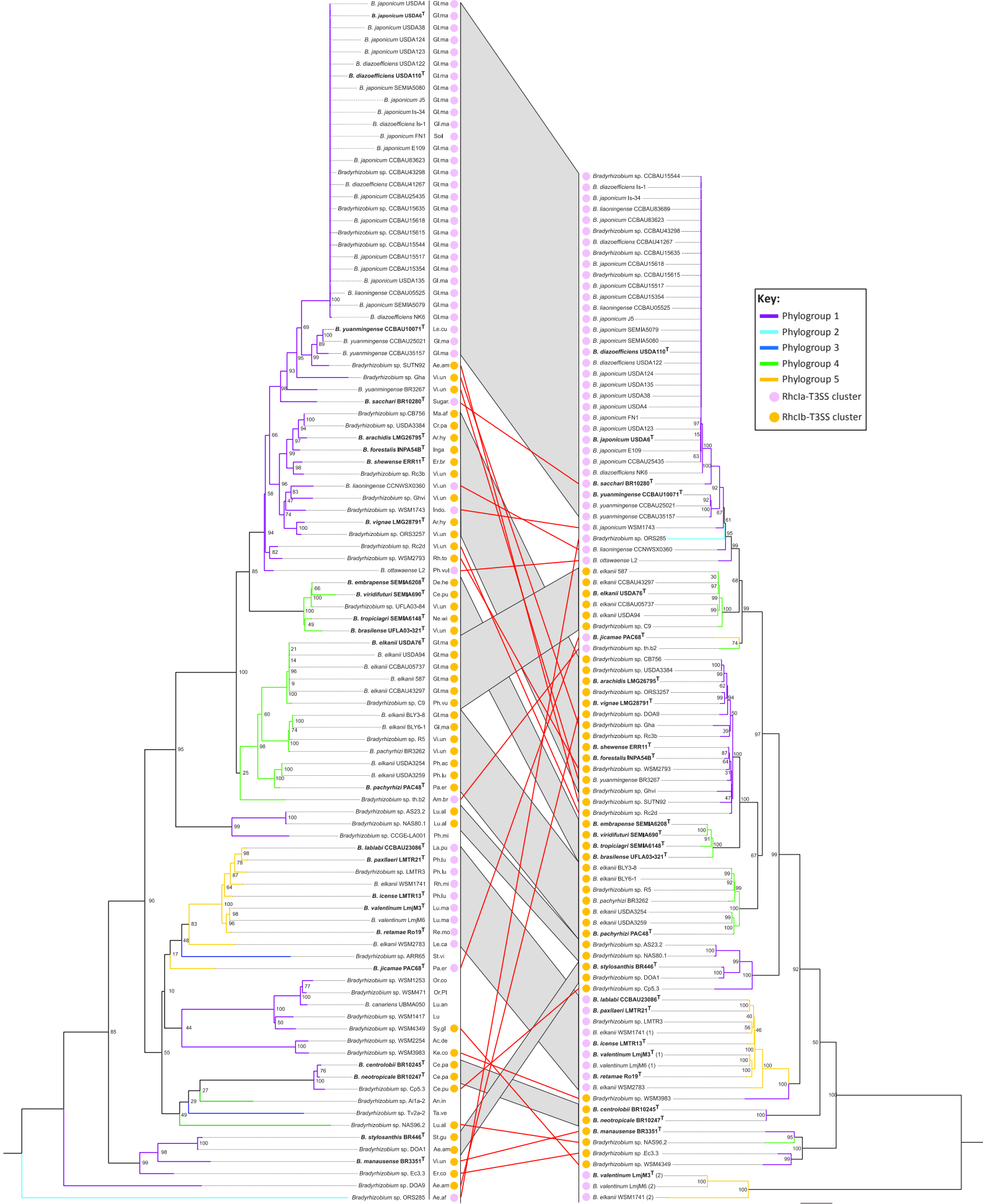


Figure 4: Comparison of phylogenetic trees for concatenated NodABC (left) and RhcC2NV (right) proteins from *Bradyrhizobium*
 The two Maximum likelihood phylogenetic trees were constructed using Mega X and 500 bootstrap replicates. The *Bradyrhizobium* sp. UFLA03-84 is not included in the RhcI-T3SS tree since this strain lacks the region III containing the *rhcV* gene. The scale bar represents the number of amino acid substitutions per site. The coloring scheme of tree branches and circles are indicated in the key provided. The phylogenetic congruence between the two trees is represented by grey bands linking the different clades while incongruence is represented by red lines. The original environment of the strains is indicated in the colone aside of the NodABC tree: *Acacia dealbata* (Ac.de), *Aeschynomene afraspera* (Ae.af), *Aeschynomene americana* (Ae.am), *Amphicarpaea bracteata* (Am.br), *Andira inermis* (An.in), *Arachis hypogaea* (Ar.hy), *Centrolobium paraense* (Ce.pa), *Centrosema pubescens* (Ce.pu), *Crotalaria paulina* (Cr.pa), *Desmodium heterocarpon* (De.he), *Erythrina brucei* (Er.br), *Erythrina costaricensis* (Er.co), *Glycine max* (Gl.ma), *Indigofera* sp. (Ind.o), *Inga* sp. (In.sp), *Kennedia coccinea* (Ke.co), *Lablab purpureus* (La.pu), *Leobordea carinata* (Le.ca), *Lepespedeza cuneata* (Le.cu), *Lupinus albus* (Lu.al), *Lupinus angustifolius* (Lu.an), *Lupinus maria-josephae* (Lu.ma), *Lupinus* sp. (Lu.sp), *Macrotyloma africanicus* (Ma.af), *Neonotonia wightii* (Ne.wi), *Ornithopus compressus* (Or.co), *Ornithopus pinnatus* (Or.pi), *Pachyrhizus erosus* (Pa.er), *Phaseolus acutifolius* (Ph.ac), *Phaseolus lunatus* (Ph.lu), *Phaseolus microcarpus* (Ph.mi), *Phaseolus vulgaris* (Ph.vu), *Retama monosperma* (Re.mo), *Rhynchosia minima* (Rh.mi), *Rhynchosia totta* (Rh.to), *Sugar cane* (Su.ca), *Stylosanthes guianensis* (St.gu), *Stylosanthes viscosa* (St.vi), *Syrmatium glabrum* (Sy.gl), *Tachigali versicolor* (Ta.ve), *Vigna unguiculata* (Vi.un).

T3SS clusters are functional and can affect the symbiotic properties of the strains requires further investigation.

A striking difference of the T3SS clusters from clades B to D in comparison to the RhcI clusters is the absence of the *ttsI* regulatory gene. The fact that *ttsI* is under the control of the master regulator NodD [18-20] supports the hypothesis that the RhcI-T3SS cluster was acquired simultaneously with the *nod* gene cluster, most probably via the acquisition of a symbiotic island gathering these two gene clusters.

The *nod* and T3SS genes share a common history in the *Bradyrhizobium* genus

To test this hypothesis, we scrutinized the genomes of the 146 *Bradyrhizobium* strains for the presence of *nodABC* genes using BLAST and observed that 100 strains of them contained these canonical *nod* genes (Figure 1). Strikingly, more than 90% of them (92 out of the 100) also contain the RhcI-T3SS cluster. In fact, all the strains containing a T3SS-RhcI cluster do contain the *nodABC* genes, except for strain *Bradyrhizobium liaoningense* CCBAU83689 (Figure 1). Furthermore, in strains for which complete genome sequences are available the T3SS-RhcI cluster co-localized with the *nod* genes inside the symbiotic island. To verify that the RhcI-T3SS and *nod* gene clusters follow the same evolutionary history, we compared the phylogenetic trees based on the concatenation of NodABC proteins or on the concatenation of proteins RhcC2, RhcN and RhcV — each corresponding gene belonging to one of the three regions composing the T3SS cluster. A high congruence between the two phylogenetic trees was observed (Figure 4), supporting the idea of a co-evolution between these two gene clusters. Nevertheless, several incongruences occur between the trees, which likely results from recombination events between symbiotic islands, as may have happened after symbiotic islands from different origins were acquired independently and co-habited in a same rhizobial genome. The (rare) co-habitation of two RhcI-T3SS clusters with divergent *rhcN* genes in the genomes of strains WSM1741, LmjM3 and LmjM6 supports this scenario (Figure 2).

Taken together, these data support the hypothesis that the bradyrhizobia strains acquired the *nod* and the RhcI-T3SS clusters simultaneously through the acquisition of a symbiotic island. The subsequent vertical inheritance and preservation of the T3SS in most of the strains containing *nod* genes also indicates that this secretory machinery plays an important role in their symbiotic life style.

T3SS was gained and lost multiple times in the *Bradyrhizobium* genus

The distribution of the RhcIa and RhcIb clusters is not random within the *Bradyrhizobium* genus, with the cluster types occurring in homogeneous patches within clades of the core proteome tree (Figure 1). The distribution of the RhcI-T3SS cluster types is biased regarding their host genome phylogroup: i) strains belonging to the Phylogroups 6 and 2 (with the exception of the strain ORS285) as well as the two members of Phylogroup 3 have no RhcI cluster, ii) Phylogroup 5 strains possessing a T3SS all have the RhcIa cluster type; iii) all Phylogroup 4 strains possessing a T3SS, except strain th.b2, have the RhcIb cluster; iv) RhcIa and RhcIb clusters are irregularly distributed within Phylogroup 1.

To determine the origin of this heterogeneous distribution of RhcIa and RhcIb cluster types, we used the program Gloome to infer the history of events of gain and loss for these clusters along the *Bradyrhizobium* tree [35]. According to the estimated scenario, an equal number of gain and loss events (14 each) occurred across the genus tree, but with different frequencies depending on the phylogroup.

A few seminal events of independent acquisition of the RhcI cluster define the main structure of their distribution: the acquisition of the RhcIa cluster in the ancestor of the Phylogroup 1 clade corresponding to the species *B. japonicum* and *B. diazoefficiens*; another acquisition of the RhcIa cluster in the ancestor of the Phylogroup 5 clade regrouping *B. lablabi*, *B. paxllaeri*, *B. jicamae*, *B. valentinum*, *B. icense* and *B. retamae*; and the acquisition of the RhcIb cluster in the ancestor of the Phylogroup 4 clade regrouping the species *B. elkanii*, *B. pachirizi*, *B.*

braziliense, *B. viridifuturi*, *B. tropicagri*, *B. mercanti* and *B. embrapenses*. These seminal horizontal transfer events were followed by the conservation of the acquired cluster, leaving patterns of locally homogeneous cluster distribution, suggesting strong purifying selection acted on these acquired genes. Another acquisition of the RhcIb cluster was inferred at the root of the Phylogroup 1, but this event was later followed by independent losses of the cluster: it was lost by the ancestor of the group formed by *B. japonicum* and unclassified *Bradyrhizobium* strains such as WSM1417 and WSM1253. The ancestor of *B. japonicum* later re-gained a T3SS cluster of the type RhcIa. Other loss events are associated to gains of the other cluster type, as six replacements of the RhcIb cluster by the RhcIa type occurred on the same branch of the tree, all within Phylogroup 1 (Figure 1).

This scenario of repeated replacements is reflected in the phylogeny of the RhcC2VN proteins, where clades of Rhc proteins associated with the RhcIa organization recurrently emerge from a larger clade of proteins associated mostly with the RhcIb type (Figure 4). The RhcIa clade at the top of Figure 4 regroups many almost identical sequences, suggesting a more recent spread of this cluster type, with repeated events of horizontal dissemination into distinct clades of the Phylogroup 1. Interestingly, most of these RhcIa Phylogroup 1 strains were isolated from *Glycine max* nodules. It is very likely that a strong selective pressure, probably driven by the plant, has favored the exchange of RhcI-T3SS clusters within this phylogroup. The selective advantage of switching to a RhcIa cluster type may be specific to Phylogroup 1, as *B. elkanii* strains of the Phylogroup 4 also isolated from *Glycine max* nodules all harbor a RhcIb cluster. The tree based on concatenated RhcC2VN proteins presents the evolutionary point of view of the genes encoded in the cluster (Figure 4), which shows that the RhcIa-type T3SS evolved twice from a clade associated with RhcIb. These events correspond to a gain by the ancestor of *B. japonicum* (Phylogroup 1), and another gain in the ancestor of Phylogroup 5 Rhc⁺ strains (Figure 1). The lineages of Rhc proteins involved in these two gain events are not related, with

those found in Phylogroup 5 branching deeply in the RhcC2VN phylogenetic tree. Interestingly, the diversity of proteins within this deep clade mirrors that of their host genomes. This suggests that in Phylogroup 5, the *rhc* genes (or at least large segments of the locus including the *rhcC2*, *rhcV* and *rhcN* genes) were vertically transmitted after the gain of the ancestral RhcIb-type cluster.

To evaluate whether these repeated changes of RhcI type were associated with the reshuffling of the alleles of core *rhc* genes, we then studied the individual trees of genes located in different regions of the RhcI locus: *rhcV* in region III, *rhcN* in region I, and *rhcC2* in region II (Figure 3 and Figure S2). The evolutionary histories of these genes appear mostly congruent, as they share the majority of ancient splits, including those leading to the emergence of the clades homogeneous for their RhcI type. This strongly indicates that the whole RhcI cluster locus evolved as a linked genetic unit, being transferred from one genomic background to another as a single fragment. In addition, it shows that the diversification of *rhc* genes is not associated with switches in RhcI cluster type; it is only the genetic organization of the locus that changed when changes of RhcIa-type occurred. Each switch of cluster type could in fact have been mediated through a single homologous recombination anchored in the conserved regions, from upstream of *nopA* to downstream of *rhcCI* (Figure 3, red underlined regions), converting the type-specific region located in-between (Figure 3, gold and pink underlined regions). This single-step scenario for conversion of a RhcIa-type cluster into a RhcIb cluster, and vice-versa, makes it a potentially frequent event.

Indeed, a few RhcI gain and loss events were observed in recent lineages, mostly limited to single genomes in our sample. These recent changes may represent random flickers in the evolutionary history with no particular selective value, or could alternatively be the sign of positive selection for the acquisition of the T3SS, or relaxation of purifying selection leading to its loss. The type-specific variant regions are also the site of the accumulation of strain-

specific genetic material – mostly insertion sequences – (Figure 3, black underlined regions), indicating that these regions are foci of rapid gene content evolution, and that strain-specific genetic apparatus have not yet undergone strong selective pressure.

On a longer evolutionary timescale, the fact that sporadic T3SS acquisitions (of either RhcIa or RhcIb type) always occurred in a Nod⁺ background suggests that the T3SS may provide some symbiotic function that is under positive selection in strains that already produce the Nod signal. Similarly, sporadic losses occurred in some lineages or recent clades, including independent losses in strains DFCI-1, SEMIA6399^T and MT12 in Phylogroup 4, and a loss in the ancestor of strains LTSP849 and LTSP857 in Phylogroup 1. Notably, in all these cases, the loss of the T3SS is correlated with the loss of the *nod* genes on the same branch. This suggests a scenario where loss of the *nod* genes led to a relaxation of the purifying selection acting on the existing RhcI-T3SS cluster, which finally resulted in its loss. However, another explanation (that does not involve natural selection) is that the *nod* and *rhc* genes can have been concomitantly acquired or lost via homologous recombination between the surrounding core genes, thus resulting in insertion or deletion of the whole symbiotic island.

Altogether, these data indicate that the T3SS have been acquired a few times by ancestors of bradyrhizobial lineages and that the distribution of the T3SS types was later disturbed by a dynamic history of gain via horizontal gene transfer and loss, perhaps driven by selective pressure related to symbiosis with the plant host.

Possible new cases of *Bradyrhizobium* strains nodulating in the absence of NF but through their T3SS

Considering the origin of the strains it appears that most of the isolates from plant nodules do contain *nodABC* genes, which reinforces the idea that the NF-dependent symbiotic process is the predominant type of interaction, but some exceptions (8 out of 106) exist. As previously indicated, five strains that were isolated from *Aeschynomene* species (*A. indica* and *A. evenia*)

and lack *nod* and RhcI-T3SS clusters nodulate *Aeschynomene* species in a NF-independent process [5, 38, 39]. More surprisingly, three strains (*B. mercantei* SEMIA 6399^T, *B. liaoningense* CCBAU83689 and *Bradyrhizobium* sp. Y36) isolated from plant species that do not belong to the *Aeschynomene* genus were also found to lack *nod* genes. The strain *B. mercantei* SEMIA 6399^T was isolated from an effective nodule of the tropical legume *Deguelia costata* (syn. *Lonchocarpus costatus*), an important plant species belonging to the Millettieae tribe that is native to eastern Brazil [62, 63]. Interestingly, this strain, which is phylogenetically distant to the Phylogroup 2 bradyrhizobia nodulating *Aeschynomene*, was confirmed to form effective nodules on its plant of origin but also on *Macroptilium atropurpureum* [62]. This strain is even used as a commercial inoculant for *D. costata*. If the symbiotic properties of the sequenced strain are confirmed, this strain would be the first example of a *Bradyrhizobium*, outside the phylogroup 2, that is able to use a NF-independent pathway to naturally nodulate other legumes than *Aeschynomene* spp. Strain SEMIA 6399^T also lacks a RhcI-T3SS cluster but contains an atypical T3SS-cluster. It would be interesting to elucidate whether this T3SS plays a role in the nodulation abilities of this bacterium.

The two others strains (*B. liaoningense* CCBAU83689 and *Bradyrhizobium* sp. Y36) were isolated from *Glycine max* and from *Phaseolus vulgaris*, respectively, two legume species known to be nodulated by rhizobia having *nod* genes. One may wonder whether these two strains were opportunist bacteria that took advantage of rhizobia excreting NFs to co-infect the same nodules. It would be interesting to verify the ability of these strains to nodulate their original host plants in a NF-independent manner. As previously stated, the strain *B. liaoningense* CCBAU83689 is the only bradyrhizobium having a RhcI-T3SS cluster but lacking *nod* genes. We can therefore assume that this strain has previously acquired a symbiotic island containing both *nod* and T3SS genes and subsequently have lost the *nod* genes but maintained the RhcI-T3SS cluster. If this strain indeed nodulates *G. max* it remains to be determined

whether its RhcI-T3SS is the major determinant governing the nodulation. Similarly, strain Y36 also contains an atypical T3SS cluster whose symbiotic role cannot be excluded.

The absence of *nopX* is correlated with the presence of *nopH* and *nopE*

The translocator proteins form a pore (named translocon) in the host membrane that allows the passage of effectors into the eukaryotic host cell [64]. The components forming the translocon in rhizobial T3SS remain unknown but the homology of NopX with the putative translocator HrpF from *Xanthomonas* species suggests that it could be a translocon component [65]. The absence of a gene encoding a translocator protein in all the strains containing a RhcIa cluster is enigmatic and raises the question of which gene(s) may play this function. A similar case has been reported in *Xanthomonas* genus where members of the ancestral, early-branching clade, lack *hrpF* [66]. Comparative genomics permitted to identify specifically in this group of strains two candidate translocator genes (*hpaT* and *hpaH*) for which a role in effector translocation has been subsequently confirmed [66]. Following this approach, we speculated that all the RhcIa+ strains should contain (a) specific gene(s) that could functionally substitute *nopX*. Comparison of the bradyrhizobial genomes highlighted two genes that were specifically associated with the presence of a RhcIa cluster (Figure 4): *nopH*, which encodes a protein of unknown function of about 100 amino acids, and *nopE*, which encodes a protein of about 500 amino acids that is assumed to be a translocated effector [67]. These two genes are found in the same genetic organization and closely associated with the core T3SS gene clusters in all the RhcIa+ strains, *nopH* is always found upstream of *nopA*, and *nopE* is always found upstream of region III in a genetic organization that is very similar to *nopX* in the RhcIb cluster (Figure 3).

To our knowledge, the function of NopH is not known except that this protein was found in the secretome of USDA110 [59]. In contrast, NopE has been functionally studied, in particular in strain USDA110, which harbors two NopE homologs. It has been shown, using CyaA reporter fusion, that both NopE variants were translocated into plant cells and that they are most

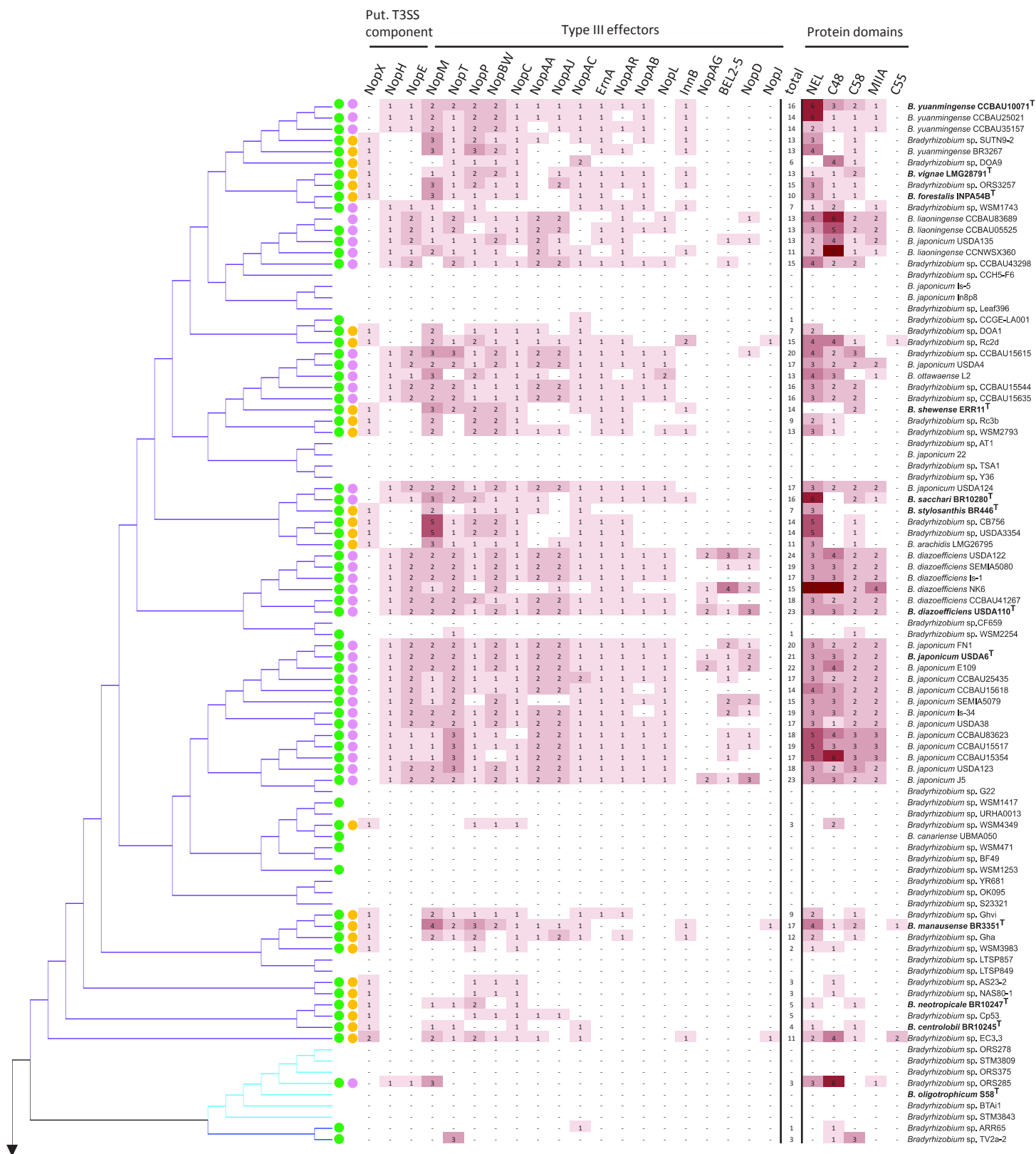


Figure 5: Representation of the effector candidate repertoire in the *Bradyrhizobium* genus

The number and distribution of some T3SS components, some known Nops and some proteins containing known functional domain identified in some rhizobia effectors are shown. Numbers represent the number of proteins found in each strain according the research parameters used defined in materials and methods. NEL, Novel E3-ubiquitine ligase. MIIA, metal ion-inducible autocleavage protein. C55, YopJ-type protein. C48, YopT-type protein. C58. SUMO protease. The asterisk (*) indicates frameshift mutations in the corresponding gene. The coloring scheme of figure 1 is used to indicate in which phylogroup the strain belongs and the colored circles indicate the presence of a *nod* gene cluster (in green), a RhcIa-T3SS cluster (in pink) or a RhcIb-T3SS cluster (in yellow).

probably functionally redundant [67]. Indeed, only a *nopE* double mutant is significantly (positively) affected in its ability to nodulate *Vigna radiata*, suggesting that NopE proteins or a process relying on NopE activity play a negative role in the nodulation of this plant species [67].

NopH and NopE display no sequence similarity with NopX, neither with known translocators from other bacteria. However, the translocon proteins are not conserved among different bacterial species [68]. The specific presence of *nopH* and *nopE* only in the RhcIa⁺ strains make them attractive candidates for functional studies of the TTSS. It would be interesting to determine if they play a role in the translocation of effectors, keeping in mind that the functional features already reported for NopE are not incompatible with such a role.

Drastic variation between the effectome of *Bradyrhizobium* strains

In order to determine the content and the diversity of T3SS effectors in the *Bradyrhizobium* genus, we screened for the presence of a set of type III effectors in the predicted proteomes of all strains using BLASTP (% of identity $\geq 40\%$ over $\geq 70\%$ of the length of the protein). We restricted this analysis to rhizobial effectors that have been demonstrated to be secreted through the T3SS and/or shown to affect the symbiosis positively or negatively (Table S2). As shown in Figure 5 and as expected from previous results, effector candidates were generally not found in genomes that do not harbor a RhcI-T3SS cluster, except for six strains (CCGE-LA001, WSM2254, ARR65, Tv2a-2, SEMIA6399 and Ai1a-2). For three of them (Tv2a-2, SEMIA6399, Ai1a-2), a few genes encoding components of the RhcI-T3SS were identified, suggesting their ancestors once harbored a T3SS with its cortege of effectors but lost most of the T3SS genes since. The question also remains for strains SEMIA6399 and Tv2a-2 whether the identified effectors might be translocated by the atypical T3SS clusters that are present in these strains (Figure 2).

For all the strains containing a RhcI-T3SS cluster, the number of identified effectors is highly variable, ranging from two for WSM3983 to 24 for *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA122 (Figure 5). Notably, *B. diazoefficiens* and *B. japonicum* strains isolated from soybean nodules have the largest set of effectors, with an average of 20 effectors. Nevertheless, this number of effectors also varies considerably (from 16/17 to 25/26) within these two species. This frequent remodeling of the repertoire of effectors, called effectome, by acquisition and loss of genes is most likely shaped by the selective pressure of the host plant.

Noteworthy, there is not a single effector that is found in all strains having a RhcI-T3SS cluster. While no core effectome can be therefore defined within the genus *Bradyrhizobium*, four effectors (NopM, NopP, NopT, NopC) are nevertheless highly prevalent and are often found in multiple copies. Interestingly, these four effectors are also conserved in other rhizobial genera [58], which leads to the speculation that they were part of an “early” effectome that was horizontally acquired by the ancestors of bradyrhizobial lineages, possibly at the same time as the RhcI-T3SS clusters, and later lost in some specific lineages, perhaps due to evolutionary/selective pressure.

We also examined whether the distribution of any effector was associated with the presence of the RhcIa or the RhcIb cluster types. No strict correlation except the ones discussed before for NopX, NopH and NopE, was observed, indicating that the ancestral RhcIa or RhcIb clusters most probably shared similar effectors repertoires. However, at a lower frequency, two other effectors, NopAG and NopJ, both encoding a putative acetyltransferase, were found specifically associated to the RhcIa and RhcIb cluster, respectively. NopAG is present in seven strains of *B. japonicum* and *B. diazoefficiens* and the distant strain WSM2783, with no homolog being found outside the *Bradyrhizobium* genus. This exclusive distribution suggests that this effector has been specifically acquired or evolved within the *B. diazoefficiens/B. japonicum* group and later horizontally transferred to the strain WSM2793. The NopJ effector was only found in three

strains that are phylogenetically very distant to each other. This effector, which belongs to the YopJ effector family in pathogenic bacteria, had previously only been reported in one rhizobial genome, *Ensifer fredii* strain NGR234 [58, 69]. It is therefore possible that NGR234 and these three *Bradyrhizobium* strains acquired NopJ independently by lateral gene transfer.

The diversity and the effectors number is most probably underestimated

Type III effectors are often modular proteins constituted of multiple conserved domains [70]. This particular architecture complicates the search for homologues because of the low level of similarity between effector proteins outside of these conserved domains. Thus, the search for specific functional domains has been proposed as a more sensitive approach to identify new candidate effector proteins [71]. Among the rhizobial effectors, five functional domains have been identified: two eukaryotic domains, NEL (for Novel E3 Ligase/ IPR029487) identified in NopM [72, 73] and the SUMO protease domain (peptidase family C48/ IPR003653) identified in NopD and BEL2-5 [74, 75]; the YopT-type domain (peptidase family C58/ IPR006473) identified in NopT [76, 77], the YopJ-type domain (peptidase family C55/ IPR005083) identified in NopJ [69] and the recent identified MIIA domain (metal ion-inducible autocleavage/ IPR011086) identified in NopE [78]. In order to highlight new putative effectors, we performed an InterProScan analysis on the annotated bradyrhizobial genomes using the MAGE pipeline (Figure 5). All proteins identified as containing one of these domains were found specifically in strains that have a RhcI-T3SS cluster or in five of the six strains (WSM2254, ARR65, Tv2a-2, SEMIA6399 and Ai1a-2) that were discussed above and are supposed to have lost their T3SS. The search for YopT and YopJ-type domains as well as for the MIIA domain retrieved 120, 4 and 76 proteins, respectively, which correlates well with the number of homologues identified by BLASTP for NopT (119 homologues), NopJ (3 homologues) and NopE (72 homologues).

In contrast, the search for the NEL and the SUMO protease domains returned a far higher number of putative effectors (271 and 202 proteins) than the BLASTP search for homologues of NopM protein or the two SUMO proteases NopD and BEL2-5, which retrieved 187, 28 and 26 homologous proteins, respectively. We thus identified 84 additional NopM-family effectors and 180 additional proteins containing a SUMO protease domain. This suggests that there are still many effectors to be discovered in the *Bradyrhizobium* genus, some of which may play an important symbiotic role.

Conclusion

The importance of the T3SS in the symbiotic ability of rhizobia remains unclear. In this study, by taking advantage of the large repertoire of genome sequences that is available for the genus *Bradyrhizobium*, we revealed that the RhcI-T3SS gene clusters and the *nod* genes largely share a common evolutionary history and have been both conserved in almost all nodulating *Bradyrhizobium* strains. This concomitant maintenance of *nod* and T3SS clusters is most likely driven by host plant-related selective pressure and suggests a much more important role of the T3SS in the symbiotic process than hitherto suspected. The recent identification that a T3SS effector (ErnA), conserved among bradyrhizobia, is able to induce nodule formation in the absence of NFs strengthens this idea [26].

This comparative genomic study provides new avenues to fill gaps in our sparse knowledge on the role of the T3SS in rhizobial symbiosis. Indeed, we propose new genetic determinants that are probably required for the T3SS symbiotic function based on their phylogenetic distribution: *nopE* and *nopH* distribution complements that of *nopX*, in association with their respective RhcI gene cluster types, suggesting a possible role of these two proteins related to the translocation function. Furthermore, the high diversity of NopM and SUMO protease effector families that emerged from our study revealed in several strains a much larger effectome than anticipated, with some of the newly identified putative effectors possibly contributing to the symbiotic

efficiency and/or the modulation of the host spectrum of these strains. The discovery of several atypical T3SS clusters in some strains raises the question whether these gene clusters contribute to the symbiotic properties of bradyrhizobia. Finally, the realization that some strains isolated from nodules lack *nod* genes but contain a T3SS cluster raises the possibility that the T3SS evolved as the main determinant governing the symbiotic interaction. These strains might constitute new models for future studies aiming at a better understanding of the T3SS's symbiotic function.

Funding information

This work was supported by grants from the French national research agency (grant "SymEffectors" number ANR-16-CE20-0013). A.T. was supported by a PhD fellowship from the French Ministry of National Education, Higher Education and Research.

Acknowledgements

The LABGeM (CEA/Genoscope & CNRS UMR8030), the France Génomique and French Bioinformatics Institute national infrastructures (funded as part of Investissement d'Avenir program managed by Agence Nationale pour la Recherche, contracts ANR-10-INBS-09 and ANR-11-INBS-0013) are acknowledged for support within the MicroScope annotation platform."

Author contributions

A. T. and E. G. devised the study, with input from F. L.; Z. R.; D. G. and R. K. Bioinformatic analyses were performed by A. T. and F. L. with advice from R. K.. A. T.; F. L. and E. G. wrote the manuscript, and all authors provided critical review and commentary.

Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

REFERENCES

1. **Delgado-Baquerizo M, Oliverio AM, Brewer TE, Benavent-González A, Eldridge DJ, Bardgett RD, Maestre FT, Singh BK, Fierer N.** A global atlas of the dominant bacteria found in soil. *Science* 2018; 359:320-325.
2. **Vaninsberghe D, Maas KR, Cardenas E, Strachan CR, Hallam SJ, Mohn WW.** Non-symbiotic *Bradyrhizobium* ecotypes dominate North American forest soils. *ISME J.* 2015; 9:2435–2441.
3. **Jones FP, Clark IM, King R, Shaw LJ, Woodward MJ, Hirsch PR.** Novel European free-living, non-diazotrophic *Bradyrhizobium* isolates from contrasting soils that lack nodulation and nitrogen fixation genes - a genome comparison. *Sci Rep* 2016;6:25858. doi: 10.1038/srep25858.
4. **Oldroyd GE.** Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nat Rev Microbiol* 2013;11:252-263.
5. **Giraud E, Moulin L, Vallenet D, Barbe V, Cytryn E, Avarre JC, Jaubert M, Simon D, Cartieaux F, Prin Y, Bena G, Hannibal L, Fardoux J, Kojadinovic M, Vuillet L, Lajus A, Cruveiller S, Rouy Z, Mangenot S, Segurens B, Dossat C, Franck LW, Chang WS, Saunders E, Bruce D, Richardson P, Normand P, Dreyfus B, Pignol D, Stacey G, Emerich D, Verméglio A, Médigue C, Sadowsky.** Legumes symbioses: absence of *nod* genes in photosynthetic bradyrhizobia. *Science* 2007;316:1307-1311.
6. **Masson-Boivin C, Giraud E, Perret X, Batut J.** Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? *Trends Microbiol* 2009;17:458-466.
7. **Masson-Boivin C, Sachs JL.** Symbiotic nitrogen fixation by rhizobia-the roots of a success story. *Curr Opin Plant Biol* 2018;44:7-15.

8. **Zhao R, Liu LX, Zhang YZ, Jiao J, Cui WJ, Zhang B, Wang XL, Li ML, Chen Y, Xiong ZQ, Chen WX, Tian CF.** Adaptive evolution of rhizobial symbiotic compatibility mediated by co-evolved insertion sequences. *ISME J* 2018;12:101-111.
9. **Kaneko T, Nakamura Y, Sato S, Minamisawa K, Uchiumi T, Sasamoto S, Watanabe A, Idesawa K, Iriguchi M, Kawashima K, Kohara M, Matsumoto M, Shimpo S, Tsuruoka H, Wada T, Yamada M, Tabata S.** Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *DNA Res* 2002; 9:189-197.
10. **Reeve W, van Berkum P, Ardley J, Tian R, Gollagher M, Marinova D, Elia P, Reddy TBK, Pillay M, Varghese N, Seshadri R, Ivanova N, Woyke T, Baeshen MN, Baeshen NA, Kyripides N.** High-quality permanent draft genome sequence of the *Bradyrhizobium elkanii* type strain USDA 76T, isolated from *Glycine max* (L.) Merr. *Stand Genomic Sci* 2017; 12:26.
11. **Gully D, Teulet A, Busset N, Nouwen N, Fardoux J, Rouy Z, Vallenet D, Cruveiller S, Giraud E.** Complete genome sequence of *Bradyrhizobium* sp. ORS285, a photosynthetic strain able to establish Nod factor-dependent or Nod factor-independent symbiosis with *Aeschynomene* legumes. *Genome Announc* 2018; 5(30):e00421-17. doi: 10.1128/genomeA.00421-17.
12. **Le Quéré A, Gully D, Teulet A, Navarro E, Gargani D, Fardoux J, Cruveiller S, Neyra M, Giraud E, Krasova Wade T.** Complete genome sequence of *Bradyrhizobium* sp. strain ORS3257, an efficient nitrogen-fixing bacterium isolated from cowpea in Senegal. *Microbiol. Resour Announc* 2019; 8(3):e01449-18. doi: 10.1128/MRA.01449-18.
13. **Deng W, Marshall NC, Rowland JL, McCoy JM, Worrall LJ, Santos AS, Strynadka NCJ, Finlay BB.** Assembly, structure, function and regulation of type III secretion systems. *Nat Rev Microbiol* 2017;15:323-337.
14. **Büttner D.** Behind the lines-actions of bacterial type III effector proteins in plant cells. *FEMS Microbiol Rev* 2016; 40:894-937.

15. **Deakin WJ, Broughton WJ.** Symbiotic use of pathogenic strategies: rhizobial protein secretion systems. *Nat Rev Microbiol* 2009; 7:312-320.
16. **Stahelin C, Krishnan HB.** Nodulation outer proteins: double-edged swords of symbiotic rhizobia. *Biochem. J.* 2015;470:263-274. doi: 10.1042/BJ20150518.
17. **Tampakaki AP.** Commonalities and differences of T3SSs in rhizobia and plant pathogenic bacteria. *Front Plant Sci* 2014;5:114. doi: 10.3389/fpls.2014.00114.
18. **Krause A, Doerfel A, Göttfert M.** Mutational and transcriptional analysis of the type III secretion system of *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol Plant-Microbe Interact* 2002;15:1228-1235.
19. **Marie C, Deakin WJ, Ojanen-Reuhs T, Diallo E, Reuhs B, Broughton W J, Perret X.** TtsI, a key regulator of *Rhizobium* species NGR234 is required for type III-dependent protein secretion and synthesis of rhamnose-rich polysaccharides. *Mo. Plant-Microbe Interact* 2004; 17:958-966.
20. **Wassem R, Hajime Kobayashi H, Kambara K, Le Quéré A, Walker GC, Broughton WJ and Deakin WJ.** TtsI regulates symbiotic genes in *Rhizobium* species NGR234 by binding to *tts* boxes. *Mol. Microbiol.* 2008;68:736–748.
21. **Miwa H, Okazaki S.** How effectors promote beneficial interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2017;38:148-154.
22. **Yang S, Tang F, Gao M, Krishnan HB, Zhu H.** R gene-controlled host specificity in the legume–rhizobia symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2010;107:18735-18740.
23. **Sugawara M, Takahashi S, Umehara Y, Iwano H, Tsurumaru H, Odake H, Suzuki Y, Kondo H, Konno Y, Yamakawa T, Sato S, Mitsui H, Minamisawa K.** Variation in bradyrhizobial NopP effector determines symbiotic incompatibility with Rj2-soybeans via effector-triggered immunity. *Nat. Commun.* 9:3139.

24. **Okazaki S, Kaneko T, Sato S, Saeki K.** Hijacking of leguminous nodulation signaling by the rhizobial type III secretion system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2013;110:17131–17136.
25. **Okazaki S, Tittabutr P, Teulet A, Thouin J, Fardoux J, Chaintreuil C, Gully D, Arrighi JF, Furuta N, Miwa H, Yasuda M, Nouwen N, Teaumroong N, Giraud E.** Rhizobium-legume symbiosis in the absence of Nod factors: two possible scenarios with or without the T3SS. *ISME J* 2016;10:64-74.
26. **Teulet A, Busset N, Fardoux J, Gully D, Chaintreuil C, Cartieaux F, Jauneau A, Okazaki S, Gressent F, Nouwen N, Arrighi JF, Koebnik R, Mergaert P, Deslandes L, Giraud E.** The rhizobial type III effector ErnA confers the ability to form nodules in legumes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2019;116:21758-21768.
27. **Lassalle F, Veber P, Jauneikaite E, Didelot X.** Automated reconstruction of all gene histories in large bacterial pangenome datasets and search for co-evolved gene modules with Pantagruel. *bioRxiv* 2019; 586495. doi: 10.1101/586495.
28. **Steinegger M, Söding J.** MMseqs2 enables sensitive protein sequence searching for the analysis of massive data sets. *Nat Biotechnol* 2017;35:1026-1028.
29. **Sievers F, Desmond GH.** Clustal Omega for making accurate alignments of many protein sequences. *Protein Sci.* 2017;27:135-145.
30. **Suyama M, Torrents D, Bork P.** PAL2NAL: robust conversion of protein sequence alignments into the corresponding codon alignments. *Nucleic Acids Res.* 2006;34:609-612. doi:10.1093/nar/gkl315.
31. **Stamatakis A.** RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Phylogenetics* 2013;30:1312-1313. doi:10.1093/bioinformatics/btu033.
32. **Ronquist F, Teslenko M, Van Der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP.** MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic

inference and model choice across a large model space. *Syst. Biol.* 2012;61:539-542. doi :10.1093/sysbio/sys029.

33. **Vallenet D, Calteau A, Cruveiller S, Gachet M, Lajus A, Josso A, Mercier J, Renaux A, Rollin J, Rouy Z, Roche D, Scarpelli C, Médigue C.** MicroScope in 2017: an expanding and evolving integrated resource for community expertise of microbial genomes. *Nucleic Acids Res.* 2017;45:517-528. doi: 10.1093/nar/gkw1101.

34. **Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K.** MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol* 2018; 1547-1549. doi: 10.1093/molbev/msy096.

35. **Cohen O, Ashkenazy H, Belinky F, Huchon D, Pupko T.** GLOOME: Gain Loss Mapping Engine, *Bioinformatics* 2010; 26:2914-2915. doi:10.1093/bioinformatics/btq549.

36. **Okazaki S, Noisangiam R, Okubo T, Kaneko T, Oshima K, Hattori M, Teamtisong K, Songwattana P, Tittabutr P, Boonkerd N, Saeki K, Sato S, Uchiumi T, Minamisawa K, Teaumroong N.** Genome analysis of a novel *Bradyrhizobium* sp. DOA9 carrying a symbiotic plasmid. *PLoS One* 20125; 10(2):e0117392. doi:10.1371/journal.pone.0117392.

37. **Iida T, Itakura M, Anda M, Sugawara M, Isawa T, Okubo T, Sato S, Chiba-Kakizaki K, Minamisawa K.** Symbiosis island shuffling with abundant insertion sequences in the genomes of extra-slow-growing strains of soybean bradyrhizobia. *Appl Environ Microbiol* 2015;81:4143-4154.

38. **Miché L, Moulin L, Chaintreuil C, Contreras-Jimenez JL, Munive-Hernández JA, Del Carmen Villegas-Hernandez M, Crozier F, Béna G.** Diversity analyses of *Aeschynomene* symbionts in Tropical Africa and Central America reveal that *nod*-independent stem nodulation is not restricted to photosynthetic bradyrhizobia. *Environ Microbiol* 2010; 12:2152-2164.

39. **Okubo T, Fukushima S, Itakura M, Oshima K, Longtonglang A, Teaumroong N, Mitsui H, Hattori M, Hattori R, Hattori T, Minamisawa K.** Genome analysis suggests that

the soil oligotrophic bacterium *Agromonas oligotrophica* (*Bradyrhizobium oligotrophicum*) is a nitrogen-fixing symbiont of *Aeschynomene indica*. *Appl Environ Microbiol* 2013;79:2542-2551.

40. **Tian R, Parker M, Seshadri R, Reddy T, Markowitz V, Ivanova N, Pati A, Woyke T, Baeshen MN, Baeshen NA, Kyrpides N, Reeve W.** High-quality permanent draft genome sequence of *Bradyrhizobium* sp. Tv2a.2, a microsymbiont of *Tachigali versicolor* discovered in Barro Colorado Island of Panama. *Stand. Genomic Sci.* 2015;10:27. doi: 10.1186/s40793-015-0006-0.

41. **Stępkowski T, Watkin E, McInnes A, Gurda D, Gracz J, Steenkamp ET.** Distinct *Bradyrhizobium* communities nodulate legumes native to temperate and tropical monsoon Australia. *Mol Phylogenet Evol* 2012;63:265-277.

42. **van Berkum P, Fuhrmann JJ.** Evolutionary relationships among the soybean bradyrhizobia reconstructed from 16S rRNA gene and internally transcribed spacer region sequence divergence. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2000;50:2165-2172.

43. **Benzine J, Shelobolina E, Xiong MY, Kennedy DW, McKinley JP, Lin X, Roden EE.** Fe-phyllsilicate redox cycling organisms from a redox transition zone in Hanford 300 Area sediments. *Front Microbiol* 2013,164:388. doi: 10.3389/fmicb.2013.00388.

44. **Crovadore J, Calmin G, Cochard B, Chablais R, Lefort F.** Whole-genome sequence of *Bradyrhizobium elkanii* strain UASWS1015, a highly ammonia-tolerant nitrifying bacterium. *Genome Announc* 2016; 4(2):e00111-16. doi:10.1128/genomeA.00111-16.

45. **van Berkum P, Elia P, Song Q, Eardly BD.** Development and application of a multilocus sequence analysis method for the identification of genotypes within genus *Bradyrhizobium* and for establishing nodule occupancy of soybean (*Glycine max* L. Merr). *Mol Plant Microbe Interact* 2012;25:321-30. doi: 10.1094/MPMI-09-11-0241.

46. **Chun J, Oren A, Ventosa A, Christensen H, Arahal DR, Costa MS, Rooney AP, Xu XW, De Meyer S, Trujillo ME.** Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. *Int J Syst Evol Microbiol* 2018;68:461-466. doi: 10.1099/ijsem.0.002516.
47. **de Lajudie P, Andrews M, Ardley J, Eardly B, Jumas-Bilak E, Kuzmanovic N, Lassalle R, Lindstrom K, Mhamdi R, Martinez-Romero E, Moulin Lionel, Mousavi S A, Nesme X, Peix A, Pulawska J, Steenkamp E, Stepkowski T, Tian C F, Vinuesa P, Wei G H, Willems A, Zili J, Young P.** Minimal standards for the description of new genera and species of rhizobia and agrobacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2019; 69:1852-1863.
48. **Avontuur JR, Palmer M, Beukes CW, Chan WY, Coetzee MPA, Blom J, Stepkowski T, Kyrpides NC, Woyke T, Shapiro N, Whitman WB, Venter SN, Steenkamp ET.** Genome-informed *Bradyrhizobium* taxonomy: where to from here? *Syst. Appl. Microbiol.* 2019;42:427-439.
49. **Garrido-Sanz D, Redondo-Nieto M, Mongiardini E, Blanco-Romero E, Durán D, Quelas JI, Martin M, Rivilla R, Lodeiro AR, Althabegoiti MJ.** Phylogenomic analyses of *Bradyrhizobium* reveal uneven distribution of the lateral and subpolar flagellar systems, which extends to *Rhizobiales*. *Microorganisms* 2019;7(2):E50. doi: 10.3390/microorganisms7020050.
50. **Troisfontaines P, Cornelis G.** Type III secretion: more systems than you think. *Physiology (Bethesda)* 2005;20:326-339.
51. **Hu Y, Huang H, Cheng X, Shu X, White AP, Stavrinides J, Köster W, Zhu G, Zhao Z, Wang Y.** A global survey of bacterial type III secretion systems and their effectors. *Environ. Microbiol.* 2017;19:3879-3895.
52. **Schmeisser C, Liesegang H, Krysciak D, Bakkou N, Le Quéré A, Wollherr A, Heinemeyer I, Morgenstern B, Pommerening-Röser A, Flores M, Palacios R, Brenner S, Gottschalk G, Schmitz RA, Broughton WJ, Perret X, Strittmatter AW, Streit WR .**

Rhizobium sp. strain NGR234 possesses a remarkable number of secretion systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009;75:4035-4045. doi: 10.1128/AEM.00515-09.

53. **Weidner S, Becker A, Bonilla I, Jaenicke S, Lloret J, Margaret I, Pühler A, Ruiz-Sainz JE, Schneiker-Bekel S, Szczepanowski R, Vinardell JM, Zehner S, Göttfert M.** Genome sequence of the soybean symbiont *Sinorhizobium fredii* HH103. *J Bacteriol* 2012;194:1617-1618. doi: 10.1128/JB.06729-11.

54. **Schuldes J, Rodriguez Orbegoso M, Schmeisser C, Krishnan HB, Daniel R, Streit WR.** Complete genome sequence of the broad- host-range strain *Sinorhizobium fredii* USDA257. *J Bacteriol* 2012;194:4483. doi: 10.1128/JB.00966-12

55. **Gazi AD, Sarris PF, Fadouloglou VE, Charova SN, Mathioudakis N, Panopoulos NJ, Kokkinidis M.** Phylogenetic analysis of a gene cluster encoding an additional, rhizobial-like type III secretion system that is narrowly distributed among *Pseudomonas syringae* strains. *BMC Microbiol.* 2012;12:188. doi: 10.1186/1471-2180-12-188.

56. **Hueck CJ.** Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1998;62:379-433.

57. **Okazaki S, Zehner S, Hempel J, Lang K, Göttfert M.** Genetic organization and functional analysis of the type III secretion system of *Bradyrhizobium elkanii*. *FEMS Microbiol Lett* 2009;295:88-95. doi: 10.1111/j.1574-6968.2009.01593.x.

58. **Kimbrel JA, Thomas WJ, Jiang Y, Creason AL, Thireault CA, Sachs JL, Chang JH.** Mutualistic co-evolution of type III effector genes in *Sinorhizobium fredii* and *Bradyrhizobium japonicum*. *PLoS Pathog* 2013; 9(2):e1003204. doi:10.1371/journal.ppat.1003204.

59. **Hempel J, Zehner S, Göttfert M, Patschkowski T.** Analysis of the secretome of the soybean symbiont *Bradyrhizobium japonicum*. *J Biotechnol* 2009;140:51-58.

60. **Jiménez-Guerrero I, Pérez-Montaña F, Medina C, Ollero FJ, López-Baena FJ.** NopC is a rhizobium-specific type 3 secretion system effector secreted by *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* HH103. *PLoS One* 2015;10(11):e0142866. doi:10.1371/journal.pone.0142866.
61. **Büttner D, Nennstiel D, Klüsener B, Bonas U.** Functional analysis of HrpF, a putative type III translocon protein from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J Bacteriol* 2002; 184:2389-2398.
62. **Helene LCF, Delamuta JRM, Ribeiro RA, Hungria M.** *Bradyrhizobium mercantei* sp. nov., a nitrogen-fixing symbiont isolated from nodules of *Deguelia costata* (syn. *Lonchocarpus costatus*). *Int J Syst Evol Microbiol* 2017;67:1827-1834.
63. **Ribeiro RA, Helene LCF, Delamuta JRM, Hungria M.** Genome sequence of *Bradyrhizobium mercantei* strain SEMIA 6399T, isolated from nodules of *Deguelia costata* in Brazil. *Genome Announc* 2017;5(36):e00943-17. doi: 10.1128/genomeA.00943-17
64. **Ji H, Dong H.** Key steps in type III secretion system (T3SS) towards translocon assembly with potential sensor at plant plasma membrane. *Mol Plant Pathol* 2015;16:762-773.
65. **Saad MM, Staehelin C, Broughton WJ, Deakin WJ.** Protein-protein interactions within type III secretion system-dependent pili of *Rhizobium* sp. strain NGR234. *J. Bacteriol.* 2008;190:750-754.
66. **Pesce C, Jacobs JM, Berthelot E, Perret M, Vancheva T, Bragard C, Koebnik R.** Comparative genomics identifies a novel conserved protein, HpaT, in proteobacterial type III secretion systems that do not possess the putative translocon protein HrpF. *Front Microbiol* 2017;8:1177. doi: 10.3389/fmicb.2017.01177
67. **Wenzel M, Friedrich L, Göttfert M, Zehner S.** The type III-secreted protein NopE1 affects symbiosis and exhibits a calcium-dependent autocleavage activity. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2010;23:124-129.

68. **Büttner D, Bonas U.** Port of entry – the type III secretion translocon. *Trends Microbiol.* 2002; 10:186-192.
69. **Kambara K, Ardisson S, Kobayashi H, Saad MM, Schumpp O, Broughton WJ, Deakin WJ.** Rhizobia utilize pathogen-like effector proteins during symbiosis. *Mol Microbiol* 2009. 71:92-106.
70. **Dean P.** Functional domains and motifs of bacterial type III effector proteins and their roles in infection. *FEMS Microbiol. Rev.* 2011; 35:1100-1125.
71. **Gomez-Valero L, Rusniok C, Carson D, Mondino S, Pérez-Cobas AE, Rolando M, Pasricha S, Reuter S, Demirtas J, Crumbach J, Descorps-Declere S, Hartland EL, Jarraud S, Dougan G, Schroeder GN, Frankel G, Buchrieser C.** More than 18,000 effectors in the *Legionella* genus genome provide multiple, independent combinations for replication in human cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2019;116:2265-2273.
72. **Xin DW, Liao S, Xie ZP, Hann DR, Steinle L, Boller T, Staehelin C.** Functional analysis of NopM, a novel E3 ubiquitin ligase (NEL) domain effector of *Rhizobium* sp. strain NGR234. *PLoS Pathog* 2012; 8(5):e1002707. doi: 10.1371/journal.ppat.1002707.
73. **Xu CC, Zhang D, Hann DR, Xie ZP, Staehelin C.** Biochemical properties and in planta effects of NopM, a rhizobial E3 ubiquitin ligase. *J Biol Chem* 2018;293:15304-15315.
74. **Rodrigues JA, López-Baena FJ, Ollero FJ, Vinardell JM, Espuny Mdel R, Bellogín RA, Ruiz-Sainz JE, Thomas JR, Sumpton D, Ault J, Thomas-Oates J.** NopM and NopD are rhizobial nodulation outer proteins: identification using LC-MALDI and LC-ESI with a monolithic capillary column. *J. Proteome Res.* 2007;6:1029-1037.
75. **Faruque OM, Miwa H, Yasuda M, Fujii Y, Kaneko T, Sato S, Okazaki S.** Identification of *Bradyrhizobium elkanii* genes involved in incompatibility with soybean plants carrying the *Rj4* allele. *Appl Environ Microbiol* 2015;81:6710-6717.

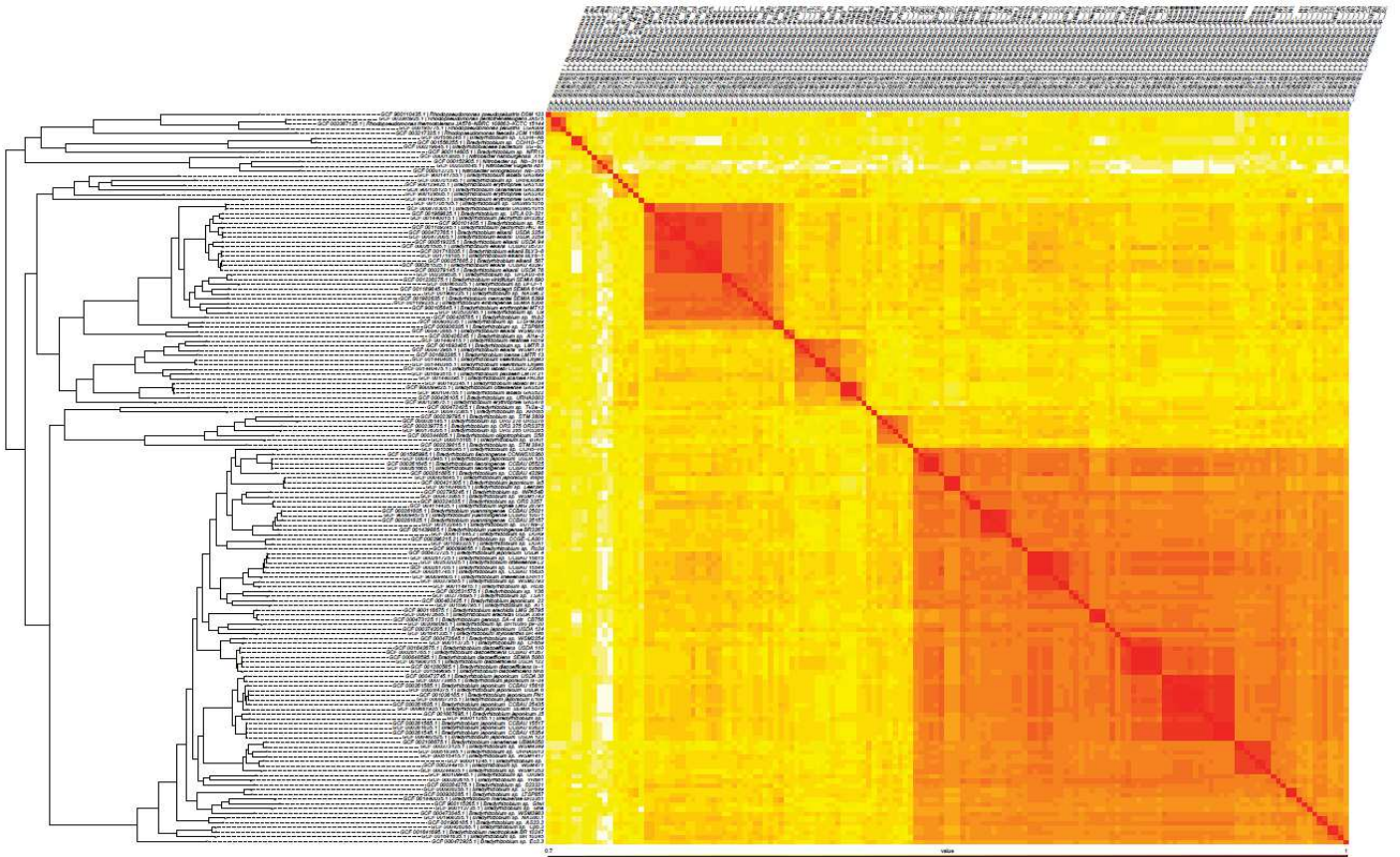
76. **Dai WJ, Zeng Y, Xie ZP, Staehelin C.** Symbiosis-promoting and deleterious effects of NopT, a novel type 3 effector of *Rhizobium* sp. strain NGR234. *J Bacteriol* 2008; 190(14):5101-5110 doi: 10.1128/JB.00306-08.
77. **Fotiadis CT, Dimou M, Georgakopoulos DG, Katinakis P, Tampakaki AP.** Functional characterization of NopT1 and NopT2, two type III effectors of *Bradyrhizobium japonicum*. *FEMS Microbiol Lett* 2011;27:66–77.
78. **Hoyer E, Knöppel J, Liebmann M, Steppert M, Raiwa M, Herczynski O, Hanspach E, Zehner S, Göttfert M, Tsushima S, Fahmy K3 Oertel J.** Calcium binding to a disordered domain of a type III-secreted protein from a coral pathogen promotes secondary structure formation and catalytic activity. *Sci Rep* 2019; 9(1):7115. doi: 10.1038/s41598-019-42898-0.

Supplementary information for

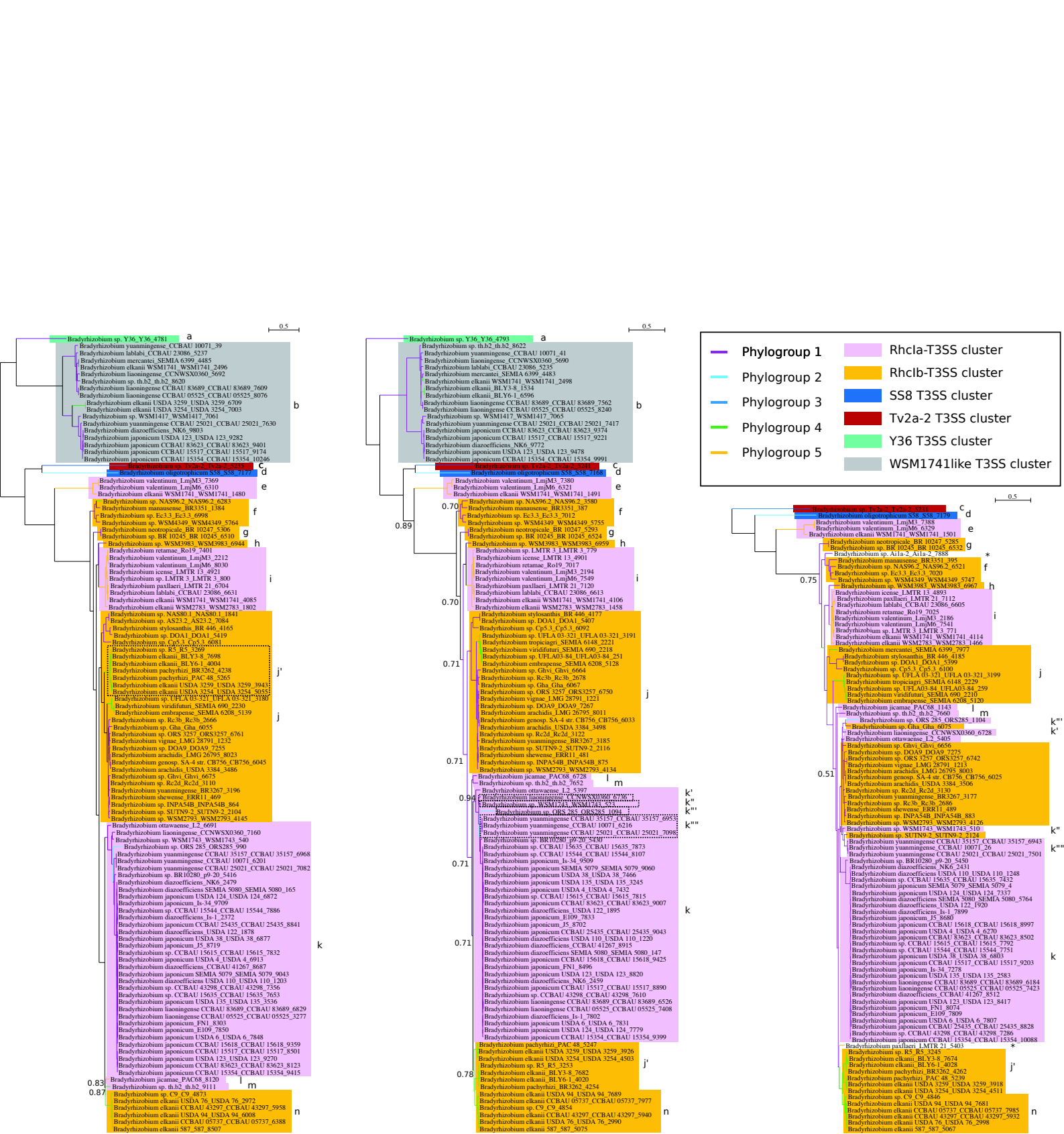
Phylogenetic distribution and evolutionary dynamics of *nod* and T3SS genes in the genus *Bradyrhizobium*

Albin Teulet¹, Djamel Gully¹, Zoe Rouy², Ralf Koebnik³, Eric Giraud^{1*+} and Florent Lassalle⁴

+ Corresponding author: eric.giraud@ird.fr



Supplementary Figure 1: Phylogenetic distance matrix between members of *Bradyrhizobium* based on whole genome content of gene family. Both axes are identical and 'heat' of the color increases with similarity in genome content.



rhcV

rhcN

rhcC2

Supplementary Figure 2: Bayesian consensus trees for individual genes *rhcV*, *rhcN* and *rhcC2*.

Majority-rule consensus trees of Bayesian samples of gene trees inferred from CDS alignments with MrBayes (v 3.2.6). Presented trees are subtrees of the gene trees for homologous gene families BRADYC021242, BRADYC005547 and BRADYC019548, respectively, which full trees can be found in Supplementary Data online at <https://figshare.com/s/cd63d7fd4d2023bf2347>. Posterior probability supports of branches are ≥ 0.95 unless indicated. Phylogroups of strains are shown as branch colours as in Figure 4; the type of Rhc T3SS cluster is indicated by background color frames as in Figures 1-4. For convenience, clades of sequences matching across loci are indicated by letters of the right-hand side of each tree. Dotted frames indicate parts of clades that are located in different parts of the tree between loci, suggesting recombination events occurred. Stars in the *rhcC2* tree indicate horizontal transfer events that led to gain of homologous genes in parts of the genome that are not a Rhc cluster.

Supplementary table 1: The inventory of bacteria strains using in this study

	Species	Strain	accession (chromosome)	Contigs	Size (Mb)	Material of origin	Country of isolation
Bradyrhizobiaceae	bacterium	SG-6C	AFOF00000000	38	4.33	Soil (Insecticide contaminated)	Australia
Bradyrhizobium	arachidis	LMG26795 ^T	NZ_FPQ00000000.1	98	9.79	Nodule of <i>Arachis hypogaea</i>	China
Bradyrhizobium	brasilense	UFLA 03-321 ^T	NZ_MPVQ00000000	94	8.59	Nodule of <i>Vigna unguiculata</i>	Brazil
Bradyrhizobium	canariense	GAS369	LT629750.1	complete	7.84	Soil (Harvest Forest)	USA
Bradyrhizobium	centrolobii	BR10245 ^T	LUUB01000000	133	10.11	Nodule of <i>Centrolobium paraense</i>	Brazil
Bradyrhizobium	diazoefficiens	CCBAU41267	AJQI01000000	563	9.12	Nodule of <i>Glycine max</i>	China
Bradyrhizobium	diazoefficiens	Is-1	LGUJ00000000	104	8.98	Nodule of <i>Glycine max</i>	Japan
Bradyrhizobium	diazoefficiens	NK6	NZ_AP014685.1	Complete	9.78	Nodule of <i>Glycine max</i>	Japan
Bradyrhizobium	diazoefficiens	SEMIA5080	ADOU00000000.1	13	9.58	Nodule of <i>Glycine max</i>	Brazil
Bradyrhizobium	diazoefficiens	USDA110 ^T	CP011360	Complete	9.11	Nodule of <i>Glycine max</i>	USA
Bradyrhizobium	diazoefficiens	USDA122	CP013127	Complete	8.98	Nodule of <i>Glycine max</i>	USA
Bradyrhizobium	elkani	587	NZ_AJK00000000.1	1002	8.80	Nodule of <i>Glycine max</i>	Brazil
Bradyrhizobium	elkani	BLY3-8	LWUI00000000	90	9.20	Nodule of <i>Glycine max</i>	Japan
Bradyrhizobium	elkani	BLY6-1	LXEM00000000	79	9.20	Nodule of <i>Glycine max</i>	Japan
Bradyrhizobium	elkani	CCBAU05737	AJPV00000000.1	751	9.78	Nodule of <i>Glycine max</i>	China
Bradyrhizobium	elkani	CCBAU43297	AJPW01000000	654	9.48	Nodule of <i>Glycine max</i>	China
Bradyrhizobium	elkani	UASWS1015	JXOF00000000.1	187	7.82	Sewage plant	Switzerland
Bradyrhizobium	elkani	USDA3254	AXAH00000000	87	8.98	Nodule of <i>Phaseolus acutifolius</i>	USA
Bradyrhizobium	elkani	USDA3259	AXAW01000000	102	8.72	Nodule of <i>Phaseolus lunatus</i>	USA
Bradyrhizobium	elkani	USDA94	JAF00000000	168	9.56	Nodule of <i>Glycine max</i>	USA
Bradyrhizobium	elkani	WSM1741	AXAU00000000	70	7.95	Nodule of <i>Rhynchosia minima</i>	Australia
Bradyrhizobium	elkani	WSM2783	NZ_AXAP00000000.1	218	9.90	Nodule of <i>Leobordea carinata</i>	South of Africa
Bradyrhizobium	elkanii	USDA76 ^T	ARAG01000000	25	9.48	Nodule of <i>Glycine max</i>	USA
Bradyrhizobium	embrapense	SEMIA6208 ^T	LFIP00000000	160	9.77	Nodule of <i>Desmodium heterocarpon</i> subsp. <i>Ovalifolium</i>	Brazil
Bradyrhizobium	enterica	DFCI-1	AMFB00000000	98	7.65	Human colon	Canada
Bradyrhizobium	erythrophlei	GAS138	LT670817.1	Complete	9.09	Soil (Harvest Forest)	USA
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>erythrophlei</i>	GAS242	LT670818.1	Complete	9.18	Soil (Harvest Forest)	USA
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>erythrophlei</i>	GAS401	LT670849.1	Complete	7.53	Soil (Harvest Forest)	USA
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>erythrophlei</i>	GAS478	FSRD01000000	4	11.74	Soil (Harvest Forest)	USA
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>erythrophlei</i>	MT12	FNTH01000000	2	8.97	Soil (Forest)	USA
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>forestalis</i>	INPA54B ^T	PGVG01000000	183	8.25	Nodule of <i>Inga</i> sp.	Brazil
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>icense</i>	LMTR13 ^T	CP016428.1	Complete	8.32	Nodule of <i>Phaseolus lunatus</i>	Peru
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>japonicum</i>	22	AXVG00000000.1	29	7.50	Soil (Hanford subsurface)	USA
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>japonicum</i>	CCBAU15354	AJPX01000000	951	9.91	Nodule of <i>Glycine max</i>	China
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>japonicum</i>	CCBAU15517	AJPY01000000	1129	9.92	Nodule of <i>Glycine max</i>	China

Supplementary table 1 (continued)

	Species	Strain	accession (chromosome)	Contigs	Size (Mb)	Material of origin	Country of isolation
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>japonicum</i>	CCBAU15618	AJPZ01000000	691	9.83	Nodule of <i>Glycine max</i>	China
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>japonicum</i>	CCBAU25435	AJQA01000000	520	9.46	Nodule of <i>Glycine max</i>	China
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>japonicum</i>	CCBAU83623	AJQB01000000	1212	10.08	Nodule of <i>Glycine max</i>	China
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>japonicum</i>	E109	CP010313.1	Complete	9.22	Nodule of <i>Glycine max</i>	Argentina
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>japonicum</i>	FN1	NZ_JGCL00000000.1	87	9.14	Soil (Grassland)	USA
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>japonicum</i>	In8p8	AUGD00000000.1	53	7.59	Soil (Hanford subsurface)	USA
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>japonicum</i>	Is-34	JRPN00000000.1	248	10.33	Nodule of <i>Glycine max</i>	Japan
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>japonicum</i>	Is5	ATWP00000000.1	60	7.59	Soil (Hanford subsurface)	USA
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>japonicum</i>	J5	CP017637.1	Complete	10.17	Nodule of <i>Glycine max</i>	Japan
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>japonicum</i>	SEMIA5079	CP007569	Complete	8.84	Nodule of <i>Glycine max</i>	Brazil
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>japonicum</i>	USDA123	NZ_AXVP00000000.1	518	10.46	Nodule of <i>Glycine max</i>	USA
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>japonicum</i>	USDA124	ARFJ00000000	126	9.00	Nodule of <i>Glycine max</i>	USA
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>japonicum</i>	USDA135	NZ_AXAT00000000.1	548	7.70	Nodule of <i>Glycine max</i>	USA
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>japonicum</i>	USDA38	NZ_AXAG00000000	109	9.61	Nodule of <i>Glycine max</i>	Japan
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>japonicum</i>	USDA4	NZ_AXAF00000000.1	99	8.74	Nodule of <i>Glycine max</i>	USA
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>japonicum</i>	USDA6 ^T	AP012206	Complete	9.13	Nodule of <i>Glycine max</i>	Japan
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>japonicum</i>	WSM1743	AXAZ01000000	168	8.34	Nodule of <i>Indigofera sp.</i>	Australia
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>jicamae</i>	PAC68 ^T	NZ_LLXZ00000000.1	235	8.71	Nodule of <i>Pachyrhizus erosus</i>	Honduras
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>lablabi</i>	CCBAU23086 ^T	LLYB00000000	135	8.82	Nodule of <i>Lablab purpureus</i>	China
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>lablabi</i>	GAS499	LT670844.1	Complete	7.91	Soil (Harvest Forest)	USA
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>lablabi</i>	GAS522	FNTI01000000	2	8.27	Soil (Harvest Forest)	USA
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>lablabi</i>	MT34	LT670845.1	Complete	8.15	Soil (Forest)	USA
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>liaoningense</i>	CCBAU05525	AJQC01000000	1040	7.98	Nodule of <i>Glycine max</i>	China
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>liaoningense</i>	CCBAU83689	AJQD01000000	1133	8.01	Nodule of <i>Glycine max</i>	China
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>liaoningense</i>	CCNWSX0360	NZ_LUKO00000000.1	2242	8.59	Nodule of <i>Vigna unguiculata</i>	China
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>manausense</i>	BR3351 ^T	LJYG00000000.1	127	9.15	Nodule of <i>Vigna unguiculata</i>	Brazil
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>neotropiale</i>	BR10247 ^T	LSEF00000000.1	125	8.68	Nodule of <i>Centrolabium paraense</i>	Brazil
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>oligotrophicum</i>	S58 ^T	AP012603	Complete	8.26	Soil (Paddy field)	Japan
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>ottawaense</i>	GAS524	LT629693.1	Complete	8.34	Soil (Harvest Forest)	USA
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>pachyrhizi</i>	BR3262	LJYE00000000	116	8.96	Nodule of <i>Vigna unguiculata</i>	Brazil
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>pachyrhizi</i>	PAC48 ^T	LFIQ00000000	124	8.75	Nodule of <i>Pachyrhizus erosus</i>	Costa Rica
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>paxllaeri</i>	LMTR21 ^T	MAXB00000000.1	146	8.29	Nodule of <i>Phaseolus lunatus</i>	Peru
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>retamae</i>	Ro19 ^T	NZ_LLYA00000000.1	235	8.47	Nodule of <i>Retama monosperma</i>	Morocco
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>sacchari</i>	BR10280 ^T	LWIG01000000	69	8.69	Sugarcane roots	Brazil
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>shewense</i>	ERR11 ^T	FMAI01000000	102	9.16	Nodule of <i>Erythrina brucei</i>	Ethiopia
<i>Bradyrhizobium</i>	sp.	Aia-2	AUEZ01000000	248	9.03	Nodule of <i>Andira inermis</i>	Costa Rica
<i>Bradyrhizobium</i>	sp.	ARR65	AWZU01000000	139	8.61	Nodule of <i>Stylosanthes viscosa</i>	Australia
<i>Bradyrhizobium</i>	sp.	AS23.2	LGHM00000000.1	430	8.71	Nodule of <i>Lupinus albus</i>	Brazil
<i>Bradyrhizobium</i>	sp.	AT1	JXDL00000000.1	8	7.35	storage roots of sweet potato	Japan
<i>Bradyrhizobium</i>	sp.	BF49	LN901633.1	Complete	7.55	Soil (Bare Fallow)	UK
<i>Bradyrhizobium</i>	sp.	BTAi1	CP000494	Complete	8.49	Nodule of <i>Aeschynomene indica</i>	USA
<i>Bradyrhizobium</i>	sp.	C9	NWTG01000000	75	8.43	Nodule of <i>Phaseolus vulgaris</i>	China

Supplementary table 1 (continued)

	Species	Strain	accession (chromosome)	Contigs	Size (Mb)	Material of origin	Country of isolation
<i>Bradyrhizobium</i>	sp.	CB756	NZ_AXBC00000000.1	11	9.83	Nodule of <i>Macrotyloma africanicus</i>	Zimbabwe
<i>Bradyrhizobium</i>	sp.	CCBAU15544	AJQF00000000.1	612	8.49	Nodule of <i>Glycine max</i>	China
<i>Bradyrhizobium</i>	sp.	CCBAU15615	AJQG00000000.1	453	8.70	Nodule of <i>Glycine max</i>	China
<i>Bradyrhizobium</i>	sp.	CCBAU15635	AJQH00000000.1	456	8.29	Nodule of <i>Glycine max</i>	China
<i>Bradyrhizobium</i>	sp.	CCBAU43298	AJQE00000000.1	508	7.92	Nodule of <i>Glycine max</i>	China
<i>Bradyrhizobium</i>	sp.	CCGE-LA001	CP013949.1	Complete	7.83	Nodule of <i>Phaseolus microcarpus</i>	Mexico
<i>Bradyrhizobium</i>	sp.	CF659	FOQJ00000000.1	25	8.47	Populus roots	USA
<i>Bradyrhizobium</i>	sp.	Cp5.3	AUFA01000000	150	8.92	Nodule of <i>Centrosema pubescens</i>	Panama
<i>Bradyrhizobium</i>	sp.	DOA1	JXJM00000000	4	7.43	Nodule of <i>Aeschynomene americana</i>	Thailand
<i>Bradyrhizobium</i>	sp.	DOA9	BAWE00000000	6	7.10	Nodule of <i>Aeschynomene americana</i>	Thailand
<i>Bradyrhizobium</i>	sp.	EC3.3	AXAS01000000	160	10.03	Nodule of <i>Erythrina costaricensis</i>	Panama
<i>Bradyrhizobium</i>	sp.	G22	LN907826.1	Complete	9.02	Soil (Harvest Forest)	UK
<i>Bradyrhizobium</i>	sp.	Gha	FOQM00000000.1	95	8.25	Nodule of <i>Vigna unguiculata</i>	Botswana
<i>Bradyrhizobium</i>	sp.	Ghvi	FOVU00000000.1	41	7.92	Nodule of <i>Vigna unguiculata</i>	Botswana
<i>Bradyrhizobium</i>	sp.	LMTR3	NZ_MAXC00000000	55	7.83	Nodule of <i>Phaseolus lunatus</i>	Peru
<i>Bradyrhizobium</i>	sp.	LTSP849	JYMR00000000.1	57	8.57	Soil (Forest)	Canada
<i>Bradyrhizobium</i>	sp.	LTSP857	JYMS00000000.1	50	8.42	Soil (Forest)	Canada
<i>Bradyrhizobium</i>	sp.	LTSP885	JYMT00000000.1	43	7.85	Soil (Forest)	Canada
<i>Bradyrhizobium</i>	sp.	LTSPM299	JYMU00000000.1	100	9.09	Soil (Forest)	Canada
<i>Bradyrhizobium</i>	sp.	NAS80-1	LGHL00000000.1	533	9.24	Nodule of <i>Lupinus albescens</i>	Brazil
<i>Bradyrhizobium</i>	sp.	NAS96-2	LGHK00000000.1	450	8.93	Nodule of <i>Lupinus albescens</i>	Brazil
<i>Bradyrhizobium</i>	sp.	NFR13	FOTP00000000.1	17	6.23	Unknown	Unknown
<i>Bradyrhizobium</i>	sp.	ORS278	CU234118	Complete	7.46	Nodule of <i>Aeschynomene sensitiva</i>	Senegal
<i>Bradyrhizobium</i>	sp.	ORS285	LT859959.1	Complete	7.60	Nodule of <i>Aeschynomene afraspera</i>	Senegal
<i>Bradyrhizobium</i>	sp.	ORS3257	LS398110.1	Complete	7.86	Nodule of <i>Vigna unguiculata</i>	Senegal
<i>Bradyrhizobium</i>	sp.	ORS375	CAFI00000000	497	8.16	Nodule of <i>Aeschynomene indica</i>	Senegal
<i>Bradyrhizobium</i>	sp.	R5	FMZW01000000	124	9.44	Nodule of <i>Vigna unguiculata</i>	South Africa
<i>Bradyrhizobium</i>	sp.	Rc2d	FNCU01000000	117	9.58	Nodule of <i>Vigna unguiculata</i>	South Africa
<i>Bradyrhizobium</i>	sp.	Rc3b	FOUS00000000.1	49	8.38	Nodule of <i>Vigna unguiculata</i>	South Africa
<i>Bradyrhizobium</i>	sp.	S23321	AP012279	Complete	7.23	Soil (Paddy field)	Japan
<i>Bradyrhizobium</i>	sp.	STM3809	CAFJ010000	803	7.31	Nodule of <i>Aeschynomene sensitiva</i>	French Guiana
<i>Bradyrhizobium</i>	sp.	STM3843	CAFK00000000	350	8.47	Nodule of <i>Aeschynomene sensitiva</i>	French Guiana
<i>Bradyrhizobium</i>	sp.	SUTN9-2	LAXE00000000	6	7.86	Nodule of <i>Aeschynomene americana</i>	Thailand
<i>Bradyrhizobium</i>	sp.	Th.b2	AUGA01000000	274	10.12	Nodule of <i>Amphicarpaea bracteata</i>	USA
<i>Bradyrhizobium</i>	sp.	Tv2a-2	AXAI01000000	87	8.50	Nodule of <i>Tachigali versicolor</i>	Panama

Supplementary table 1 (continued)

	Species	Strain	accession (chromosome)	Contigs	Size (Mb)	Material of origin	Country of isolation
<i>Bradyrhizobium</i>	sp.	UASWS1016	MDEP00000000.1	107	8.05	Sewage plant	Italy
<i>Bradyrhizobium</i>	sp.	UFLA03-84	NSJY00000000.1	21	8.63	Nodule of <i>Vigna unguiculata</i>	Brazil
<i>Bradyrhizobium</i>	sp.	URHA0002	AUES00000000.1	145	6.97	Unknown	Unknown
<i>Bradyrhizobium</i>	sp.	URHA0013	JADK00000000.1	25	7.19	Unknown	Unknown
<i>Bradyrhizobium</i>	sp.	URHD0069	JNIJ00000000.1	132	6.79	Unknown	Unknown
<i>Bradyrhizobium</i>	sp.	USDA3384	AXAD01000000	52	9.80	Nodule of <i>Crotalaria paulina</i>	Brazil
<i>Bradyrhizobium</i>	sp.	WSM1253	AHMB00000000	71	8.72	Nodule of <i>Ornithopus compressus</i>	Greece
<i>Bradyrhizobium</i>	sp.	WSM1417	AZXU01000000	3	8.05	Nodule of <i>Lupinus sp.</i>	Chili
<i>Bradyrhizobium</i>	sp.	WSM2254	AXAB01000000	105	9.08	Nodule of <i>Acacia dealbata</i>	Australia
<i>Bradyrhizobium</i>	sp.	WSM2793	ARBF00000000	85	8.87	Nodule of <i>Rhynchosia totta</i>	South Africa
<i>Bradyrhizobium</i>	sp.	WSM3983	AXAY00000000	73	8.79	Nodule of <i>Kennedia coccinea</i>	Australia
<i>Bradyrhizobium</i>	sp.	WSM4349	ARDH01000000	107	8.29	Nodule of <i>Syrmatium glabrum</i>	USA
<i>Bradyrhizobium</i>	sp.	YR681	AKIY00000000	351	7.83	rhizosphere and endosphere of <i>Populus deltoides</i>	USA
<i>Bradyrhizobium</i>	sp.	WSM471	AHLW00000000	2	7.78	Nodule of <i>Ornithopus pinnatus</i>	Australia
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>stylosanthis</i>	BR446 ^T	NZ_LVEM00000000.1	22	8.80	Nodule of <i>Stylosanthes guianensis</i>	Brazil
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>tropicagi</i>	SEMIA6148 ^T	LFLZ00000000	189	9.09	Nodule of perennial soybean [<i>Neonotonia wightii</i>]	Brazil
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>valentinum</i>	LmjM3 ^T	LLXX00000000	242	8.85	Nodule of <i>Lupinus maria-josephae</i>	Spain
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>valentinum</i>	LmjM6	LLXY01000000	242	9.14	Nodule of <i>Lupinus maria-josephae</i>	Spain
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>vignae</i>	LMG28791 ^T	RDQF00000000	156	8.18	Nodule of <i>Arachis hypogaea</i>	China
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>viridifuturi</i>	SEMIA690 ^T	LGTB00000000	152	8.81	Nodule of <i>Centrosema pubescens</i>	Brazil
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>yuanmingense</i>	BR3267	LJYF00000000	55	7.90	Nodule of <i>Vigna unguiculata</i>	Brazil
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>yuanmingense</i>	CCBAU10071 ^T	FMAE01000000	108	8.20	Nodule of <i>Lespedeza cuneata</i>	China
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>yuanmingense</i>	CCBAU25021	AJQK01000000	490	7.99	Nodule of <i>Glycine max</i>	China
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>yuanmingense</i>	CCBAU35157	AJQL01000000	457	7.86	Nodule of <i>Glycine max</i>	China
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>canariense</i>	UBMA050	NAEX00000000.1	188	8.29	Nodule of <i>Lupinus angustifolius</i>	Algeria
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>mercantei</i>	SEMIA6399 ^T	MKFI00000000.1	72	8.27	Nodule of <i>Deguelia costata</i>	Brazil
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>ottawaense</i>	L2	NWTF01000000	167	8.80	Nodule of <i>Phaseolus vulgaris</i>	China
<i>Bradyrhizobium</i>	sp.	CCH1-B1	LSIY01000000	243	4.30	Drinking water biofilm in hospital	USA
<i>Bradyrhizobium</i>	sp.	CCH5-A9	LSJL01000000	295	4.71	Drinking water biofilm in hospital	USA
<i>Bradyrhizobium</i>	sp.	CCH5-F6	LSIC01000000	222	8.16	Drinking water biofilm in hospital	USA
<i>Bradyrhizobium</i>	sp.	Leaf396	LMQJ01000000	66	7.71	<i>Arabidopsis thaliana</i> leaf	Germany
<i>Bradyrhizobium</i>	sp.	TSA1	LFJC01000000	15	8.20	Soil (Paddy field)	Japan
<i>Bradyrhizobium</i>	sp.	Y36	NWTI01000000	56	7.33	Nodule of <i>Phaseolus vulgaris</i>	China
<i>Bradyrhizobium</i>	sp.	CCH4-A6	LSIM01000000	249	5.30	Drinking water biofilm in hospital	USA
<i>Bradyrhizobium</i>	sp.	CCH10-C7	LSIN01000000	366	5.59	Drinking water biofilm in hospital	USA

Supplementary table 1 (continued)

	Species	Strain	accession (chromosome)	Contigs	Size (Mb)	Material of origin	Country of isolation
<i>Nitrobacter</i>	<i>hamburgensis</i>	X14	CP000319.1	Comple	4.41	soil	Germany
<i>Nitrobacter</i>	sp.	Ab1	MWPQ01000000	95	3.90	Sewage system	Germany
<i>Nitrobacter</i>	sp.	Nb-311A	AAMY00000000.1	63	4.10	Ocean water	Eastern Atlantic Ocean
<i>Nitrobacter</i>	<i>winogradskyi</i>	Nb-255	NC_007406.1	Comple	3.40	soil	Germany
<i>Rhodopseudomonas</i>	<i>faecalis</i>	JCM 11668	QJT100000000.1	62	4.07	Unknown	Unknown
<i>Rhodopseudomonas</i>	<i>palustris</i>	CGA0009	NC_005296.1	Comple	5.46	Freshwater sediment	Netherlands
<i>Rhodopseudomonas</i>	<i>pentothentaxigens</i>	JA575	QRDT00000000.1	69	5.34	Unknown	Unknown
<i>Rhodopseudomonas</i>	<i>pseudopalustris</i>	DSM 123	FODT00000000.1	28	5.27	Unknown	Unknown

Supplementary table 2: The inventory of *bona fide* effectors using in this study

Protein name	strains	gene ID	proposed function	References
NopX; NolX	<i>Ensifer fredii</i> NGR234	NGR_a00700	T3SS translocator	Krishnan et al. 2002; Saad et al. 2008
NopH	<i>B. diazoefficiens</i> USDA110	bll1804		Hempel et al. 2009
NopE	<i>B. diazoefficiens</i> USDA110	blr1649	-	Wenzel et al. 2010
NopM	<i>B. diazoefficiens</i> USDA110	blr1676	Novel E3 ligase	Kambara et al. 2009
NopT	<i>B. diazoefficiens</i> USDA110	blr2058	Cysteine protease	Fotiadis et al. 2011
NopP	<i>B. diazoefficiens</i> USDA110	blr1752	-	Sugawara et al., 2018
NopBW	<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099	mlr6358	-	Staelin and Krishnan, 2015
NopC	<i>Ensifer fredii</i> HH103	AAY33494	-	Jiménez-Guerrero et al. 2015
NopAA; GunA2	<i>B. diazoefficiens</i> USDA110	blr1656	Endoglucanase	Süb et al 2009
NopAJ	<i>B. diazoefficiens</i> USDA110	bll1846	-	Kimbrel et al. 2013
NopAC	<i>B. diazoefficiens</i> USDA110	blr1993	Polygalacturonases	Kimbrel et al. 2013
ErnA	<i>B. elkanii</i> USDA61	LC460804	-	Teulet et al 2019
NopAR	<i>B. diazoefficiens</i> USDA110	bll1840	-	Tsukui et al. 2013
NopAB	<i>B. diazoefficiens</i> USDA110	blr1869	-	Kimbrel et al. 2013
NopL	<i>Ensifer fredii</i> NGR234	NGR_a00770	-	Kambara et al. 2009
InnB	<i>B. elkanii</i> USDA76	WP_018270178	-	Nguyen et al., 2018
NopAG; NopF	USDA110	bll1862	-	Süb et al 2009
BEL2-5	<i>B. elkanii</i> USDA61	AKS25901.1	SUMO protease	Faruque et al., 2015
NopD	HH103, MAF	SFHH103_psfHH103d_287	SUMO protease	Rodrigues et al. 2007
NopJ	<i>Ensifer fredii</i> NGR234	NGR_a02610	Acetyltransferase	Marie et al. 2004

Souche	Accession	Nombre de plante nodulée	Moyenne nodules	Infection	Activité ARA	T3SS/ <i>ernA</i>	16S-23S	Catégorie phénotypique	
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	BTAi1	5/5	27	Intra	250%-5/5	-/-	ec		Nod+ Fix+
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	ORS278	5/5	34	Intra	730%-5/5	-/-	ec		
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	ORS285	5/5	27	Intra	450%-5/5	+/-	ec		
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	ORS375	5/5	16	Intra	620%-5/5	-/-	ec		
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	STM3809	5/5	21	Intra	310%-5/5	-/-	ec		
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	STM3843	5/5	17	Intra	460%-5-5	-/-	V		
<i>B. oligotrophicum</i>	S58	5/5	27	Intra	265%-5/5	-/-	ec		
<i>B. vignae</i>	LMG28791	7/7	10	Intra	91%-4/6	+/+	V		
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	ORS3257	33/33	15	Intra	100%-33/33	+/+	V		
<i>B. sacchari</i>	BR10280	5/7	5	ND	0	+/+	V		
<i>B. yuanmingense</i>	BR3267	5/7	5	ND	0	+/+	V		
<i>B. japonicum</i>	CCBAU15354	5/7	2	ND	0	+/+	V		
<i>B. japonicum</i>	CCBAU15517	6/7	15	ND	0	+/+	V		
<i>B. lablabi</i>	CCBAU23086	5/5	47	Inter	0	+/-	ec		
<i>B. yuanmingense</i>	CCBAU25021	7/7	7	ND	0	+/+	V		
<i>B. elkani</i>	CCBAU43297	4/7	2	ND	0	+/+	ec		
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	ERR11	5/5	14	Inter	0	+/+	ec		
<i>B. paxllaeri</i>	LMTR21	5/5	60	Inter	0	+/-	ec		
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	LMTR3	5/5	45	Inter	0	+/-	ec		
<i>B. retamae</i>	Ro19	5/5	67	Inter	0	+/-	ec		
<i>B. elkani</i>	USDA76	5/5	15	Inter	0	+/+	ec		
<i>B. japonicum</i>	22	0/7	-	-	0	-/-	V		
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	BF49	0/5	-	-	0	-/-	V		
<i>B. elkani</i>	BLY3-8	0/5	-	-	0	+/+	V		
<i>B. elkani</i>	BLY6-1	0/5	-	-	0	+/+	V		
<i>B. manausense</i>	BR3351	0/7	-	-	0	+/-	V		
<i>B. stylosanthis</i>	BR446	0/5	-	-	0	-/-	V		
<i>B. yuanmingense</i>	CCBAU10071	0/5	-	-	0	+/+	V		
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	CCBAU15544	0/7	-	-	0	+/+	V		
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	CCBAU15635	0/7	-	-	0	+/+	ec		
<i>B. japonicum</i>	CCBAU25435	0/7	-	-	0	+/+	ec		
<i>B. diazoefficiens</i>	CCBAU41267	0/7	-	-	0	+/+	ec		
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	CCGE-LA001	0/5	-	-	0	-/-	V		
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	DOA9	0/5	-	-	0	+/-	V		
<i>B. japonicum</i>	E109	0/7	-	-	0	+/+	V		
<i>B. japonicum</i>	is5	0/7	-	-	0	-/-	ec		
<i>B. icense</i>	LMTR13	0/5	-	-	0	+/-	V		
<i>B. japonicum</i>	ls-34	0/5	-	-	0	+/+	V		
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	LTSP849	0/7	-	-	0	-/-	V		
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	LTSPM299	0/7	-	-	0	-/-	ec		
<i>B. erythrophlei</i>	MT12	0/7	-	-	0	-/-	V		
<i>B. jicamae</i>	PAC68	0/5	-	-	0	+/-	V		
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	S23321	0/7	-	-	0	-/-	V		
<i>B. diazoefficiens</i>	SEMIA5080	0/7	-	-	0	+/+	ec		
<i>B. tropiciagri</i>	SEMIA6148	0/5	-	-	0	+/+	V		
<i>B. embrapense</i>	SEMIA6208	0/5	-	-	0	+/+	V		
<i>B. viridifuturi</i>	SEMIA690	0/5	-	-	0	+/+	V		
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	SUTN9-2	0/7	-	-	0	+/+*	V		
<i>B. elkani</i>	UASWS1015	0/7	-	-	0	-/-	ec		
<i>B. elkani</i>	UASWS1016	0/7	-	-	0	-/-	V		
<i>B. canariens</i>	UBMA050	0/7	-	-	0	-/-	ec		
<i>B. diazoefficiens</i>	USDA110	0/7	-	-	0	+/+	V		
<i>B. diazoefficiens</i>	USDA122	0/5	-	-	0	+/+	ec		
<i>B. japonicum</i>	USDA124	0/5	-	-	0	+/+	ec		
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	USDA3384	0/7	-	-	0	+/+	V		
<i>B. japonicum</i>	USDA6	0/7	-	-	0	+/+	V		

Tableau 5. Propriétés symbiotiques de diverses souches de *Bradyrhizobium* testées sur *A. indica*

La moyenne des nodules est calculée en prenant en compte uniquement les plantes ayant nodulées. - : aucun nodule formé et aucune infection; Dans la colonne "Infection", Inter : intercellulaire, Intra: intracellulaire ; ND : bactérie non détectée dans le nodule. L'activité de la réduction de l'acétylène (ARA) est calculée en pourcentage par rapport à ORS3257 estimé uniquement sur les plantes ayant nodulées. Dans la colonne "T3SS/*ernA*", le - et + indiquent respectivement l'absence et la présence d'un cluster de type Rhci-T3SS ou d'un homologue d'*ernA*. Dans la colonne "16S-23S", V : séquence intergénique 16S-23S validée; ec : en cours de validation. Les couleurs indiquent les différents phénotypes symbiotiques observés; noir pour l'absence de nodule (Nod-); vert pour l'induction de « pseudo-nodules » (Nod+ Inf-); et rouge pour l'induction de nodules fixateurs d'azote (Nod+ Inf+ Fix+).

3. Identification des déterminants communs et spécifiques des *Bradyrhizobium* nodulant *A. indica*

Grâce à la collecte par Eric Giraud d'une grande partie des souches de *Bradyrhizobium* utilisées dans notre analyse génomique comparative, les propriétés symbiotiques de certaines d'entre elles ont pu commencer à être testées sur *A. indica*. L'objectif principal de ce travail est de relier ces propriétés symbiotiques à notre analyse génomique comparative dans le but d'identifier des déterminants communs ou spécifiques, liés au T3SS, des différentes souches nodulant *A. indica*.

Les résultats qui vont être présentés dans cette partie correspondent à une synthèse du travail d'Alicia Camuel, effectué au cours de son stage de M1 que j'ai encadré, mais également de celui de Joël Fardoux et de Clémence Chaintreuil, qui avaient débuté les tests symbiotiques sur *A. indica* avant l'arrivée d'Alicia en stage. La pureté de la majorité des souches utilisées dans ce travail a été testée conjointement par Alicia Camuel, Clémence Chaintreuil et Joël Fardoux en effectuant un séquençage de la région intergénique ribosomique 16S-23S de l'ADNr avec les amorces suivantes, BR5 : CTTGTAGCTCAGTTGGTTAG et 23S-38 : CCGGGTTCCCCATTCGG.

3.1. Résultats des tests symbiotiques sur *A. indica*

Sur les 146 souches utilisées dans notre analyse génomique comparative présentée dans l'Article 2, 50 ont pu être testées sur *A. indica*. Afin d'estimer l'efficacité symbiotique de chacune d'entre elles, plusieurs caractéristiques symbiotiques ont été relevées : (I) la capacité de la souche testée à induire des nodules sur *A. indica*; (II) l'activité nitrogénase de ces nodules, estimée par la capacité à réduire l'acétylène en tests ARA, puis; (III) le niveau d'infection inter- ou intracellulaire des nodules, déterminé par des analyses cytologiques.

En résumé, l'analyse des propriétés symbiotiques des 50 souches de *Bradyrhizobium* a permis de distinguer trois grandes catégories phénotypiques différentes : une absence de nodulation (Nod-), concernant 54% des souches testées (27 souches); le développement de « pseudo-nodules » non-infectés (Nod+ Inf-) par 28% des souches (14 souches); et l'apparition de nodules fixateurs d'azote (Nod+ Inf+ Fix+) par 18% des souches testées (9 souches). Ces trois grandes catégories phénotypiques sont identiques à celles identifiées lors d'un travail similaire sur *A. indica* en inoculant une quarantaine de souches de *Bradyrhizobium* (Okazaki *et al.*, 2016).

Afin de mieux caractériser chaque catégorie phénotypique, des observations en microscopie confocale ont été systématiquement réalisées sur des coupes de nodules induits par les différentes souches testées. On observe notamment que beaucoup de nodules induits par les souches appartenant à la catégorie phénotypique Nod+ Inf- sont similaires à ceux induits par *B. elkanii* USDA61 sur *A. indica* (Okazaki *et al.*, 2016; Article 1), c.-à-d. qu'ils présentent un système vasculaire

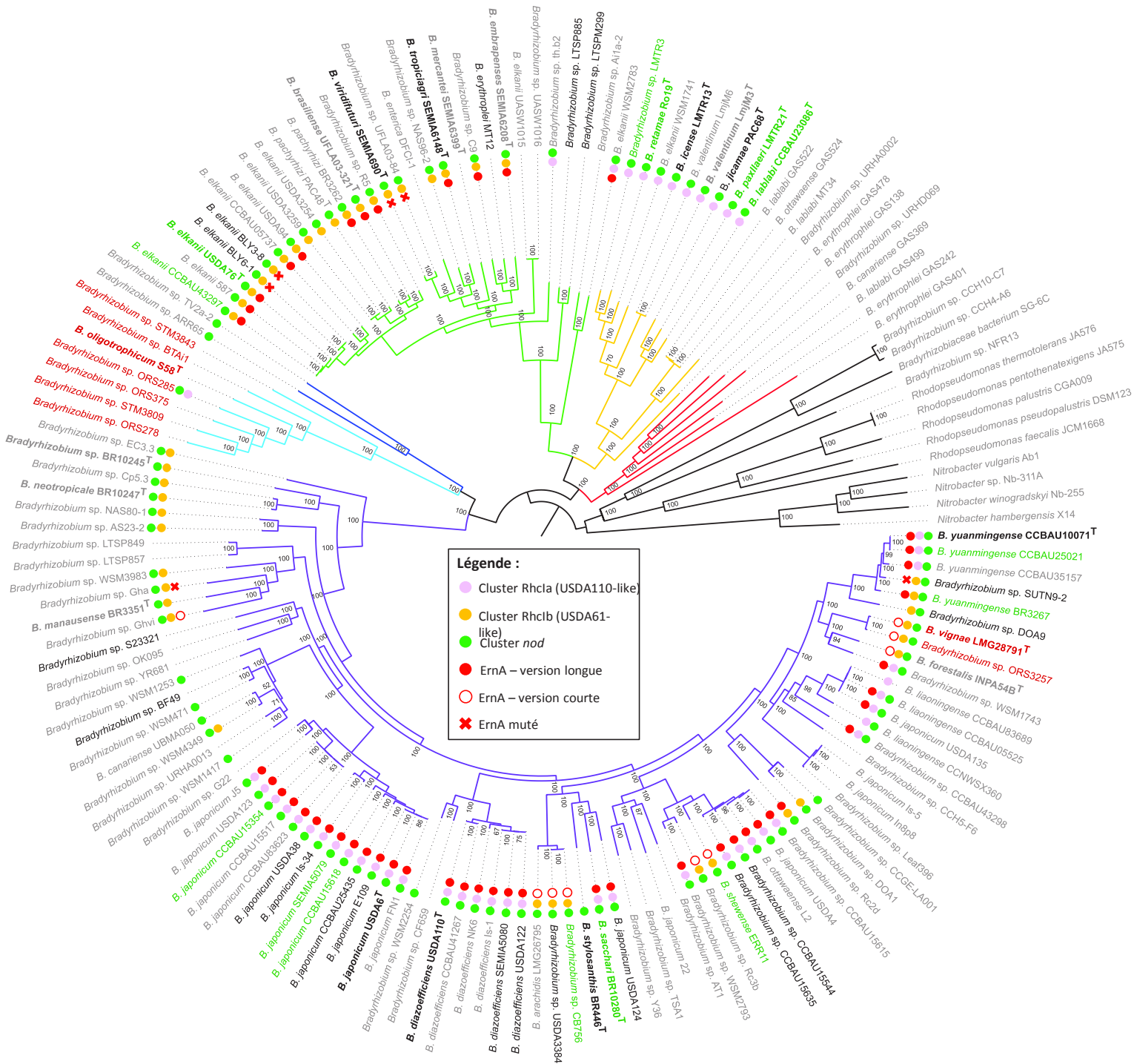


Figure 56. Arbre phylogénétique des *Bradyrhizobium*

L'analyse est basée sur 441 gènes concaténés du core-génomme de 148 souches de *Bradyrhizobium*. La valeur de bootstrap a été obtenue après 1000 répétitions. Les *Rhodopseudomonas* et les *Nitrobacter* qui appartiennent à la famille Bradyrhizobiaceae ont été utilisés comme groupe externe. Les souches écrites en gras avec un T indique les souches types (souches de référence). La couleur de police d'écriture du nom des souches réfère aux différents catégories phénotypiques sur *A. indica* : Nod+ Inf+ Fix+ en rouge, Nod+ Inf- en vert, Nod- en noir. Les souches non testées apparaissent en gris. Les couleurs des branches de l'arbre réfèrent aux différents phylogroupes présentés dans l'Article 2. Les cercles de couleurs réfèrent à la présence des clusters de gènes *nod* et T3SS, ainsi que du gène *ernA*, comme décrit dans la légende.

bien visible mais qu'aucune infection intracellulaire du tissu central n'est observée. Dans de rares cas, comme chez *Bradyrhizobium* sp. ERR11, une infection de l'espace intercellulaire est observable. Comme attendu, les nodules de cette catégorie phénotypique ne sont pas fonctionnels pour la fixation d'azote puisqu'aucune activité nitrogénase n'a été détectée en tests ARA (Tableau 5). Sur les neuf souches présentant un phénotype Nod+ Inf+ Fix+, sept appartiennent au clade des *Bradyrhizobium* photosynthétiques (Figure 56), et étaient déjà connus pour induire des nodules particulièrement efficaces sur les *Aeschynomene* (Giraud *et al.*, 2007; Mornico *et al.*, 2012; Okubo *et al.*, 2013). Les deux dernières souches, LMG28791 et ORS3257, très proches phylogénétiquement, sont les seules souches qui induisent des nodules fixateurs et qui n'appartiennent pas au clade des *Bradyrhizobium* photosynthétiques (Tableau 5, Figure 56).

Il est intéressant de noter que parmi les souches appartenant à la catégorie phénotypique Nod+ Inf-, une grande disparité dans la capacité d'induction des nodules est observable. Certaines souches, comme *B. paxllaeri* LMTR21^T ou *B. retamae* Ro19^T induisent une profusion de nodules répartis depuis le collet jusqu'à l'extrémité racinaire. D'autres souches, en revanche, n'induisent que quelques nodules sur un nombre très limité de plante. Pour ces dernières, il sera important de confirmer ces observations par de nouveaux tests symbiotiques.

Récemment, Okazaki et ses collaborateurs (2016) montraient que sur une quarantaine de *Bradyrhizobium* testées, environ la moitié nodulait *A. indica* et donc utiliserait peut être le mécanisme symbiotique FN-indépendant T3SS-dépendant. Les tests symbiotiques présentés ici ont permis de confirmer en partie ce résultat. En effet, 36% des souches testées ont montré leur capacité à noduler *A. indica*, ce qui est légèrement inférieur à ce qui avait été observé.

3.2. Analyse de la répartition des homologues d'*ernA* dans l'arbre des *Bradyrhizobium*

Afin de mieux comprendre les propriétés symbiotiques des différentes souches de *Bradyrhizobium* testées sur *A. indica*, les catégories phénotypiques de chacune d'entre elles, ainsi que la présence d'un cluster RhcIa ou RhcIb, ont été renseignées sur l'arbre phylogénomique dessiné par Florent Lasalle pour l'étude de la répartition du T3SS chez les *Bradyrhizobium* (Figure 56). Considérant le rôle déterminant joué par ErnA dans l'organogénèse nodulaire sur *A. indica* (comme présenté dans l'Article 1), une recherche de ses homologues dans chacune des souches de l'arbre a été effectuée en utilisant l'outil tblastn disponible sur la plateforme MAGE du Génoscope. Au total, cette recherche a permis l'identification de 63 homologues chez les 92 souches qui possèdent un cluster RhcI-T3SS. Parmi eux, 58 avaient été précédemment identifiés en blastp dans l'étude présentée dans l'Article 2. Les cinq homologues manquants correspondent à des versions d'*ernA* non

prédites par l'outil d'annotation des génomes de MAGE chez les cinq souches correspondantes. Une analyse de la séquence en acides nucléiques de ces cinq homologues a mis en évidence la présence d'une ou plusieurs mutations ponctuelles entraînant une modification du cadre de lecture du gène et l'apparition d'un codon stop prématuré (mutation frameshift), ce qui peut expliquer qu'ils n'aient pas été prédits par l'outil d'annotation des génomes utilisé par MAGE. Enfin, il apparaît clairement que la version courte d'ErnA est sous-représentée, avec seulement neuf homologues et uniquement retrouvés dans le Phylogroupe 1 associé à un cluster T3SS de type RhcIb (Figure 56).

En croisant ces données génomiques précédentes avec les tests symbiotiques réalisés, trois cas différents peuvent être distingués.

(I) Des souches qui présentent un homologue d'ErnA et qui nodulent *A. indica*. Ces souches sont retrouvées dans les Phylogroupes 1 et 4.

(II) Des souches de *Bradyrhizobium* qui possèdent un homologue d'*ernA* mais qui ne nodulent pas *A. indica* : c'est le cas de nombreuses souches appartenant au Phylogroupe 1 et de quelques souches du Phylogroupe 4.

(III) Des souches de *Bradyrhizobium* qui nodulent *A. indica* et qui possèdent un cluster RhcI-T3SS mais pour lesquelles aucun homologue d'*ernA* n'a été identifié : c'est le cas de quatre souches du Phylogroupe 5.

Ces différents cas sont détaillés et discutés dans les paragraphes suivants.

3.2.1. Certains *Bradyrhizobium* nodulant *A. indica* ont bien un homologue d'*ernA*

Considérant la présence d'un homologue d'*ernA*, la capacité de ces souches à interagir avec *A. indica* peut probablement s'expliquer par la sécrétion de cet effecteur. Pour appuyer cette argumentation, ce cas a été étudié chez la souche *B. elkanii* USDA61 (qui appartient à la catégorie phénotypique Nod+ Inf-) dans l'Article 1. La mutation de l'homologue *ernA* de cette souche (numéro d'accès LC460804) conduit à un phénotypique Nod- quasiment strict, confirmant l'implication de cet effecteur dans l'induction de la nodulation. Cependant, et comme discuté par la suite, nous n'excluons pas la possibilité que, chez les autres souches de cette catégorie, un autre effecteur puisse être responsable de l'induction des nodules.

3.2.2. Certains *Bradyrhizobium* ont un homologue d'*ernA* mais ne nodulent pas *A. indica*

Quatre souches, proches phylogénétiquement, présentent des propriétés symbiotiques différentes sur *A. indica*. Les deux souches USDA76 et CCBAU43297 forment des nodules infectés intercellulairement alors que les deux autres, BLY3-8 et BLY6-1, ne nodulent pas *A. indica*. (Tableau 5,

Figure 56). Une analyse fine de la séquence des homologues d'*ernA* de BLY3-8 et BLY6-1 fait apparaître la présence de mutations entraînant une modification du cadre de lecture du gène (mutation frameshift). Les phénotypes symbiotiques ainsi observés pour ces trois souches peuvent alors parfaitement s'expliquer par la présence de ces mutations dans les séquences d'*ernA*, rendant le gène non fonctionnel. De la même manière, chez *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 (dans le Phylogroupe 1 dans la Figure 56), qui donne un phénotype Nod-, l'analyse de la séquence de son homologue d'*ernA* a montré que le CM3 et le CM2 de l'extrémité C-terminale sont manquants. Cette particularité pourrait expliquer l'incapacité de SUTN9-2 à interagir avec *A. indica* considérant les résultats complémentaires de l'Article 1 mettant en évidence le rôle fonctionnel important du CM2 du côté C-terminal d'ErnA.

De même, de nombreuses souches de *B. japonicum* montrent une capacité symbiotique différente alors qu'elles présentent toutes un homologue d'*ernA*. En effet, cinq souches ont un phénotype Nod- et trois un phénotype Nod+ Inf-. Les mêmes observations sont réalisées pour les deux souches CCBAU10071 et CCBAU25021, très proches phylogénétiquement, qui n'ont pas le même phénotype symbiotique. D'une manière surprenante, la comparaison des séquences des homologues d'*ernA* de toutes ces souches montre qu'elles sont toutes strictement identiques (100% d'identité partagée). L'incapacité de certaines d'entre elles à induire des nodules ne s'explique donc pas par une variation dans la séquence d'*ernA* mais pourrait résulter d'une incompatibilité d'hôte. En effet, certains composés de surfaces des bactéries, comme les EPS ou les LPS, et même les facteurs Nods, peuvent être reconnus comme des PAMPs et induire le déclenchement d'une PTI (Gourion *et al.*, 2014). De même, des effecteurs délivrés par le T3SS dans le cytoplasme des cellules peuvent aussi être reconnus par des protéines de résistance de la plante est ainsi induire une ETI. En 2018, Sugawara et ses collaborateurs (2018) montraient ainsi que la sécrétion de l'effecteur NopP, présent chez presque toutes les souches de *Bradyrhizobium* qui possèdent un T3SS, peut conduire à une ETI chez *Glycine max* cv. Hardee, rendant incompatible l'interaction. De même, la protéine BEL2-5, qui est une SUMO protéase, empêche *B. elkanii* USDA61 de noduler *G. max* cv. BARC2 (Faruque *et al.*, 2015). Pour l'instant, notre analyse de génomique comparative n'a pas permis de faire ressortir d'effecteurs candidats qui pourraient être responsables d'une incompatibilité d'hôte chez les souches non-nodulantes et possédant un homologue d'*ernA*. Ainsi, nous privilégions l'hypothèse du déclenchement d'une PTI par des PAMPs reconnus négativement par *A. indica*.

Espèce	souche	Identifiant	Longueurs (pb/aa)	tts box	CD2 identifiés	NLS identifié ^b	Homologie	Fonction putative
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	LMTR3	MAXC01_v1_520215	4887/1628	GTCAGCTTCTCGAAAGCTAACGGTAGTA	3	2	MAXB01_v1_1040031	Peptidase C48
		MAXC01_v1_10865	2235/744	GTCAGCTTCTCAACAGGTAACCTCCTA	3	-	InnB (Nguyen <i>et al.</i> , 2018)	-
		MAXC01_v1_10885	2760/919	GTCAGCTTCTAGAAAGCTAACCATCCTA	2	-	-	-
		MAXC01_v1_520332	1920/639	GTCAGCTTCTCGAAAGCTTTGCCCGAGT	2	1	LLYA01_v1_1890045 MAXB01_v1_960046 LLYB01_v1_150001	-
<i>B. retamae</i>	Ro19	LLYA01_v1_670001 ^a	1272/423	-	1	-	-	Peptidase C48
		LLYA01_v1_1990017	2214/737	GTCAGCTTCTCATCAGGTAACCTCCTA	3	-	InnB (Nguyen <i>et al.</i> , 2018)	-
		LLYA01_v1_160003	456/151	GTCAGCTTCTGACAGCTAAGCTCCCTA	1	-	NopAB (Article 1)	-
		LLYA01_v1_2010015	1770/589	-	1	-	-	Trehalose-6-phosphate synthase
		LLYA01_v1_1890045	1571/521	GTCAGGTTTTCGAAAGCTTGCCCGAGTA	2	1	MAXC01_v1_520332 MAXB01_v1_960046 LLYB01_v1_150001	-
		LLYA01_v1_820003	1422/473	-	3	-	-	-
<i>B. paxllaeri</i>	LMTR21	MAXB01_v1_1040031	4995/1664	GTCAGCTTCTCGAAAGCTAACGGTAGTA	3	2	MAXC01_v1_520215	Peptidase C48
		MAXB01_v1_1150030	2628/875	GTCAGCTTTTAGAAAGCTAAGCATCCTA	2	-	-	-
		MAXB01_v1_960046	1209/402	GTCAGCTTCTCGAAAGCTTGCCCGAGTA	1	1	MAXC01_v1_520332 LLYA01_v1_1890045 LLYB01_v1_150001	-
<i>B. lablabi</i>	CCBAU23086	LLYB01_v1_690016	2235/744	GTCAGCTTCTCAACAGGTAACCTCCTA	3	-	InnB (Nguyen <i>et al.</i> , 2018)	-
		LLYB01_v1_1170020	2436/811	GTCAGCTTTTAGAAAGCTAACCATCCTA	2	-	-	-
		LLYB01_v1_150001	2223/740	GTCAGCTTCTCGAAAGCTTGCCCTGAGTA	2	1	MAXC01_v1_520332 LLYA01_v1_1890045 MAXB01_v1_960046	-
		LLYB01_v1_890061	630/209	-	1	-	-	-

Tableau 6. Gènes candidats pour l'induction de la nodulation sur *A. indica* pour les souches ne possédant pas *ernA*

Le recherche du CM2 par HMM dans le protéome de chacune des 4 souches de *Bradyrhizobium* nodulant *A. indica* et ne possédant pas d'homologue d'*ernA* a fait ressortir 17 candidats dont 6 ayant un domaine NLS. pb : paire de bases; aa : acide aminé ; ^a : gène à cheval sur deux contigs. ^B : les motifs NLS ont été identifiés en utilisant le logiciels en ligne NLS-mapper (<http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp>) avec un score >5.

3.2.3. Certains *Bradyrhizobium*, possédant un cluster Rhcl-T3SS, nodulent *A. indica* alors qu'ils n'ont pas d'homologue d'*ernA*

Ce cas concerne quatre souches du Phylogroupe 5 (*Bradyrhizobium* sp. LMTR3, *B. retamae* Ro19^T, *B. paxllaeri* LMTR21^T et *B. lablabi* CCBAU23086^T) qui possèdent toutes un phénotype Nod+ Inf- (Tableau 5, Figure 56). Il s'agit probablement du cas le plus intéressant, puisqu'à condition que le T3SS soit bien impliqué dans l'induction de la nodulation chez ces quatre souches, cela suggère l'existence d'un ou de plusieurs autres effecteurs qui pourraient potentiellement jouer un rôle symbiotique similaire à celui d'ErnA.

Un des objectifs est maintenant d'identifier ce ou ces nouveaux effecteurs inducteurs de la nodulation. Cependant, l'identification d'un effecteur comme ErnA chez ORS3257 a nécessité plusieurs années de travail et la construction d'une dizaine de mutants. Il apparaît ainsi plus approprié, pour l'identification du ou des effecteur(s) inducteur(s) de la nodulation chez ces quatre nouvelles souches, d'utiliser une approche avec *a priori*. En considérant que l'analyse des mutants de délétions sériées d'ErnA a fait ressortir l'importance du CM2 dans le processus d'induction des nodules sur *A. indica*, nous avons choisi d'utiliser la séquence du CM2 comme marqueur pour la recherche de nouveaux effecteurs candidats. Pour cela, un modèle HMM a été spécifiquement entraîné à partir des 12 séquences de CM2 identifiées par MEME dans six effecteurs différents (ErnA, InnB, NopAB, NopAR, BEL2-5 et NopD) (voir la partie Article 1 - Résultat complémentaire). Ce modèle a ensuite été appliqué sur le protéome putatif des quatre souches ayant un phénotype Nod+ sur *A. indica* et ne possédant pas d'homologue d'ErnA.

Cette recherche *in silico* a conduit à l'identification de 17 protéines candidates chez les quatre souches d'intérêts, dont 13 possèdent une *tts* box dans la région promotrice du gène correspondant. Chaque candidat possède au moins un domaine CM2 et de manière intéressante, six d'entre eux possèdent également un domaine NLS prédit par le logiciel NLS-Mapper qui suppose que, comme ErnA, ces six protéines sont potentiellement adressées au noyau des cellules hôtes (Tableau 6). Afin d'identifier de potentiels homologues, un calcul du taux d'identité deux à deux des 17 protéines a été réalisé avec ClustalW et a permis de réduire la liste à 11 candidats différents.

La majorité de ces gènes candidats code pour des protéines de fonction inconnue à l'exception de trois d'entre eux : MAXB01_v1_1040031/MAXC01_v1_520215 et LLYA01_v1_670001 qui codent pour des putatives peptidases C48 (SUMO protéase) et LLYA01_v1_2010015 codant pour une putative thréalo-6-phosphatase synthase. Trois des 11 candidats sont des homologues de l'effecteur InnB, identifié dans le cadre d'une incompatibilité d'hôte entre *B. elkanii* USDA61 et *Vigna mungo* cv. KPSI (Nguyen *et al.*, 2018) et un cinquième est homologue à NopAB, aujourd'hui connu pour jouer un rôle important dans l'infection nodulaire au cours de l'interaction T3SS-dépendante

entre ORS3257 et *A. indica* (voir l'Article 1) (Tableau 6). Par ailleurs, il est à noter que les quatre souches partagent toutes entre elles une seule copie d'un même effecteur putatif : LLYB01_v1_150001 chez CCBAU23086. Ce gène, de fonction inconnue, est systématiquement précédé d'une *tts* box et contient deux CM2 et un NLS. De plus, un CM3 peut être identifié du côté C-terminal de la protéine par alignement avec celui retrouvé chez ErnA. La distribution de ce nouveau putatif effecteur et la présence de différents domaines retrouvés chez ErnA, font de cette protéine un candidat sérieux en tant qu'inducteur de la nodulation sur *A. indica*. Son homologue chez *B. lablabi* CCBAU23086^T est en cours de mutation dans l'équipe, ce qui permettra, dès son obtention, de tester son niveau d'implication dans l'interaction avec *A. indica*.

Enfin, il est à noter que l'approche utilisée pour l'identification des nouveaux effecteurs candidats se base essentiellement sur la présence d'un CM2. Cette approche présente certaines limites puisqu'il se peut que d'autres effecteurs ne présentant pas ce motif puissent jouer un rôle d'induction de l'organogénèse nodulaire. Il faudrait donc étendre ce type d'analyses en considérant les autres domaines conservés identifiés chez ErnA, ce qui est en cours dans l'équipe. De même, il serait intéressant de comparer l'effectome (que l'on peut prédire en se basant sur la recherche du motif *tts* box) des souches Nod+/ErnA- afin de rechercher de nouveaux candidats qui seraient conservés spécifiquement dans ce groupe de *Bradyrhizobium*.

Cette étude ouvre ainsi de nouvelles perspectives pour l'identification de nouveaux acteurs qui pourraient jouer un rôle majeur dans ces processus symbiotiques alternatifs T3SS-dépendants.

Chapitre III

1. Contexte de l'étude

Au cours de mon travail de thèse, les compétences que j'ai acquises sur l'étude du T3SS ont pu être utilisées pour différentes études visant à améliorer nos connaissances sur son influence dans l'interaction symbiotique entre les *Bradyrhizobium* et de nombreuses légumineuses. Ce troisième chapitre sera composé de quatre études auxquelles j'ai participé et qui ont toutes pour point commun l'étude du T3SS des *Bradyrhizobium*.

En collaboration avec l'équipe thaïlandaise dirigée par Neung Teaumroong (Université de Technologie de Suranaree, Thaïlande), j'ai participé à deux études sur le T3SS de la souche *Bradyrhizobium* sp. DOA9. Cette souche est atypique au sein du genre *Bradyrhizobium*, puisqu'elle possède un méga-plasmide symbiotique sur lequel sont conservés les gènes de nodulation *nod*, de fixation d'azote *nif/fix*, mais également ceux du T3SS et des effecteurs (Okazaki *et al.*, 2015).

La première étude à laquelle j'ai participé a permis de confirmer la fonctionnalité du T3SS de la souche DOA9, et a notamment mis en évidence son rôle positif dans l'établissement de la nodulation avec de nombreuses légumineuses, dont certaines d'intérêts agronomiques tels que l'arachide (*Arachis hypogaea*) et le haricot mungo (*Vigna radiata*). Dans cette étude, publiée dans *Frontier in Microbiology* en 2017, mon travail a consisté à caractériser le cluster T3SS porté par le méga-plasmide de la souche DOA9 et d'identifier les gènes codant pour des putatifs effecteurs en utilisant la même méthode que celle employée pour l'identification des putatifs effecteurs de la souche ORS3257 (Article 1). Certains de ces gènes sont aujourd'hui en cours de mutation dans l'équipe dirigée par Neung Teaumroong, et leur rôle dans le processus de nodulation pourra prochainement être testé.

La présence d'un méga-plasmide symbiotique chez DOA9 est une caractéristique unique chez les *Bradyrhizobium* qui portent, pour la plupart, leurs gènes symbiotiques sur un large îlot intégré dans le chromosome. Il est connu depuis longtemps que les gènes symbiotiques peuvent se propager d'une souche à l'autre par transfert horizontal d'un plasmide ou d'un îlot symbiotique. Ce transfert est un moteur de la dispersion de la capacité de nodulation. La seconde étude à laquelle j'ai participé, en collaboration avec l'équipe dirigée par Neung Teaumroong, a consisté à transférer artificiellement le méga-plasmide de DOA9 à la souche de *Bradyrhizobium* photosynthétique ORS278, qui a la particularité d'être dépourvue des gènes de nodulation *nod* et du T3SS mais qui peut malgré tout noduler de manière efficiente les *Aeschynomene* à nodulation FN-indépendante. Cette approche de biologie synthétique, publiée dans *Environmental Microbiology* en 2019, a notamment permis de démontrer que ce transfert confère à la souche chimère ORS278-pDOA9 la capacité à noduler certaines légumineuses à nodulation exclusivement FN-dépendant, mais impacte négativement la nodulation sur *Aeschynomene* à nodulation FN-indépendante. Il a pu être montré

que plusieurs déterminants génétiques portés par le méga-plasmide, notamment les gènes de nodulation ainsi que ceux codant pour le T3SS, sont en partie responsables de cet impact négatif. Je suis intervenu de manière mineure dans cette étude, où mon travail a constitué, comme pour l'étude précédente, à identifier les effecteurs putatifs de la souche ORS285 qui a servi de comparaison pour la compréhension du comportement symbiotique de la souche chimérique ORS278-pDOA9.

Enfin, au cours de ma thèse, j'ai participé à l'annotation experte des ilots symbiotiques des deux souches ORS285 et ORS3257.

2. Article 3 : Type 3 secretion system (T3SS) of *Bradyrhizobium* sp. DOA9 and its roles in Legume symbiosis and rice endophytic association

3. Article 4 : Symbiotic properties of chimeric Nod-independent photosynthetic *Bradyrhizobium* strain obtained by conjugative transfert of a symbiotic plasmid

4. Article 5 : Complete genome sequence of *Bradyrhizobium* sp. ORS285, a photosynthetic strain able to establish Nod factor-dependent and Nod factor-indépendente symbiosis with *Aeschynomene* legumes

5. Article 6 : Complete genome sequence of *Bradyrhizobium* sp. strain ORS3257, an efficient nitrogen-fixing bacterium isolated from cowpea in Senegal



Type 3 Secretion System (T3SS) of *Bradyrhizobium* sp. DOA9 and Its Roles in Legume Symbiosis and Rice Endophytic Association

OPEN ACCESS

Edited by:

Pascal Ratet,
Centre National de la Recherche
Scientifique (CNRS), France

Reviewed by:

Francisco Javier López-Baena,
University of Seville, Spain
Brian H. Kvitko,
University of Georgia, United States

*Correspondence:

Neung Teaumroong
neung@sut.ac.th
Eric Giraud
eric.giraud@ird.fr

† These authors have contributed
equally to this work.

Specialty section:

This article was submitted to
Plant Microbe Interactions,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 15 June 2017

Accepted: 05 September 2017

Published: 20 September 2017

Citation:

Songwattana P, Noisangiam R,
Teamtisong K, Prakamhang J,
Teulet A, Tittabutr P, Piromyou P,
Boonkerd N, Giraud E and
Teaumroong N (2017) Type 3
Secretion System (T3SS)
of *Bradyrhizobium* sp. DOA9 and Its
Roles in Legume Symbiosis and Rice
Endophytic Association.
Front. Microbiol. 8:1810.
doi: 10.3389/fmicb.2017.01810

Pongpan Songwattana¹, Rujirek Noisangiam², Kamonluck Teamtisong³,
Janpen Prakamhang⁴, Albin Teulet⁵, Panlada Tittabutr¹, Pongdet Piromyou¹,
Nantakorn Boonkerd¹, Eric Giraud^{5*†} and Neung Teaumroong^{1*†}

¹ School of Biotechnology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand, ² National Bureau of Agricultural Commodity and Food Standards, Ministry of Agriculture and Cooperatives, Bangkok, Thailand, ³ The Center for Scientific and Technological Equipment, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand, ⁴ Department of Applied Biology, Faculty of Sciences and Liberal Arts, Rajamangala University of Technology Isan, Nakhon Ratchasima, Thailand, ⁵ Institut de Recherche pour le Développement, LSTM, UMR IRD/SupAgro/INRA/Univ. Montpellier/CIRAD, Montpellier, France

The *Bradyrhizobium* sp. DOA9 strain isolated from a paddy field has the ability to nodulate a wide spectrum of legumes. Unlike other bradyrhizobia, this strain has a symbiotic plasmid harboring *nod*, *nif*, and type 3 secretion system (T3SS) genes. This T3SS cluster contains all the genes necessary for the formation of the secretory apparatus and the transcriptional activator (TtsI), which is preceded by a *nod*-box motif. An *in silico* search predicted 14 effectors putatively translocated by this T3SS machinery. In this study, we explored the role of the T3SS in the symbiotic performance of DOA9 by evaluating the ability of a T3SS mutant ($\Delta rhcN$) to nodulate legumes belonging to Dalbergioid, Millettoid, and Genistoid tribes. Among the nine species tested, four (*Arachis hypogea*, *Vigna radiata*, *Crotalaria juncea*, and *Macroptilium atropurpureum*) responded positively to the *rhcN* mutation (ranging from suppression of plant defense reactions, an increase in the number of nodules and a dramatic improvement in nodule development and infection), one (*Stylosanthes hamata*) responded negatively (fewer nodules and less nitrogen fixation) and four species (*Aeschynomene americana*, *Aeschynomene afraspera*, *Indigofera tinctoria*, and *Desmodium tortuosum*) displayed no phenotype. We also tested the role of the T3SS in the ability of the DOA9 strain to endophytically colonize rice roots, but detected no effect of the T3SS mutation, in contrast to what was previously reported in the *Bradyrhizobium* SUTN9-2 strain. Taken together, these data indicate that DOA9 contains a functional T3SS that interferes with the ability of the strain to interact symbiotically with legumes but not with rice.

Keywords: type 3 secretion system, effector proteins, *Bradyrhizobium*, legume, symbiosis

INTRODUCTION

The establishment of the legume–rhizobium symbiosis relies on the exchange of diffusible signal molecules between the two partners. The first important bacterial signals are lipochitooligosaccharides (LCOs) called Nod factors (NFs) that are synthesized and secreted after activation of bacterial nodulation (*nod*) genes by the transcriptional regulator protein NodD in specific response to host flavonoids. In return, perception of the NFs signal by the plant triggers nodule organogenesis and bacterial infection processes (Oldroyd et al., 2011). Besides NFs, other bacterial components are important for the successful establishment of the symbiosis, including exopolysaccharides (EPS), lipopolysaccharides (LPS), capsular polysaccharides (KPS), and cyclic β -glucans (Gibson et al., 2008; Janczarek et al., 2015). These bacterial compounds can also act as a symbiotic signal or permit to avoid plant immune responses (Gourion et al., 2015; Kawaharada et al., 2015).

In addition, some rhizobia use a type 3 secretion system (T3SS), which shares homology with the T3SS apparatus of plant and animal pathogenic bacteria, to translocate some putative effectors into the host cell, named nodulation outer proteins (Nops). Those putative effector proteins may have contrasting effects on nodulation depending on the host plant (Stahelin and Krishnan, 2015). Some secreted effector proteins can play a positive role in the establishment and maintenance of symbiosis by suppressing plant defense reactions thereby facilitating the bacterial infection (Bartsev et al., 2004; Jiménez-Guerrero et al., 2015). Conversely, secreted Nop proteins can be recognized by plant receptor proteins [resistant (R) proteins] leading to effector-triggered immunity, which blocks infection and nodulation (Yang et al., 2010; Yasuda et al., 2016).

It is important to indicate that the term Nop has been initially introduced by Marie et al. (2001) to mirror the nomenclature of *Yersinia* outer proteins (Yops) and that the first identified Nops was done by characterizing the proteins secreted in *Sinorhizobium* NGR234 culture supernatants in a NodD1- and a flavonoid-dependent manner (Marie et al., 2003). As consequence, this term has been used to name some components of the extracellular appendages or pili of the T3SS, i.e., NopA, NopB, and NopX but also effector proteins secreted through the T3SS that are translocated to the interior of the host cell, i.e., NopL, NopE, and NopC. In this paper, we will consider the term Nop to speak about the effector proteins translocated into the host cell.

The involvement of the T3SS in the establishment of the symbiosis is supported by two facts: (i) the genes that code for T3SS machinery and some Nops are found in the same region as the *nod* and *nif* genes (on a symbiotic island or a symbiotic plasmid) and (ii) expression of the T3SS genes is also controlled via a regulatory cascade involving NodD. In the latter case, NodD regulates, in a flavonoid-dependent manner, the expression of the transcriptional activator (TtsI), which, in return, activates the expression of T3SS genes by binding to their promoter region at the level of a specific motif, called *tts*-box (Krause et al., 2002; Tampakaki, 2014).

The importance of T3SS in the modulation of the host spectrum has been extensively demonstrated in several rhizobial strains (*Sinorhizobium* sp. NGR234, *S. fredii* USDA257, *S. fredii* HH103, *Mesorhizobium loti* MAFF303099, *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110, *B. elkanii* USDA61) (Viprey et al., 1998; Krause et al., 2002; Krishnan et al., 2003; de Lyra Mdo et al., 2006; López-Baena et al., 2009; Okazaki et al., 2009, 2010). More recently, some non-photosynthetic *Bradyrhizobium* strains have been shown to be able to nodulate some legume plants (*Glycine max* cv. Enrei and several *Aeschynomene* species) in the absence of NF synthesis but in these cases, nodulation requires a functional T3SS. This points to the existence of an alternative Nod-independent symbiotic pathway in which some Nop effectors can directly activate the nodulation signaling pathway (Okazaki et al., 2013, 2016). Moreover, in *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2, T3SS has been reported to be an important determinant of rice-endophyte colonization (Piromyou et al., 2015b). Taken together, these data show that the role played by the T3SS in rhizobia during the interaction with their host plants is more important and broader than previously believed.

The non-photosynthetic *Bradyrhizobium* sp. strain DOA9 was originally isolated from a paddy field in Thailand using *Aeschynomene americana* as trap plant (Noisangiam et al., 2012). In addition to its ability to endophytically colonize rice roots, this strain has been shown to be able to induce the formation of nodules in a large spectrum of legume hosts (Teamtisong et al., 2014). Unlike other bradyrhizobia, the DOA9 is the only strain yet identified to possess a symbiotic plasmid that harbors nitrogen fixation (*nif*), nodulation (*nod*), and T3SS genes (Okazaki et al., 2015). In this study, we examined the role of T3SS in the DOA9 strain by testing the symbiotic performance of a T3SS mutant (Ω *rhcN*) on various legume species as well as on rice.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial Strains and Culture Conditions

The bacterial strains used in this study are listed in **Table 1**. *Bradyrhizobium* sp. strain DOA9 and its Ω *rhcN* derivative were grown in YM medium (Vincent, 1970) at 28°C. *Escherichia coli* strains were cultured at 37°C in LB medium (Sambrook et al., 2001). The media were supplemented with antibiotics at the following concentrations when appropriate: 200 μ g/mL streptomycin (Sm), 20 μ g/mL nalidixic acid (Nal), and 50 μ g/mL kanamycin (Km).

Construction of the Reporter and Mutant Strains

The single cross-homologous recombination technique was used to construct the insertion mutant in the structural type III secretion system gene (*rhcN*) of strain DOA9. For this purpose, an internal fragment (263-bp) of *rhcN* was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using the following primers: *RhcN.D9p.int.f* (5'-CATCTCGTCTCGACTCGCAGCA AAGGATGTCGATAC-3') and *RhcN.D9p.int.r* (5'-GAGCAG TCTAGACCCGACTGACACTTCTCGATG-3'). The PCR

TABLE 1 | Bacterial strains, plasmids used, and plants tested in this study.

	Relevant characteristics	Source or reference
Strains		
<i>Bradyrhizobium</i> sp. DOA9	Isolated from paddy field using <i>A. americana</i> as trap legume	Noisangiam et al., 2012
Ω <i>rhcN</i>	<i>rhcN</i> mutant of DOA9 strain obtained by integration of pVO155-Sm-npt2-gfp; Sm ^r Sp ^r Km ^r	This study
<i>Escherichia coli</i> S17-1	hsdR pro thi (RP4-2 km::Tn7 tc::Mu)	
Plasmid		
pVO155-Sm-npt2-gfp	pUC119-derived suicide vector with <i>gusA</i> gene, GFP, and Sm ^r cassette, Km ^r Sm ^r Sp ^r	Wongdee et al., 2016
pMG103-npt2-Sm-npt2-gfp	Cloning vector harboring <i>gfp</i> gene under the control of the constitutive <i>npt2</i> promoter; Sm ^r Sp ^r Km ^r	Bonaldi et al., 2010

product was then digested by *Xba*I and *Sal*I and cloned onto the corresponding sites of the plasmid pVO155-Sm-npt2-gfp (Wongdee et al., 2016). This plasmid, which is non-replicative in *Bradyrhizobium* strains, is a derivative of the plasmid pVO155 (Oke and Long, 1999) and carries the promoterless *gusA* gene, a constitutively expressed *gfp*, and a Km- and a Sm/spectinomycin-resistance genes (Wongdee et al., 2016). The resulting plasmid was introduced into *E. coli* S17-1 by electroporation (15 kv/cm, 100 Ω , and 25 μ F) and was transferred into the *Bradyrhizobium* sp. strain DOA9 by biparental mating, using the protocol described by Giraud et al. (2010). The transconjugants were spread on YM medium supplemented with an antibiotic mixture of Sm, Km, and Nal, and the successful insertion of the plasmid in *rhcN* was checked by PCR.

The GFP-labeled DOA9 strain was constructed by introducing the replicative plasmid pMG103-npt2-Sm-npt2-gfp harboring a constitutive *gfp* gene by electroporation (15 kv/cm, 100 Ω , and 25 μ F). Plasmid-containing strains were selected on YM plates supplemented with Sm.

Plant Nodulation and Symbiosis Analysis

DOA9 and its derivatives were grown for 5 days as previously described and used as inoculum. Sterilization and germination of the seeds of all plants tested (Supplementary Table S1) were performed as described by Teamtisong et al. (2014). Plants were sown in Leonard's jar filled with sterilized vermiculite (Somasegaran and Hoben, 1994). All the plants were watered with BNM medium (Ehrhardt et al., 1992) and grown under the following controlled environmental conditions: 28 \pm 2°C with a 16 h light/8 h dark cycle at light intensities of 300 μ E/m²S and with 50% humidity. Five days after planting, each seedling was inoculated with 1 mL of a 5 day old inoculum (log-phase) after washing and adjusting the optical density to 600 nm to 1 (approximately 10⁹ cells). The experiment was conducted with five replicates with the following treatments: control (no inoculation), GFP-labeled DOA9, and Ω *rhcN*. To check nodulation and nitrogen fixation abilities, five plants were taken at 21 day post-inoculation (dpi) and the number of nodules and nitrogenase activity were assessed using the acetylene reduction assay (ARA). Briefly, all the nodules on each plant were collected and placed in headspace bottles with 10% acetylene, and incubated at 28°C for 1 h. Gas chromatography was used to measure the peak height of ethylene and acetylene with 1 mL gas samples from the bottles by using a PE-alumina packed column with injector at 150°C, an oven temperature of

200°C, and ionization detector (FID) at a temperature of 50°C (Somasegaran and Hoben, 1994).

Rice Experiment

Rice (*Oryza sativa* L. ssp. *indica* cv. Pathum Thani) seeds were surface sterilized by soaking in 70% (v/v) ethanol for 30 s, then washed twice with 10% (v/v) hydrogen peroxide for 10 min, washed again in 3% (v/v) sodium hypochlorite for 1 h. Finally, the seeds were washed in sterilized water five times and germinated overnight on YM medium containing 0.8% (v/v) agar. The germinated seeds with 1 cm of root were soaked in DOA9 cell suspension (OD₆₀₀ = 1) overnight. The rice seedlings were transferred to metal net in 80 mL tubes containing 15 mL Hoagland's plant growth medium (Hoagland and Arnon, 1950) in presence of 0.1 mM NH₄NO₃. The experiment was conducted with three technical replicates with the following treatments: control (no inoculation), GFP-labeled DOA9, and Ω *rhcN*. Plants were grown under the following controlled environmental conditions: 28 \pm 2°C with a 16 h light/8 h dark cycle at light intensities of 300 μ E/m²S and with 50% humidity.

Enumeration of Epiphytic and Endophytic Bacteria in Rice Roots

Two and 3 weeks after inoculation with the DOA9 tagged strains and Ω *rhcN* containing *gfp* and Sm^r, the rice roots were washed in normal saline solution (0.85% of NaCl) to remove debris and any bacteria not firmly attached to the root surface. Next, the bacterial cells remaining on the surface of the roots were harvested by vortex with normal saline containing 0.3% (v/v) tween-80 for 30 s. The washing solution containing the epiphytic bacteria was then spread on YM plates containing Sm. For the enumeration of endophytic bacterial, root tissues were surface sterilized with 70% (v/v) ethanol for 5 min followed by 3% (v/v) sodium hypochlorite for 5 min and rinsed with sterilized water five times. The surface sterilized roots were macerated with a sterilized mortar and pestle and diluted in saline solution prior to being spread on medium as described above (Piromyou et al., 2015a). The epiphyte and endophyte population counted on agar plates are expressed as colony-forming unit per gram of root fresh weight.

Preparation of Root Exudates and Bacterial Induction

The sterilized legume seeds were germinated and transferred into tubes containing BNM medium (50 mg seeds/mL). Plants were

maintained in controlled environmental conditions as described above for 5 days. The root exudates were obtained from plant medium after filtration using a 0.2 μm filter syringe. Root exudates were stored at -20°C until use.

The mid-log phase culture of DOA9 was washed and the OD_{600} was adjusted to approximately 0.4 with YM supplemented with 1/3 (v/v) of the root exudates or purified flavonoids (20 μM of naringenin or genistein dissolved in DMSO). The sterilized BNM medium and DMSO were used as negative controls. The bacterial cells were cultured at 28°C for 24 h and then collected by centrifugation ($4,000 \times g$ for 10 min, 4°C) and immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for further total RNA isolation.

RNA Isolation and qRT-PCR

Total bacterial RNA was extracted from induced cells using the RNeasy[®] Mini Kit (QIAGEN, United States) according to the manufacturer's protocol. Total RNA was treated with RNase-free DNase I (NEB) for 30 min at 37°C . cDNA was synthesized from 500 ng total RNA using High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems[™]) according to the manufacturers' protocols. Thirty nanograms of cDNA was subjected to PCR amplification using specific primers of *rhcN* (*rhcN*.RT.D9.f: 5'-CATTGGCGATATGGTAGGCT-3'; *rhcN*.RT.D9.r: 5'-GGACAAGTGTGAACCGTCCT-3') and *nopX* (*nopX*.RT.D9.f: 5'-CATCAACCCGAACAACACAG-3'; *nopX*.RT.D9.r: 5'-GGCTCGATAGACAAGGTCCACAA-3') genes. PCR amplification was performed using QuantStudio 3 Real-Time PCR System Mix (Applied Biosystems[™]) and the following program: an initial denaturation step at 95°C for 2 min; 35 cycles at 95°C for 30 s, 55°C for 30 s, and at 72°C for 1.5 min; and a final extension step at 72°C for 10 min. The relative gene expression was analyzed using the comparative Ct method ($-\Delta\Delta\text{CT}$) normalized to the endogenous housekeeping gene (16S rRNA) using PBA338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') and PRUN518R (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'). Three biological replicates were pooled and analyzed. At least three replicate PCR amplifications were performed for each sample.

Microscopy

An Olympus Fluoview FV1000 confocal laser scanning microscope was used to investigate nodule development, bacteroid differentiation, and rice colonization. For this purpose, 40–50 μm thick sections of fresh nodules and rice roots were prepared using a VT1000S vibratome (Leica Nanterre, France). Nodule sections were stained for 20 min with 0.01% calcofluor (to stain the plant cell wall) and with 30 μM propidium iodide (PI) in 50 mM Tris-HCl pH 7.0 buffer to identify dead cells (Haag et al., 2011). Calcofluor was excited at 405 nm and detected with a 460–500 nm emission filter. The GFP-labeled DOA9 and Ω *rhcN* strains were detected after excitation with the 488 nm laser line and emission signal collection at 490–522 nm, while the PI used to identify dead cells was excited with the 535 nm laser line and emission signals were collected at 617–636 nm. Confocal images were reconstructed with NIS elements software (Nikon), and images were colored and prepared for publication

with Adobe Photoshop software. To detect β -glucuronidase (GUS) activity in the nodules elicited by the *rhcN* mutant the same protocol than Bonaldi et al. (2010) was used.

Search for Genes Encoding Putative T3 Effectors on the DOA9 Genome

Two complementary approaches were used to identify putative effector genes: (i) a TBlastN search of the genome for known Nops identified in rhizobia (Kimrel et al., 2013; Staehelin and Krishnan, 2015), the identified homologs were considered as possible candidates when they matched the following parameters (% of identity $\geq 40\%$ over 80% of the length of the sequence) and (ii) a search for *tts*-boxes on the chromosome and plasmid of DOA9 genome (GenBank accession numbers DF820425 and DF820426, respectively) using a hidden Markov model initially trained with the sequences of 26 confirmed *tts*-boxes from *Sinorhizobium* (*Ensifer*) sp. strain NGR234, *B. diazoefficiens* USDA110, and *B. elkanii* USDA61 (Eddy, 1998; Marie et al., 2004; Zehner et al., 2008; Okazaki et al., 2009). To be considered as a candidate, the gene had to contain a *tts*-box with a score ≥ 9 located on the same strand in its upstream region (up to 1 kb).

Statistical Analysis

The experiment data were subjected to analysis of variance (ANOVA). When confirming a statistically significant value in the *F*-test ($p \leq 0.05$), a *post hoc* test (Duncan's multiple-range test at $p \leq 0.05$) was used as a multiple comparison procedure (Duncan, 1955) using SPSS1 software for WINDOWS[™], Version 14.0.

RESULTS

Gene Organization and Comparison of the T3SS Genes of *Bradyrhizobium* sp. DOA9 and Other Rhizobial Strains

Sequence genome analysis revealed the presence of a T3SS gene cluster organized in several operons on the pDOA9 plasmid (Figures 1A,B). The main putative operon preceded by a *tts*-box contained most of the genes coding for components of the secretion machinery in the order *nopB*, *rhcJ*, *noIU*, *rhcL*, *rhcN*, *rhcU*, *rhcQ*, *rhcR*, *rhcS*, *rhcT*, and *rhcU*. This genetic organization is similar to that found in other *Bradyrhizobium* or *Sinorhizobium* strains and a very high level of AA identity was observed with the corresponding homologous proteins. However, unlike these strains, a large intergenic region of 650 bp was observed between *rhcS* and *rhcT* also containing a *tts*-box (Figure 1A), raising the possibility that the *rhcT* and *rhcU* genes are transcribed independently.

As described in other rhizobia, we could assume that this main cluster is under the dual control of *TtsI* and *NodD* since a *ttsI* homolog was found at the vicinity of the main operon preceded by a *nod*-box (Figure 1A). However, it is to highlight the presence of a gene encoding a putative transposase between this *nod*-box and *ttsI*. To confirm that the presence of this putative

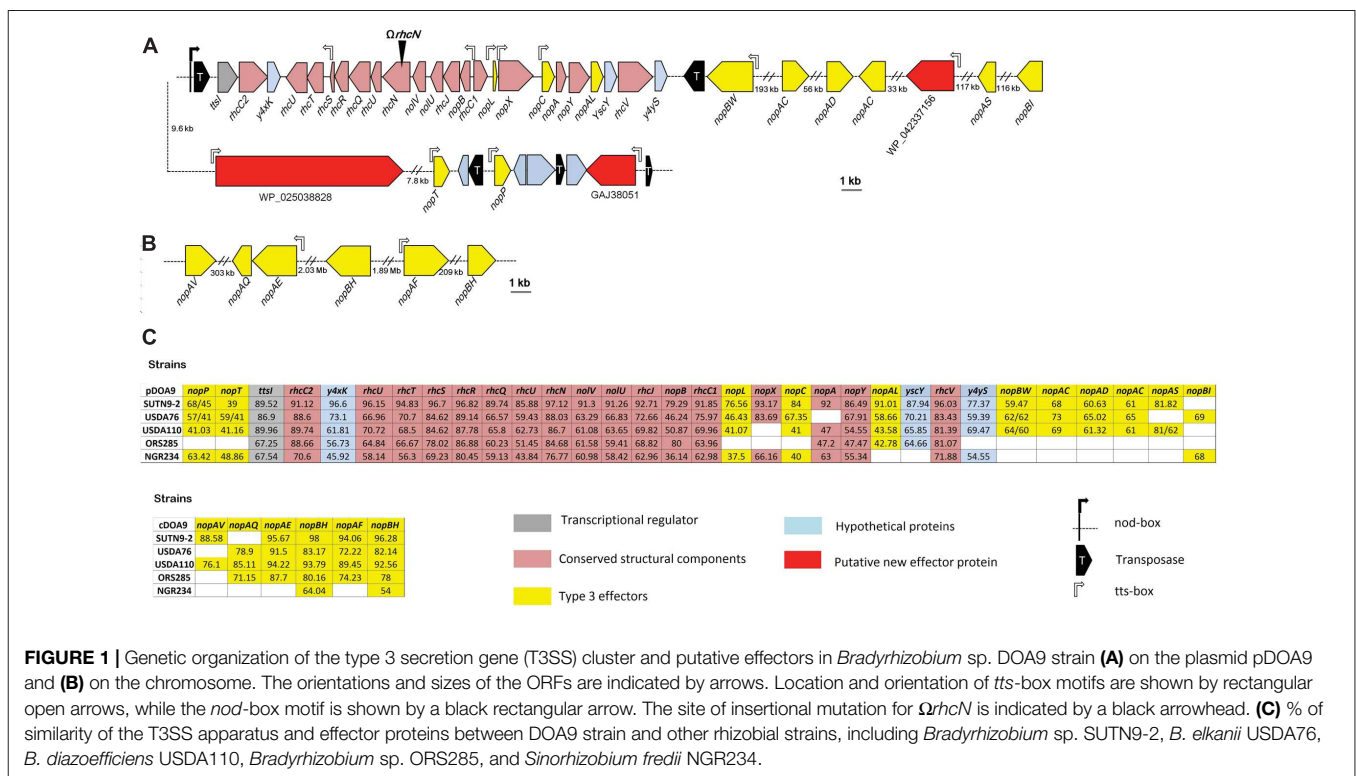


FIGURE 1 | Genetic organization of the type 3 secretion gene (T3SS) cluster and putative effectors in *Bradyrhizobium* sp. DOA9 strain (A) on the plasmid pDOA9 and (B) on the chromosome. The orientations and sizes of the ORFs are indicated by arrows. Location and orientation of *tts*-box motifs are shown by rectangular open arrows, while the *nod*-box motif is shown by a black rectangular arrow. The site of insertional mutation for Ω *rhcN* is indicated by a black arrowhead. (C) % of similarity of the T3SS apparatus and effector proteins between DOA9 strain and other rhizobial strains, including *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2, *B. elkanii* USDA76, *B. diazoefficiens* USDA110, *Bradyrhizobium* sp. ORS285, and *Sinorhizobium fredii* NGR234.

transposase does not interfere with the formation of the T3SS secretion apparatus, we analyzed the expression of two structural T3SS genes (*rhcN* and *nopX*) in the presence of two flavonoids (genistein or naringenin) previously reported to induce T3SS genes in rhizobial strains (Krause et al., 2002; Okazaki et al., 2010). As shown in Supplementary Figure S1, both flavonoids strongly induced *nopX* and *rhcN* expression, showing that despite this transposase, the T3SS genes in DOA9 strain are classically regulated by flavonoids, most probably via the control of NodD and TtsI.

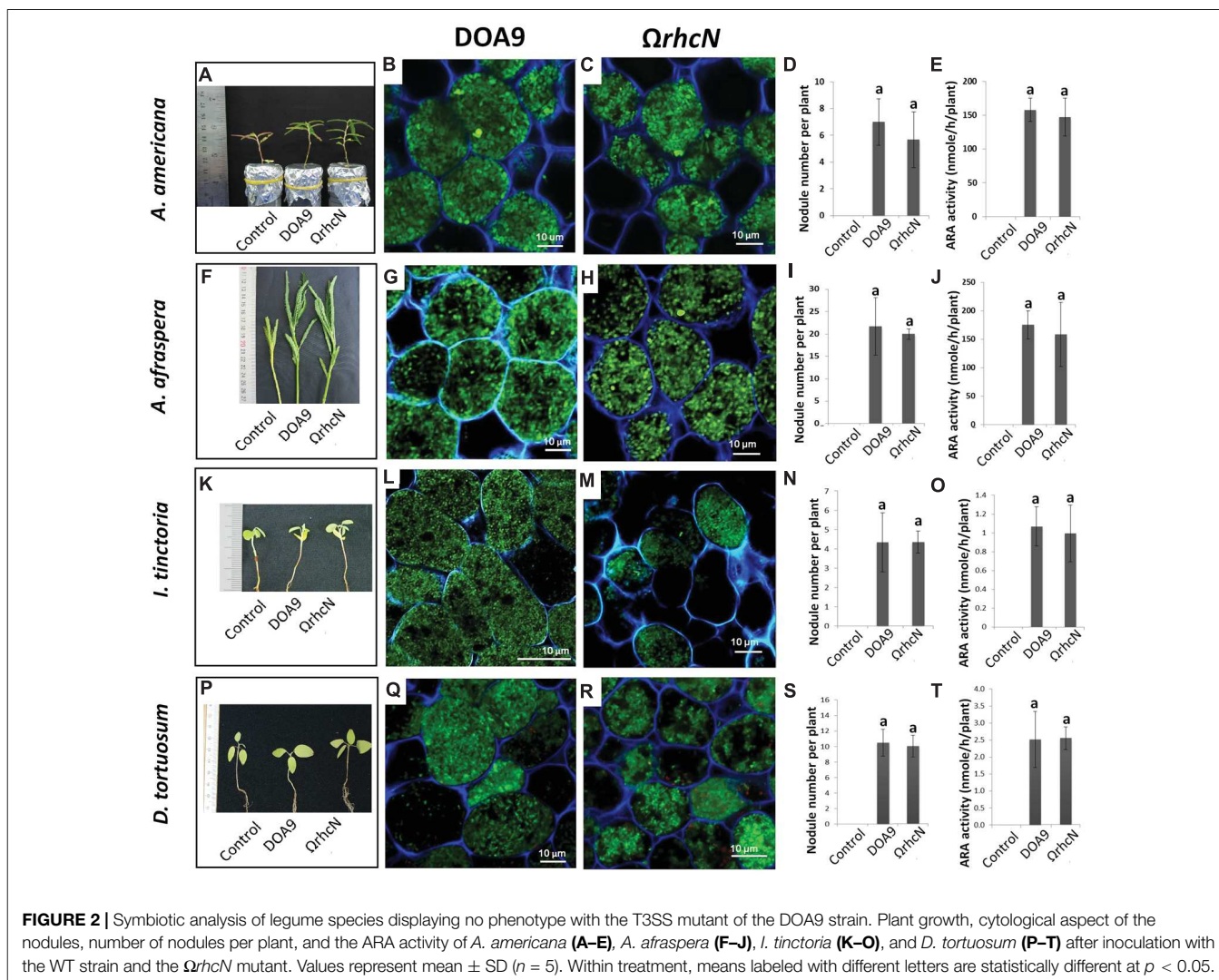
To identify putative effectors that are possibly translocated by this T3SS machinery, we combined two *in silico* searches: (i) a TblastN search of the genome for Nops previously identified in other rhizobia and (ii) a search of the *tts*-box motif using a hidden Markov model. After eliminating the Nops proteins predicted to correspond to components of the secretory apparatus (NopA, NopX, and NopB) (Staelin and Krishnan, 2015), this analysis retrieved 20 putative translocated effectors. Of these, six were located on the chromosome (Figure 1C). However, all six candidates remain doubtful because homologous proteins for all of them can be identified in photosynthetic *Bradyrhizobium* strains that lack a T3SS gene cluster (Supplementary Table S2). Interestingly, among the other putative effectors found on the plasmid, three correspond to new effectors not previously identified in other rhizobia. They were preceded by a *tts*-box and all contained the small ubiquitin-like modifier (SUMO) protease domain of the C48 peptidase [ubiquitin-like protease 1 (Ulp1)] family. Several effectors containing this functional domain have already been characterized in pathogenic and symbiotic bacteria (Hotson et al., 2003; Hubber et al., 2004;

Rodrigues et al., 2007; Tsurumaru et al., 2015), reinforcing the hypothesis that these three effector candidates are *bona fide* new effectors.

Symbiotic Role of the T3SS

To analyze the role of the T3SS in DOA9 strain during symbiosis, we constructed a T3SS mutant by inserting the non-replicative plasmid pVO155-Sm-npt2-gfp into the 5'-region of *rhcN*. The *rhcN* gene was selected as target because it encodes an ATPase that is indispensable for the functioning of the T3SS injectisome. Furthermore, the pVO155 plasmid used for inactivation of the gene contains a constitutive expressed GFP that enables monitoring of the bacteria inside the nodules. The symbiotic performance of the WT and Ω *rhcN* mutant was compared on several legume species belonging to Genistoid (*Crotalaria juncea*), Dalbergioid (*Aeschynomene americana*, *A. afraspera*, *Arachis hypogaea*, and *Stylosanthes hamata*), and Millettoid tribes (*Macroptilium atropurpureum*, *Vigna radiata*, *Indigofera tinctoria*, and *Desmodium tortuosum*) by analyzing several symbiotic parameters (number of nodules per plant, nitrogen fixation estimated using the ARA, plant dry weight, and cytological aspect of the nodules).

Depending on the plant species, the Ω *rhcN* mutant displayed contrasted responses compared to the WT strain. The responses were classified in three categories. In category 1, non-responsive phenotype (called T3SS-no effect group), the plants inoculated with the mutant displayed the same number of nodules and the same nitrogen fixing capacity as the plants inoculated with the WT strain. Furthermore, no cytological differences were observed between the mutant and WT nodules. These plants



were *A. americana*, *A. afraspera*, *I. tinctoria*, and *D. tortuosum* (Figure 2).

In category 2, the *rhcN* mutation had a positive effect on one of the symbiotic parameters analyzed (Figure 3). This group comprised *A. hypogaea*, *V. radiata*, *C. juncea*, and *M. atropurpureum*. Inoculation with the $\Omega rhcN$ mutant led to an almost 65% increase in the number of nodules on *A. hypogaea* compared with WT (Figure 3F). This result suggests that in DOA9, T3SS compromises either the infection or nodule organogenesis process in this species. Figure 3 shows that the higher number of nodules is not correlated with an increase in N_2 fixation. We assume that the plant compensates for the small number of nodules elicited by the WT strain by stimulating their expansion, as can be seen in Figures 3B,C. The same mechanism has been reported in *Medicago* and is related to plant N demand (Laguerre et al., 2012). The deleterious effect of the T3SS on the establishment of the symbiosis was more marked in the cases of *C. juncea* and *V. radiata*. Indeed, whereas the WT strain only elicited bumps or small completely necrotic nodules in *C. juncea* and *V. radiata*, respectively, the $\Omega rhcN$

mutant formed perfectly developed nodules on these two plants (Figures 3H–U). This suggests that some effectors translocated by the T3SS could activate plant defense reactions in these two species, thereby preventing infection and the development of nodules. Similar stimulation of plant immunity probably also occurred in *M. atropurpureum* but to a lesser extent, since the nodules induced by the WT strain were well formed, but displayed brown necrotic areas. The bacteroids in these areas were dead as revealed by the red PI staining, whereas the $\Omega rhcN$ nodules were perfectly normal and the host cells were filled with viable bacteroids, as revealed by the green of GFP tagging cells (Figures 3V–AB). Nevertheless, while the T3SS mutation made it possible to restore nodule formation capacity in *V. radiata* and *C. juncea*, only very weak nitrogenase activity was detected, and no real benefit for plant growth was observed (Figures 3N,U and Supplementary Table S3). This shows that other restrictions exist between DOA9 and these two plant species resulting in inefficient symbiosis.

Only one species, *S. hamata*, was attributed to category 3, corresponding to a negative effect of the *rhcN* mutation.

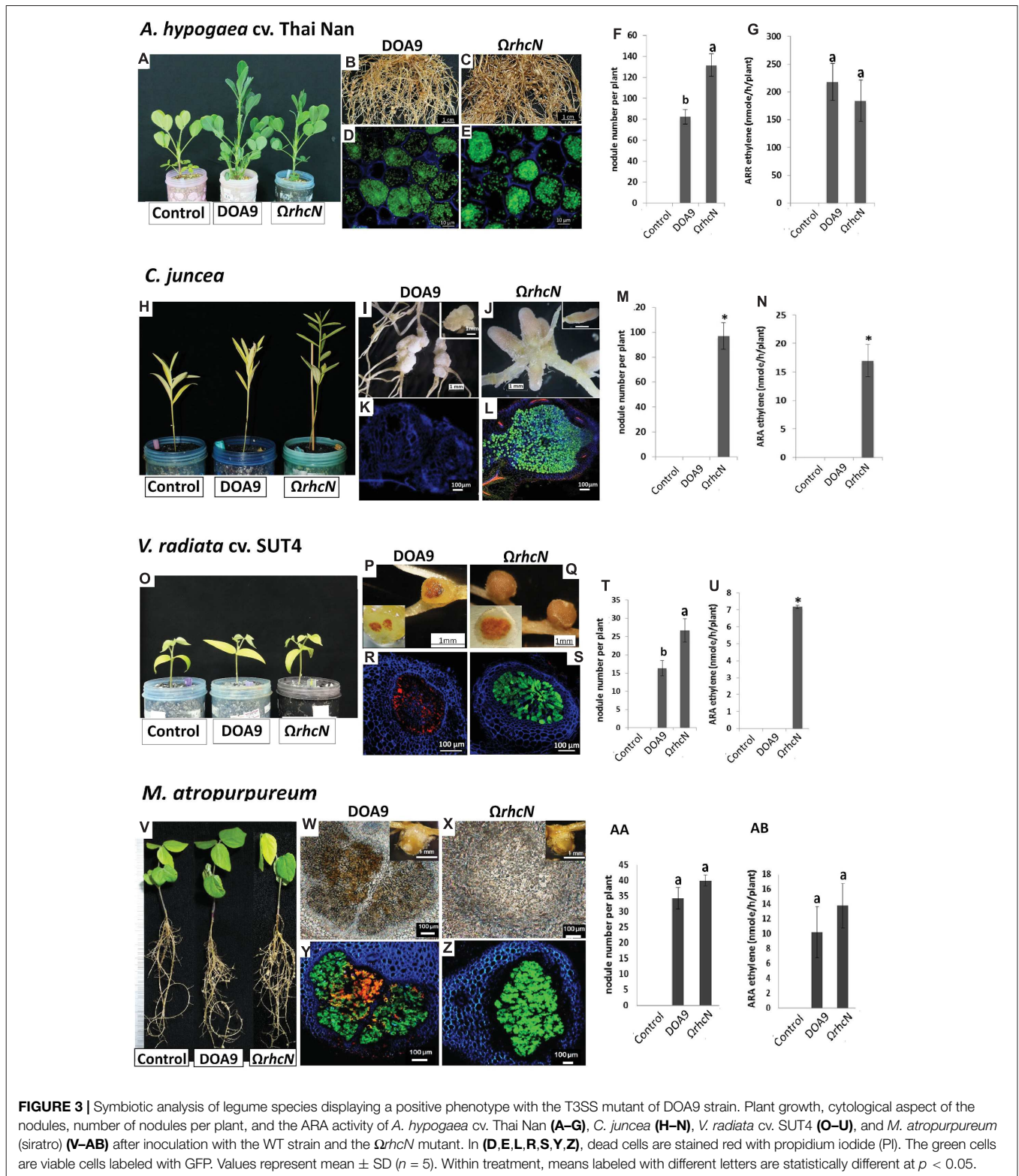
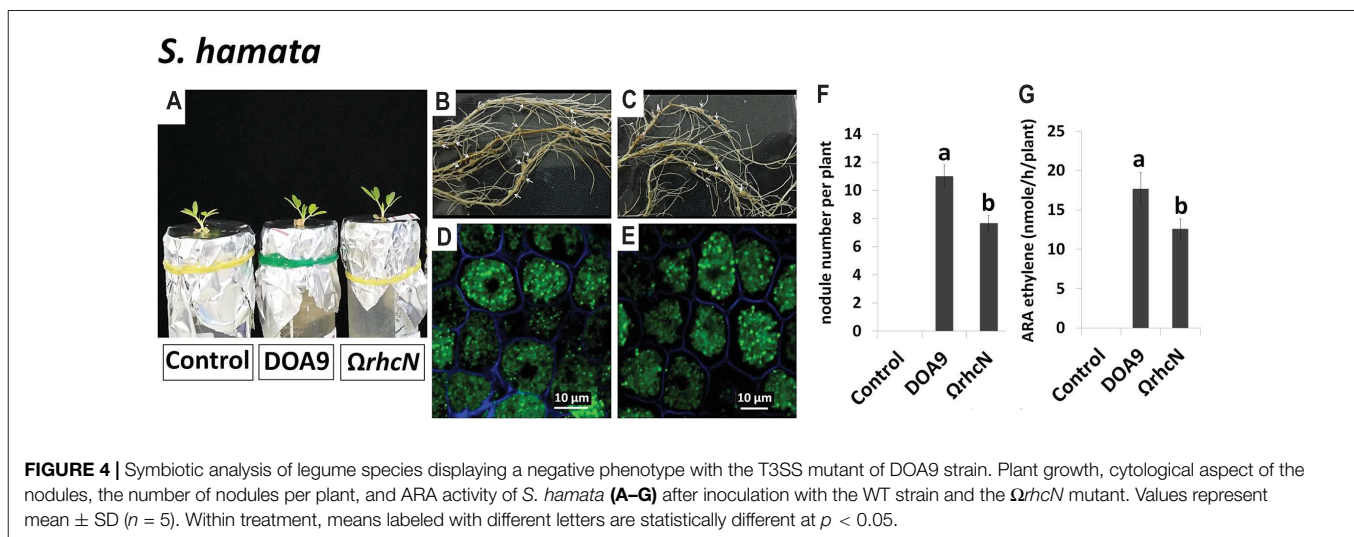


FIGURE 3 | Symbiotic analysis of legume species displaying a positive phenotype with the T3SS mutant of DOA9 strain. Plant growth, cytological aspect of the nodules, number of nodules per plant, and the ARA activity of *A. hypogaea* cv. Thai Nan (**A–G**), *C. juncea* (**H–N**), *V. radiata* cv. SUT4 (**O–U**), and *M. atropurpureum* (siratro) (**V–AB**) after inoculation with the WT strain and the *ΩrhcN* mutant. In (**D, E, L, R, S, Y, Z**), dead cells are stained red with propidium iodide (PI). The green cells are viable cells labeled with GFP. Values represent mean ± SD (*n* = 5). Within treatment, means labeled with different letters are statistically different at *p* < 0.05.

The number of nodules and nitrogenase activity of nodules induced by the *ΩrhcN* strain were reduced by approximately 30% compared with the wild-type strain (**Figures 4A–G**). These data suggest that the T3SS of strain DOA9 also plays a positive

role in the establishment of the symbiosis, most probably by translocating effectors that weakened the plant immune system.

We also examined the effect of root exudates on the expression of *rhcN* and *nopX* genes to determine whether the absence of



phenotype observed for the *rhcN* mutant in some legume species could be linked with the absence of formation of the T3SS apparatus. As expected, a significant level of expression of the two T3SS genes was detected in the five species displaying a positive or negative phenotype with the $\Omega rhcN$ strain (Supplementary Figure S1). In contrast, of the four species that displayed no phenotype with the *rhcN* mutant, the root exudates of two of them (*I. tinctoria* and *D. tortuosum*) displayed a similar level of expression to the control without inducers raising the possibility that the T3SS machinery is not formed during the early steps of the interaction between the DOA9 strain and these two legume species. We also took advantage of the promoterless *gusA* reporter gene present in the insertional pVO155 plasmid used to construct the *rhcN* mutant to determine whether the T3SS is expressed in mature nodules as already reported in *B. diazoefficiens* USDA110 nodulating soybean (Zehner et al., 2008). As shown in Supplementary Figure S2, for the three tested species (*A. americana*, *M. atropurpureum*, and *I. tinctoria*), a GUS activity was detected in the infected nodule cells, in contrast to the WT nodules, in which no activity was observed (Supplementary Figure S2). Altogether, these data suggest that T3SS genes of DOA9 strain are active during the early and/or late stages of symbiosis on the different species tested.

Role of the T3SS in Rice Colonization and Infection

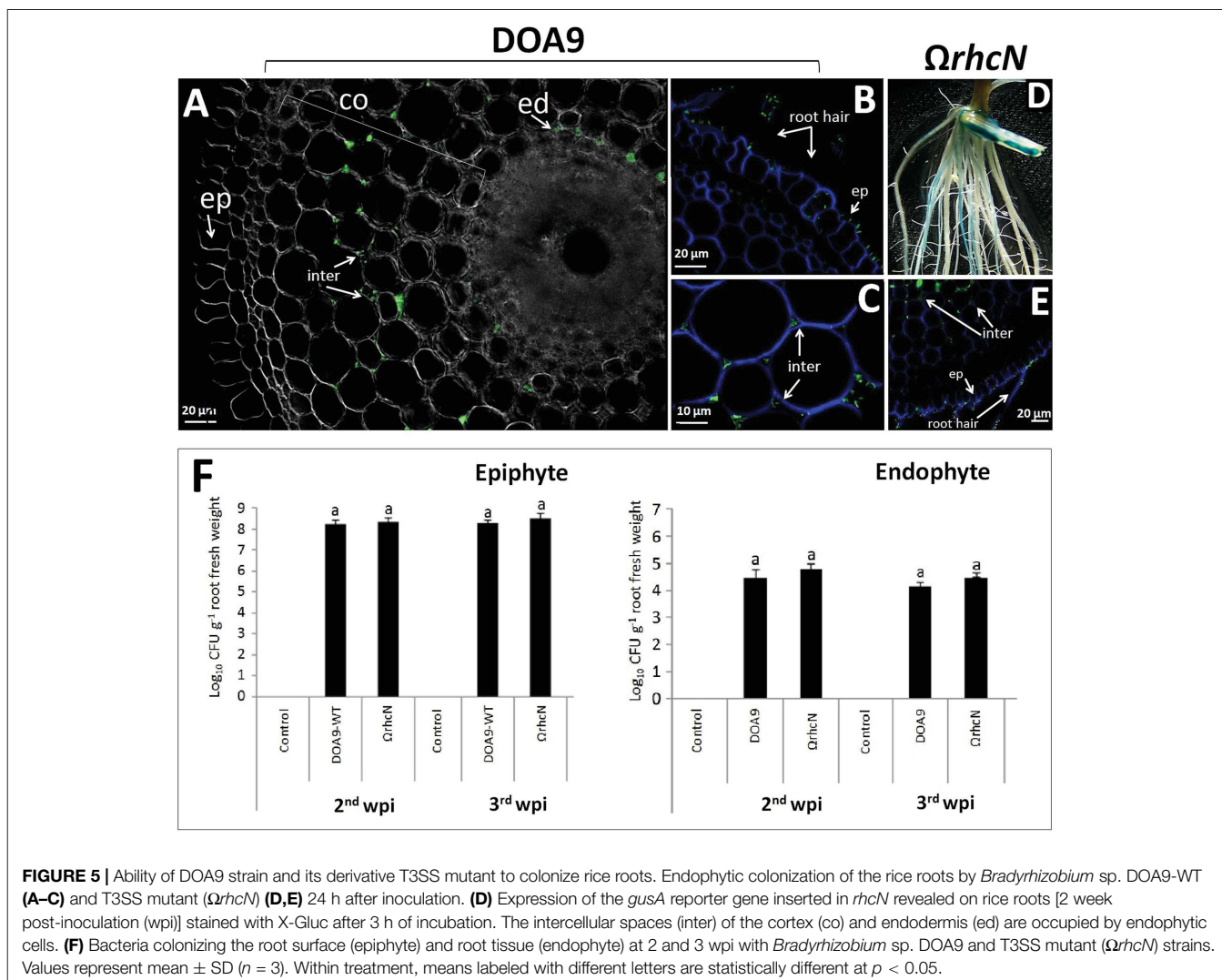
We also investigated the effect of the T3SS mutation on the ability of DOA9 to colonize the surface of rice roots and to infect deep root tissue. These observations were made on a Thai rice (cultivar Pathum Thani 1) at the second and third week post-inoculation (wpi) (Figure 5F). The total population density of WT and $\Omega rhcN$ strains on the surface of the rice roots was almost the same (around $8 \log_{10}$ CFU/g of root fresh weight), and this level of population remained constant at 2 and 3 wpi. When the roots were surface sterilized to conserve only the endophytic bacteria cells, the estimated population of both WT and mutant strains was also very close (around $4 \log_{10}$ CFU/g

root fresh weight). We also took advantage of the GFP tag added on the WT and $\Omega rhcN$ strains to monitor invasion of the roots. As can be seen in Figures 5A–C,E, both WT and $\Omega rhcN$ cells were attached to the root hairs and to the surface of the root epidermis. Analysis of root sections revealed endophytic bacterial cells in the intercellular space of the root cortex and endodermis. Taken together, these data suggest that the T3SS mutation did not affect the ability of the DOA9 strain to colonize and infect the rice root tissue intercellularly. This absence of effect of the T3SS mutation was not related to the absence of T3SS genes expression considering that a GUS activity could be detected at the surface of the rice roots inoculated with the *rhcN* mutant (Figure 5D).

DISCUSSION

The *Bradyrhizobium* sp. DOA9 strain isolated from a paddy field has been shown to have the ability to induce the development of symbiotic nodules in various legume species (Teamtisong et al., 2014). Unlike other bradyrhizobia, this strain contains a symbiotic megaplasmid (pDOA9) that harbors the *nod* and *nif* genes as well as a T3SS gene cluster (Okazaki et al., 2015). This T3SS cluster contains all the genes necessary for the formation of the secretory apparatus and the transcriptional activator (TtsI), which is preceded by a *nod*-box promoter motif. This genetic organization is similar to that described in other bradyrhizobial strains. Why DOA9 harbors a symbiotic plasmid while all the other *Bradyrhizobium* strains sequenced contain a symbiotic island remains an open question. In both cases, the lower GC content and the codon usage of the genes present in the symbiotic region suggest an acquisition by lateral transfer. This indicates that, in addition to the possibility of a difference in the origin of the symbiotic region, the mechanisms of its transfer and its maintenance inside the bacterial genome could also differ from one *Bradyrhizobium* strain to another.

Despite high conservation of T3SS genes encoding the injectisome, the T3SS effector contents of DOA9 strain differ from those in other bradyrhizobia, notably in their number,



which is comparatively lower. Indeed, in the DOA9 strain, only 14 candidate effector proteins have been predicted versus between 30 and 35 putative effectors in other bradyrhizobia (Zehner et al., 2008; Kimbrel et al., 2013). In particular, the effectors NopM and NopE, classically found in *Bradyrhizobium* strains, often as multicopies, are clearly absent in the DOA9 genome. Conversely, three putative effectors that were not previously identified in rhizobia are predicted in the DOA9 strain. These three new putative effectors proteins (WP_042337156, WP_025038828, and GAJ3805) most probably correspond to SUMO peptidases that contain the catalytic domain of members of the family of C48 cysteine proteases involved in the de-ubiquitination of eukaryotic proteins (Hotson et al., 2003). Interestingly, a SUMO peptidase protein named NopD in *S. fredii* HH103 was identified to be secreted through the T3SS in the culture supernatant indicating that this family protein could constitute *bona fide* effectors translocated into the host cell (Rodrigues et al., 2007). Furthermore, more recently, other SUMO protease putative effectors were reported to be responsible for the incompatibility of some *Bradyrhizobium*

strains (*B. japonicum* Is-1 and *B. elkanii* USDA61), which prevents them from interacting symbiotically with Rj4 genotype soybeans (Faruque et al., 2015; Tsurumaru et al., 2015). Taken together, this reinforces the hypothesis that the three new Nop candidates identified in DOA9 strain are effectors that could also affect the ability to interact with some plants.

It has previously been shown that T3SS in bradyrhizobia can have a positive or negative effect on nodule formation by stimulating or repressing the plant immune system depending on the host plant. For example, the deletion of T3SS in *B. diazoefficiens* delayed nodulation on soybean and reduced the number of nodules on *M. atropurpureum* (Krause et al., 2002), while the absence of T3SS in *B. elkanii* USDA61 induced the formation of nodules on *V. radiata* L. cv. KPS1 and on the soybean cultivar Hill, which contains the Rj4 allele (Okazaki et al., 2009). In the present study, we observed that the T3SS mutation affected the ability of DOA9 strain to interact with five out of the nine species tested. In particular, the T3SS mutation dramatically improved nodule formation and development in *C. juncea* and *V. radiata* and had a more moderate but also positive impact

on nodulation in *A. hypogaea* and *M. atropurpureum*. This suggests that among the cocktail of effectors that are translocated into the host cell, some are recognized as virulence factors by R-proteins and block infection and nodule organogenesis to a greater or lesser extent. As previously mentioned above, some SUMO protease effectors and also NopT have been observed to act as negative effectors in some hosts (Dai et al., 2008), which raises the possibility that the effector(s) responsible for this incompatibility could be one or some of the new effectors identified in the DOA9 strain or even NopT, which is also present in DOA9.

Conversely, the T3SS mutation had a negative impact on the number of nodules elicited on *S. hamata*, suggesting, in this case, that some effectors act positively on the symbiosis most probably, either by helping the bacteria to overcome plant defense reactions that limit the interaction or by directly inducing the nodulation signaling pathway as recently described for some non-photosynthetic bradyrhizobia shown to nodulate some legume species in the absence of NFs synthesis but thanks to the T3SS (Okazaki et al., 2013, 2016).

Identifying the effectors responsible for these contrasted symbiotic effects depending on the host plant, and understanding their role are real challenges. To date, a specific role in the symbiosis has been described for only a few effectors (Stahelin and Krishnan, 2015). One limitation is that the different effectors translocated into the host cell mostly act synergistically by interfering in different plant defense pathways. The DOA9 strain may be an ideal model to study the specific role of effectors individually or in combination. Indeed, all the symbiotic determinants are found on the pDOA9 plasmid and it has been possible to create a plasmid-free DOA9 strain (Tittabutr, personal communication). We can imagine designing plasmids encompassing a minimum set of canonical *nod*, *nif*, and T3SS injectisome genes supplemented by different combinations of effectors and to study the symbiotic properties of a DOA9 strain lacking pDOA9 in which these synthetic plasmids are re-introduced. This kind of approach may seem too ambitious and time consuming, but with the development of synthetic biology and a reduction in the cost of synthesizing DNA, it could be feasible in the near future.

Among the four species in which the T3SS mutation had no effect on the symbiosis, we observed that the root exudate of two of them (*I. tinctoria* and *D. tortuosum*) did not induce the expression of *nopX* and *rhcN* genes, suggesting that the T3SS apparatus is not formed during the early stages of the symbiosis between the DOA9 strain and these two species. These results were surprising considering that these two species were found to be nodulated by the DOA9 strain, indicating that the *nod* genes are expressed. It would be interesting to explore more deeply the regulation of the T3SS and *nod* genes in presence of flavonoids and root exudates to determine if decoupling between their expression is possible. In the same vein, we observed that some putative T3SS effector genes are not preceded by a *tts*-box, which raises the question of whether these genes are expressed when the T3SS is formed or if their regulation involves another activator than TtsI. The observation that T3SS genes were found expressed in mature nodules while they were not found activated

by root exudates is also puzzling. This could be related to the fact that we used different techniques to analyze genes expression or that the technique of extraction of root exudate was not adapted for *I. tinctoria* considering that this very small plant do not grow well in liquid medium. We cannot also exclude the possibility that the regulation of the T3SS genes could be more complex involving other input signals than flavonoids and additional regulators than NodD and TtsI leading to different gene expression controls during the early and late stages of symbiosis.

Finally, given that a previous study focusing on the SUTN9-2 strain showed that the T3SS is an important determinant in rice infection (Piromyou et al., 2015b), we also investigated if the T3SS plays a similar role during the interaction between the DOA9 strain and rice. However, despite the use of the same cultivar (Pathum Thani 1), our observations indicate that the T3SS mutation does not affect the ability of DOA9 strain to colonize the root surface and to infect the root tissue intercellularly. This result was surprising given that the two strains were isolated from similar ecological niches (Thai paddy fields using *A. americana* as trap legumes) and considering that we observed that the T3SS genes are active during the interaction of DOA9 strain with rice. These two strains differ in the origin of the symbiotic region, which harbors a different cortege of *nod* and *nop* genes. We can suppose that during evolution, each strain adapted this symbiotic toolbox differently as a function of the variety of plant partners it encountered during its life history. This might explain why, via a different cocktail of effectors, the same T3SS machinery can lead to different responses from one strain to another and from one host to another.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

PS, PT, NB, EG, and NT conceived the experiment(s). PS, RN, KT, JP, AT, PT, and PP conducted the experiment(s). PS, PT, EG, and NT analyzed the result(s) and wrote the paper. All authors reviewed the manuscript.

FUNDING

This work was financially supported by Suranaree University of Technology (OROG), the Franco-Thai Cooperation Program in Higher Education and Research (PHC SIAM 2017 – No. 38280WF) and by the ANR, grant “SymEffectors” number ANR-16-CE20-0013.

ACKNOWLEDGMENT

The authors would like to thank Dr. Issra Pramoolsook for advice and comments on the language of the manuscript.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.01810/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Bartsev, A. V., Deakin, W. J., Boukli, N. M., McAlvin, C. B., Stacey, G., Malnoe, P., et al. (2004). NopL, an effector protein of *Rhizobium* sp. NGR234, thwarts activation of plant defense reactions. *Plant Physiol.* 134, 871–879. doi: 10.1104/pp.103.031740
- Bonaldi, K., Gherbi, H., Franche, C., Bastien, G., Fardoux, J., Barker, D., et al. (2010). The Nod factor-independent symbiotic signaling pathway development of *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation for the legume *Aeschynomene indica*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 23, 1537–1544. doi: 10.1094/MPMI-06-10-0137
- Dai, W. J., Zeng, Y., Xie, Z. P., and Staehelin, C. (2008). Symbiosis-promoting and deleterious effects of NopT, a novel type 3 effector of *Rhizobium* sp. strain NGR234. *J. Bacteriol.* 190, 5101–5110. doi: 10.1128/JB.00306-08
- de Lyra Mdo, C., Lopez-Baena, F. J., Madinabeitia, N., Vinardell, J. M., Espuny Mdel, R., Cubo, M. T., et al. (2006). Inactivation of the *Sinorhizobium fredii* HH103 *rhcJ* gene abolishes nodulation outer proteins (Nops) secretion and decreases the symbiotic capacity with soybean. *Int. Microbiol.* 9, 125–133.
- Duncan, D. B. (1955). Multiple range and multiple F tests. *Biometrics* 11, 1–42. doi: 10.2307/3001478
- Eddy, S. R. (1998). Profile hidden Markov models. *Bioinformatics* 14, 755–763. doi: 10.1093/bioinformatics/14.9.755
- Ehrhardt, D. W., Atkinson, E. M., and Long, S. R. (1992). Depolarization of alfalfa root hair membrane potential by *Rhizobium meliloti* Nod factors. *Sci. (New York, NY)* 256, 998–1000. doi: 10.1126/science.10744524
- Faruque, O. M., Miwa, H., Yasuda, M., Fujii, Y., Kaneko, T., Sato, S., et al. (2015). Identification of *Bradyrhizobium elkanii* genes involved in incompatibility with soybean plants carrying the Rj4 allele. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 6710–6717. doi: 10.1128/AEM.01942-15
- Gibson, K. E., Kobayashi, H., and Walker, G. C. (2008). Molecular determinants of a symbiotic chronic infection. *Annu. Rev. Genet.* 42, 413–441. doi: 10.1146/annurev.genet.42.110807.091427
- Giraud, E., Lavergne, J., and Vermeglio, A. (2010). Characterization of bacteriophytochromes from photosynthetic bacteria: Histidine kinase signaling triggered by light and redox sensing. *Methods Enzymol.* 471, 135–159. doi: 10.1016/S0076-6879(10)71009-0
- Gourion, B., Berrabah, F., Ratet, P., and Stacey, G. (2015). Rhizobium-legume symbioses: the crucial role of plant immunity. *Trends Plant Sci.* 20, 186–194. doi: 10.1016/j.tplants.2014.11.008
- Haag, A. F., Balaban, M., Sani, M., Kerscher, B., Pierre, O., Farkas, A., et al. (2011). Protection of *Sinorhizobium* against host cysteine-rich antimicrobial peptides is critical for symbiosis. *PLoS Biol.* 9:e1001169. doi: 10.1371/journal.pbio.1001169
- Hoagland, D. R., and Arnon, D. I. (1950). *The Water-Culture Method for Growing Plants Without Soil*. Oakland, CA: University of California.
- Hotson, A., Chosed, R., Shu, H., Orth, K., and Mudgett, M. B. (2003). *Xanthomonas* type III effector XopD targets SUMO-conjugated proteins in planta. *Mol. Microbiol.* 50, 377–389. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03730.x
- Hubber, A., Vergunst, A. C., Sullivan, J. T., Hooykaas, P. J. J., and Ronson, C. W. (2004). Symbiotic phenotypes and translocated effector proteins of the *Mesorhizobium loti* strain R7A VirB/D4 type IV secretion system. *Mol. Microbiol.* 54, 561–574. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04292.x
- Janczarek, M., Rachwał, K., Marzec, A., Grządziel, J., and Palusinska-Szys, M. (2015). Signal molecules and cell-surface components involved in early stages of the legume-rhizobium interactions. *Appl. Soil Ecol.* 85, 94–113. doi: 10.1016/j.apsoil.2014.08.010
- Jiménez-Guerrero, I., Pérez-Montaño, F., Monreal, J. A., Preston, G. M., Fones, H., Vioque, B., et al. (2015). The *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* HH103 Type 3 secretion system suppresses early defense responses to effectively nodulate soybean. *Mol. Plant Microbe Interact.* 28, 790–799. doi: 10.1094/MPMI-01-15-0020-R
- Kawaharada, Y., Kelly, S., Nielsen, M. W., Hjuler, C. T., Gysel, K., Muszyński, R. W., et al. (2015). Receptor-mediated exopolysaccharide perception controls bacterial infection. *Nature* 523, 308–312. doi: 10.1038/nature14611
- Kimbril, J. A., Thomas, W. J., Jiang, Y., Creason, A. L., Thireault, C. A., Sachs, J. L., et al. (2013). Mutualistic co-evolution of type III effector genes in *Sinorhizobium fredii* and *Bradyrhizobium japonicum*. *PLoS Pathog.* 9:e1003204. doi: 10.1371/journal.ppat.1003204
- Krause, A., Doerfel, A., and Gottfert, M. (2002). Mutational and transcriptional analysis of the type III secretion system of *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 15, 1228–1235. doi: 10.1094/MPMI.2002.15.12.1228
- Krishnan, H. B., Lorio, J., Kim, W. S., Jiang, G., Kim, K. Y., DeBoer, M., et al. (2003). Extracellular proteins involved in soybean cultivar-specific nodulation are associated with pilus-like surface appendages and exported by a type III protein secretion system in *Sinorhizobium fredii* USDA257. *Mol. Plant Microbe Interact.* 16, 617–625. doi: 10.1094/MPMI.2003.16.7.617
- Laguerre, G., Heulin-Gotty, K., Brunel, B., Klonowska, A., Le Quéré, A., Tillard, P., et al. (2012). Local and systemic N signaling are involved in *Medicago truncatula* preference for the most efficient *Sinorhizobium* symbiotic partners. *New Phytol.* 195, 437–449. doi: 10.1111/j.1469-8137.2012.04159.x
- López-Baena, F. J., Monreal, J. A., Pérez-Montaño, F., Guasch-Vidal, B., Bellogín, R. A., Vinardell, J. M., et al. (2009). The absence of Nops secretion in *Sinorhizobium fredii* HH103 increases GmPR1 expression in Williams soybean. *Mol. Plant Microbe Interact.* 22, 1445–1454. doi: 10.1094/MPMI-22-11-1445
- Marie, C., Broughton, W. J., and Deakin, W. J. (2001). *Rhizobium* type III secretion systems: legume charmers or alarmers? *Curr. Opin. Plant Biol.* 4, 336–342. doi: 10.1016/S1369-5266(00)00182-5
- Marie, C., Deakin, W. J., Ojanen-Reuhs, T., Diallo, E., Reuhs, B., Broughton, W. J., et al. (2004). TtsI, a key regulator of *Rhizobium* species NGR234 is required for type III-dependent protein secretion and synthesis of rhamnose-rich polysaccharides. *Mol. Plant Microbe Interact.* 9, 958–966. doi: 10.1094/MPMI.2004.17.9.958
- Marie, C., Deakin, W. J., Viprey, V., Kopczińska, J., Golinowski, W., Krishnan, H. B., et al. (2003). Characterization of Nops, nodulation outer proteins, secreted via the type III secretion system of NGR234. *Mol. Plant Microbe Interact.* 16, 743–751. doi: 10.1094/MPMI.2003.16.9.743
- Noisangiam, R., Teamtisong, K., Tittabutr, P., Boonkerd, N., Toshiki, U., Minamisawa, K., et al. (2012). Genetic diversity, symbiotic evolution, and proposed infection process of *Bradyrhizobium* strains isolated from root nodules of *Aeschynomene americana* L. in Thailand. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 6236–6250. doi: 10.1128/AEM.00897-12
- Okazaki, S., Kaneko, T., Sato, S., and Saeki, K. (2013). Hijacking of leguminous nodulation signaling by the rhizobial type III secretion system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 17131–17136. doi: 10.1073/pnas.1302360110
- Okazaki, S., Noisangiam, R., Okubo, T., Kaneko, T., Oshima, K., Hattori, M., et al. (2015). Genome analysis of a novel *Bradyrhizobium* sp. DOA9 carrying a symbiotic plasmid. *PLOS ONE* 10:e0117392. doi: 10.1371/journal.pone.0117392
- Okazaki, S., Okabe, S., Higashi, M., Shimoda, Y., Sato, S., Tabata, S., et al. (2010). Identification and functional analysis of type III effector proteins in *Mesorhizobium loti*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 23, 223–234. doi: 10.1094/MPMI-23-2-0223
- Okazaki, S., Tittabutr, P., Teulet, A., Thouin, J., Fardoux, J., Chaintreuil, C., et al. (2016). *Rhizobium*-legume symbiosis in the absence of Nod factors: two possible scenarios with or without the T3SS. *ISME J.* 1, 64–74. doi: 10.1038/ismej.2015.103
- Okazaki, S., Zehner, S., Hempel, J., Lang, K., and Gottfert, M. (2009). Genetic organization and functional analysis of the type III secretion system of *Bradyrhizobium elkanii*. *FEMS Microbiol. Lett.* 295, 88–95. doi: 10.1111/j.1574-6968.2009.01593.x
- Oke, V., and Long, S. R. (1999). Bacterial genes induced within the nodule during the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Mol. Microbiol.* 32, 837–849. doi: 10.1046/j.1365-2958.1999.01402.x
- Oldroyd, G. E., Murray, J. D., Poole, P. S., and Downie, J. A. (2011). The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annu. Rev. Genet.* 45, 119–144. doi: 10.1146/annurev-genet-110410-132549
- Piromy, P., Greetatorn, T., Teamtisong, K., Okubo, T., Shinoda, R., Nuntakij, A., et al. (2015a). Preference of endophytic bradyrhizobia in different rice cultivars and the implication of rice endophyte evolution. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 3049–3061. doi: 10.1128/AEM.04253-14
- Piromy, P., Songwattana, P., Greetatorn, T., Okubo, T., Kakizaki, K. C., Prakamhang, J., et al. (2015b). The type III secretion system (T3SS) is a determinant for rice-endophyte colonization by non-photosynthetic *Bradyrhizobium*. *Microbes Environ.* 30, 291–300. doi: 10.1264/jmsme2.ME15080
- Rodrigues, J. A., López-Baena, F. J., Ollero, F. J., Vinardell, J. M., Espuny, M., del, R., et al. (2007). NopM and NopD are rhizobial nodulation outer proteins:

- identification using LC-MALDI and LC-ESI with a monolithic capillary column. *J. Proteome Res.* 6, 1029–1037. doi: 10.1021/pr060519f
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Somasegaran, P., and Hoben, H. J. (1994). *Handbook for Rhizobia: Methods in Legume-Rhizobium Technology*. Berlin: Springer-Verlag.
- Staehelein, C., and Krishnan, H. B. (2015). Nodulation outer proteins: double-edged swords of symbiotic rhizobia. *Biochem. J.* 470, 263–274. doi: 10.1042/BJ20150518
- Tampakaki, A. P. (2014). Commonalities and differences of T3SSs in rhizobia and plant pathogenic bacteria. *Front. Plant Sci.* 5:114. doi: 10.3389/fpls.2014.00114
- Teamtisong, K., Songwattana, P., Noisangiam, R., Piromyong, P., Boonkerd, N., Tittabutr, P., et al. (2014). Divergent nod-containing *Bradyrhizobium* sp. DOA9 with a megaplasmid and its host range. *Microbes Environ.* 29, 370–376. doi: 10.1264/jsme2.ME14065
- Tsurumaru, H., Hashimoto, S., Okizaki, K., Kanesaki, Y., Yoshikawa, H., and Yamakawa, T. (2015). A putative type III secretion system effector encoded by the MA20_12780 gene in *Bradyrhizobium japonicum* Is-34 causes incompatibility with Rj4 genotype soybeans. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 5812–5819. doi: 10.1128/AEM.00823-15
- Vincent, J. (1970). *A Manual for the Practical Study of Root-Nodule Bacteria*. Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- Viprey, V., Del-Greco, A., Golinowski, W., Broughton, W., and Perret, X. (1998). Symbiotic implications of type III protein secretion machinery in *Rhizobium*. *Mol. Microbiol.* 28, 1381–1389. doi: 10.1046/j.1365-2958.1998.00920.x
- Wongdee, J., Songwattana, P., Nouwen, N., Noisangiam, R., Fardoux, J., Chaintreuil, C., et al. (2016). nifDK clusters located on the chromosome and megaplasmid of *Bradyrhizobium* sp. strain DOA9 contribute differently to nitrogenase activity during symbiosis and free-living growth. *Mol. Plant Microbe Interact.* 29, 767–773. doi: 10.1094/MPMI-07-16-0140-R
- Yang, S., Tang, F., Gao, M., Krishnan, H. B., and Zhu, H. (2010). R gene-controlled host specificity in the legume-rhizobia symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 18735–18740. doi: 10.1073/pnas.1011957107
- Yasuda, M., Miwa, H., Masuda, S., Takebayashi, Y., Sakakibara, H., and Okazaki, S. (2016). Effector-triggered immunity determines host genotype-specific incompatibility in legume-Rhizobium symbiosis. *Plant Cell Physiol.* 57, 1791–1800. doi: 10.1093/pcp/pcw104
- Zehner, S., Schober, G., Wenzel, M., Lang, K., and Göttfert, M. (2008). Expression of the *Bradyrhizobium japonicum* type III secretion system in legume nodules and analysis of the associated tts-box promoter. *Mol. Plant Microbe Interact.* 21, 1087–1093. doi: 10.1094/MPMI-21-8-1087

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

Copyright © 2017 Songwattana, Noisangiam, Teamtisong, Prakamhang, Teulet, Tittabutr, Piromyong, Boonkerd, Giraud and Teaumroong. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Supplementary Material

Type 3 Secretion System (T3SS) of *Bradyrhizobium* sp. DOA9 and its Roles in Legume Symbiosis and Rice Endophytic Association

Pongpan Songwattana¹, Rujirek Noisangiam², Kamonluck Teamtisong³, Janpen Prakamhang⁴, Albin Teulet⁵, Panlada Tittabutr¹, Pongdet Piromyou¹, Nantakorn Boonkerd¹, Eric Giraud^{5*}, Neung Teaumroong^{1*}

* Corresponding author: neung@sut.ac.th and eric.giraud@ird.fr

Note: EG and NT contribute equally to this work

Supplementary Tables

Table S1 Plants tested in this study

Tribes	Plants tested	Source or references
Gienistioid	<i>Crotalaria juncea</i>	Nakhon Rathasima, Thailand
Derbergioid	<i>Aeschynomene americana</i>	Nakhon Rathasima, Thailand
	<i>Aeschynomene afraspera</i>	LSTM, IRD, France
	<i>Arachis hypogaea</i> cv. Thai Nan	Nakhon Rathasima, Thailand
	<i>Stylosanthes hamata</i>	Nakhon Rathasima, Thailand
Millettioid	<i>Macroptilium atropurpureum</i>	Nakhon Rathasima, Thailand
	<i>Indigofera tinctoria</i>	Nakhon Rathasima, Thailand
	<i>Vigna radiata</i> cv. SUT4	Nakhon Rathasima, Thailand
	<i>Desmodium tortuosum</i>	Nakhon Rathasima, Thailand
Non-leguminous plant	<i>Oryza sativa</i> L. cv. Pathum Thani1	Department of Agriculture, Thailand

Table S2 List of putative Nop effectors and *tts*-boxes identified in *Bradyrhizobium* DOA9 strain

Gene ID ^a	Replicon ^b	Protein homology ^c	Upstream <i>tts</i> -box sequence ^d	Characteristics of proteins ^e
<i>WP_025038413</i>	P	NopBI (K)	ni.	put. kinase Y4dM (HipA-like protein)
<i>WP_025038507</i>	P	NopAS (K)	ni.	put. panB
WP_042337156	P	put. new Nop	TB1. GTCAG CATCTCG TAAG TTGACCGAGTA	C-terminal C48 (SUMO) peptidase domain
GAJ37770	P	NopAC (S)	ni.	put. endo-polygalacturonase
GAJ37771	P	NopAD (K)	ni.	put. pectinesterase
WP_025038647	P	NopAC (S)	ni.	put. endo-polygalacturonase
WP_025038801	P	NopBW (S)	TB2. GTCAG CCAACCG TCAG CCAGGCGGCCTA	unknown
WP_042337078	P	NopC (S)	TB3. GTCAG CTTGT CGAAAG CTAATACTTGCA	secreted effector
WP_082848019	P	NopA (S)	TB3.	T3SS pili component
WP_025038808	P	NopAL (K)	TB3.	unknown
WP_025038811	P	NopX (S)	TB4. GTCAG CTTTTGG AAAG CTAATCGAACCT	NoIX : T3SS translocon
GAL91145	P	NopL (S)	TB5. GTCAG CTTTT CGAAAG CGACTGCTGCCA	secreted effector
GAJ38008	P	NopB (S)	TB6. GTCAG TTTTTGG TCAG CTTGTCTCTA	T3SS pili associated Nop
WP_025038820	P	RhcT	TB7. GTCAG CTTATCG AAAG CTCGCCTCACCA	T3SS minor apparatus component
WP_025038828	P	put. new Nop	TB8. GTCAG CTTCAAG TCAG GTTAGAACAGTA	C-terminal C48 (SUMO) peptidase domain
WP_025038834	P	NopT (S)	TB9. GACAG CTTGCCG TCAG CTTGGCCAAGTA	cysteine protease - secreted effector
GAJ38044	P	NopP (S)	TB10. GTCAG GCTCCGG ACAG CTAAGCTGTCTA	secreted effector
GAJ38051	P	put. new Nop	TB11. GTCAG CCCTGCG TCAG GCTGCAACGGTA	C-terminal C48 (SUMO) peptidase domain
<i>WP_025034134</i>	C	NopAF (K)	TB12. GTCAG TTTGT CGTCA GTGTGCCGGGTA	put. transpeptidase
<i>WP_025033944</i>	C	NopBH (K)	ni.	put. aminopeptidase
<i>WP_025035848</i>	C	NopBH (K)	ni.	put. aminopeptidase
<i>WP_025037732</i>	C	NopAE (K)	TB13. GTCAG GT TTCCG TC AG GTGACCGCCGAC	put. quinoprotein ethanol dehydrogenase
<i>WP_025037734</i>	C	NopAQ (K)	TB13.	put. ABC transporter periplasmic binding protein
<i>WP_025037995</i>	C	NopAV (K)	ni.	put. carboxylesterase

^a in italics, these candidate genes are considered as doubtful because homologs are also found in *Bradyrhizobium* strains lacking a T3SS. ^b P, genes located on the plasmid; C, genes located on the chromosome. ^c (S) and (K) are used to indicate that Nop names were attributed according to the nomenclature used in the publication of Staehelin and Krishnan, 2015 (S) and Kimbrel *et al.*, 2013 (K); put. indicated putative; ^d in bold are indicated the nucleotides that are conserved with the consensus *tts*-box motif described in Zehner *et al.*, 2008. ni., *tts*-boxes not identified in the upstream region of the gene; ^e put. indicated putative.

Table S3 Total plant dry weight (mg) of all plants tested after inoculated with *Bradyrhizobium* sp. DOA9 and mutant $\Omega rhcN$ strain

Tested plants / strains		Total plant dry weight (mg)		
		Control ¹	DOA9	$\Omega rhcN$
Genistoid	<i>C. juncea</i>	169±20 ab ²	152±4.9 a	196±38.3 b
Dalbergioid	<i>A. americana</i>	13.1±2.2 a	67.4±4.9 b	53.6±9.9 b
	<i>A. afraspera</i>	54.4±7.9 a	78.2±6.9 b	79.2±2.8 b
	<i>A. hypogaea</i>			
	cv. Thai Nan	1200±219 a	2112±330 b	1779±248 b
	<i>S. hamata</i>	5.0±0.6 a	7.8±1 c	6.4±1.1 ab
Millettioid	<i>M. atropurpureum</i>	55.9±3.2 a	59.2±3.1 a	60.2±5.6 a
	<i>I. tinctoria</i>	5.1±0.6 a	5.1±0.7 a	5.0±0.8 a
	<i>V. radiata</i> cv. SUT4	45.6±9.0 a	47.2±9.3 a	45.6±13.4 a
	<i>D. tortuosum</i>	6.5±1.2 a	6.3±1.1 a	7.3±1.1 a

Values are shown as Mean±SD of at least triplicates, ¹ : uninoculation control, ² a-d means in a column followed by the same letter are not significantly different by Duncan's multiple range test at the 5% ($p \leq 0.5$), ³ means not observed in this study.

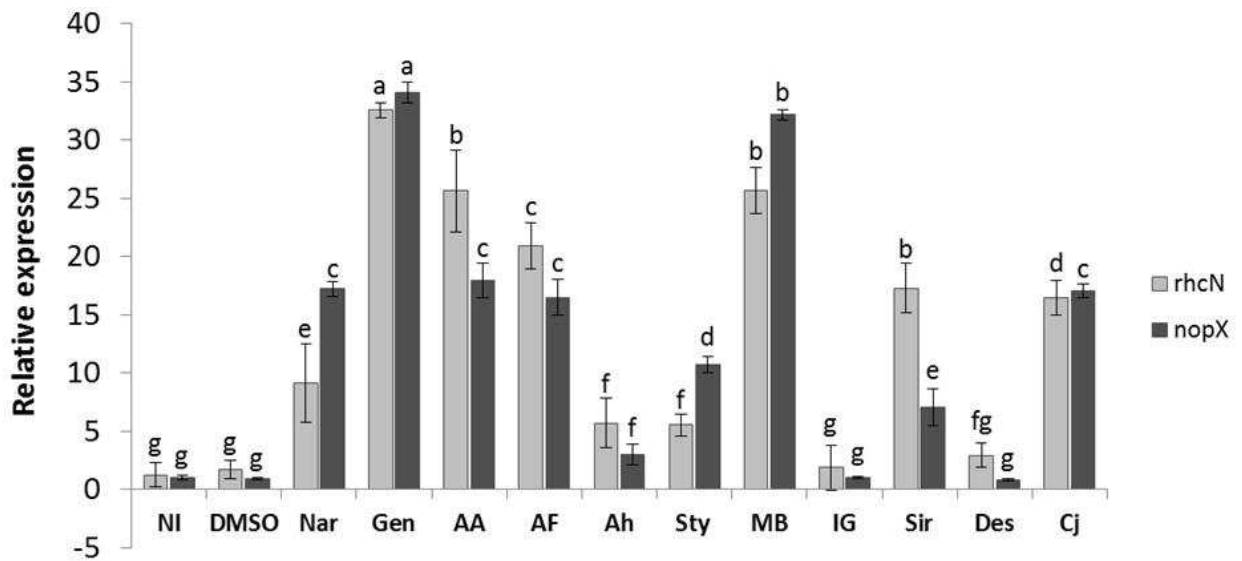


Figure S1 The relative expression of *rhcN* and *nopX* genes of *Bradyrhizobium* sp. DOA9 (WT) after induction with Nar = Naringenin, Gen = Genistein. DMSO and sterilized BMN medium (NI) were used as negative control. The root exudates from legumes were indicated as AA = *A. americana*, AF = *A. afraspera*, Sty = *S. hamata*, Ah = *A. hypogaea* cv. Thai Nan, MB = *V. radiata* cv. SUT4, Ig = *I. trinctoria*, Sir = *M. atropurpureum* (siratiro), Des = *D. tortuosum* and Cj = *C. juncea*. The level of expression was measured by using qRT-PCR. Values represent mean \pm SD (n = 3). Within treatment, means labeled with different letters are statistically different at $P < 0.05$.

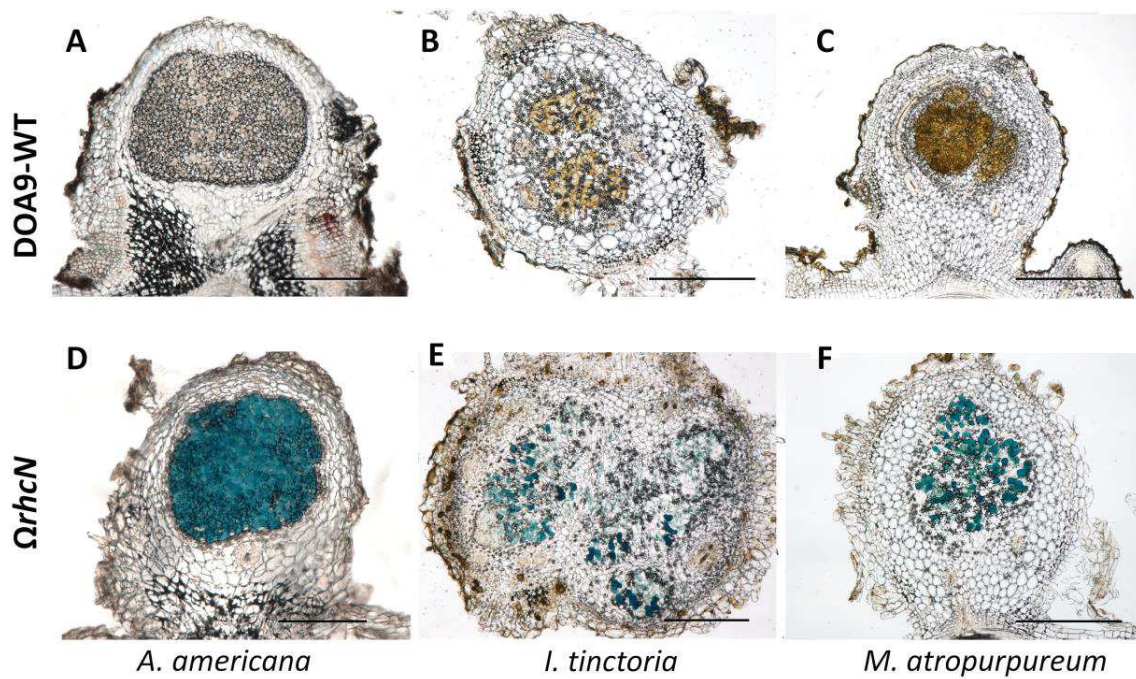


Figure S2 T3SS genes of DOA9 strain are expressed in mature nodules (14 dpi) of various species. Expression of the *gusA* reporter gene inserted in *rhcN* revealed on 40- μ m nodule sections stained with X-Gluc after 3 h of incubation. A, B and C nodules elicited by DOA9 wild type; D, E and F by *rhcN* mutant strain ($\Delta rhcN$). Scale bars are 500 μ m.

Symbiotic properties of a chimeric Nod-independent photosynthetic *Bradyrhizobium* strain obtained by conjugative transfer of a symbiotic plasmid

Pongpan Songwattana,¹ Panlada Tittabutr,¹ Jenjira Wongdee,¹ Kamonluck Teamtisong,² Dyah Wulandari,¹ Albin Teulet,³ Joel Fardoux,³ Nantakorn Boonkerd,¹ Eric Giraud³ and Neung Teaumroong¹*

¹School of Biotechnology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, 30000, Thailand.

²The Center for Scientific and Technological Equipment, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand.

³IRD, Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes, UMR 113, IRD/CIRAD/INRA/UM/SupAgro. Campus de Baillarguet, TA-A82/J, 34398 Montpellier Cedex 5, France.

Summary

The lateral transfer of symbiotic genes converting a predisposed soil bacteria into a legume symbiont has occurred repeatedly and independently during the evolution of rhizobia. We experimented the transfer of a symbiotic plasmid between *Bradyrhizobium* strains. The originality of the DOA9 donor is that it harbours a symbiotic mega-plasmid (pDOA9) containing *nod*, *nif* and T3SS genes while the ORS278 recipient has the unique property of inducing nodules on some *Aeschynomene* species in the absence of Nod factors (NFs). We observed that the chimeric strain ORS278-pDOA9* lost its ability to develop a functional symbiosis with *Aeschynomene indica* and *Aeschynomene evenia*. The mutation of *rhcN* and *nodB* led to partial restoration of nodule efficiency, indicating that T3SS effectors and NFs block the establishment of the NF-independent symbiosis. Conversely, ORS278-pDOA9* strain acquired the ability to form nodules on *Crotalaria juncea* and *Macroptillium atropurpureum* but not on NF-dependent *Aeschynomene*

(*A. afraspera* and *A. americana*), suggesting that the ORS278 strain also harbours incompatible factors that block the interaction with these species. These data indicate that the symbiotic properties of a chimeric rhizobia cannot be anticipated due to new combination of symbiotic and non-symbiotic determinants that may interfere during the interaction with the host plant.

Introduction

The rhizobium-legume symbiosis results in the formation of a new organ, the nodule, in which the bacteria fix nitrogen for the plant's benefit and received an exchange carbon sources. This symbiotic process is initiated by a molecular dialogue between the two partners (Lerouge *et al.*, 1990). The key rhizobial signal molecules are lipochitooligosaccharides (LCOs) named Nod factors (NFs) that are synthesized by enzymes encoded by nodulation (*nod*) genes, which are expressed in response to a specific spectrum of plant flavonoids. Their perception by plant LysM-receptors coordinates two distinct programs: nodule organogenesis and bacterial infection, called the NF-dependent symbiotic process (Oldroyd, 2013). Besides NFs, other bacterial determinants including surface polysaccharides (LPS, EPS or KPS) are important for the initial attachment of the bacteria to the root surface and/or the suppression of the plant immunity (for a review, see Poole *et al.*, 2018).

In addition, some rhizobia use a type 3 Secretion System (T3SS) to deliver into the host plant cell, effector proteins that interfere with the plant immune system (Staehelin and Krishnan, 2015). Depending on the host plant, these effectors can play a positive, negative or neutral roles on the symbiosis. They can promote the bacterial infection and nodulation by repressing specific plant defence responses activated after recognition of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), or by opposite, they can render the interaction incompatible if they are recognized by plant immune receptors [resistant (R) proteins] leading to the activation of effector-triggered immunity (ETI) (Yang *et al.*, 2010; Jiménez-Guerrero *et al.*, 2015; Yasuda *et al.*, 2016; Sugawara *et al.*, 2018).

These different key symbiotic genes as well as the *nif* and *fix* genes necessary for nitrogen fixation are generally clustered in the same DNA region either on a plasmid named

Received 12 December, 2018; revised 23 March, 2019; accepted 7 May, 2019. *For correspondence. E-mail eric.giraud@ird.fr; Tel. +33-467593783; Fax. +33-467593802. E-mail neung@sut.ac.th; Tel. (+66) 44 223389; Fax (+66) 44 216345 †These authors have contributed equally to this work.

the symbiotic plasmid or on the chromosome. This cluster of 'symbiotic-toolkit' genes can be transferred between different bacteria in the soil by horizontal gene transfer, explaining why rhizobia do not form a monophyletic group but rather a large polyphyletic group including 12 genera of α - and β -proteobacteria intermixed with saprophytes and pathogens (Masson-Boivin *et al.*, 2009).

Photosynthetic bradyrhizobia, which include the ORS278 and BTAi1 strains, are unique among rhizobia. While these bacteria are able to induce the formation of efficient nitrogen fixing nodules on the roots and stem of some tropical legumes belonging to the *Aeschynomene* genus, no hallmark of a symbiotic island has been identified in their genomes (Giraud *et al.*, 2007). These bacteria lack the canonical *nodABC* genes necessary for the synthesis of NFs as well as a T3SS gene cluster (Giraud *et al.*, 2007; Okazaki *et al.*, 2016). Their host spectrum is extremely limited, as it is restricted to a monophyletic clade of *Aeschynomene* plants that encompasses 19 species including *A. indica* and *A. evenia* (Chaintreuil *et al.*, 2018). Despite direct and reverse genetic approaches used on the bacterial partner, the 'Non-Nod' signal molecules that enable the triggering of this alternative symbiotic process called the 'NF-independent symbiotic process' remain unknown.

Interestingly, some photosynthetic *Bradyrhizobium* strains do contain *nod* genes and displayed a broader host range (Chaintreuil *et al.*, 2001). Sequence genome analysis of one of these strains, the strain ORS285, revealed the presence of a genomic island of 262-kb harbouring *nod* and T3SS genes that are absent in the other photosynthetic strains (ORS278 and BTAi1) and that displayed all the hallmarks of acquisition by lateral transfer (lower GC content than the one of the chromosome, different codon usage and a high concentration of transposases and insertional sequences that are typical features of symbiotic islands) (Gully *et al.*, 2017). Thanks to the acquisition of this symbiotic island, this strain acquired the ability to synthesize NFs whose structures are very close to the ones produced by *Bradyrhizobium diazoefficiens* (Renier *et al.*, 2011). This event confers to this strain the ability to induce nodules on some NF-dependent *Aeschynomene* species such as *A. afraspera* but also on soybean (Giraud *et al.*, 2013). It is noteworthy that the mutation of *nodB* aborts the nodulation on *A. afraspera* but not on *A. indica* and *A. evenia* (Bonaldi *et al.*, 2011; Giraud *et al.*, 2007). Furthermore, the inactivation of the T3SS has an impact on NF-dependent symbiosis but not on NF-independent symbiosis (Okazaki *et al.*, 2016).

The non-photosynthetic *Bradyrhizobium* strain sp. DOA9 is also original among bradyrhizobia. It is the only *Bradyrhizobium* strain in which the classical symbiotic genes (*nod*, *nif*, *fix* and T3SS) are harboured on a mega plasmid (named pDOA9), in the other *Bradyrhizobium* strains, these genes are generally clustered on a genomic island (Okazaki *et al.*, 2015). This strain, which is phylogenetically distant to

the photosynthetic bradyrhizobia, was isolated from a paddy field using *A. americana* as a trap plant (Noisangiam *et al.*, 2012). This *A. americana* species uses a classical NF-dependent symbiotic process. Interestingly, the DOA9 strain has a wide host spectrum, it can nodulate legume species belonging to Dalbergioid, Millettoid and Genistoid tribes but not the Nod-independent *Aeschynomene* clade (Teamtisong *et al.*, 2014) indicating that it lacks the symbiotic genetic toolkit required for Nod-independent symbiosis.

Taken together, these few examples highlight the diversity of the mechanisms used by bradyrhizobia to interact symbiotically with legumes. The Supporting Information Table S1 summarizes the main feature and symbiotic properties of the different strains previously pointed out.

In this study, we took advantage of the presence of a symbiotic plasmid in the DOA9 strain to examine the impact of its conjugative transfer on the symbiotic properties of the ORS278 strain. The questions to which we wanted answers were the following: Does this simple genetic transfer confer the ability of the chimeric bacteria generated to use either an NF-dependent or an NF-independent symbiotic process, depending on the host plant? Does the transfer of the symbiosis genes involved in the NF-dependent process interfere positively or negatively in the NF-independent one and if so, what are the genetic determinants? To answer these questions, we examined the symbiotic properties of a ORS278 transconjugant strain containing the pDOA9 plasmid using a variety of legume species (some NF-independent *Aeschynomene* species and some NF-dependent plant hosts of the DOA9 strain), and by analysing the impact of the mutation of some symbiotic determinants found on pDOA9 during these plant interactions.

Results

Transfer of pDOA9 into ORS278 strain

To transfer the pDOA9 plasmid from DOA9 into ORS278 strain, we first constructed a derivative plasmid annotated pDOA9* in which the non-replicative plasmid pK18mob-sacB-Cefo^r was introduced in an intergenic region of pDOA9, the Cefo^r resistance gene being used for the selection of ORS278 transconjugants. This construct was transferred into ORS278 by conjugation, and an ORS278 transconjugant containing pDOA9* (annotated as ORS278-pDOA9*) was selected, as described in Experimental procedure section.

To confirm that pDOA9* was completely transferred into the ORS278 strain, the genomic DNA of ORS278-pDOA9* was analysed by PCR. For this purpose, primers were designed from representative symbiotic genes (*nodA*, *nodB*, *nodD2*, *rhcN* and *nifD*) and other genes located surround pDOA9 (*repA*, *moeB*, *trbG*, *hupK* and GAJ38051 encoding a putative T3SS effector) (Fig. 1B). As shown in Fig. 1A, no

PCR band was obtained for the ORS278-WT strain while a PCR product for all the selected gene markers was amplified for ORS278-pDOA9* indicating a complete transfer of the pDOA9 plasmid.

To confirm that in ORS278-pDOA9*, the transferred plasmid formed an autonomous replicon not integrated into the chromosome, the genomic DNA was further analysed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). As shown in Fig. 1C, the genomic profile of ORS278-pDOA9* (lane 4) was similar to that of DOA9 (lane 1), it displayed an additional DNA band at 0.7 Mbp corresponding to the pDOA9 size, a band that was absent in the ORS278-WT (lane 3).

Finally, we analysed the stability of the pDOA9 plasmid in ORS278-pDOA9*. For this purpose, the transconjugant was cultured for 1 week in a liquid medium in the absence of antibiotic selection and then spread on YEM-agar medium. After growth, 100% of the colonies were able to grow when cefotaxime antibiotic was applied and amplified a specific gene marker of pDOA9.

Taken together, these data show for the first time the possibility of a conjugative transfer of a symbiotic plasmid between *Bradyrhizobium* strains and its stable maintenance in the recipient strain.

The transfer of the symbiotic pDOA9 plasmid into ORS278 strain interferes with the establishment of the NF-independent symbiosis

The symbiotic properties of the chimeric ORS278-pDOA9* strain were first analysed on the NF-independent *Aeschynomene* species (*A. indica* and *A. evenia*) at 21 days post

(dpi) inoculation. Unexpectedly, while the ORS278-WT strain elicited the formation of perfectly functional nodules in these two *Aeschynomene* species, ORS278-pDOA9* was drastically impaired in symbiosis (Fig. 2 and Supporting Information Fig. S1). The chimeric strain produced more nodules, but the nodules were smaller and did not fix nitrogen (Fig. 2B and C; Supporting Information Fig. S1B and C). Cytological analysis showed that the nodules elicited on these two plant species were either necrotic, with the accumulation of brownish compounds, or that the central tissue was completely digested (Fig. 2G and H; Supporting Information Fig. S1G and H). These symptoms recall plant defence reactions and/or the triggering of a senescence program, suggesting that some genetic determinants present on the pDOA9 plasmid render incompatible the symbiotic interaction.

To better understand at which step of the symbiotic process the chimeric ORS278-pDOA9* strain was blocked, early observations at 4 and 8 dpi were also done on *A. indica*. At 4 dpi, no major differences could be observed between the plants inoculated with WT or the ORS278-pDOA9* strains. In both cases, first young nodules, systematically found at the emergence of lateral roots, could be observed (Supporting Information Fig. S2A and E). The nodules formed by ORS278-pDOA9* strain displayed a similar size and the same aspect of the WT nodules with the presence of a central infected tissue and the absence of necrotic areas (Supporting Information Fig. S2B, C, F, and G). Confocal microscopy observation after live–dead staining of nodule sections confirmed the presence of intracellular bacteria in both nodules but while the bacterial population was high in host cells infected by the WT strain (Supporting Information Fig. S2D),

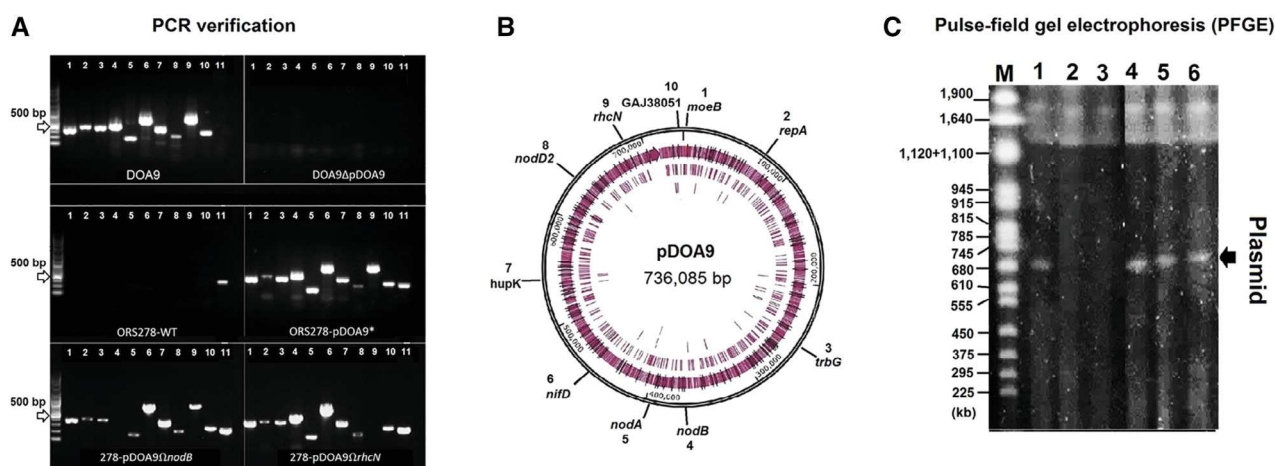


Fig. 1. Conjugative transfer of pDOA9 into ORS278 strain; PCR verification (A) and PFGE (C) of *Bradyrhizobium* sp. DOA9, DOA9ΔpDOA9, ORS278-WT, ORS278-pDOA9*, 278-pDOA9ΔnodB and 278-pDOA9ΔrhcN genomic DNA. (A) The target genes, position and size of PCR product from genes 1 to 11 are listed in the Supporting Information Table S3. PCR products from each tested strains were observed on 1% agarose gel. The PCR products from 1 to 10 correspond to marker genes of pDOA9, the location of which is indicated on the pDOA9 circular plasmid map. (B) The PCR product in line 11 corresponds to the amplification of the *bchL* gene which is specifically found on the ORS278 chromosome. This PCR product is used as a chromosome marker of ORS278-WT and the various chimeric strains (ORS278-pDOA9*, 278-pDOA9ΔnodB, 278-pDOA9ΔrhcN). (C) Genomic DNA of all tested strains was separated by PFGE with 1% certified megabase agarose in 1x TAE buffer to separate fragments of 225–1900 kb. Closed arrowhead indicates the pDOA9 plasmid (0.7 Mbp). Lane M: *Saccharomyces cerevisiae* chromosome PFG marker DNA ladder, lanes 1–6: followed by genomic DNA from DOA9, DOA9ΔpDOA9, ORS278-WT, ORS278-pDOA9*, 278-pDOA9ΔnodB and 278-pDOA9ΔrhcN respectively.

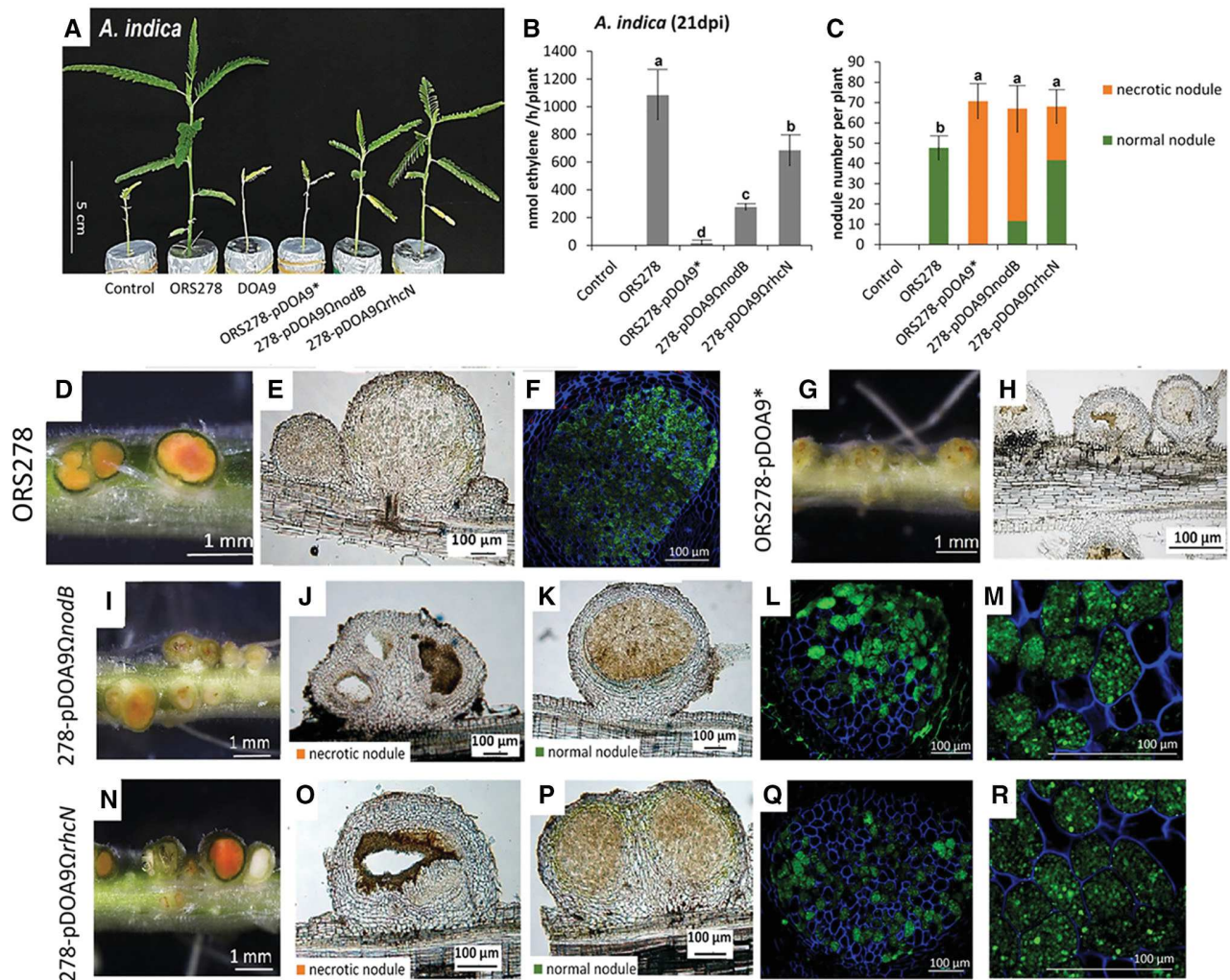


Fig. 2. Symbiotic properties of *Bradyrhizobium* sp. ORS278 and its various chimeric derivatives (ORS278-pDOA9*, 278-pDOA9ΩnodB and 278-pDOA9ΩrhcN) on *A. indica*. A. Comparison of the growth of the plants (aerial part) at 21 days post-inoculation (dpi). B. Acetylene-reducing activity (ARA) in *A. indica* nodules. C. Number of nodules per plant. For (B and C), values represent mean \pm SD ($n = 5$). Within treatment, means labelled with different letters are statistically different at $p < 0.05$. D–R. Cytological analysis of the nodules elicited by ORS278 (D–F), ORS278-pDOA9* (G, H), 278-pDOA9ΩnodB (I–M) and 278-pDOA9ΩrhcN (N–R). Confocal microscopy images showing the bacterial colonization of normal nodules elicited by ORS278 (F), 278-pDOA9ΩnodB (L, M) and 278-pDOA9ΩrhcN (Q, R), in green (bacteria tagged with GFP), in blue (plant cell wall revealed by calcofluor).

only a few bacteria could be detected in the nodules formed by ORS278-pDOA9* strain (Supporting Information Fig. S2H). At this step, in both cases, the bacteria were rod shaped and coloured in green by Syto9 suggesting that they were alive even in the case of ORS278-pDOA9* (Supporting Information Fig. S2D and H). At 8 dpi, drastic differences were observed between the nodules elicited by the WT and the ORS278-pDOA9* strains. The WT nodules were larger and the central tissue was infected by bacteria differentiated in large spherical bacteroids as previously described (Bonaldi *et al.*, 2011), while the nodules elicited by ORS278-pDOA9* started to display large necrotic zones (Supporting

Information Fig. S2Q–W). In these zones, plant cells were completely collapsed and the few observed bacteria displayed a rod shape indicating that the differentiation process did not occur (Supporting Information Fig. S2X). Furthermore, the bacteria were stained red by PI indicating that they were dead (Supporting Information Fig. S2X).

These observations showed that the transfer of the pDOA9 in ORS278 strain do not interfere in the first steps of the symbiotic process with NF-independent *Aeschynomene* species (nodule organogenesis and infection) but rapidly when the bacteria are internalized in host cells, some determinants harboured by the pDOA9 plasmid elicit plant defence

reactions which result in the blocking of the endosymbiont proliferation and the nodule development.

Both nod and T3SS genes present on pDOA9 interfere negatively in the establishment of the NF-independent symbiosis

Since the injection of some rhizobial effectors has been shown to provoke an hypersensitive response in some legumes (Stahelin and Krishnan, 2015; Yasuda *et al.*, 2016), we hypothesized that the T3SS genes present on the pDOA9 plasmid could be responsible for the symbiotic impairment of the ORS278-pDOA9* strain. Another hypothesis is that in the unusual context of the NF-independent *Aeschynomene* species, the NF signal, whose backbone corresponds to chitin, could be recognized as PAMPs eliciting plant defence reactions, i.e. the *nod* genes present on pDOA9 are the genetic determinants responsible for this incompatibility. To test these two non-exclusive hypotheses, we constructed two pDOA9 derivatives (pDOA9 Ω *nodB* and pDOA9 Ω *rhcN*) in which either the synthesis of the NF genes or the functioning of the T3SS machinery was altered. These two plasmids were also successfully transferred into the ORS278 strain (Fig. 1A–C) and the symbiotic properties of the two corresponding transconjugants (278-pDOA9 Ω *nodB* and 278-pDOA9 Ω *rhcN*) were tested on *A. indica* and *A. evenia* plants. As shown in Fig. 2A–C and Supporting Information Fig. S1A–C, we observed a partial rescue of the symbiotic properties of these two transconjugant strains with a higher recovery rate by the 278-pDOA9 Ω *rhcN* strain. Indeed, in both mutants, we observed the formation of a mixture of nodules, some displaying the same symptoms of necrosis or digestion of the central tissue, others resembling WT-nodules that accumulate leghemoglobin (Fig. 2D–E, I–K, and N–P and Supporting Information Fig. S1D–E, I–K, and N–P). The proportion of these last types of nodules was higher in plants inoculated with 278-pDOA9 Ω *rhcN* correlated with a higher level of nitrogen fixation and plant growth (Fig. 2B and C and Supporting Information Fig. S1B and C). Although the green fluorescent protein (GFP) signal was very low, confocal analysis of the WT-like nodules elicited by 278-pDOA9 Ω *rhcN* and 278-pDOA9 Ω *nodB* confirmed that these nodules were occupied by GFP-bacteria thereby excluding the possibility that the nodules were formed by the ORS278 strain that had lost the pDOA9 plasmid (Fig. 2L, M, Q, and R; Supporting Information Fig. S1 L, M, Q, and R).

Observations also done at early stage (4 and 8 dpi) on *A. indica* showed that the 278-pDOA9 Ω *rhcN* mutant almost behaves as the WT strain (Supporting Information Fig. S2A–D, M–P, Q–T, AC–AF), the only difference observed was the presence of some localized necrotic areas detected on few nodules at 8 dpi (Supporting Information Fig. S2 AD–AF). In contrast, the nodules elicited by the 278-pDOA9 Ω *nodB* were more drastically affected (Supporting Information Fig. S2I–L,

Y–AB), the bacteria proliferation inside the host cells at 4 dpi was less important (Supporting Information Fig. S2L) and large necrotic zones in more than a half of the nodules observed could be detected at 8 dpi (Supporting Information Figure S2AZ–AB).

Taken together, these data suggest that several genetic determinants harboured by the pDOA9 plasmid hindered the establishment of the chimeric ORS278-pDOA9* strain with Nod-independent *Aeschynomene* species. Some T3SS effector(s) translocated in the host cell are most probably the main factor(s) blocking the intracellular bacteria proliferation due to the elicitation of plant defence reactions, but more surprisingly, the NFs synthesized by the transconjugant strain was also able to negatively interfere in the symbiosis.

The transfer of pDOA9 into the ORS278 strain partially confers the ability to nodulate some NF-dependent legume species

We next addressed the question whether the transfer of pDOA9 into the ORS278 strain could extend the host spectrum of the bacteria to species that require NF-signalling. For this purpose, we tested the ability of the various ORS278-pDOA9* chimeric strains in seven legume species belonging to different clades that are normally nodulated by the DOA9 strain (Table 1). The first unexpected result was that the ORS278-WT strain was able to induce the formation of nodule-like structures in *Stylosanthes hamata* (Fig. 3E and F). To the best of our knowledge, this is the first report of a legume species outside the *Aeschynomene* group found to be nodulated by this strain. However, cytological analysis showed that these nodules did not have central infected tissue, indicating that only the nodule organogenesis program was activated during the interaction (Fig. 3F). Other chimeric ORS278 strains (ORS278-pDOA9*, 278-pDOA9 Ω *rhcN* and 278-pDOA9 Ω *nodB*) were not able to proceed further in the symbiotic process with *S. hamata* (Fig. 3A, B, and G–J). In all cases, the number of nodules formed per plant was low (around one or two nodules/plant) and no bacterial infection and nitrogenase activity were detected (Fig. 3A and B).

The second unexpected result was that the transfer of pDOA9 into ORS278 strain did not result in the formation of nodules in the two NF-dependent *Aeschynomene* species (*A. afraspera* and *A. americana*). The transconjugant behaved like the ORS278-WT strain, no plant response, e.g. induction of bumps, was detected (Table 1). This result is even more unexpected considering that ORS278-pDOA9* was able to induce the formation of nodules or nodule-like structures in two legumes species that are phylogenetically distant (*Crotalaria juncea* and *Macroptilium atropurpureum*) (Table 1 and Fig. 3K–AC). In these two cases, the triggering of nodulation was definitely under the control of NFs because the transconjugant 278-pDOA9 Ω *nodB* was unable to induce nodules (Table 1, Fig. 3K and T). It is to note that in the case of

Table 1. Symbiotic properties of *Bradyrhizobium* ORS278 and DOA9 strains and their derivatives on various legume species.

Tribes	Plant species	Symbiotic characteristics ^a							
		DOA9			ORS278				
		WT	pDOA9 Ω nodB	pDOA9 Ω rhcN	Δ pDOA9	WT	+pDOA9	+pDOA9 Ω nodB	+pDOA9 Ω rhcN
GENISTOID	<i>C. juncea</i>	Nod+/inf-	Nod-	Fix+	Nod-	Nod-	Nod-	Nod-	Nod+/inf-
	<i>A. americana</i>	Fix++	Nod-	Fix++	Nod-	Nod-	Nod-	Nod-	Nod-
	A. afraspera	Fix++	Nod-	Fix++	Nod-	Nod-	Nod-	Nod-	Nod-
DALBERGIOD	<i>A. indica</i>	Nod-	Nod-	Nod-	Nod-	Fix++	Fix++	Fix++	Fix++
	<i>A. evenia</i>	Nod-	Nod-	Nod-	Nod-	Fix++	Fix++	Fix++	Fix++
	<i>A. hypogea</i>	Fix++	Nod-	Fix++	Nod-	Nod-	Nod-	Nod-	Nod-
	<i>S. hamata</i>	Fix++	Nod-	Fix++	Nod-	Nod+/inf-	Nod+/inf-	Nod+/inf-	Nod+/inf-
MILLETTIOD	<i>M. atropurpureum</i>	Fix+	Nod-	Fix+	Nod-	Fix+	Fix+	Fix-	Fix-
	<i>V. radiata</i>	Fix-	Nod-	Fix+	Nod-	Fix+	Fix-	Nod-	Nod-

a. Symbiotic characteristics indicate (Nod-: no nodule forming; Nod+/inf-: pseudonodules or non-infected nodules; Fix-: nodules with no nitrogenase activity; Fix+: nodules with a low nitrogenase activity; Fix++: nodules with a high nitrogenase activity).

M. atropurpureum, the number of nodules formed by ORS278-pDOA9* was very low (only one or two nodules observed in a total of 10 plants) (Fig. 3T). However, in contrast to *C. juncea*, the nodules elicited did have central infected tissue, suggesting that in this case, the symbiotic process could go further (Fig. 3T and AA). These nodules nevertheless remained inefficient because no nitrogenase activity was detected (Fig. 3U). Similar observations were made with the transconjugant 278-pDOA9 Ω rhcN (Fig. 3T, U, and AC).

In the two other species tested (*Arachis hypogea* and *Vigna radiata*), no effect of the transfer of the pDOA9 plasmid was observed, the transconjugant ORS278-pDOA9* remained unable to form nodules like the ORS278-WT strain (Table 1).

Taken together, these observations indicate that the transfer of pDOA9 into ORS278 can positively interfere with the symbiotic properties of the strain but in the seven species tested, even if a gain was observed, it was only partial, pointing to either lack of an important symbiotic determinant or the presence of incompatible factor(s) in the recipient strain.

The curing of pDOA9 in DOA9 strain does not confer the ability to nodulate NF-independent Aeschynomene species

Considering the negative impacts of the transfer of pDOA9 plasmid on the ability of ORS278 strain to develop a NF-independent symbiosis, we wanted to see whether the inability of the DOA9 strain to nodulate *A. indica* and *A. evenia* species was due to conflicting factors present in pDOA9; in other words, if the genetic toolkit for NF-independent symbiosis is present on the DOA9 chromosome, but it is masked by the acquisition of the pDOA9 symbiotic plasmid that renders the interaction incompatible. Using the suicide *sacB* gene present on the pK18mob-sacB-Cefo^r vector integrated in pDOA9*, we successfully cured the DOA9 strain (Fig. 1A–C). As expected, the cured DOA9 Δ pDOA9 strain lost its ability to nodulate all the species nodulated by the WT-DOA9 strain (Table 1), but at the same time, no nodules were formed in the NF-independent *Aeschynomene* species, suggesting that the genetic program for NF-independent symbiosis is most probably absent on the DOA9 chromosome.

Discussion

The horizontal transfer of the symbiotic-toolkit genes harboured either on a plasmid or a genomic island is a major driving force in the evolution of the rhizobium-legume symbiosis (Marchetti *et al.*, 2010; Sullivan and Ronson, 1998). In this study, we investigated the experimental case of a conjugal transfer of a symbiotic plasmid containing *nod* and T3SS genes between *Bradyrhizobium* strains, the recipient strain, ORS278, which, in addition, displayed the original properties

to develop a NF-independent symbiosis with some *Aeschynomene* species. Interestingly, a parallel can be drawn between this artificial chimeric strain and the photosynthetic *Bradyrhizobium* ORS285 strain which naturally acquired by lateral transfer a symbiotic island containing *nod* and T3SS genes, thus widening its host spectrum to some NF-dependent species. We therefore originally expected that the transfer of the pDOA9 plasmid from the DOA9 to the ORS278 strain would result in a transconjugant also displaying this double symbiotic facets, but this was clearly not the case, as discussed below.

We observed that this acquisition results in a chimeric strain that has lost its ability to form functional nodules on NF-independent *Aeschynomene* (the nodules formed were all

necrotic or senescent). The presence of several incompatible determinants on the pDOA9 plasmid is clearly responsible for the loss of the symbiotic performance of ORS278-pDOA9*. Indeed, the mutation of the *rhcN* gene, which encodes an ATPase that is indispensable for the functioning of the T3SS injectisome, made it possible to partially restore the formation of functional nodules, strongly suggesting that some T3SS effectors activate an ETI when they are translocated in the NF-independent *Aeschynomene* host cells. Most unexpectedly, the mutation of *nodB* also resulted in a partial gain in the formation of efficient nodules, suggesting that the NFs themselves activate plant defence responses that prevent the intracellular bacterial proliferation when they are perceived by the NF-independent *Aeschynomene*. During the conventional

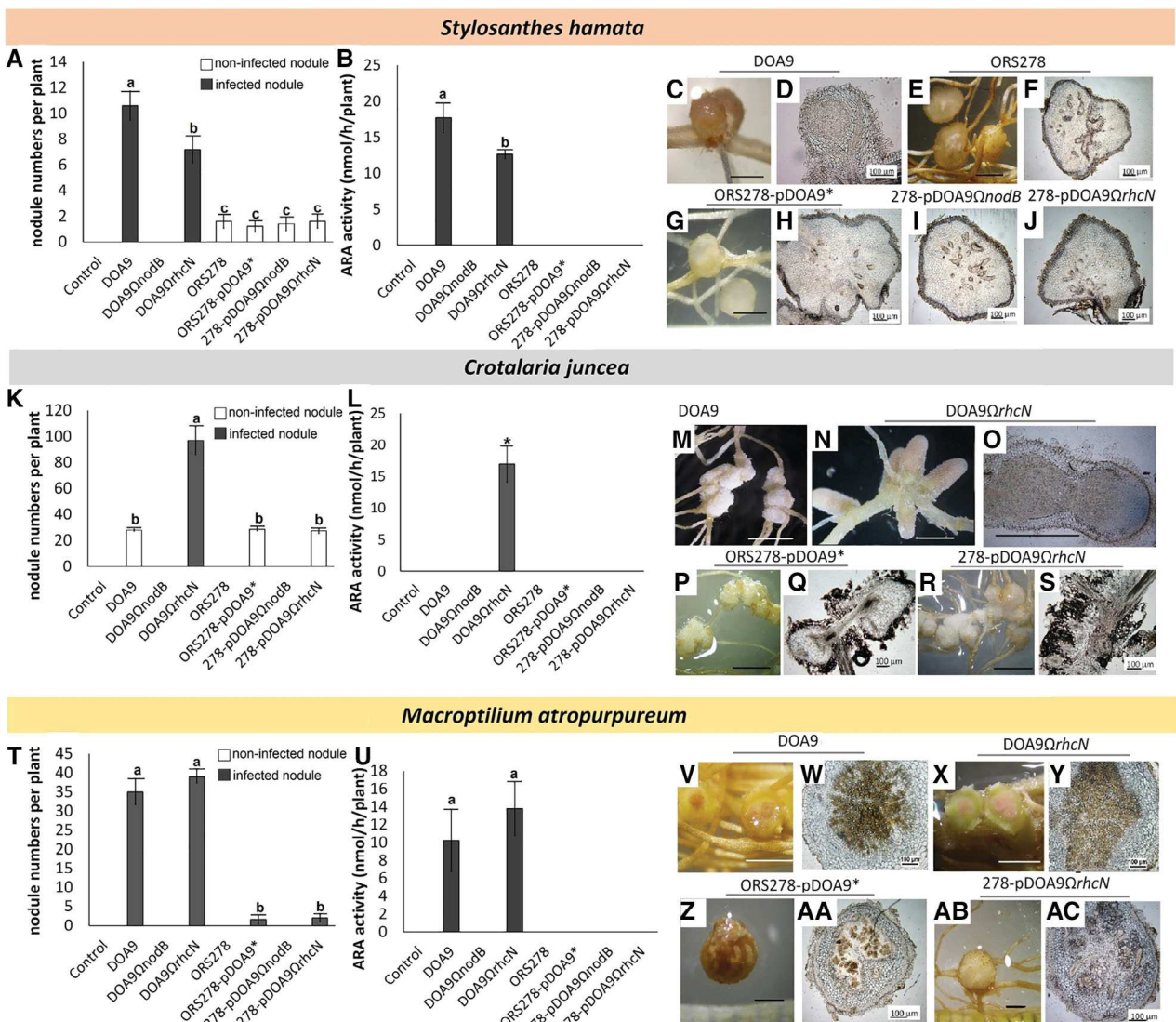


Fig. 3. Symbiotic properties of *Bradyrhizobium* ORS278 and DOA9 strains and their derivatives on *Stylosanthes hamata* (A–J), *Crotalaria juncea* (K–S), and *Macroptilium atropurpureum* (T–AC). A, K, T. Number of nodules per plant at 21 days post inoculation (dpi). B, L, U. Acetylene-reducing activity (ARA) in nodules. C–J, M–S, and V–AC. cytological analysis of the nodules. The scale bar in pictures C, E, G, M–P, R, V, X, Z, and AB indicates 1 mm and in pictures D, F, H–J, Q, S, W, Y, AA and AC indicates 100 μm.

rhizobium-legume interaction, many genes involved in plant defence responses are strongly induced during the early stages of infection but subsequently downregulated during the nodule formation (Kouchi *et al.*, 2004; Lohar *et al.*, 2006). It has been suggested that NFs actively suppress plant immunity (Gourion *et al.*, 2015; Limpens *et al.*, 2003). However, the application of NFs also results in the transient upregulation of defence-related genes (Jardinaud *et al.*, 2016). Considering the ambivalent nature of NFs, i.e. a key symbiotic signal that corresponds to a PAMP chitin oligosaccharide derivative, it is possible that the dual effect of NFs result in their perception via distinct LYSM RLK receptor complexes that can activate symbiosis and/or plant immune response. In the context of the NF-independent *Aeschynomene* species, for which no LYK3 homologue (one of the two LysM receptor involved in NFs recognition) has been found expressed in roots and nodules (Chaintreuil *et al.*, 2016), we can assume that NFs are only recognized as PAMPs.

The most troubling aspect is that *nod* genes and a T3SS gene cluster that interfere negatively in the ability of ORS278-pDOA9* to establish a NF-independent symbiosis are also present on the symbiotic island of the ORS285 strain. The main difference between these two strains could be the cortege of effector or symbiotic genes present in each respective DNA region acquired horizontally but also the time lag after acquisition. In this study, we are at ‘time-zero’ of the acquisition for ORS278-pDOA9*, whereas the event most probably occurred a long time ago in the ORS285 strain. In the interim, one can assume that the ORS285 symbiotic island has evolved, the selective pressure exerted by the host plants and the successive rounds of interaction with them has most probably shaped a compatible strain by inactivating some incompatible determinants either by mutation, deletion or by negative control of their expression. A tblastn search of known bradyrhizobial T3SS effectors revealed an extremely low number on the ORS285 genome with notably the absence *nopL*, *nopT* and *nopP* effector genes encountered in the different *Bradyrhizobium* strains containing a T3SS

including the DOA9 strain characterized to date (Fig. 4). The incompatibility of ORS278-pDOA9* with NF-independent *Aeschynomene* species could therefore result in the presence of one or in a combination of these effectors including some additional effectors specifically found in pDOA9.

Concerning incompatibility due to NFs, we propose that this also occurs with the ORS285 strain but that the strain has evolved specific regulatory mechanisms to avoid NFs synthesis during the interaction with NF-independent *Aeschynomene*. Indeed, when the synthesis of NFs is forced by adding inducible flavonoids in the plant medium culture, this also negatively interferes with the establishment of the NF-independent symbiosis (Nouwen *et al.*, 2016). Furthermore, it has been shown that the flavonoid compositions of root exudates differs markedly in NF-dependent and NF-independent species and that only the exudates from the NF-dependent species induce *Bradyrhizobium* ORS285 *nod* genes (Nouwen *et al.*, 2016). It is therefore tempting to suggest that during evolution of the ORS285 strain, a master regulator NodD, specifically activated by flavonoids of NF-dependent *Aeschynomene* species, has been selected.

The transfer of pDOA9 plasmid into ORS278 did not enhance the ability of the transconjugant ORS278-pDOA9* to nodulate NF-dependent *Aeschynomene*. This result was also unexpected considering that the DOA9-WT strain is able to nodulate these *Aeschynomene* species, suggesting that the strain produces the appropriate NFs able to activate the symbiotic program in these species (Teamtisong *et al.*, 2014). Two non-exclusive hypotheses can be proposed (i) pDOA9 does not harbour all the symbiotic determinants needed for the establishment of the symbiosis and (ii) the recipient strain (ORS278) also includes determinants that are incompatible with NF-dependent *Aeschynomene*. The first assumption does not apply, at least not to the NF symbiotic signal, given that the ORS278-pDOA9* strain is able to initiate the formation of nodules in some distant NF-dependent legumes species (*M. artropurpureum* and *C. juncea*) and that the mutation of *nodB* blocks this capacity. This suggests that

	NopC	NopE	NopL	NopM	NopP	NopT	NopH	NopAA	NopAB	NopAC	NopAD	NopAG	NopAI	NopAH	NopAJ	NopAK	NopAL	NopAM	NopAN	NopAO	NopAR	NopAV	NopAZ	NopBA	NopBC	NopBP	NopBK	NopBL	NopBM	NopBN	NopBO	NopBW	
USDA6	2	2	1	2	3	2	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
USDA110	2	2	1	2	4	2	1	1	1	1	1	2	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
USDA122	2	2	1	2	4	2	1	1	1	1	1	2	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
USDA123	2	2	1	2	4	3	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
USDA124	1	2	1	2	4	2	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
DOA9p	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
ORS285	1	1	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Fig. 4. Diversity of putative type III effectome in seven *Bradyrhizobium* strains. The putative effectors in ORS285 strain were predicted by tblastn search of the genome for known effectors (Nops) identified in rhizobia (Kimbrel *et al.*, 2013; Staehelin and Krishnan, 2015). The putative effectome of USDA6; USDA110; USDA122; USDA123; USDA124 were already predicted by Kimbrel *et al.* (2013) and the one of DOA9 by Songwattana *et al.* (2017). The number of homologous *nop* genes identified in each strain genome is indicated by circles. The genes were considered as *nop* homologues when the percentage of identity was at least 40% over 80% of the length of the protein sequence.

all the determinants needed for NF synthesis are harboured by the plasmid, in agreement with genome sequence analysis. On the other hand, we cannot exclude the possibility that other symbiotic signals, such as EPS/LPS or KPS, may be essential for the infection process during the interaction of DOA9 with NF-dependent *Aeschynomene* species and that the corresponding genes are harboured by the chromosome rather than by the plasmid. The second hypothesis can be also challenged if we consider that the ORS285 strain, which perfectly nodulates NF-dependent *Aeschynomene*, is also a photosynthetic bradyrhizobia. However, although both these strains belong to the same monophyletic group, they are not so close and most probably correspond to two distinct genospecies (Willems *et al.*, 2000 and 2001), each likely to have its own panel of PAMPS that can compromise the interaction. Furthermore, as argued earlier, ORS285 could have evolved since the acquisition of its symbiotic island by inactivating specific incompatible determinants not only on the symbiotic island but also on the chromosome.

To further advance our understanding of what limits the interaction of ORS278-pDOA9* with NF-dependent *Aeschynomene*, it would be interesting to test a Tn5 mutant library of the chimeric strain on plants, this test would be facilitated by the fact that it would be a positive screen, as only the mutant affected in the factor responsible of the incompatibility would be likely to form a nodule. However, this approach would have its limitation if several rather than one factor render the symbiosis incompatible. In this case, the 'experimental evolution' approaches used by Marchetti *et al.* (2010) to evolve a plant pathogen into a legume symbiont after transferring a symbiotic plasmid would be an interesting alternative. At the same time, to be sure that all the key determinants needed for the symbiosis are present on pDOA9, we are currently testing its transfer into another *Bradyrhizobium*, the strain sp. S23321, which is phylogenetically close to *B. diazoefficiens* USDA110, but which is a non-nodulating strain due to the lack of the acquisition of a symbiotic island. Studying different chimeric bacteria with different chromosomal backgrounds that have at some point received the same symbiotic-toolkit genes by testing their symbiotic properties on a diversity of host plants would be an alternative way to identify the mechanisms constraining the interaction or shaping it into a mutualistic symbiosis.

Experimental procedures

Bacterial strains and culture conditions

Supporting Information Table S2 lists the bacterial strains used in this study. *Bradyrhizobium* sp. strains ORS278 and DOA9 were grown in yeast extract-mannitol (YEM) medium (Callow and Vincent, 1971) at 28°C on a rotary shaker at 180 rpm. *Escherichia coli* strains were cultured at 37°C in LB medium (Sambrook *et al.*, 2001). When required, the media

were supplemented with the appropriate antibiotics at the following concentrations: 200 µg ml⁻¹ spectinomycin (Sp), 50 µg ml⁻¹ kanamycin (Km), 20 µg ml⁻¹ nalidixic acid (Nal), and 20 µg ml⁻¹ cefotaxime (Cefo).

Construction of derivative pDOA9 plasmids

To enable the selection of a chimeric ORS278 strain harbouring the pDOA9 plasmid, we first incorporated the non-replicative plasmid pK18mob-sacB carrying the Cefo resistance gene (pK18mob-sacB-Cefo^r) into an intergenic region of pDOA9 (between BRADOA9_v1_p0807 and BRADOA9_v1_p0808 genes) resulting in the plasmid annotated pDOA9*. For this purpose, the npt2-Cefo containing region from pVO155-npt2-Cefo^r plasmid (Okazaki *et al.*, 2016) was isolated after HindIII digestion and subsequently cloned into the HindIII site present in pK18mob-sacB resulting in pK18mob-sacB-Cefo^r. The intergenic region of pDOA9 was then amplified by PCR using the primers: Inter.DOA9p.f (5'-CAGAAGGATCCCTCGAAGGCATCGCTGCCCAAAC-3') and Inter.DOA9p.r (5'-AGAGGGTTCGACCTTGA CAGGGCCGGGTTGATAC-3'). The PCR product (450 bp) was then ligated into pK18mob-sacB-Cefo^r at the BamHI and Sall restriction sites.

For the mutation of *nodB* (chitin deacetylase) and *rhcN* (ATPase of T3SS) present in pDOA9, an internal fragment (287 bp) of *nodB* and (263 bp) of *rhcN* were amplified by PCR using the following primers: *nodB*.D9p.int.f (5'-TGACTCGTCGACGACGCCGCACCTCTTGGATGTTTTAG-3'), *nodB*.D9p.int.r (5'-GTTCCGCTAGAGCCCATAGGGCGCACGTATATG-3'), *RhcN*.D9p.int.f (5'-CATCTCGTCTCGACTCGCAGCAAAGGATGTCGATAC-3') and *RhcN*.D9p.int.r (5'-GAGCATCTAGACCCGACTGACACTTCTGCATG-3'). The PCR products were then ligated into the plasmid pVO155-npt2-Cefo-npt2-gfp (Okazaki *et al.*, 2016) at the XbaI and Sall restriction sites.

All resulting plasmids were electroporated (15 kv cm⁻¹, 100 Ω, and 25 mF) into *E. coli* S17-1 and then transferred into the *Bradyrhizobium* sp. strain DOA9 by bi-parental mating, using the protocol described by Giraud *et al.* (2010). The recombinant strains were selected on YEM medium supplemented with a mixture of Cefo and Nal antibiotics. The mutant strains obtained were annotated as DOA9-pDOA9*, DOA9-pDOA9Ω*nodB* and DOA9-pDOA9Ω*rhcN*.

Transfer of pDOA9 derivatives into ORS278

The pDOA9 derivatives constructed were transferred into *Bradyrhizobium* sp. ORS278 using the conjugation method. To enable selection of ORS278 transconjugants containing the various pDOA9 derivatives as recipient strain, we used a spontaneous spectinomycin resistant mutant of ORS278 (ORS278-sp^r) whose ability to form functional nodules on *A. indica* had previously been shown to remain unaffected

(Giraud, pers. comm.). The plasmid was transferred using tri-parental mating by mixing suspensions of donor cells (DOA9-pDOA9*, DOA9-pDOA9 Ω *nodB*, or DOA9-pDOA9 Ω *rhcn*): recipient ORS278-sp^r: helper (*E. coli* PRK2013) at a ratio of 3:3:1 respectively. Briefly, the bacterial strains were cultured on LB or YEM media as mentioned above. The bacterial cells were then harvested by centrifugation and washed with the YEM or LB medium. The mixed cell solutions were centrifuged at 4000 rpm at 4°C for 15 min and resuspended with 150 μ l of YEM broth, and then dropped on YEM agar and incubated at 30°C for 3 days. The ORS278 transconjugants were selected on YEM medium containing a mixture of three antibiotics (Sp, Km, Cefo and Nal). The ORS278 transconjugants obtained named (ORS278-pDOA9*, 278-pDOA9 Ω *nodB* and 278-pDOA9 Ω *rhcn*) were checked by PCR using 10 pairs of specific primers for genes located on pDOA9 (Supporting Information Table S3) and one pair of primer for a photosynthetic gene (*bchl*) specifically found on the ORS278 chromosome and confirmed by PFGE.

Curing plasmid from DOA9 strain

To select a DOA9 strain in which the pDOA9 plasmid was cured, we took advantage of the *sacB* selectable marker gene introduced into pDOA9*. Briefly, the DOA9-pDOA9* strain was cultured for 5 days at 28°C and then washed with YEM medium. The bacterial suspension was diluted 10 to 1000-fold and spread on YEM supplemented with 10% sucrose. The colonies grown on the medium were re-streaked on new plates and checked by PCR as previously described but also including primers specific to a gene located on DOA9 chromosome as positive control (*nifV*, Supporting Information Table S3). The cured strain named DOA9 Δ pDOA9 was negative for the PCR 1–10 but positive for the PCR of *nifV* gene.

Pulsed-field gel electrophoresis

Bacterial cultures of DOA9, DOA9 Δ pDOA9, ORS278, ORS278-pDOA9*, 278-pDOA9 Ω *nodB* and 278-pDOA9 Ω *rhcn* were cultured in HM medium (Cole and Elkan, 1973) for 7 days at 28°C. DNA plugs for PFGE were prepared using contour-clamped homogeneous electric field (CHEF) Genomic DNA Plug Kits (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) as follows, bacterial cells were collected by centrifugation at 4000 rpm at 4°C for 15 min, washed twice with 0.85% NaCl, and resuspended with cell suspension buffer to obtain an OD 600 of 5. The cell suspension (0.5 ml) was thoroughly mixed with 0.5 ml of 2% CleanCut agarose (Bio-Rad Laboratories) before being transferred into plug moulds. Plugs were solidified at 4°C for 30 min then treated with lysozyme buffer (10 mM Tris, pH 7.2, 50 mM NaCl, 0.2% sodium deoxycholate, 0.5% sodium lauryl sarcosine, 1 mg/ml lysozyme) at 37°C for 4 h and with Proteinase K Reaction Buffer

(100 mM EDTA, pH 8.0, 0.2% sodium deoxycholate, 1% sodium lauryl sarcosine, 1 mg/ml Proteinase K) at 50°C overnight. Plugs were washed with wash buffer (20 mM Tris, pH 8.0, 50 mM EDTA) for 30 min at room temperature under gentle agitation. Genomic DNA plugs were separated on 1% Certified Megabase Agarose (Bio-Rad Laboratories) in TAE buffer. CHEF electrophoresis was conducted at 14°C in a temperature controlled cooling unit using the auto-algorithm mode in the CHEF Mapper gel electrophoresis system (Bio-Rad Laboratories). The gel was stained with ViSafe Red Gel Stain (Vivantis Technologies, USA) for 15 min and then observed under UV illumination (ChemiDoc™ XRS system; Bio-Rad).

Evaluation of plasmid stability

The bacterial strains (ORS278-pDOA9*, 278-pDOA9 Ω *nodB* and 278-pDOA9 Ω *rhcn*) were cultured in YEM medium for 1 week with no antibiotic selection. The bacterial cells were harvested and washed with YEM medium. A 10-fold dilution series of the bacterial suspension was then performed and spread on YEM agar with no antibiotic selection. From these plates, 200 colonies each were transferred onto selective (YEM with 20 μ g ml⁻¹ Cefo) and non-selective plates to determine the frequency of plasmid loss based on the percentage of cefotaxime-sensitive colonies. Additionally, 100 colonies each were randomly checked by PCR using the primers repA.D9p.f and repA.D9p.r (Supporting Information Table S3) that are specific to the pDOA9 plasmid.

Plant nodulation and symbiosis analysis

The plants tested in this study are listed in the Supporting Information Table S4. *Aeschynomene* and other legume seeds were sterilized and germinated as described in the studies by Bonaldi *et al.* (2011) and Teamtisong *et al.* (2014). The germinated *Aeschynomene* seeds were transplanted into test tubes containing BNM medium (Ehrhardt *et al.*, 1992) and covered with aluminium foil. Seeds of the other legumes were sown in Leonard jars filled with sterilized vermiculite (Somasegaran and Hoben, 1994) and watered with BNM medium. The plantlets were grown under the following controlled environmental conditions: 28°C with a 16-h light and 8-h dark regime at light intensities of 300 μ mol m⁻²s⁻¹ and 70% humidity. Seven days after planting, each seedling was inoculated with 1 ml of a 5-day-old inoculum after washing and adjusting the optical density at 600 nm to 1 (approximately 10⁹ cells mL⁻¹). Twenty-one days after inoculation (dpi), the plantlets were observed and the number of nodules and plant nitrogenase activity were assessed using the acetylene reduction assay (ARA) (Somasegaran and Hoben, 1994). The experiment was carried out in duplicate using five plants per condition.

Cytological analysis of nodules

Fresh nodules were observed under a Leica Microsystems 10447197 EZ4 Stereo Microscope (Leica Nanterre, France). Sections (40–50 µm thick) of fresh nodules were prepared using a VT1000S vibratome (Leica Nanterre, France), and then observed under a compound microscope (Carl Zeiss, Germany). Confocal images were observed with a Nikon A1Rsi inverted confocal microscope (Nikon, USA). Nodule sections were stained for 20 min with 0.01% calcofluor to stain the plant cell wall (Haag *et al.*, 2011). Calcofluor was excited at 405 nm and detected with a 460–500 nm emission filter. The GFP illumination of 278-pDOA9Ω*nodB* and 278-pDOA9Ω*rhcN* strains were detected after excitation with the 488 nm laser line and emission signals were collected at 490–522 nm. As a WT reference, we used a tagged strain containing the pVO155-npt2-gfp plasmid inserted in the BRADO5083 gene, which encodes a protein of unknown function. Previous studies did not reveal any particular symbiotic defect due to the plasmid insertion. The images were reconstructed with the NIS-Elements software (Nikon), and images were coloured and prepared for publication with Adobe Photoshop.

For observation of early times (4 and 8 dpi), the nodule sections were incubated for 15 min in live/dead staining solution (5 µM SYTO 9 and 30 µM propidium iodide in 50 mM Tris pH 7.0 buffer; Live/Dead BacLight, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) before calcofluor staining. For SYTO 9 and propidium iodide, an excitation wavelength of 488 and 555 nm was used with emission signal collection at 490–522 nm and 555–700 nm respectively.

Statistical analysis

The experimental data were subjected to analysis of variance (ANOVA). When a statistically significant value was confirmed in the F-test ($p < 0.05$), a post hoc test (Duncan's multiple-range test at $p < 0.05$) was used for multiple comparison (Duncan, 1955) using the SPSS1 software for WINDOWSTM, Version 14.0.

Acknowledgements

This study was supported by Suranaree University of Technology (SUT), the National Research Council of Thailand (SUT3-304-55-36-23), by IRD (JEAI_Symbi Trop); the Franco-Thai Cooperation Program in Higher Education and Research (PHC SIAM 2017 – No. 38280WF) and by the ANR, grant 'SymEffectors' number ANR-16-CE20-0013.

References

Bonaldi, K., Gargani, D., Prin, Y., Fardoux, J., Gully, D., Nouwen, N., *et al.* (2011) Nodulation of *Aeschynomene afraspera* and *A. indica* by photosynthetic *Bradyrhizobium* sp. strain ORS285:

- the nod-dependent versus the nod-independent symbiotic interaction. *Mol Plant Microbe Interact* **24**: 1359–1371.
- Callow, J.A., and Vincent, J.M. (1971) A manual for the practical study of root nodule bacteria. *J Appl Ecol* **8**: 977.
- Chaintreuil, C., Boivin, C., Dreyfus, B., and Giraud, E. (2001) Characterization of the common nodulation genes of the photosynthetic *Bradyrhizobium* sp. ORS285 reveals the presence of a new insertion sequence upstream of *nodA*. *FEMS Microbiol Lett* **194**: 83–86.
- Chaintreuil, C., Perrier, X., Martin, G., Fardoux, J., Lewis, G. P., Brottier, L., *et al.* (2018) Naturally occurring variations in the nod-independent model legume *Aeschynomene evenia* and relatives: a resource for nodulation genetics. *BMC Plant Biol* **18**: 54.
- Chaintreuil, C., Rivallan, R., Bertioli, D.J., Klopp, C., Gouzy, J., Courtois, B., *et al.* (2016) A gene-based map of the nod factor-independent *Aeschynomene evenia* sheds new light on the evolution of nodulation and legume genomes. *DNA Res* **23**: 365–376.
- Cole, M.A., and Elkan, G.H. (1973) Transmissible resistance to penicillin G, neomycin, and chloramphenicol in *Rhizobium japonicum*. *Antimicrob Agents Chemother* **4**: 248–253.
- Duncan, D.B. (1955) Multiple range and multiple F tests. *Biometrics* **11**: 1–42.
- Ehrhardt, D.W., Atkinson, E.M., and Long, S.R. (1992) Depolarization of alfalfa root hair membrane potential by *Rhizobium meliloti* Nod factors. *Science* **256**: 998–1000.
- Giraud, E., Lavergne, J., and Verméglio, A. (2010) Characterization of bacteriophytochromes from photosynthetic bacteria: histidine kinase signaling triggered by light and redox sensing. *Methods Enzymol* **471**: 135–159.
- Giraud, E., Moulin, L., Vallenet, D., Barbe, V., Cytryn, E., Avarre, J.-C., *et al.* (2007) Legumes symbioses: absence of Nod genes in photosynthetic bradyrhizobia. *Science* **316**: 1307–1312.
- Giraud, E., Xu, L., Chaintreuil, C., Gargani, D., Gully, D., and Sadowsky, M.J. (2013) Photosynthetic *Bradyrhizobium* sp. strain ORS285 is capable of forming nitrogen-fixing root nodules on soybeans (*Glycine max*). *Appl Environ Microbiol* **79**: 2459–2462.
- Gourion, B., Berrabah, F., Ratet, P., and Stacey, G. (2015) Rhizobium–legume symbioses: the crucial role of plant immunity. *Trends Plant Sci* **20**: 186–194.
- Gully, D., Teulet, A., Busset, N., Nouwen, N., Fardoux, J., Rouy, Z., *et al.* (2017) Complete genome sequence of *Bradyrhizobium* sp. ORS285, a photosynthetic strain able to establish nod factor-dependent or nod factor-independent symbiosis with *Aeschynomene* legumes. *Genome Announc* **5**: e00421–e00417.
- Haag, A.F., Balaban, M., Sani, M., Kerscher, B., Pierre, O., Farkas, A., *et al.* (2011) Protection of *Sinorhizobium* against host cysteine-rich antimicrobial peptides is critical for symbiosis. *PLoS Biol* **9**: e1001169.
- Jardinaud, M.F., Boivin, S., Rodde, N., Catrice, O., Kisiiala, A., Lepage, A., *et al.* (2016) A laser dissection-RNAseq analysis highlights the activation of cytokinin pathways by Nod factors in the *Medicago truncatula* root epidermis. *Plant Physiol* **171**: 2256–2276.
- Jiménez-Guerrero, I., Pérez-Montaño, F., Monreal, J.A., Preston, G.M., Fones, H., Vioque, B., *et al.* (2015) The *Sinorhizobium* (*Ensifer*) *fredii* HH103 type 3 secretion

- system suppresses early defense responses to effectively nodulate soybean. *Mol Plant Microbe Interact* **28**: 790–799.
- Kimbrel, J.A., Thomas, W.J., Jiang, Y., Creason, A.L., Thireault, C.A., Sachs, J.L., and Chang, J.H. (2013) Mutualistic co-evolution of type III effector genes in *Sinorhizobium fredii* and *Bradyrhizobium japonicum*. *PLoS Pathog* **9**: e1003204.
- Kouchi, H., Shimomura, K., Hata, S., Hirota, A., Wu, G.-J., Kumagai, H., et al. (2004) Large-scale analysis of gene expression profiles during early stages of root nodule formation in a model legume, *Lotus japonicus*. *DNA Res* **11**: 263–274.
- Lerouge, P., Roche, P., Faucher, C., Maillet, F., Truchet, G., Promé, J.C., and Dénarié, J. (1990) Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature* **344**: 781–784.
- Limpens, E., Franken, C., Smit, P., Willemsse, J., Bisseling, T., and Geurts, R. (2003) LysM domain receptor kinases regulating rhizobial Nod factor-induced infection. *Science* **302**: 630–633.
- Lohar, D.P., Sharopova, N., Endre, G., Penuela, S., Samac, D., Town, C., et al. (2006) Transcript analysis of early nodulation events in *Medicago truncatula*. *Plant Physiol* **140**: 221–234.
- Marchetti, M., Capela, D., Glew, M., Cruveiller, S., Chanewoon-Ming, B., Gris, C., et al. (2010) Experimental evolution of a plant pathogen into a legume symbiont. *PLoS Biol* **8**: e1000280.
- Masson-Boivin, C., Giraud, E., Perret, X., and Batut, J. (2009) Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? *Trends Microbiol* **17**: 458–466.
- Noisangiam, R., Teamtisong, K., Tittabutr, P., Boonkerd, N., Toshiki, U., Minamisawa, K., and Teamroong, N. (2012) Genetic diversity, symbiotic evolution, and proposed infection process of *Bradyrhizobium* strains isolated from root nodules of *Aeschynomene americana* L. in Thailand. *Appl Env. Microbiol* **78**: 6236–6250.
- Nouwen, N., Fardoux, J., and Giraud, E. (2016) NodD1 and NodD2 are not required for the symbiotic interaction of *Bradyrhizobium* ORS285 with nod-factor-independent *Aeschynomene* legumes. *PLoS One*. **11**: e0157888. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157888>.
- Okazaki, S., Noisangiam, R., Okubo, T., Kaneko, T., Oshima, K., Hattori, M., et al. (2015) Genome analysis of a novel *Bradyrhizobium* sp. DOA9 carrying a symbiotic plasmid. *PLoS One* **10**: e0117392. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117392>.
- Okazaki, S., Tittabutr, P., Teulet, A., Thouin, J., Fardoux, J., Chaintreuil, C., et al. (2016) *Rhizobium*–legume symbiosis in the absence of nod factors: two possible scenarios with or without the T3SS. *ISME J* **10**: 64–74.
- Oldroyd, G.E. (2013) Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nat Rev Microbiol* **11**: 252–263.
- Poole, P., Ramachandran, V., and Terpolilli, J. (2018) Rhizobia: from saprophytes to endosymbionts. *Nat Rev Microbiol* **16**: 291–303.
- Renier, A., Maillet, F., Fardoux, J., Poinot, V., Giraud, E., and Nouwen, N. (2011) Photosynthetic *Bradyrhizobium* sp. strain ORS285 synthesizes 2-O-Methylfucosylated lipochitooligosaccharides for nod gene-dependent interaction with *Aeschynomene* plants. *Mol Plant Microbe Interact* **24**: 1440–1447.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (2001) *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Somasegaran, P., and Hoben, H.J. (1994) *Handbook for Rhizobia: Methods in Legume-Rhizobium Technology*. New York: Springer-Verlag, p. 450.
- Songwattana, P., Noisangiam, R., Teamtisong, K., Prakamhang, J., Teulet, A., Tittabutr, P., et al. (2017) Type 3 secretion system (T3SS) of *Bradyrhizobium* sp. DOA9 and its roles in legume symbiosis and rice endophytic association. *Front Microbiol* **8**: 1–12.
- Staehelin, C., and Krishnan, H.B. (2015) Nodulation outer proteins: double-edged swords of symbiotic rhizobia. *Biochem J* **470**: 263–274.
- Sugawara, M., Takahashi, S., Umehara, Y., Iwano, H., Tsurumaru, H., Odake, H., et al. (2018) Variation in bradyrhizobial NopP effector determines symbiotic incompatibility with Rj2-soybeans via effector-triggered immunity. *Nat Commun* **9**: 3139. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05663-x>.
- Sullivan, J.T., and Ronson, C.W. (1998) Evolution of rhizobia by acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates into a phe-tRNA gene. *Proc Natl Acad Sci* **95**: 5145–5149.
- Teamtisong, K., Songwattana, P., Noisangiam, R., Piromyong, P., Boonkerd, N., Tittabutr, P., et al. (2014) Divergent nod-containing *Bradyrhizobium* sp. DOA9 with a megaplasmid and its host range. *Microbes Env* **29**: 370–376.
- Willems, A., Doignon-Bourcier, F., Coopman, R., Hoste, B., de Lajudie, P., and Gillis, M. (2000) AFLP fingerprint analysis of *Bradyrhizobium* strains isolated from *Faidherbia albida* and *Aeschynomene* species. *Syst Appl Microbiol* **23**: 137–147.
- Willems, A., Doignon-Bourcier, F., Goris, J., Coopman, R., de Lajudie, P., De Vos, P., and Gillis, M. (2001) DNA-DNA hybridization study of *Bradyrhizobium* strains. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**: 1315–1322.
- Yang, S., Tang, F., Gao, M., Krishnan, H.B., and Zhu, H. (2010) R gene-controlled host specificity in the legume–rhizobia symbiosis. *Proc Natl Acad Sci* **107**: 18735–18740.
- Yasuda, M., Miwa, H., Masuda, S., Takebayashi, Y., Sakakibara, H., and Okazaki, S. (2016) Effector-triggered immunity determines host genotype-specific incompatibility in legume–*Rhizobium* symbiosis. *Plant Cell Physiol* **57**: 1791–1800.

Supporting Information

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

Table S1. Main features and symbiotic properties of the different *Bradyrhizobium* strains pointed out in this study

Table S2. Bacterial strains and plasmids used in this study

Table S3. Primers used in this study for bacterial verification

Table S4. Plants tested in this study

Fig. S1. Symbiotic properties of *Bradyrhizobium* sp. ORS278 and its chimeric derivatives (ORS278-pDOA9^{*}, 278-pDOA9 Ω nodB and 278-pDOA9 Ω rhcN) on *A. evenia*.

(A) Comparison of the growth of the plants (aerial part) at 21 days post-inoculation (dpi). (B) Acetylene-reducing activity (ARA) in *A. evenia* nodules. (C) Number of nodules per plant. For (B and C), values represent mean \pm SD (n = 5).

Within treatment, means labelled with different letters are statistically different at $p < 0.05$. Cytological analysis of the nodules elicited by ORS278 (D-F), ORS278-pDOA9* (G, H), 278-pDOA9 Ω *nodB* (I-M) and 278-pDOA9 Ω *rhcN* (N- R). Confocal microscopy images showing the bacterial colonization of normal nodules elicited by ORS278 (F), 278-pDOA9 Ω *nodB* (L, M) and 278-pDOA9 Ω *rhcN* (Q, R), in green (bacteria tagged with GFP), in blue (plant cell wall revealed by calcofluor).

Fig. S2. Early times (4 and 8dpi) of the interaction of *Bradyrhizobium* sp. ORS278 and its chimeric derivatives

(ORS278-pDOA9*, 278-pDOA9 Ω *nodB* and 278-pDOA9 Ω *rhcN*) on *A. indica*. Cytological analysis by light and confocal microscopy of the root and nodules elicited at 4 and 8dpi by ORS278 (A-D and Q-T), ORS278-pDOA9* (E-H, U-X), 278-pDOA9 Ω *nodB* (I-L and Y-AB) and 278-pDOA9 Ω *rhcN* (M-P, AC-AF). The confocal microscopy images were obtained after staining of nodule sections with Syto9 (green; live bacteria), calcofluor (blue; plant cell wall), and propidium iodide (red; bacteria or bacteria with compromised membranes).

Dead cell of undifferentiated bacteria (rod shape) are indicated by arrows in picture X.

Supplementary information

Symbiotic properties of a chimeric Nod-independent photosynthetic *Bradyrhizobium* strain obtained by conjugative transfer of a symbiotic plasmid

Authors: Pongpan Songwattana¹, Panlada Tittabutr¹, Jenjira Wongdee¹, Kamonluck Teamtisong², Dyah Wulandari¹, Albin Teulet³, Joel Fardoux³, Nantakorn Boonkerd¹, Eric Giraud^{3*}, Neung Teaumroong^{1*}

Affiliations:

¹ School of Biotechnology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand

² The Center for Scientific and Technological Equipment, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand

³ IRD, Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes, UMR 113, IRD/CIRAD/INRA/UM/SupAgro. Campus de Baillarguet, TA-A82/J, 34398 Montpellier Cedex 5, France

* **Author for correspondence:** These authors have contributed equally to this work

E-mail: eric.giraud@ird.fr (Eric Giraud); E-mail: neung@sut.ac.th (Neung Teaumroong)

Tel. +66-44-223389; Fax. +66-44-216345

Running title: pSym properties of a chimeric *Bradyrhizobium*

Table S1 : Main features and symbiotic properties of the different *Bradyrhizobium* strains pointed out in this study

Strains	Bacterial characteristics	Symbiosis characteristics ^a					Reference
		NF-independent <i>Aeschynomene</i>		NF-dependent <i>Aeschynomene</i>		<i>Glycine max</i> cv. Williams	
		<i>A. indica</i>	<i>A. evenia</i>	<i>A. americana</i>	<i>A. afraspera</i>		
<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS278	<ul style="list-style-type: none"> • Photosynthetic bacteria • Absence of <i>nod</i> genes 	Fix++	Fix++	Nod-	Nod-	Nod-	Giraud <i>et al.</i> , 2007
<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS285	<ul style="list-style-type: none"> • Photosynthetic bacteria • Strain with <i>nod</i> and T3SS genes on the chromosome 	Fix++	Fix++	Nod-	Fix++	Fix+	Bonaldi <i>et al.</i> , 2011; Giraud <i>et al.</i> , 2013
<i>Bradyrhizobium</i> sp. DOA9	<ul style="list-style-type: none"> • Non-photosynthetic bacteria • Strain with <i>nod</i> and T3SS genes on a symbiotic plasmid 	Nod-	Nod-	Fix++	Fix++	Nod-	Songwattana <i>et al.</i> , 2017; Teamtisong <i>et al.</i> , 2014
<i>Bradyrhizobium</i> sp. USDA110	<ul style="list-style-type: none"> • Non-photosynthetic bacteria • Strain with <i>nod</i> and T3SS genes on the chromosome 	Nod-	Nod-	Fix+	Fix+	Fix++	Chaintreuil <i>et al.</i> , 2013

^a Symbiosis characteristics indicate (Nod- : no nodule forming; ; Fix-: nodules with no nitrogenase activity, Fix+ and Fix++: nodules with a low or a high nitrogenase activity)

Table S2. Bacterial strains and plasmids used in this study

Strains	Relevant characteristics	Source or references
<i>Bradyrhizobium</i> sp. DOA9	Non-photosynthetic strain, isolated from paddy field using <i>A. americana</i> as trap legume, Nod-dependent strain	(Noisangiam <i>et al.</i> , 2012)
DOA9-pDOA9*	<i>Bradyrhizobium</i> sp. DOA9 obtained by integration of pK18mob- <i>sacB</i> -Cefo ^r Km ^r	This study
DOA9-pDOA9Ω <i>nodB</i>	<i>nodB</i> mutant of DOA9 strain obtained by integration of pVO155-npt2-Cefo ^r - npt2-gfp; Cefo ^r Km ^r	This study
DOA9-pDOA9Ω <i>rhcN</i>	<i>rhcN</i> mutant of DOA9 strain obtained by integration of pVO155-npt2-Cefo ^r - npt2-gfp; Cefo ^r Km ^r	This study
DOA9ΔpDOA9	Curing of pDOA9 plasmid in DOA9	This study
<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS278	Photosynthetic <i>Bradyrhizobium</i> nodulating <i>Aeschynomene</i> , Nod-independent strain	(Giraud <i>et al.</i> , 2007)
ORS278-pDOA9*	<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS278 (sp ^f) containing pDOA9 plasmid (pDOA9-pK18mob- <i>sacB</i> - <i>cefo</i> ^r), Sp ^f Km ^r Cefo ^r	This study
278-pDOA9Ω <i>nodB</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS278 (sp ^f) containing pDOA9Ω <i>nodB</i> plasmid, Sp ^f Km ^r Cefo ^r	This study
278-pDOA9Ω <i>rhcN</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS278 (sp ^f) containing pDOA9Ω <i>rhcN</i> plasmid, Sp ^f Km ^r Cefo ^r	This study
<i>E. coli</i> PRK2013	Helper plasmid; <i>mob</i> +, <i>tra</i> +, Km ^r	(Figurski and Helinski, 1979)
<i>E. coli</i> S17-1	<i>hsdR pro thi hsdM</i> ⁺ <i>regA</i> RP4-2 2-TC::Mu-Km::Tn7Sm ^r λ <i>pir</i>	(Simon <i>et al.</i> , 1983)
Plasmid	Relevant characteristics	Source or references
pVO155-npt2-Cefo ^r - npt2-gfp	pUC119-derived suicide vector with <i>gusA</i> gene, GFP and Cefo ^r cassette, Km ^R Cefo ^r	(Okazaki <i>et al.</i> , 2016)
pK18mob- <i>sacB</i> -Cefo ^r	Non repetitive plasmid, <i>sacB</i> , Cefo ^r Km ^r	This study

Table S3. Primers used in this study for bacterial verification

Genome target	Primer name	Sequence (‘5 →3’)	Target genes	Position	Product size (bp)
DOA9 chromosome (cDOA9)	nifV.D9c.f	GATCGACGTCACCGTTTCCC	<i>nifV</i>	6,495,509-6,495,996	488
	nifV.D9c.r	TGACGATCTCGGTCTTGCG			
DOA9 plasmid (pDOA9)	moeB.D9p.f	GAGCCGTCCTTCAGCAATTA	<i>moeB</i>	3,401-3,759	359
	moeB.D9p.r	GCGACTTCTCAGACCATCATAAC			
	repA.D9p.f	AAGAGAACGGCACCTTGTATG	<i>repA</i>	73,170-73,539	370
	repA.D9p.r	TCCGAGGTCATCAGGAGAAA			
	trbG.D9p.f	CGTGTGTCACTTGAGACCAA	<i>trbG</i>	254,228-254,578	350
	trbG.D9p.r	GAAGGCGCGATAATTGAGGA			
	nodB.D9p.f	GGCCTGCCGAGCGTCCATCTAAC	<i>nodB</i>	365,175-365,656	482
	nodB.D9p.r	GGTGGACAGCCGTCGTGCAATAG			
	nodA.D9p.f	GCGTTCAATGCAAGACC	<i>nodA</i>	397,266-397,131	136
	nodA.D9p.r	GCGTACAATCCGAGTTTCAG			
	nifD.D9p.f	GAGCCGAACGACCAACCA	<i>nifD</i>	454,195-454,920	726
	nifD.D9p.r	GCGTCGCCGCCGATATTGTAG			
	hupK.D9p.f	CGCAACGAGATCGACATCA	<i>hupK</i>	541,507-541,860	354
	hupK.D9p.r	GGTAGTCGCCTGCATCATT			
	nodD2.D9p.f	CGCAAGCTGACATTTGAGAA	<i>nodD2</i>	633,492-633,713	222
	nodD2.D9p.r	TGTCTTTGCGAAATGCTTTG			
	rhcN.D9p.f	GCAACAATCAGGCCATAATCAAG	<i>rhcN</i>	684,370-685,044	675
	rhcN.D9p.r	AGGGCATCTCCAATATGACGTTT			
	GAJ38051.D9p.f	GCTCATGGGTGGGTTGAATA	GAJ38051	731,822-731,592	231
	GAJ38051.D9p.r	TCCTGATTGGAACGGTTAAGG			
ORS278 chromosome	BchL.ORS278.f	TCGTCTACCAGGGCTACAA	<i>BchL</i>	1,760,661-1,760,907	247
	BchL.ORS278.r	GCGAAGATCGAGTCGAAATCA			

Table S4. Plants tested in this study

Tribes	Plants tested	Source or references
Genistoid	<i>Crotalaria juncea</i>	Nakhon Ratchasima, Thailand
Derbergioid	<i>Aeschynomene americana</i>	Nakhon Ratchasima, Thailand
	<i>Aeschynomene afraspera</i>	LSTM, IRD, France
	<i>Aeschynomene indica</i>	LSTM, IRD, France
	<i>Aeschynomene evenia</i>	LSTM, IRD, France
	<i>Arachis hypogaea</i> cv. Thai Nan	Nakhon Ratchasima, Thailand
	<i>Stylosanthes hamata</i>	Nakhon Ratchasima, Thailand
Millettoid	<i>Macroptilium atropurpureum</i>	Nakhon Ratchasima, Thailand
	<i>Vigna radiata</i> cv. SUT4	Nakhon Ratchasima, Thailand

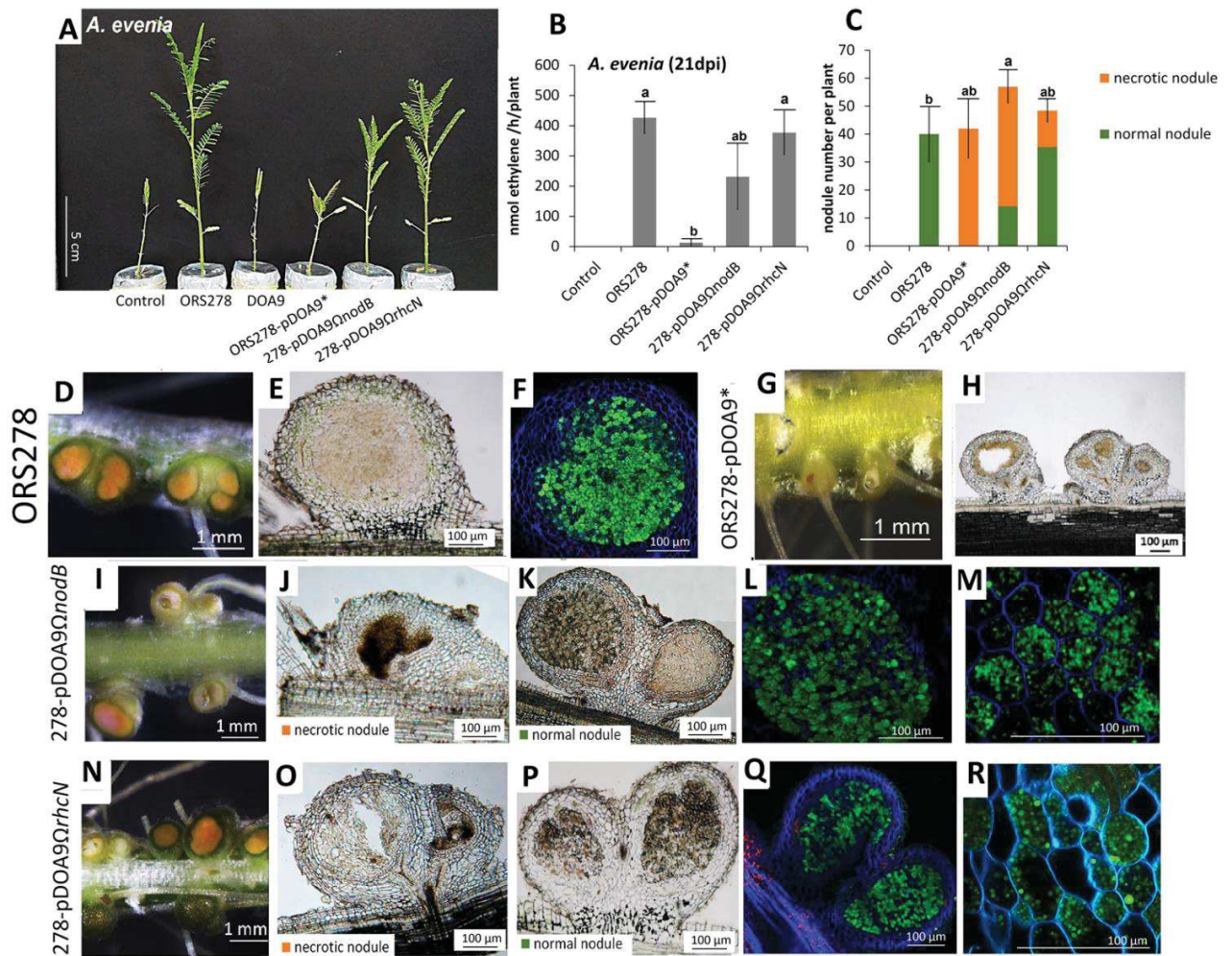


Figure S1. Symbiotic properties of *Bradyrhizobium* sp. ORS278 and its chimeric derivatives (ORS278-pDOA9*, 278-pDOA9 Ω nodB and 278-pDOA9 Ω rhcN) on *A. evenia*.

(A) Comparison of the growth of the plants (aerial part) at 21 days post-inoculation (dpi). (B) Acetylene-reducing activity (ARA) in *A. evenia* nodules. (C) Number of nodules per plant. For (B and C), values represent mean \pm SD (n = 5). Within treatment, means labeled with different letters are statistically different at $p < 0.05$. Cytochemical analysis of the nodules elicited by ORS278 (D-F), ORS278-pDOA9* (G, H), 278-pDOA9 Ω nodB (I-M) and 278-pDOA9 Ω rhcN (N-R). Confocal microscopy images showing the bacterial colonization of normal nodules elicited by ORS278 (F), 278-pDOA9 Ω nodB (L, M) and 278-pDOA9 Ω rhcN (Q, R), in green (bacteria tagged with GFP), in blue (plant cell wall revealed by calcofluor).

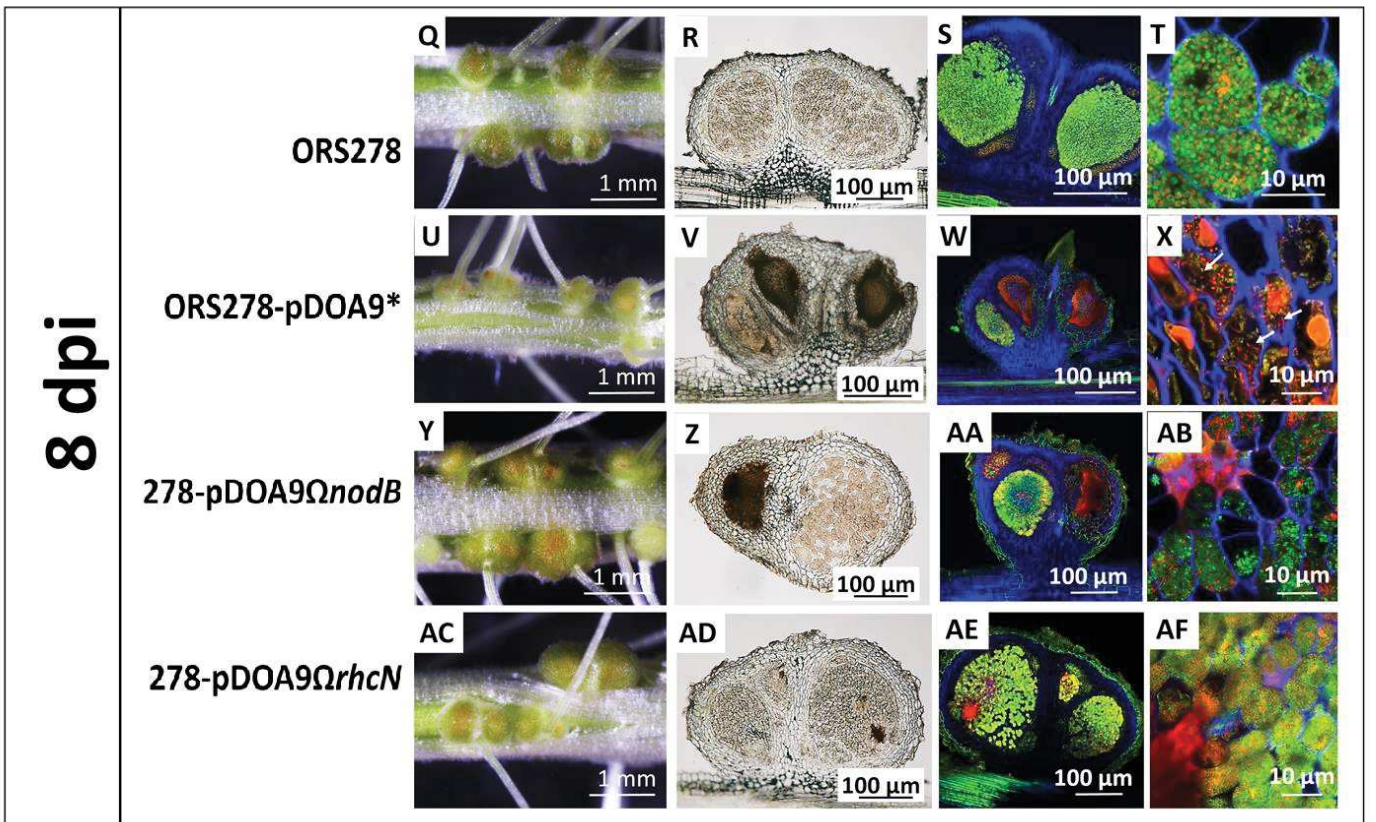
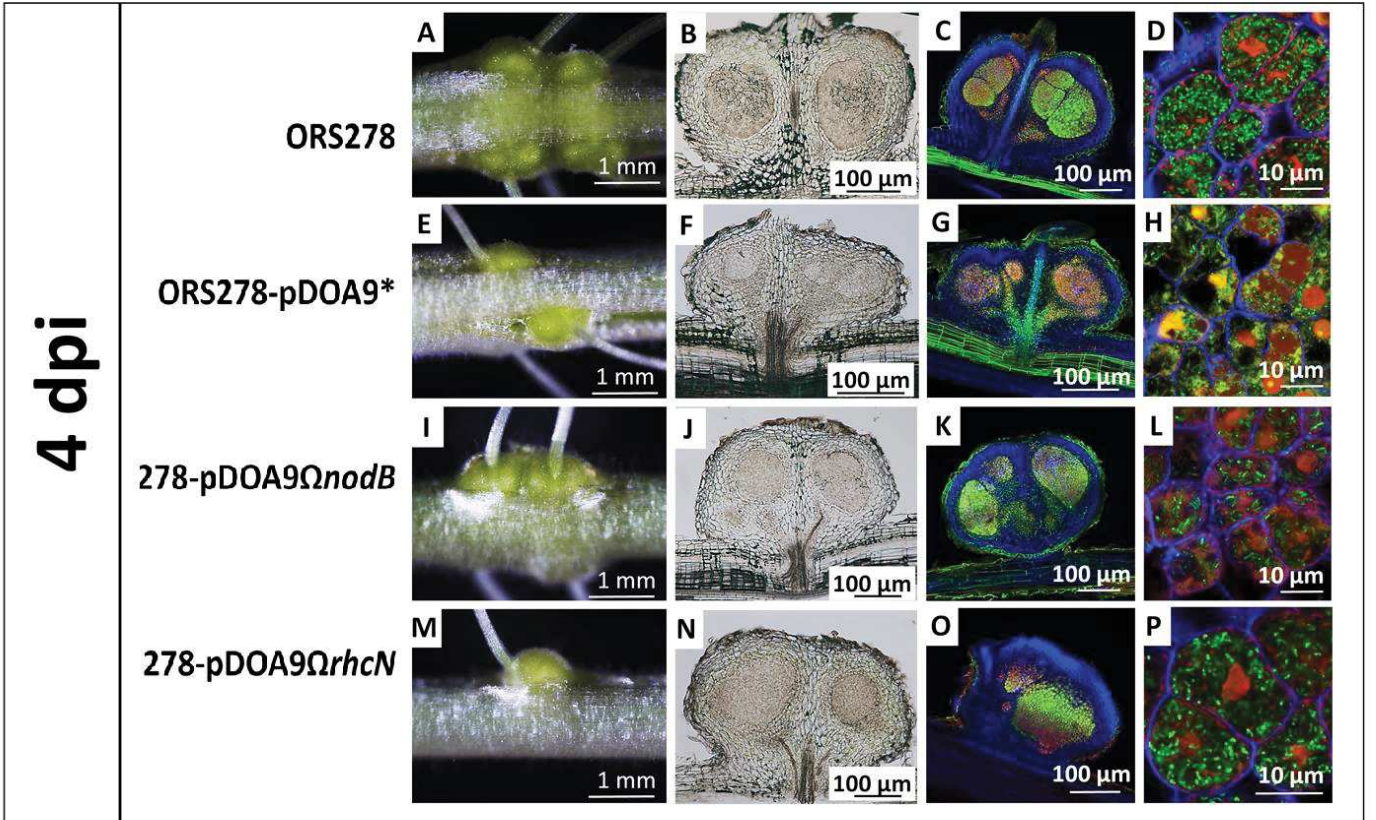
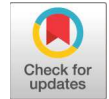


Figure S2. Early times (4 and 8dpi) of the interaction of *Bradyrhizobium* sp. ORS278 and its chimeric derivatives (ORS278-pDOA9*, 278-pDOA9 Ω *nodB* and 278-pDOA9 Ω *rhcN*) on *A. indica*. Cytological analysis by light and confocal microscopy of the root and nodules elicited at 4 and 8dpi by ORS278 (A-D and Q-T), ORS278-pDOA9* (E-H, U-X), 278-pDOA9 Ω *nodB* (I-L and Y-AB) and 278-pDOA9 Ω *rhcN* (M-P, AC-AF). The confocal microscopy images were obtained after staining of nodule sections with Syto9 (green; live bacteria), calcofluor (blue; plant cell wall), and propidium iodide (red; bacteria or bacteria with compromised membranes). Dead cell of undifferentiated bacteria (rod shape) are indicated by arrows in picture X.



Complete Genome Sequence of *Bradyrhizobium* sp. ORS285, a Photosynthetic Strain Able To Establish Nod Factor-Dependent or Nod Factor-Independent Symbiosis with *Aeschynomene* Legumes

Djamel Gully,^a Albin Teulet,^a Nicolas Busset,^a Nico Nouwen,^a Joël Fardoux,^a Zoe Rouy,^b David Vallenet,^b Stéphane Cruveiller,^b Eric Giraud^a

IRD, Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes, UMR IRD/SupAgro/INRA/UM/CIRAD, Campus International de Baillarguet, TA A-82/J, Montpellier, France^a; Commissariat à l'Energie Atomique, Direction des Sciences du Vivant, Institut de Génomique, Génomoscope, Évry, France^b

ABSTRACT Here, we report the complete genome sequence of *Bradyrhizobium* sp. strain ORS285, which is able to nodulate *Aeschynomene* legumes using two distinct strategies that differ in the requirement of Nod factors. The genome sequence information of this strain will help understanding of the different mechanisms of interaction of rhizobia with legumes.

The photosynthetic *Bradyrhizobium* sp. strain ORS285 is able to induce the formation of nitrogen-fixing nodules on the root and stem of some aquatic tropical legumes of the *Aeschynomene* genus (1). In contrast to the previously sequenced photosynthetic *Bradyrhizobium* strains (BTai1 and ORS278) (2), this strain does contain the canonical *nodABC* genes required for the synthesis of Nod factors (NF) and displays a broader host range (3). Depending on the host plant, two symbiotic processes can be distinguished: a classical one involving NF perception, and an alternative one which is NF independent and for which the symbiotic signal molecules remain to be disclosed (2, 4). *Bradyrhizobium* sp. ORS285 is therefore an interesting model strain in comparative studies of these two distinct symbiotic mechanisms (4).

A draft genome sequence of the ORS285 strain has been previously obtained using 454-pyrosequencing technology, but the presence of a high number of transposase genes and repetitive DNA sequences resulted in a fragmented genome (301 contigs) which made analysis of the regions containing symbiotic genes difficult (5).

In this study, we have obtained the complete genome sequence of *Bradyrhizobium* sp. strain ORS285 using the Pacific BioSciences (PacBio) sequencing technology. Genomic DNA libraries were prepared using the Pacific Biosciences 20-kb library preparation protocol. A total of 60,640 polymerase reads with a mean read length of 14,753 bp were generated, which led to a total of 894.59 Mb, with an average coverage of 114-fold. *De novo* assembly of the read sequences was performed using continuous long reads according to the Hierarchical Genome Assembly Process (HGAP) version 3 workflow (DevNet; Pacific Biosciences) as available in the SMRT Analysis software version 2.3.0. The circularization of contigs was performed with Minimus2 software (Amos package). The sequence was polished sequentially with RS_Resequencing.1 software (SMRT Analysis version version 2.3.0) and Pilon software (version 1.21) using available transcriptomic data (HiSeq 2000; Illumina).

Received 5 April 2017 Accepted 8 June 2017 Published 27 July 2017

Citation Gully D, Teulet A, Busset N, Nouwen N, Fardoux J, Rouy Z, Vallenet D, Cruveiller S, Giraud E. 2017. Complete genome sequence of *Bradyrhizobium* sp. ORS285, a photosynthetic strain able to establish Nod factor-dependent or Nod factor-independent symbiosis with *Aeschynomene* legumes. *Genome Announc* 5:e00421-17. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00421-17>.

Copyright © 2017 Gully et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to Eric Giraud, eric.giraud@ird.fr.

The genome of *Bradyrhizobium* sp. ORS285 comprises one circular chromosome of 7,797,098 nucleotides, with an average G+C content of 65.19%. Annotation of the *Bradyrhizobium* sp. ORS285 genome was performed using the MicroScope platform (6) and subsequently verified manually. A total of 6,983 coding sequences (CDSs) and 51 tRNAs were predicted. In contrast to the genomes of ORS278 and BTAi1, a clear symbiotic island of 262 kb was identified. To our knowledge, this is the smallest symbiotic island described for a *Bradyrhizobium* strain. It contains *nod* genes, a type III secretion system (T3SS) gene cluster, genes involved in tricarboxylic acid transport, and numerous transposase elements. Remarkably, the *nif* genes are not located in the symbiotic island but are located in a different region of the genome. Comparing the complete genome sequence of *Bradyrhizobium* sp. ORS285 with other bradyrhizobial genomes will facilitate the identification of the symbiotic genes governing the NF-dependent and NF-independent processes.

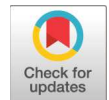
Accession number(s). This genome sequence has been deposited in ENA/GenBank/ DDBJ under the accession no. [LT859959](https://doi.org/10.1093/nar/gks1194).

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the Agence Nationale de la Recherche, grant “SymEffectors” no. ANR-16-CE20-0013. The LABGeM (CEA/IG/Genoscope & CNRS UMR 8030) and the France Génomique National infrastructure (funded as part of Investissement d’Avenir Program managed by Agence Nationale pour la Recherche, contract ANR-10-INBS-09) are acknowledged for support within the MicroScope annotation platform.

REFERENCES

- Giraud E, Fleischman D. 2004. Nitrogen-fixing symbiosis between photosynthetic bacteria and legumes. *Photosynth Res* 82:115–130. <https://doi.org/10.1007/s11120-004-1768-1>.
- Giraud E, Moulin L, Vallenet D, Barbe V, Cytryn E, Avarre JC, Jaubert M, Simon D, Cartieaux F, Prin Y, Bena G, Hannibal L, Fardoux J, Kojadinovic M, Vuillet L, Lajus A, Cruveiller S, Rouy Z, Mangenot S, Segurens B, Dossat C, Franck WL, Chang WS, Saunders E, Bruce D, Richardson P, Normand P, Dreyfus B, Pignol D, Stacey G, Emerich D, Verméglio A, Médigue C, Sadowsky M. 2007. Legumes symbioses: absence of Nod genes in photosynthetic bradyrhizobia. *Science* 316:1307–1312. <https://doi.org/10.1126/science.1139548>.
- Chaintreuil C, Boivin C, Dreyfus B, Giraud E. 2001. Characterization of the common nodulation genes of the photosynthetic *Bradyrhizobium* sp. ORS285 reveals the presence of a new insertion sequence upstream of *nodA*. *FEMS Microbiol Lett* 194:83–86. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb09450.x>.
- Bonaldi K, Gargani D, Prin Y, Fardoux J, Gully D, Nouwen N, Goormachtig S, Giraud E. 2011. Nodulation of *Aeschynomene afraaspera* and *A. indica* by photosynthetic *Bradyrhizobium* sp. strain ORS285: the Nod-dependent versus the Nod-independent symbiotic interaction. *Mol Plant Microbe Interact* 24:1359–1371. <https://doi.org/10.1094/MPMI-04-11-0093>.
- Renier A, Maillat F, Fardoux J, Poinsot VR, Giraud E, Nouwen N. 2011. Photosynthetic *Bradyrhizobium* sp. strain ORS285 synthesizes 2-O-methylfucosylated lipochitooligosaccharides for *nod* gene dependent interaction with *Aeschynomene* plants. *Mol Plant Microbe Interact* 24: 1440–1447. <https://doi.org/10.1094/MPMI-05-11-0104>.
- Vallenet D, Belda E, Calteau A, Cruveiller S, Engelen S, Lajus A, Le Fèvre F, Longin C, Mornico D, Roche D, Rouy Z, Salvignol G, Scarpelli C, Thil Smith AA, Weiman M, Médigue C. 2013. MicroScope—an integrated microbial resource for the curation and comparative analysis of genomic and metabolic data. *Nucleic Acids Res* 41:D636–D647. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1194>.



Complete Genome Sequence of *Bradyrhizobium* sp. Strain ORS3257, an Efficient Nitrogen-Fixing Bacterium Isolated from Cowpea in Senegal

Antoine Le Quéré,^{a,b} Djamel Gully,^b Albin Teulet,^b Elisabeth Navarro,^b Daniel Gargani,^c Joël Fardoux,^b Stéphane Cruveiller,^d Marc Neyra,^b Eric Giraud,^b Tatiana Krasova Wade^a

^aIRD, Laboratoire Commun de Microbiologie, UR040, ISRA, UCAD, Centre de Recherche de Bel Air, Dakar, Senegal

^bIRD, Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes, UMR LSTM, Université de Montpellier, CIRAD, Montpellier SupAgro, Montpellier, France

^cCIRAD, Biologie et Génétique des Interactions Plante-Parasite, UMR BGPI, Université de Montpellier, INRA, Montpellier SupAgro, Montpellier, France

^dCEA, Institut de Biologie François Jacob, Genoscope, Laboratoire d'Analyses Bioinformatiques pour la Génomique et le Métabolisme, UMR-CNRS 8030 Génomique Métabolique, Université d'Évry-Val-d'Essonne, Université Paris-Saclay, Évry, France

ABSTRACT Here, we report the complete genome sequence of *Bradyrhizobium* sp. strain ORS3257, which forms efficient symbioses with cowpea, peanut, or groundnut. These genomic data will be useful to identify genes associated with symbiotic performance and host compatibility on several legumes, including *Aeschynomene* species, with which a Nod-independent type III secretion system (T3SS)-dependent symbiosis can be established.

Bradyrhizobium sp. strain ORS3257 was isolated from a root nodule of *Vigna unguiculata* collected in Bambey, Senegal, in 1999 (1). Being an efficient nitrogen-fixing symbiont on various *Vigna unguiculata* cultivars and a good competitor for nodule occupancy (2, 3), ORS3257 develops efficient symbioses on other tropical legumes of agronomical importance (peanut and groundnut). In addition, this strain can nodulate some *Aeschynomene* species using an alternative symbiotic process that does not rely on Nod factor synthesis but on a functional type III secretion system (T3SS) (4). Considering its agronomic relevance and its original symbiotic properties, ORS3257, which might be related to the recently described species *Bradyrhizobium vignae* (5), is an interesting strain to investigate at the genomic level.

In this study, we have obtained the complete genome sequence of *Bradyrhizobium* sp. strain ORS3257 using the Pacific Biosciences (PacBio) sequencing technology. ORS3257 was grown in liquid yeast malt (YM) medium (6), and genomic DNA was extracted as described by Wilson (7). Libraries were prepared using the Pacific Biosciences 20-kb library preparation protocol. A total of 89,698 polymerase reads with a mean read length of 14,225 bp were generated, which led to a total of 1,277 Mb, with an average coverage of 85-fold. *De novo* assembly of the read sequences was performed using continuous long reads according to the Hierarchical Genome Assembly Process (HGAP) version 3 workflow (DevNet; Pacific Biosciences), as available in the SMRT Analysis software version 2.3.0. Circularization of contigs was performed using the Minimus2 software (Amos package) (8). The sequence was polished sequentially with the RS_Resequencing.1 software (SMRT Analysis version 2.3.0) and Pilon software (version 1.21) (9) using available transcriptomic data (HiSeq 2000; Illumina) that mapped to all predicted coding sequences with a median coverage of 145×. This enabled the correction of 2 nucleotides only, demonstrating the high quality of the assembled genome sequence reported.

The genome of ORS3257 comprises one circular chromosome of 8,156,021 nucleotides, with a GC content of 63.34%. A total of 8,271 coding sequences and 99 RNA

Citation Le Quéré A, Gully D, Teulet A, Navarro E, Gargani D, Fardoux J, Cruveiller S, Neyra M, Giraud E, Krasova Wade T. 2019. Complete genome sequence of *Bradyrhizobium* sp. strain ORS3257, an efficient nitrogen-fixing bacterium isolated from cowpea in Senegal. *Microbiol Resour Announc* 8:e01449-18. <https://doi.org/10.1128/MRA.01449-18>.

Editor Irene L. G. Newton, Indiana University, Bloomington

Copyright © 2019 Le Quéré et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to Antoine Le Quéré, antoine.le-quere@ird.fr.

Received 19 October 2018

Accepted 12 December 2018

Published 17 January 2019

genes were predicted using the MicroScope platform (10). A symbiotic island of 730 kb containing *nod*, *nif*, and T3SS genes can be distinguished. Most of the *nod* genes are clustered in a main region comprising the 3 regulator-encoding genes *nodD1*, *nodD2*, and *nodI* in one direction and *nodY*, *nodA*, *nodB*, *nodC*, *nodS*, *nodU*, *nodI*, *nodJ*, and *nodZ* in the opposite direction. The T3SS gene cluster contains all the genes required for the formation of a functional T3SS apparatus (11). Notably, this includes the *nopX* translocon-encoding gene, which is required for injection of effector proteins into host cell and which is not found in several *Bradyrhizobium* strains, including USDA110. Furthermore, 11 rhizobial T3SS effector homologs were found (*nopC*, *nopM1*, *nopM2*, *nopM3*, *nopL*, *nopT*, *nopP1*, *nopP2*, *nopAC*, *nopAR*, and *nopBW*), all spread within the symbiotic island.

The genomic sequence data reported here will be useful for identifying the effectors governing the establishment of the Nod-independent T3SS-dependent symbiotic process with some *Aeschynomene* species and the genes that are important for host compatibility and performance of the *Bradyrhizobium* ORS3257 strain to interact efficiently with several tropical legumes of agronomic importance.

Data availability. This genome sequence has been deposited in DDBJ/ENA/GenBank under the accession no. [LS398110](#). The PacBio and HiSeq raw sequence reads used in this study are available from GenBank under the accession no. [PRJNA507707](#) and [PRJNA507934](#), respectively.

ACKNOWLEDGMENT

This study was supported by the Agence Nationale de la Recherche, grants “SoIAO” ANR-VMCS-2008 and “SymEffectors” ANR-16-CE20-0013.

REFERENCES

1. Krasova-Wade T, Ndoye I, Braconnier S, Sarr B, de Lajudie P, Neyra M. 2003. Diversity of indigeneous bradyrhizobia associated with 3 cowpea cultivars (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) grown under limited and favorable water conditions in Senegal (West Africa). *Afr J Biotechnol* 21:13–22.
2. Wade TK, Le Quéré A, Laguerre G, N'Zoué A, Ndione J-A, doRego F, Sadio O, Ndoye I, Neyra M. 2014. Eco-geographical diversity of cowpea bradyrhizobia in Senegal is marked by dominance of two genetic types. *Syst Appl Microbiol* 37:129–139. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2013.10.002>.
3. Krasova-Wade T, Diouf O, Ndoye I, Sall CE, Braconnier S, Neyra M. 2006. Water-condition effects on rhizobia competition for cowpea nodule occupancy. *Afr J Biotechnol* 25:1457–1463.
4. Okazaki S, Tittabutr P, Teulet A, Thouin J, Fardoux J, Chaintreuil C, Gully D, Arrighi JF, Furuta N, Miwa H, Yasuda M, Nouwen N, Teaumroong N, Giraud E. 2016. Rhizobium-legume symbiosis in the absence of Nod factors: two possible scenarios with or without the T3SS. *ISME J* 10: 64–74. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.103>.
5. Grönemeyer JL, Hurek T, Bünger W, Reinhold-Hurek B. 2016. *Bradyrhizobium vignae* sp. nov., a nitrogen-fixing symbiont isolated from effective nodules of *Vigna* and *Arachis*. *Int J Syst Evol Microbiol* 66:62–69. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000674>.
6. Vincent JM. 1970. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. International Biological Programme, Blackwell Scientific Publications, Oxford, United Kingdom.
7. Wilson K. 2001. Preparation of genomic DNA from bacteria. *Curr Protoc Mol Biol* Chapter 2:Unit 2.4. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0204s56>.
8. Sommer DD, Delcher AL, Salzberg SL, Pop M. 2007. Minimus: a fast, lightweight genome assembler. *BMC Bioinformatics* 8:64. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-64>.
9. Walker BJ, Abeel T, Shea T, Priest M, Abouelliel A, Sakthikumar S, Cuomo CA, Zeng Q, Wortman J, Young SK, Earl AM. 2014. Pilon: an integrated tool for comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement. *PLoS One* 9:e112963. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112963>.
10. Vallenet D, Belda E, Calteau A, Cruveiller S, Engelen S, Lajus A, LeFèvre F, Longin C, Mornico D, Roche D, Rouy Z, Salvignol G, Scarpelli C, Thil Smith AA, Weiman M, Médigue C. 2013. MicroScope—an integrated microbial resource for the curation and comparative analysis of genomic and metabolic data. *Nucleic Acids Res* 41:636–647. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1194>.
11. Staehelin C, Krishnan HB. 2015. Nodulation outer proteins: double-edged swords of symbiotic rhizobia. *Biochem J* 470:263–274. <https://doi.org/10.1042/BJ20150518>.

Conclusions & Perspectives

1. La symbiose FN-indépendante T3SS-dépendante : un processus complexe impliquant un cocktail subtil de divers effecteurs

L'étude de l'interaction symbiotique FN-dépendante sur les légumineuses modèles a contribué de manière considérable à la compréhension de la mise en place de la symbiose fixatrice d'azote. Les bases moléculaires du déclenchement de cette nodulation reposent principalement sur la reconnaissance, par des récepteurs de la plante, d'un unique signal synthétisé par la bactérie, les facteurs Nod. Cette reconnaissance spécifique est à la base du déclenchement des processus moléculaires et physiologiques indispensables à l'organogenèse nodulaire, à l'infection des nodules ainsi qu'à la répression du système immunitaire de la plante hôte, nécessaire à l'acceptation du symbiote.

Ce travail de thèse a permis de mettre en évidence qu'à la différence du processus symbiotique FN-dépendant, l'interaction symbiotique FN-indépendante T3SS-dépendante ne repose pas sur un unique signal comparable à la reconnaissance des FN. En effet, il requiert la sécrétion d'un cocktail d'effecteurs qui, séparément, orchestrent le déclenchement des différents processus moléculaires nécessaires à l'établissement de la nodulation. Nous avons ainsi démontré que la mise en place de la symbiose ORS3257/*A. indica* implique au moins cinq effecteurs. Les deux effecteurs NopT et NopAB ont été identifiés comme jouant un rôle majeur dans l'infection des nodules, alors que NopM1 et NopP1 jouent probablement un rôle dans la répression des mécanismes des défenses de la plante assurant ainsi une infection chronique des nodules. De manière plus intéressante, le déclenchement de l'organogénèse nodulaire dépend largement de la sécrétion d'un unique effecteur, ErnA.

Beaucoup de choses restent à découvrir en ce qui concerne le mode d'action concerté de ces cinq effecteurs. Les connaissances actuelles sur les fonctions des homologues de trois d'entre eux - NopM1, NopP1 et NopT - peuvent nous fournir des pistes intéressantes pour progresser dans la compréhension de leur rôle dans l'infection et la modulation de la réponse immunitaire d'*A. indica*. En revanche, les fonctions de NopAB et d'ErnA restent pour l'instant inconnues. La comparaison de leur séquence protéique ainsi que l'analyse *in silico* menée en utilisant le logiciel MEME, mettent en évidence que ces deux effecteurs possèdent chacun un motif CM1 et deux motifs CM2. Dans le cas où ces motifs seraient associés à une fonction spécifique, il ne serait pas à exclure que NopAB et ErnA partagent des cibles communes ou des modes d'action similaires. Décortiquer au niveau moléculaire les mécanismes par lesquels ce cocktail de cinq effecteurs aboutit à la mise en place de cette symbiose constitue l'un des objectifs principaux de notre équipe, ce qui représente probablement un challenge de plusieurs années de recherche.

2. ErnA, le premier exemple d'une famille d'effecteurs capables d'induire la nodulation ?

Au cours de ce travail, trois données indépendantes suggèrent l'existence d'autres effecteurs, non-homologues à ErnA, capables d'induire la nodulation. En effet, la mutation du gène *ernA* chez ORS3257 ne conduit pas chez *A. indica* à un phénotype Nod- strict, suggérant qu'il peut exister un autre effecteur (NopAB ?) pouvant jouer un rôle similaire à celui d'ErnA. Par ailleurs, nous avons mis en évidence que plusieurs souches de *Bradyrhizobium* phylogénétiquement proches, appartenant au Phylogroupe 5, sont capables de noduler *A. indica* alors qu'elles ne présentent pas d'homologue d'ErnA. Dans ce cas-là, il convient de vérifier que la nodulation est bien dépendante du T3SS. Enfin, dans le cas de l'interaction symbiotique USDA61 / *Glycine max* cv. Enrei, la mutation de l'homologue d'*ernA* chez USDA61 ne conduit qu'à une réduction du nombre de nodules induits (S Okazaki, communication personnelle). Notre collaborateur Shin Okazaki a pu identifier que la mutation de l'effecteur BEL2-5 conduit, quant à elle, à un phénotype Nod- strict suggérant un rôle prédominant à celui d'ErnA sur la capacité à induire la nodulation sur le soja. Dans le même sens, il a pu être montré que le transfert de ce gène dans la souche ORS3257, lui confère la capacité à noduler la variété Enrei mutée au niveau du récepteur NFR1. BEL2-5 apparaît comme l'effecteur central gouvernant la nodulation T3SS-dépendante chez *Glycine max* cv. Enrei.

Ces observations nous poussent ainsi à penser que les effecteurs ErnA et BEL2-5 pourraient constituer les deux premiers membres d'une nouvelle "famille" d'effecteurs capables d'induire l'organogénèse nodulaire chez les légumineuses. Bien que l'effecteur BEL2-5 ne soit pas homologue à ErnA, ces deux effecteurs partagent certaines caractéristiques. En effet, en collaboration avec Shin Okazaki, nous avons démontré que BEL2-5 possède un motif NLS et qu'il est, comme ErnA, adressé au noyau des cellules végétales. De plus, l'analyse *in silico* menée par MEME a conduit à l'identification des deux domaines CM1 et CM2 dans la séquence protéique de BEL2-5. En utilisant ces points communs, plusieurs gènes candidats ont émergé au sein des *Bradyrhizobium* du Phylogroupe 5 et sont en cours d'étude dans l'équipe. Par ailleurs, une approche de génomique comparative serait à envisager pour identifier des effecteurs communs à ces souches qui pourraient constituer d'autres candidats à tester par mutagénèse.

L'identification de nouveaux membres de cette "famille" d'effecteurs pourrait nous aider à développer des études structure-fonction visant à identifier au sein de ces effecteurs des domaines fonctionnels cruciaux impliqués dans leurs activités d'induction de la nodulation, mais également à mieux comprendre leur(s) origine(s) évolutive(s) et leur spécificité d'action.

3. L'induction de la nodulation par ErnA recrute-t-elle certains acteurs de la voie de signalisation Nod ?

L'organogénèse d'un nodule est un processus complexe associé à de profonds changements génétiques et hormonaux qui conduisent, entre autres, à une reprise des divisions cellulaires. L'étude de la signalisation moléculaire de la nodulation chez les légumineuses modèles a révélé le rôle déterminant joué par l'activation de la CSSP et l'expression du gène *NIN* dans l'organogénèse et l'infection des nodules. Les travaux de recherche menés depuis plusieurs années dans notre équipe sur le modèle *Bradyrhizobium* photosynthétiques / *Aeschynomene* ont permis de confirmer que plusieurs acteurs de la voie de signalisation Nod étaient également recrutés dans l'établissement de la symbiose FN-indépendante T3SS-indépendante. De plus, les analyses transcriptomiques réalisées par Okazaki et ses collaborations (2013) en Microarray et en RT-qPCR ont montré que la nodulation NF-indépendante T3SS-dépendante, déclenchée par *B. elkanii* USDA61 sur le soja En1282 (*nfr1*), est associée à une surexpression des deux gènes symbiotiques *GmNIN* et *GmENOD40*. Ainsi, l'ensemble de ces données suggère fortement que l'induction de la nodulation par ErnA passe également par certains déterminants de la voie de signalisation Nod.

Cependant, il est apparu clair que l'expression ectopique d'*ernA* dans les racines d'*A. indica*, en plus d'induire la formation de « nodule-like structures », provoque également l'induction de structures comparables à des racines latérales. Considérant que les principales phytohormones impliquées dans le développement nodulaire, à savoir les auxines et les cytokinines, sont également nécessaires au développement racinaire, on ne peut pas exclure que l'activation exercée par ErnA court-circuite complètement la voie de signalisation Nod et emprunte une voie d'induction alternative conduisant à un déséquilibre de la balance hormonale auxines/cytokinines. Dans ce sens, et très récemment, il a été démontré que les racines latérales et les nodules partagent des programmes de développement qui se chevauchent et aboutissent à l'induction de la biosynthèse d'auxines dans les futures cellules à l'origine des primordia racinaires et nodulaires (Schiessl *et al.*, 2019). Cette convergence passe par le facteur de transcription LBD16 (pour « Lob-domain protein 16 »), dont l'expression est sous le contrôle de *NIN* et dont la surexpression induit sur les racines de *Medicago truncatula* la formation de protubérances comparables à celles induites par l'expression ectopique d'ErnA dans les racines d'*A. indica*. Cette découverte renforce la possibilité qu'ErnA puisse directement déclencher la nodulation en activant l'expression de *LBD16* ou un autre facteur de transcription indépendamment des acteurs de la CSSP ou de *NIN*.

Afin de déterminer si la symbiose FN-indépendante T3SS-dépendante retrouvée au cours de l'interaction ORS3257 et les *Aeschynomene*, implique ou pas des acteurs de la voie de signalisation Nod, il devait justement être testé certains mutants symbiotiques issus de la mutagenèse EMS d'*A.*

evenia N°76 (générée par JF Arrighi pour l'étude de la symbiose NF-indépendante T3SS-indépendante). L'espèce *A. evenia* présente l'avantage d'être diploïde ce qui facilite les études de génétiques et de transcriptomiques, à la différence d'*A. indica* qui est hexaploïde. Cependant, il est rapidement apparu un problème d'efficacité symbiotique sur cette accession où seulement un ou deux nodules sur quelques plantes peuvent être induits par la souche ORS3257. L'origine de cette incompatibilité reste pour l'instant inconnue mais rend difficile l'utilisation des mutants EMS. C'est pour cela qu'il est envisagé aujourd'hui de travailler avec une autre accession d'*A. evenia* (N°21). Cette dernière a été montrée très efficace pour la nodulation avec ORS3257 en développant des approches d'extinction ciblées par ARN-interférence (RNAi) sur un certain nombre de gènes de la voie de signalisation Nod (notamment *SYMRK*, *CCaMK* et *NIN*).

L'analyse de la banque de mutants EMS a permis par ailleurs l'identification de nouveaux déterminants symbiotiques de la voie de signalisation NF-indépendante T3SS-indépendante chez *A. evenia* (JF Arrighi, communications personnelles, 2019). Ces nouveaux gènes, dont certains sont absents chez les légumineuses modèles, sont en cours d'étude dans notre équipe. Il serait également particulièrement intéressant de déterminer s'ils sont impliqués dans le processus T3SS-dépendant afin d'évaluer le degré de recouvrement de ces deux processus symbiotiques indépendants des FN.

4. Quels sont les cibles et les interactants d'ErnA ?

Les analyses de la localisation d'ErnA mettent clairement en évidence que la protéine se localise dans le noyau des cellules végétales. Jusqu'à présent, les tentatives visant à déterminer si la fonction d'ErnA est liée à sa localisation nucléaire ont échoué. Cependant, de nombreux faisceaux d'évidences nous poussent à penser que c'est bien le cas, notamment la conservation du motif NLS chez tous les homologues d'ErnA et la mise en évidence par des approches de FRET-FLIM de l'interaction d'ErnA avec les acides nucléiques. Ainsi, nous privilégions aujourd'hui l'identification des cibles et des interactants d'ErnA, plutôt que d'essayer de relier sa localisation à sa fonction.

L'interaction d'ErnA avec les acides nucléiques nous suggère qu'il agit en tant que modulateur de l'expression génétique des cellules de l'hôte. Il serait intéressant, dans un premier temps, de statuer sur la nature des acides nucléiques avec lesquels interagit ErnA (ADN ou ARN). Cette information nous permettrait de déterminer si la régulation de l'expression génique exercée par ErnA se fait au stade transcriptionnel ou post-transcriptionnel. En collaboration avec l'équipe de Laurent Deslandes (LIPM, Toulouse) l'utilisation d'une approche de FRET-FLIM, couplée à un prétraitement RNase, nous permettra de déterminer si ErnA s'associe préférentiellement avec de l'ADN ou de l'ARN (Camborde *et al.*, 2017).

Par la suite, la possibilité de transformer des racines d'*A. evenia* N°21 avec une construction *p35S-ernA*, ou *p35S-gus* en contrôle, nous permet d'envisager le développement d'une analyse transcriptomique comparative afin d'identifier des gènes dont l'expression est modulée par ErnA. Enfin, la purification d'ErnA et la fabrication d'anticorps anti-ErnA réalisés par l'équipe de Peter Mergaert (I2BC, Saclay) ouvre aussi la possibilité de développer différentes approches d'immuno-précipitations pour l'identification des interactants d'ErnA, quelles que soient leurs natures moléculaires (protéine, ADN, ou ARN). A terme, les résultats apportés par ces différentes techniques devraient nous aider à mieux comprendre le mode d'action d'ErnA et la voie de signalisation de la nodulation FN-indépendante T3SS-dépendante.

5. Le rôle du T3SS des *Bradyrhizobium* aurait-il été sous-estimé ?

Jusqu'à présent, une grande partie des études publiées sur le T3SS des *Bradyrhizobium* ont été menées sur la souche *B. diazoefficiens* USDA110. Cependant, aucun rôle majeur du T3SS au cours de l'interaction symbiotique n'a été rapporté chez cette souche. Notre analyse génomique comparative a mis en évidence une forte corrélation, chez les *Bradyrhizobium*, entre la présence des gènes de nodulation *nod* et ceux codant pour l'injectisome. Une telle conservation des deux clusters suggère que le rôle du T3SS pourrait être bien plus important qu'estimé jusqu'alors. Ainsi se pose la question du rôle joué par le T3SS des *Bradyrhizobium* au cours du processus symbiotique FN-dépendant, dominant à l'état naturel. Ne se limite-t-il qu'à la répression des mécanismes de défense de la plante hôte ?

Des résultats préliminaires obtenus en collaboration avec l'équipe dirigée par Neung Teamroong (Université de Technologie de Suranaree, Thaïlande) ont montré que la mutation d'*ernA* chez ORS3257 réduit drastiquement le nombre de nodules induit sur *V. mungo* cv. Uthong1 (P Songwattana, communication personnelle). Ces résultats suggèrent que le rôle joué par ErnA ne se limite pas seulement à l'induction de la nodulation sur *A. indica*, mais qu'il pourrait également contribuer de manière significative à la nodulation dans le cadre d'une interaction FN-dépendante. Il serait donc intéressant de poursuivre ce type d'étude sur ErnA ou d'autres effecteurs identifiés jouant un rôle similaire chez différentes souches de *Bradyrhizobium* qui interagissent suivant un processus FN-dépendant avec des légumineuses d'intérêt agronomique. Ces connaissances nous permettraient de mieux comprendre la contribution du T3SS au cours de la symbiose, ce qui pourrait aider à la sélection ou à l'engineering d'inoculum plus performant.

Il y a quelques années encore, la symbiose FN-indépendante représentait une exception limitée à l'interaction entre les *Bradyrhizobium* photosynthétiques et les *Aeschynomene*. Depuis la

découverte de la nodulation FN-indépendante T3SS-dépendante, la capacité à établir une symbiose en l'absence de FN a été étendue à de très nombreuses souches de *Bradyrhizobium* non-photosynthétiques. Cependant, les tests de nodulation ont tous été réalisés artificiellement en condition de laboratoire sur une plante non-hôte, *A. indica*. Ainsi, la question se pose sur l'utilisation de ce processus symbiotique FN-indépendant T3SS-dépendant à l'état naturel. Dans notre Article 2, nous mettons en évidence que trois souches de *Bradyrhizobium* (SEMIA6399^T, CCBAU83689 et Y36), isolées de nodules, ne possèdent pas les gènes *nodABC* mais contiennent au moins un cluster T3SS. Dans le cas où leur T3SS serait impliqué dans cette induction nodulaire, ces souches pourraient représenter le premier exemple naturel d'utilisation de ce nouveau processus symbiotique.

Beaucoup de choses restent encore à découvrir sur le T3SS des *Bradyrhizobium*. Au-delà de la caractérisation de nouveaux effecteurs de type III, ce travail de thèse met en évidence un rôle insoupçonné du T3SS et des effecteurs durant la symbiose. Le programme symbiotique caractérisé chez les légumineuses modèles a évolué de manière très sophistiqué en impliquant la perception de facteurs Nod spécifiques et la formation d'un codon d'infection intracellulaire qui permet la libération des bactéries dans les cellules des nodules en formation. Cette complexité constitue pour l'instant un frein pour transférer la capacité de nodulation aux céréales qui constituent la principale source d'alimentation humaine. La découverte que certains effecteurs de type III sont capables d'induire un processus de nodulation ravive les espoirs de voir ce projet aboutir. La compréhension des mécanismes par lesquels ces effecteurs peuvent orchestrer la mise en place d'une interaction symbiotique permettra d'envisager de nouvelles stratégies pour le développement de céréales fixatrices d'azote.

Références bibliographiques

- Abby SS, Cury J, Gugliemini J, Néron B, Touchon M, Rocha EPC. Identification of protein secretion systems in bacterial genomes. *Sci Rep* 2016; **6**:23080.
- Abby SS, Rocha EPC. The non-flagellar type III secretion system evolved from the bacterial flagellum and diversified into host-cell adapted systems. *PLoS Genet* 2012; **8**: e1002983.
- Akiyama K, Matsuzaki K, Hayashi H. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 2005; **435**: 824–827.
- Alazard D, Becker M. Aeschynomene as green manure for rice. *Plant Soil* 1987; **101**: 141–143.
- Alazard D. Nitrogen-Fixation in Pure Culture by Rhizobia Isolated from Stem Nodules of Tropical *Aeschynomene* Species. *Fems Microbiology Letters* 1990; **68**: 177–182.
- Alazard D. Stem and Root Nodulation in *Aeschynomene* spp. *Appl Environ Microbiol* 1985; **50**: 732–734.
- Alexander C, Rietschel ET. Bacteria lipopolysaccharides and innate immunity. *J Endotoxin Res* 2001; **3**: 167–202.
- Alfano JR, Charkowski AO, Deng WL, Badel JL, Petnicki-Ocwieja T, van Dijk K, *et al.* The *Pseudomonas syringae* Hrp pathogenicity island has a tripartite mosaic structure composed of a cluster of type III secretion genes bounded by exchangeable effector and conserved effector loci that contribute to parasitic fitness and pathogenicity in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 4856–4861.
- Allen ON, Allen EK. The Leguminosae : a source book of characteristics, uses and nodulation. *The University of Wisconsin Press*, Madison. 1981.
- Amadou C, Pascal G, Mangenot S, Glew M, Bontemps C, Capela D, *et al.* Genome sequence of the beta-rhizobium *Cupriavidus taiwanensis* and comparative genomics of rhizobia. *Genome Res* 2008; **18**: 1472–1483.
- Amor BB, Shaw SL, Oldroyd GED, Maillet F, Penmetsa RV, Cook D, *et al.* The NFP locus of *Medicago truncatula* controls an early step of Nod factor signal transduction upstream of a rapid calcium flux and root hair deformation. *Plant J* 2003; **34**: 495–506.
- Antolín-Llovera M, Ried MK, Parniske M. Cleavage of the SYMBIOSIS RECEPTOR-LIKE KINASE ectodomain promotes complex formation with Nod factor receptor 5. *Curr Biol* 2014; **24**: 422–427.

- Ardourel M, Demont N, Debellé D, Maillet F, de Billy F, Promé JC *et al.* Rhizobium meliloti Lipooligosaccharide Nodulation Factors: Different Structural Requirements for Bacterial Entry into Target Root Hair Cells and Induction of Plant Symbiotic Developmental Responses. *The Plant Cell* 1994; **6**:1357–1374.
- Arrighi J-F, Cartieaux F, Brown SC, Rodier-Goud M, Boursot M, Fardoux J, *et al.* Aeschynomene evenia, a model plant for studying the molecular genetics of the nod-independent rhizobium-legume symbiosis. *Mol Plant Microbe Interact* 2012; **25**: 851–861.
- Arrighi JF, Chaintreuil C, Cartieaux F, Cardi C, Rodier-Goud M, Brown SC *et al.* Radiation of the Nod-independent *Aeschynomene* relies on multiple allopolyploid speciation events. *New Phytologist* 2014; **201**: 1457–1468.
- Avontuur JR, Palmer M, Beukes CW, Chan WY, Coetzee MPA, Blom J, *et al.* Genome-informed Bradyrhizobium taxonomy: where to from here? *Syst Appl Microbiol* 2019; **42**: 427–439.
- Bailey TL, Boden M, Buske FA, Frith M, Grant CE, Clementi L, *et al.* MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Res* 2009; **37**: 202-208.
- Barker DG, Chabaud M, Russo G, Genre A. Nuclear Ca²⁺ signalling in arbuscular mycorrhizal and actinorhizal endosymbioses: on the trail of novel underground signals. *New Phytol* 2017; **214**: 533-538
- Bartsev AV, Deakin WJ, Boukli NM, McAlvin CB, Stacey G, Malnoë P, *et al.* NopL, an effector protein of Rhizobium sp. NGR234, thwarts activation of plant defense reactions. *Plant Physiol* 2004; **134**: 871–879.
- Bastedo DP, Lo T, Laflamme B, Desveaux D, Guttman DS. Diversity and Evolution of Type III Secreted Effectors: A Case Study of Three Families. *Curr Top Microbiol Immunol* 2019.
- Becker A, Pühler A. Production of exopolysaccharide. *The Rhizobiaceae* 1998; 97–118.
- Belin BJ, Busset N, Giraud E, Molinaro A, Silipo A, Newman DK. Hopanoid lipids: from membranes to plant-bacteria interactions. *Nat Rev Microbiol* 2018; **16**: 304–315.
- Bender GL, Nayudu M, Strange KKL, Rolfe BG. The nodD1 gene from *Rhizobium* strain NGR234 is a key determinant in the extension of host range to the non-legume *Parasponia*. *Mol. Plant-Microbe Interact* 1988; **1**:259–266.

- Berg HC. The rotary motor of bacterial flagella. *Annu Rev Biochem* 2003; **72**: 19–54.
- Bernal P, Llamas MA, Filloux A. Type VI secretion systems in plant-associated bacteria. *Environ Microbiol* 2018; **20**: 1–15.
- Berrabah F, Balliau T, Aït-Salem EH, George J, Zivy M, Ratet P, *et al.* Control of the ethylene signaling pathway prevents plant defenses during intracellular accommodation of the rhizobia. *New Phytol* 2018; **219**: 310–323.
- Berrabah F, Bourcy M, Cayrel A, Eschstruth A, Mondy S, Ratet P, *et al.* Growth Conditions Determine the DNF2 Requirement for Symbiosis. *PLoS ONE* 2014a; **9**: e91866.
- Berrabah F, Bourcy M, Eschstruth A, Cayrel A, Guefrachi I, Mergaert P, *et al.* A nonRD receptor-like kinase prevents nodule early senescence and defense-like reactions during symbiosis. *New Phytol* 2014b; **203**: 1305–1314.
- Boivin C, Ndoye I, Molouba F, Lajudie P de, Dupuy N, Dreyfus B, *et al.* Stem Nodulation in Legumes: Diversity, Mechanisms, and Unusual Characteristics. *Critical Reviews in Plant Sciences* 1997; **16**: 1–30.
- Boller T, Felix G. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu Rev Plant Biol* 2009; **60**: 379–406.
- Bonaldi K, Gargani D, Prin Y, Fardoux J, Gully D, Nouwen N, *et al.* Nodulation of *Aeschynomene afraspera* and *A. indica* by photosynthetic *Bradyrhizobium* Sp. strain ORS285: the nod-dependent versus the nod-independent symbiotic interaction. *Mol Plant Microbe Interact* 2011; **24**: 1359–1371.
- Bonaldi K, Gherbi H, Franche C, Bastien G, Fardoux J, Barker D, *et al.* The Nod factor-independent symbiotic signaling pathway: development of *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation for the legume *Aeschynomene indica*. *Mol Plant Microbe Interact* 2010; **23**: 1537–1544.
- Booger FC, van Rossum D. Nodulation of groundnut by *Bradyrhizobium*: a simple infection process by crack entry. *FEMS Microbiology Reviews* 1997; **21**: 5–27.
- Breedveld MW, Cremers HC, Batley M, Posthumus MA, Zevenhuizen LP, Wijffelman CA, *et al.* Polysaccharide synthesis in relation to nodulation behavior of *Rhizobium leguminosarum*. *J Bacteriol* 1993; **175**: 750–757.

- Brewin NJ. Plant Cell Wall Remodelling in the Rhizobium–Legume Symbiosis. *Critical Reviews in Plant Sciences* 2004; **23**: 293–316.
- Broghammer A, Krusell L, Blaise M, Sauer J, Sullivan JT, Maolanon N, *et al.* Legume receptors perceive the rhizobial lipochitin oligosaccharide signal molecules by direct binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; **109**: 13859–13864.
- Brottier L, Chaintreuil C, Simion P, Scornavacca C, Rivallan R, Mournet P, *et al.* A phylogenetic framework of the legume genus *Aeschynomene* for comparative genetic analysis of the Nod-dependent and Nod-independent symbioses. *BMC Plant Biol* 2018; **18**: 333.
- Broughton WJ, Jabbouri S, Perret X. Keys to symbiotic harmony. *J Bacteriol* 2000; **182**: 5641–5652.
- Buendia L, Wang T, Girardin A, Lefebvre B. The LysM receptor-like kinase SLYK10 regulates the arbuscular mycorrhizal symbiosis in tomato. *New Phytol* 2016; **210**: 184–195.
- Busset N, Di Lorenzo F, Palmigiano A, Sturiale L, Gressent F, Fardoux J, *et al.* The Very Long Chain Fatty Acid (C26:25OH) Linked to the Lipid A Is Important for the Fitness of the Photosynthetic Bradyrhizobium Strain ORS278 and the Establishment of a Successful Symbiosis with *Aeschynomene* Legumes. *Front Microbiol* 2017; **8**: 1821.
- Büttner D, Nennstiel D, Klüsener B, Bonas U. Functional analysis of HrpF, a putative type III translocon protein from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J Bacteriol* 2002; **184**: 2389–2398.
- Büttner D. Behind the lines-actions of bacterial type III effector proteins in plant cells. *FEMS Microbiol Rev* 2016; **40**: 894–937.
- Büttner D. Protein export according to schedule: architecture, assembly, and regulation of type III secretion systems from plant- and animal-pathogenic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 2012; **76**: 262–310.
- Callaham DA, Torrey JG. The structural basis of infection of root hairs of *Trifolium repens* by *Rhizobium*. *Can J Botany* 1981; **59**: 1647-1664.
- Camborde L, Jauneau A, Brière C, Deslandes L, Dumas B, Gaulin E. Detection of nucleic acid-protein interactions in plant leaves using fluorescence lifetime imaging microscopy. *Nat Protoc* 2017; **12**: 1933–1950.

- Cao Y, Halane MK, Gassmann W, Stacey G. The role of plant innate immunity in the Legume-Rhizobium symbiosis. *Annu Rev Plant Biol* 2017; **68**:535–561.
- Capoen W, Sun J, Wysham D, Otegui MS, Venkateshwaran M, Hirsch S, *et al.* Nuclear membranes control symbiotic calcium signaling of legumes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; **108**: 14348–14353.
- Catoira R, Galera C, de Billy F, Penmetsa RV, Journet EP, Maillet F, *et al.* Four genes of *Medicago truncatula* controlling components of a nod factor transduction pathway. *Plant Cell* 2000; **12**: 1647–1666.
- Cerri MR, Wang Q, Stolz P, Folgmann J, Frances L, Katzer K, *et al.* The ERN1 transcription factor gene is a target of the CCaMK/CYCLOPS complex and controls rhizobial infection in *Lotus japonicus*. *New Phytol* 2017; **215**: 323–337.
- Chaintreuil C, Arrighi J-F, Giraud E, Miché L, Moulin L, Dreyfus B, *et al.* Evolution of symbiosis in the legume genus *Aeschynomene*. *New Phytol* 2013; **200**: 1247–1259.
- Chaintreuil C, Boivin C, Dreyfus B, Giraud E. Characterization of the common nodulation genes of the photosynthetic *Bradyrhizobium* sp. ORS285 reveals the presence of a new insertion sequence upstream of *nodA*. *FEMS Microbiol Lett* 2001; **194**: 83–86.
- Chaintreuil C, Giraud E, Prin Y, Lorquin J, Bâ A, Gillis M, *et al.* Photosynthetic bradyrhizobia are natural endophytes of the African wild rice *Oryza breviligulata*. *Appl Environ Microbiol* 2000; **66**: 5437–5447.
- Chaintreuil C, Rivallan R, Bertoli DJ, Klopp C, Gouzy J, Courtois B, *et al.* A gene-based map of the Nod factor-independent *Aeschynomene evenia* sheds new light on the evolution of nodulation and legume genomes. *DNA Res* 2016; **23**: 365–376.
- Chakravarthy S, Huot B, Kvitko BH. Effector Translocation: Cya Reporter Assay. *Methods Mol Biol* 2017; **1615**: 473–487.
- Charpentier M, Sun J, Vaz Martins T, Radhakrishnan GV, Findlay K, Soumpourou E, *et al.* Nuclear-localized cyclic nucleotide-gated channels mediate symbiotic calcium oscillations. *Science* 2016; **352**: 1102–1105.
- Chinchilla D, Bauer Z, Regenass M, Boller T, Felix G. The Arabidopsis receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception. *Plant Cell* 2006; **18**: 465–476.

- Cleland EE, Harpole WS. Nitrogen enrichment and plant communities. *Ann N Y Acad Sci* 2010; **1195**: 46–61.
- Clarke VC, Loughlin PC, Day DA, Smith PMC. Transport processes of the legume symbiosome membrane. *Front Plant Sci* 2014; **5**: 699.
- Coba de la Peña T, Fedorova E, Pueyo JJ, Lucas MM. The Symbiosome: Legume and Rhizobia Co-evolution toward a Nitrogen-Fixing Organelle? *Front Plant Sci* 2017; **8**: 2229.
- Cooper JB, Long SR. Morphogenetic Rescue of Rhizobium meliloti Nodulation Mutants by trans-Zeatin Secretion. *Plant Cell* 1994; **6**: 215–225.
- Cooper JL, Till BJ, Laport RG, Darlow MC, Kleffner JM, Jamaï A, *et al.* TILLING to detect induced mutations in soybean. *BMC Plant Biol* 2008; **8**: 9.
- Costa TRD, Felisberto-Rodrigues C, Meir A, Prevost MS, Redzej A, Trokter M, *et al.* Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights. *Nat Rev Microbiol* 2015; **13**: 343–359.
- Cunningham S, Kollmeyer WD, Stacey G. Chemical control of interstrain competition for soybean nodulation by *Bradyrhizobium japonicum*. *Appl Environ Microbiol* 1991; **57**: 1886.
- Czernic P, Gully D, Cartieaux F, Moulin L, Guefrachi I, Patrel D, *et al.* Convergent Evolution of Endosymbiont Differentiation in Dalbergioid and Inverted Repeat-Lacking Clade Legumes Mediated by Nodule-Specific Cysteine-Rich Peptides. *Plant Physiol* 2015; **169**: 1254–1265.
- Dai W-J, Zeng Y, Xie Z-P, Staehelin C. Symbiosis-promoting and deleterious effects of NopT, a novel type 3 effector of Rhizobium sp. strain NGR234. *J Bacteriol* 2008; **190**: 5101–5110.
- Dale C, Moran NA. Molecular interactions between bacterial symbionts and their hosts. *Cell* 2006; **126**: 453–465.
- Daubech B, Poinso V, Klonowska A, Capela D, Chaintreuil C, Moulin L, Marchetti M, Masson-Boivin C. noeM, a new nodulation gene involved in the biosynthesis of Nod-Factors with open-chain oxidized terminal residue and in symbiosis with *Mimosa pudica*. *Mol Plant Microbe Interact* 2019; *in press*

- de Campos SB, Deakin WJ, Broughton WJ, Passaglia LMP. Roles of flavonoids and the transcriptional regulator TtsI in the activation of the type III secretion system of *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA587. *Microbiology* 2011; **157**: 627–635.
- de Lajudie PM, Andrews M, Ardley J, Eardly B, Jumas-Bilak E, Kuzmanović N, *et al.* Minimal standards for the description of new genera and species of rhizobia and agrobacteria. *Int J Syst Evol Microbiol* 2019; **69**: 1852–1863.
- de Lajudie PM, Young JPW. International Committee on Systematics of Prokaryotes Subcommittee for the Taxonomy of Rhizobium and Agrobacterium Minutes of the meeting, Budapest, 25 August 2016. *Int J Syst Evol Microbiol* 2017; **67**: 2485–2494.
- Deakin WJ, Broughton WJ. Symbiotic use of pathogenic strategies: rhizobial protein secretion systems. *Nat Rev Microbiol* 2009; **7**: 312–320.
- Deakin WJ, Marie C, Saad MM, Krishnan HB, Broughton WJ. NopA is associated with cell surface appendages produced by the type III secretion system of *Rhizobium* sp. strain NGR234. *Mol Plant Microbe Interact* 2005; **18**: 499–507.
- Dean P. Functional domains and motifs of bacterial type III effector proteins and their roles in infection. *FEMS Microbiol Rev* 2011; **35**: 1100–1125.
- Delamuta JRM, Gomes DF, Ribeiro RA, Chueire LMO, Souza RC, Almeida LGP, *et al.* Genome Sequence of *Bradyrhizobium tropiciagri* Strain CNPSo 1112T, Isolated from a Root Nodule of *Neonotonia wightii*. *Genome Announc* 2015; **3**.
- Delamuta JRM, Ribeiro RA, Ormeño-Orrillo E, Melo IS, Martínez-Romero E, Hungria M. Polyphasic evidence supporting the reclassification of *Bradyrhizobium japonicum* group Ia strains as *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2013; **63**: 3342–3351.
- Delgado J, Forst S, Harlocker S, Inouye M. Identification of a phosphorylation site and functional analysis of conserved aspartic acid residues of OmpR, a transcriptional activator for ompF and ompC in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 1993; **10**: 1037–1047.
- Delgado-Baquerizo M, Oliverio AM, Brewer TE, Benavent-González A, Eldridge DJ, Bardgett RD, *et al.* A global atlas of the dominant bacteria found in soil. *Science* 2018; **359**: 320–325.
- Dénarié J, Debellé F, Promé JC. Rhizobium lipo-chitoooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annu Rev Biochem* 1996; **65**: 503–535.

- Deng W, Marshall NC, Rowland JL, McCoy JM, Worrall LJ, Santos AS, *et al.* Assembly, structure, function and regulation of type III secretion systems. *Nat Rev Microbiol* 2017; **15**: 323–337.
- Diepol A, Armitage JP. Type III secretion systems: the bacterial flagellum and the injectisome. *Phil. Trans. R.* 2015; **370**: 20150020
- Dohlich K, Zumsteg AB, Goosmann C, Kolbe M. A substrate-fusion protein is trapped inside the Type III Secretion System channel in *Shigella flexneri*. *PLoS Pathog* 2014; **10**: e1003881.
- Dou D, Zhou J-M. Phytopathogen effectors subverting host immunity: different foes, similar battleground. *Cell Host Microbe* 2012; **12**: 484–495.
- Downen RH, Engel JL, Shao F, Ecker JR, Dixon JE. A family of bacterial cysteine protease type III effectors utilizes acylation-dependent and -independent strategies to localize to plasma membranes. *J Biol Chem* 2009; **284**: 15867–15879.
- Downie JA. The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots. *FEMS Microbiol Rev* 2010; **34**: 150–170.
- Doyle JJ, Luckow MA. The Rest of the Iceberg. Legume Diversity and Evolution in a Phylogenetic Context. *Plant Physiol* 2003; **131**: 900–910.
- Dreyfus BL, Dommergues YR. Nodulation of Acacia Species by Fast- and Slow-Growing Tropical Strains of Rhizobium. *Appl Environ Microbiol* 1981; **41**: 97–99.
- Dreyfus B, Garcia JL, Gillis M. Characterization of Azorhizobium-Caulinodans Gen-Nov, Sp-Nov, a Stem-Nodulating Nitrogen-Fixing Bacterium Isolated from Sesbania-Rostrata. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1988; **38**: 89–98.
- Durán D, Imperial J, Palacios J, Ruiz-Argüeso T, Göttfert M, Zehner S, *et al.* Characterization of a novel MIIA domain-containing protein (MdcE) in *Bradyrhizobium* spp. *FEMS Microbiol Lett* 2018; **365**.
- Ehrhardt DW, Wais R, Long SR. Calcium spiking in plant root hairs responding to Rhizobium nodulation signals. *Cell* 1996; **85**: 673–681.
- Endre G, Kereszt A, Kevei Z, Mihacea S, Kaló P, Kiss GB. A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature* 2002; **417**: 962–966.

- Engelhardt S, Lee J, Gäbler Y, Kemmerling B, Haapalainen M-L, Li C-M, *et al.* Separable roles of the *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* accessory protein HrpZ1 in ion-conducting pore formation and activation of plant immunity. *Plant J* 2009; **57**: 706–717.
- Esseling JJ, Lhuissier FGP, Emons AMC. Nod factor-induced root hair curling: continuous polar growth towards the point of nod factor application. *Plant Physiol* 2003; **132**: 1982–1988.
- Fabre S, Gully D, Poitout A, Patrel D, Arrighi J-F, Giraud E, *et al.* Nod Factor-Independent Nodulation in *Aeschynomene evenia* Required the Common Plant-Microbe Symbiotic Toolkit. *Plant Physiol* 2015; **169**: 2654–2664.
- Falcone Ferreyra ML, Rius SP, Casati P. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Front Plant Sci* 2012; **3**: 222.
- Faruque OM, Miwa H, Yasuda M, Fujii Y, Kaneko T, Sato S, *et al.* Identification of *Bradyrhizobium elkanii* Genes Involved in Incompatibility with Soybean Plants Carrying the Rj4 Allele. *Appl Environ Microbiol* 2015; **81**: 6710–6717.
- Felix G, Duran JD, Volko S, Boller T. Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J* 1999; **18**: 265–276.
- Ferguson BJ, Indrasumunar A, Hayashi S, Lin M-H, Lin Y-H, Reid DE, *et al.* Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *J Integr Plant Biol* 2010; **52**: 61–76.
- Ferguson BJ, Mathesius U. Phytohormone regulation of legume-rhizobia interactions. *J Chem Ecol* 2014; **40**: 770–790.
- Fonouni-Farde C, Tan S, Baudin M, Brault M, Wen J, Mysore KS, *et al.* DELLA-mediated gibberellin signalling regulates Nod factor signalling and rhizobial infection. *Nat Commun* 2016; **7**: 12636.
- Fotiadis CT, Dimou M, Georgakopoulos DG, Katinakis P, Tampakaki AP. Functional characterization of NopT1 and NopT2, two type III effectors of *Bradyrhizobium japonicum*. *FEMS Microbiol Lett* 2012; **327**: 66–77.
- Fournier J, Teillet A, Chabaud M, Ivanov S, Genre A, Limpens E, *et al.* Remodeling of the infection chamber before infection thread formation reveals a two-step mechanism for rhizobial entry into the host legume root hair. *Plant Physiol* 2015; **167**: 1233–1242.

- Fournier J, Timmers ACJ, Sieberer BJ, Jauneau A, Chabaud M, Barker DG. Mechanism of Infection Thread Elongation in Root Hairs of *Medicago truncatula* and Dynamic Interplay with Associated Rhizobial Colonization. *Plant Physiology* 2008; **148**: 1985–1995
- Foyer CH, Lam H-M, Nguyen HT, Siddique KHM, Varshney RK, Colmer TD, *et al.* Neglecting legumes has compromised human health and sustainable food production. *Nat Plants* 2016; **2**: 16112.
- Francis MS, Wolf-Watz H, Forsberg A. Regulation of type III secretion systems. *Curr Opin Microbiol* 2002; **5**: 166–172.
- Fraysse N, Couderc F, Poinot V. Surface polysaccharide involvement in establishing the rhizobium-legume symbiosis. *Eur J Biochem* 2003; **270**: 1365–1380.
- Freiberg C, Fellay R, Bairoch A, Broughton WJ, Rosenthal A, Perret X. Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. *Nature* 1997; **387**: 394–401.
- Gage DJ. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004; **68**: 280–300.
- Garrido-Sanz D, Redondo-Nieto M, Mongiardini E, Blanco-Romero E, Durán D, Quelas JI, *et al.* Phylogenomic Analyses of *Bradyrhizobium* Reveal Uneven Distribution of the Lateral and Subpolar Flagellar Systems, Which Extends to Rhizobiales. *Microorganisms* 2019; **7**.
- Gaudio-Pedraza R, Beck M, Frances L, Kirk P, Ripodas C, Niebel A, *et al.* Callose-Regulated Symplastic Communication Coordinates Symbiotic Root Nodule Development. *Curr Biol* 2018; **28**: 3562-3577.e6.
- Gazi AD, Sarris PF, Fadouloglou VE, Charova SN, Mathioudakis N, Panopoulos NJ, *et al.* Phylogenetic analysis of a gene cluster encoding an additional, rhizobial-like type III secretion system that is narrowly distributed among *Pseudomonas syringae* strains. *BMC Microbiol* 2012; **12**: 188.
- Ge Y-Y, Xiang Q-W, Wagner C, Zhang D, Xie Z-P, Staehelin C. The type 3 effector NopL of *Sinorhizobium* sp. strain NGR234 is a mitogen-activated protein kinase substrate. *J Exp Bot* 2016; **67**: 2483–2494.
- Genre A, Russo G. Does a Common Pathway Transduce Symbiotic Signals in Plant-Microbe Interactions? *Front Plant Sci* 2016; **7**: 96.
- Giraud E, Fardoux J, Fourrier N, Hannibal L, Genty B, Bouyer P, *et al.* Bacteriophytochrome controls photosystem synthesis in anoxygenic bacteria. *Nature* 2002; **417**: 202–205.

- Giraud E, Moulin L, Vallenet D, Barbe V, Cytryn E, Avarre J-C, *et al.* Legumes symbioses: absence of Nod genes in photosynthetic bradyrhizobia. *Science* 2007; **316**: 1307–1312.
- Gleason C, Chaudhuri S, Yang T, Muñoz A, Poovaiah BW, Oldroyd GED. Nodulation independent of rhizobia induced by a calcium-activated kinase lacking autoinhibition. *Nature* 2006; **441**: 1149–1152.
- Gophna U, Ron EZ, Graur D. Bacterial type III secretion systems are ancient and evolved by multiple horizontal-transfer events. *Gene* 2003; **312**: 151–163.
- Göttfert M, Röthlisberger S, Kündig C, Beck C, Marty R, Hennecke H. Potential symbiosis-specific genes uncovered by sequencing a 410-kilobase DNA region of the *Bradyrhizobium japonicum* chromosome. *J Bacteriol* 2001; **183**: 1405–1412.
- Gourion B, Berrabah F, Ratet P, Stacey G. Rhizobium-legume symbioses: the crucial role of plant immunity. *Trends Plant Sci* 2015; **20**: 186–194.
- Graham PH, Vance CP. Legumes: Importance and Constraints to Greater Use. *Plant Physiology* 2003; **131**: 872–877.
- Greenberg JT, Yao N. The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Cell Microbiol* 2004; **6**: 201–211.
- Gresshoff PM, Skotnicki ML, Eadie JF, Rolfe BG. Viability of *Rhizobium trifolii* bacteroids from clover root nodules. *Plant Sci Lett* 1977; **10**: 299–304.
- Griesmann M, Chang Y, Liu X, Song Y, Haberer G, Crook MB, *et al.* Phylogenomics reveals multiple losses of nitrogen-fixing root nodule symbiosis. *Science* 2018; **361**.
- Guefrachi I, Pierre O, Timchenko T, Alunni B, Barrière Q, Czernic P, *et al.* Bradyrhizobium BclA Is a Peptide Transporter Required for Bacterial Differentiation in Symbiosis with Aeschynomene Legumes. *Mol Plant Microbe Interact* 2015; **28**: 1155–1166.
- Guinel FC. Getting around the legume nodule: I. The structure of the peripheral zone in four nodule types. *Botany-Botanique* 2009; **87**: 1117–1138.
- Gully D, Czernic P, Cruveiller S, Mahé F, Longin C, Vallenet D, *et al.* Transcriptome Profiles of Nod Factor-independent Symbiosis in the Tropical Legume *Aeschynomene evenia*. *Sci Rep* 2018; **8**: 10934.

- Gully D, Gargani D, Bonaldi K, Grangeteau C, Chaintreuil C, Fardoux J, *et al.* A Peptidoglycan-Remodeling Enzyme Is Critical for Bacteroid Differentiation in Bradyrhizobium spp. During Legume Symbiosis. *Mol Plant Microbe Interact* 2016; **29**: 447–457.
- Haag AF, Arnold MFF, Myka KK, Kerscher B, Dall’Angelo S, Zanda M, *et al.* Molecular insights into bacteroid development during Rhizobium-legume symbiosis. *FEMS Microbiol Rev* 2013; **37**: 364–383.
- Haag AF, Baloban M, Sani M, Kerscher B, Pierre O, Farkas A, *et al.* Protection of Sinorhizobium against host cysteine-rich antimicrobial peptides is critical for symbiosis. *PLoS Biol* 2011; **9**: e1001169.
- Haapalainen M, Engelhardt S, Küfner I, Li C-M, Nürnberger T, Lee J, *et al.* Functional mapping of harpin HrpZ of Pseudomonas syringae reveals the sites responsible for protein oligomerization, lipid interactions and plant defence induction. *Mol Plant Pathol* 2011; **12**: 151–166.
- Halbleib CM, Ludden PW. Regulation of biological nitrogen fixation. *J Nutr* 2000; **130**: 1081–1084.
- Hayashi M, Shiro S, Kanamori H, Mori-Hosokawa S, Sasaki-Yamagata H, Sayama T, *et al.* A thaumatin-like protein, Rj4, controls nodule symbiotic specificity in soybean. *Plant Cell Physiol* 2014; **55**: 1679–1689.
- Heckmann AB, Sandal N, Bek AS, Madsen LH, Jurkiewicz A, Nielsen MW, *et al.* Cytokinin induction of root nodule primordia in Lotus japonicus is regulated by a mechanism operating in the root cortex. *Mol Plant Microbe Interact* 2011; **24**: 1385–1395.
- Heidstra R, Geurts R, Franssen H, Spaik HP, Van Kammen A, Bisseling T. Root Hair Deformation Activity of Nodulation Factors and Their Fate on Vicia sativa. *Plant Physiol* 1994; **105**: 787–797.
- Hempel J, Zehner S, Göttfert M, Patschkowski T. Analysis of the secretome of the soybean symbiont Bradyrhizobium japonicum. *J Biotechnol* 2009; **140**: 51–58.
- Hirsch AM, Bhuvaneshwari TV, Torrey JG, Bisseling T. Early nodulin genes are induced in alfalfa root outgrowths elicited by auxin transport inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 1244–1248.
- Hoche V, Ngom M, Carré-Mlouka A, Tisseyre P, Gherbi H, Svistoonoff S. Signalling in actinorhizal root nodule symbioses. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2019; **112**: 23–29.

- Horváth B, Domonkos Á, Kereszt A, Szűcs A, Ábrahám E, Ayaydin F, *et al.* Loss of the nodule-specific cysteine rich peptide, NCR169, abolishes symbiotic nitrogen fixation in the *Medicago truncatula* dnf7 mutant. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015; **112**: 15232–15237.
- Hsiao WWL, Ung K, Aeschliman D, Bryan J, Finlay BB, Brinkman FSL. Evidence of a large novel gene pool associated with prokaryotic genomic islands. *PLoS Genet* 2005; **1**: e62.
- Hu Y, Huang H, Cheng X, Shu X, White AP, Stavrinides J, *et al.* A global survey of bacterial type III secretion systems and their effectors. *Environ Microbiol* 2017; **19**: 3879–3895.
- Hueck CJ. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998; **62**: 379–433.
- Iida T, Itakura M, Anda M, Sugawara M, Isawa T, Okubo T, *et al.* Symbiosis island shuffling with abundant insertion sequences in the genomes of extra-slow-growing strains of soybean bradyrhizobia. *Appl Environ Microbiol* 2015; **81**: 4143–4154.
- Ivanov S, Fedorova EE, Limpens E, De Mita S, Genre A, Bonfante P, *et al.* Rhizobium-legume symbiosis shares an exocytotic pathway required for arbuscule formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; **109**: 8316–8321.
- Jabbouri S, Fellay R, Talmont F, Kamalaprija P, Burger U, Relić B, *et al.* Involvement of nodS in N-methylation and nodU in 6-O-carbamoylation of *Rhizobium* sp. NGR234 nod factors. *J Biol Chem* 1995; **270**: 22968–22973.
- Jamet A, Mandon K, Puppo A, Hérouart D. H₂O₂ is required for optimal establishment of the *Medicago sativa*/*Sinorhizobium meliloti* symbiosis. *J Bacteriol* 2007; **189**: 8741–8745.
- Jiménez-Guerrero I, Pérez-Montaña F, Medina C, Ollero F, López-Baena FJ. NopC is a *Rhizobium*-specific type 3 secretion system effector secreted by *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* HH103. *PLoS ONE* 2015; **10**: e0142866.
- Jin Y, Liu H, Luo D, Yu N, Dong W, Wang C, *et al.* DELLA proteins are common components of symbiotic rhizobial and mycorrhizal signalling pathways. *Nat Commun* 2016; **7**: 12433.
- Jones FP, Clark IM, King R, Shaw LJ, Woodward MJ, Hirsch PR. Novel European free-living, non-diazotrophic Bradyrhizobium isolates from contrasting soils that lack nodulation and nitrogen fixation genes - a genome comparison. *Sci Rep* 2016; **6**: 25858.
- Jones JDG, Dangl JL. The plant immune system. *Nature* 2006; **444**: 323–329.

- Jones KM, Sharopova N, Lohar DP, Zhang JQ, VandenBosch KA, Walker GC. Differential response of the plant *Medicago truncatula* to its symbiont *Sinorhizobium meliloti* or an exopolysaccharide-deficient mutant. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 704–709.
- Jordan DC. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a Genus of Slow-Growing, Root Nodule Bacteria from Leguminous Plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1982; **32**: 136–139.
- Juhas M, van der Meer JR, Gaillard M, Harding RM, Hood DW, Crook DW. Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. *FEMS Microbiol Rev* 2009; **33**: 376–393.
- Kambara K, Ardisson S, Kobayashi H, Saad MM, Schumpp O, Broughton WJ, *et al.* Rhizobia utilize pathogen-like effector proteins during symbiosis. *Mol Microbiol* 2009; **71**: 92–106.
- Kanamori N, Madsen LH, Radutoiu S, Frantescu M, Quistgaard EMH, Miwa H, *et al.* A nucleoporin is required for induction of Ca²⁺ spiking in legume nodule development and essential for rhizobial and fungal symbiosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**: 359–364.
- Kaneko T, Nakamura Y, Sato S, Asamizu E, Kato T, Sasamoto S, *et al.* Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA Res* 2000; **7**: 331–338.
- Kannenberg EL, Brewin NJ. Host-plant invasion by *Rhizobium*: the role of cell-surface components. *Trends Microbiol* 1994; **2**: 277–283.
- Kannenberg EL, Perzl M, Müller P, Härtner T, Poralla K. Hopanoid lipids in *Bradyrhizobium* and other plant-associated bacteria and cloning of the *Bradyrhizobium japonicum* squalene-hopene cyclase gene. *Plant Soil* 1996; **186**: 107–112.
- Kawaharada Y, Kelly S, Nielsen MW, Hjuler CT, Gysel K, Muszyński A, *et al.* Receptor-mediated exopolysaccharide perception controls bacterial infection. *Nature* 2015; **523**: 308–312.
- Kenicer G. Legumes of the World. *Edinburgh Journal of Botany* 2005; **62**: 195–199.
- Kim M, Chen Y, Xi J, Waters C, Chen R, Wang D. An antimicrobial peptide essential for bacterial survival in the nitrogen-fixing symbiosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015; **112**: 15238–15243.
- Kim WS, Krishnan HB. A *nopA* deletion mutant of *Sinorhizobium fredii* USDA257, a soybean symbiont, is impaired in nodulation. *Curr Microbiol* 2014; **68**: 239–246.

- Kimbrel JA, Thomas WJ, Jiang Y, Creason AL, Thireault CA, Sachs JL, *et al.* Mutualistic Co-evolution of Type III Effector Genes in *Sinorhizobium fredii* and *Bradyrhizobium japonicum*. *PLoS Pathogens* 2013; **9**: e1003204.
- Kistner C, Parniske M. Evolution of signal transduction in intracellular symbiosis. *Trends Plant Sci* 2002; **7**: 511–518.
- Klitgaard BB, Lavin M. Dalbergieae. Lewis GP, Schrire B, MacKinder B, M. Lock M. [eds.], Legumes of the world, 2005; 307 – 335. *Royal Botanic Gardens, Kew, UK.*
- Klose KE, Weiss DS, Kustu S. Glutamate at the site of phosphorylation of nitrogen-regulatory protein NTRC mimics aspartyl-phosphate and activates the protein. *J Mol Biol* 1993; **232**: 67–78.
- Kobayashi H, Naciri-Graven Y, Broughton WJ, Perret X. Flavonoids induce temporal shifts in gene-expression of nod-box controlled loci in *Rhizobium* sp. NGR234. *Mol Microbiol* 2004; **51**: 335–347.
- Kondorosi E, Buiré M, Cren M, Iyer N, Hoffmann B, Kondorosi A. Involvement of the *syrM* and *nodD3* genes of *Rhizobium meliloti* in *nod* gene activation and in optimal nodulation of the plant host. *Mol Microbiol* 1991; **5**: 3035–3048.
- Kondorosi E, Mergaert P, Kereszt A. A paradigm for endosymbiotic life: cell differentiation of *Rhizobium* bacteria provoked by host plant factors. *Annu Rev Microbiol* 2013; **67**: 611–628.
- Kosuta S, Hazledine S, Sun J, Miwa H, Morris RJ, Downie JA, *et al.* Differential and chaotic calcium signatures in the symbiosis signaling pathway of legumes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 9823–9828.
- Krause A, Doerfel A, Göttfert M. Mutational and transcriptional analysis of the type III secretion system of *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol Plant Microbe Interact* 2002; **15**: 1228–1235.
- Krishnan HB, Lewin A, Fellay R, Broughton WJ, Pueppke SG. Differential expression of *nodS* accounts for the varied abilities of *Rhizobium fredii* USDA257 and *Rhizobium* sp. strain NGR234 to nodulate *Leucaena* spp. *Mol Microbiol* 1992; **6**: 3321–3330.
- Kudla J, Becker D, Grill E, Hedrich R, Hippler M, Kummer U, *et al.* Advances and current challenges in calcium signaling. *New Phytol* 2018; **218**: 414–431.

- Lamouche F, Gully D, Chaumeret A, Nouwen N, Verly C, Pierre O, *et al.* Transcriptomic dissection of *Bradyrhizobium* sp. strain ORS285 in symbiosis with *Aeschynomene* spp. inducing different bacteroid morphotypes with contrasted symbiotic efficiency. *Environ Microbiol* 2018; **21**: 3244–3258.
- Lan CY, Igo MM. Differential expression of the OmpF and OmpC porin proteins in *Escherichia coli* K-12 depends upon the level of active OmpR. *J Bacteriol* 1998; **180**: 171–174.
- Lang K, Lindemann A, Hauser F, Göttfert M. The genistein stimulon of *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol Genet Genomics* 2008; **279**: 203–211.
- Lavin M, Pennington RT, Klitgaard BB, Sprent JI, Cavalcante de Lima H, Gasson PE. The dalbergioid legumes (Fabaceae): delimitation of a pantropical monophyletic clade. *Am J Bot* 2001; **88**: 503–553.
- Le Quéré A, Gully D, Teulet A, Navarro E, Gargani D, Fardoux J, *et al.* Complete Genome Sequence of *Bradyrhizobium* sp. Strain ORS3257, an Efficient Nitrogen-Fixing Bacterium Isolated from Cowpea in Senegal. *Microbiol Resour Announc* 2019; **8**.
- Lerouge P, Roche P, Faucher C, Maillet F, Truchet G, Promé JC, *et al.* Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature* 1990; **344**: 781–784.
- Lévy J, Bres C, Geurts R, Chalhoub B, Kulikova O, Duc G, *et al.* A putative Ca²⁺ and calmodulin-dependent protein kinase required for bacterial and fungal symbioses. *Science* 2004; **303**: 1361–1364.
- Lewin A, Cervantes E, Chee-Hoong W, Broughton WJ. nodSU, two new nod genes of the broad host range *Rhizobium* strain NGR234 encode host-specific nodulation of the tropical tree *Leucaena leucocephala*. *Mol Plant Microbe Interact* 1990; **3**: 317–326.
- Lewis GP, Schrire BD, Mackinder BA, Rico L, Clark R. A 2013 linear sequence of legume genera set in a phylogenetic context — A tool for collections management and taxon sampling. 2013; **83**: 76–84.
- Li YH, Wang R, Sui XH, Wang ET, Zhang XX, Tian CF, *et al.* *Bradyrhizobium nanningense* sp. nov., *Bradyrhizobium guangzhouense* sp. nov. and *Bradyrhizobium zhanjiangense* sp. nov., isolated from effective nodules of peanut in Southeast China. *Syst Appl Microbiol* 2019; **42**: 126002.

- Liang Y, Cao Y, Tanaka K, Thibivilliers S, Wan J, Choi J, *et al.* Nonlegumes respond to rhizobial Nod factors by suppressing the innate immune response. *Science* 2013; **341**: 1384–1387.
- Libault M, Farmer A, Brechenmacher L, Drnevich J, Langley RJ, Bilgin DD, *et al.* Complete transcriptome of the soybean root hair cell, a single-cell model, and its alteration in response to *Bradyrhizobium japonicum* infection. *Plant Physiol* 2010; **152**: 541–552.
- Lin Y-H, Machner MP. Exploitation of the host cell ubiquitin machinery by microbial effector proteins. *J Cell Sci* 2017; **130**: 1985–1996.
- Lindgren PB, Peet RC, Panopoulos NJ. Gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. 'phaseolicola' controls pathogenicity of bean plants and hypersensitivity of nonhost plants. *J Bacteriol* 1986; **168**: 512–522.
- Ling J, Wang H, Wu P, Li T, Tang Y, Naseer N, *et al.* Plant nodulation inducers enhance horizontal gene transfer of *Azorhizobium caulinodans* symbiosis island. *Proc Natl Acad Sci USA* 2016; **113**: 13875–13880.
- Liu H, Zhang C, Yang J, Yu N, Wang E. Hormone modulation of legume-rhizobial symbiosis. *J Integr Plant Biol* 2018; **60**: 632–648.
- Liu J-J, Sturrock R, Ekramoddoullah AKM. The superfamily of thaumatin-like proteins: its origin, evolution, and expression towards biological function. *Plant Cell Rep* 2010; **29**: 419–436.
- Liu X, Luo Y, Li Z, Wei G. Functional Analysis of a Putative Type III Secretion System in Stress Adaption by *Mesorhizobium alhagi* CCNWXJ12-2T. *Front Microbiol* 2018; **9**: 263.
- Loh J, Stacey G. Nodulation gene regulation in *Bradyrhizobium japonicum*: a unique integration of global regulatory circuits. *Appl Environ Microbiol* 2003; **69**: 10–17.
- Lohou D, Lonjon F, Genin S, Vailleau F. Type III chaperones & Co in bacterial plant pathogens: a set of specialized bodyguards mediating effector delivery. *Front Plant Sci* 2013; **4**.
- Lopez-Gomez M, Sandal N, Stougaard J, Boller T. Interplay of flg22-induced defence responses and nodulation in *Lotus japonicus*. *J Exp Bot* 2012; **63**: 393–401.

- López-López A, Negrete-Yankelevich S, Rogel MA, Ormeño-Orrillo E, Martínez J, Martínez-Romero E. Native bradyrhizobia from Los Tuxtlas in Mexico are symbionts of *Phaseolus lunatus* (Lima bean). *Syst Appl Microbiol* 2013; **36**: 33–38.
- Lorio JC, Kim WS, Krishnan HB. NopB, a soybean cultivar-specificity protein from *Sinorhizobium fredii* USDA257, is a type III secreted protein. *Mol Plant Microbe Interact* 2004; **17**: 1259–1268.
- LPWG TLPW. A new subfamily classification of the leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. *Taxon* 2017; **66**: 44–77.
- Macho AP, Zipfel C. Plant PRRs and the activation of innate immune signaling. *Mol Cell* 2014; **54**: 263–272.
- Maddocks SE, Oyston PCF. Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiology* 2008; **154**: 3609–3623.
- Madsen EB, Antolín-Llovera M, Grossmann C, Ye J, Vieweg S, Broghammer A, *et al.* Autophosphorylation is essential for the in vivo function of the *Lotus japonicus* Nod factor receptor 1 and receptor-mediated signalling in cooperation with Nod factor receptor 5. *Plant J* 2011; **65**: 404–417.
- Madsen EB, Madsen LH, Radutoiu S, Olbryt M, Rakwalska M, Szczyglowski K, *et al.* A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. *Nature* 2003; **425**: 637–640.
- Madsen LH, Tirichine L, Jurkiewicz A, Sullivan JT, Heckmann AB, Bek AS, *et al.* The molecular network governing nodule organogenesis and infection in the model legume *Lotus japonicus*. *Nat Commun* 2010; **1**: 10.
- Maillet F, Poinot V, André O, Puech-Pagès V, Haouy A, Gueunier M, *et al.* Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. *Nature* 2011; **469**: 58–63.
- Makino F, Shen D, Kajimura N, Kawamoto A, Pissaridou P, Oswin H, *et al.* The Architecture of the Cytoplasmic Region of Type III Secretion Systems. *Sci Rep* 2016; **6**: 33341.
- Marie C, Broughton WJ, Deakin WJ. Rhizobium type III secretion systems: legume charmers or alarmers? *Curr Opin Plant Biol* 2001; **4**: 336–342.

- Marie C, Deakin WJ, Ojanen-Reuhs T, Diallo E, Reuhs B, Broughton WJ, *et al.* TtsI, a key regulator of Rhizobium species NGR234 is required for type III-dependent protein secretion and synthesis of rhamnose-rich polysaccharides. *Mol Plant Microbe Interact* 2004; **17**: 958–966.
- Marie C, Deakin WJ, Viprey V, Kopcińska J, Golinowski W, Krishnan HB, *et al.* Characterization of Nops, nodulation outer proteins, secreted via the type III secretion system of NGR234. *Mol Plant Microbe Interact* 2003; **16**: 743–751.
- Marino D, Andrio E, Danchin EGJ, Oger E, Gucciardo S, Lambert A, *et al.* A *Medicago truncatula* NADPH oxidase is involved in symbiotic nodule functioning. *New Phytol* 2011; **189**: 580–592.
- Marlovits TC, Kubori T, Sukhan A, Thomas DR, Galán JE, Unger VM. Structural insights into the assembly of the type III secretion needle complex. *Science* 2004; **306**: 1040–1042.
- Martínez-Abarca F, Herrera-Cervera JA, Bueno P, Sanjuan J, Bisseling T, Olivares J. Involvement of Salicylic Acid in the Establishment of the Rhizobium meliloti-Alfalfa Symbiosis. *MPMI* 1998; **11**: 153–155.
- Masson-Boivin C, Giraud E, Perret X, Batut J. Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? *Trends Microbiol* 2009; **17**: 458–466.
- McCann HC, Guttman DS. Evolution of the type III secretion system and its effectors in plant-microbe interactions. *New Phytol* 2008; **177**: 33–47.
- McRae DG, Miller RW, Berndt WB. Viability of alfalfa nodule bacteroids isolated by density gradient centrifugation. *Symbiosis* 1989; **7**: 67–80.
- Mercante V, Duarte CM, Sánchez CM, Zalguizuri A, Caetano-Anollés G, Lepek VC. The absence of protein Y4yS affects negatively the abundance of T3SS *Mesorhizobium loti* secretin, RhcC2, in bacterial membranes. *Front Plant Sci* 2015; **6**: 12.
- Mergaert P, Nikovics K, Kelemen Z, Maunoury N, Vaubert D, Kondorosi A, *et al.* A novel family in *Medicago truncatula* consisting of more than 300 nodule-specific genes coding for small, secreted polypeptides with conserved cysteine motifs. *Plant Physiol* 2003; **132**: 161–173.
- Mergaert P, Uchiumi T, Alunni B, Evanno G, Cheron A, Catrice O, *et al.* Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the Rhizobium-legume symbiosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**: 5230–5235.

- Messinese E, Mun J-H, Yeun LH, Jayaraman D, Rougé P, Barre A, *et al.* A novel nuclear protein interacts with the symbiotic DMI3 calcium- and calmodulin-dependent protein kinase of *Medicago truncatula*. *Mol Plant Microbe Interact* 2007; **20**: 912–921.
- Meyer D, Cunnac S, Guéneron M, Declercq C, Van Gijsegem F, Lauber E, *et al.* PopF1 and PopF2, two proteins secreted by the type III protein secretion system of *Ralstonia solanacearum*, are translocators belonging to the HrpF/NopX family. *J Bacteriol* 2006; **188**: 4903–4917.
- Miché L, Moulin L, Chaintreuil C, Contreras-Jimenez JL, Munive-Hernández J-A, Del Carmen Villegas-Hernandez M, *et al.* Diversity analyses of *Aeschynomene* symbionts in Tropical Africa and Central America reveal that nod-independent stem nodulation is not restricted to photosynthetic bradyrhizobia. *Environ Microbiol* 2010; **12**: 2152–2164.
- Michiels T, Wattiau P, Brasseur R, Ruyschaert JM, Cornelis G. Secretion of Yop proteins by *Yersinia*. *Infect Immun* 1990; **58**: 2840–2849.
- Miller KJ, Kennedy EP, Reinhold VN. Osmotic adaptation by gram-negative bacteria: possible role for periplasmic oligosaccharides. *Science* 1986; **231**: 48–51.
- Miri M, Janakirama P, Held M, Ross L, Szczyglowski K. Into the Root: How Cytokinin Controls Rhizobial Infection. *Trends Plant Sci* 2016; **21**: 178–186.
- Mitra RM, Shaw SL, Long SR. Six non-nodulating plant mutants defective for Nod factor-induced transcriptional changes associated with the legume-rhizobia symbiosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 10217–10222.
- Miwa H, Okazaki S. How effectors promote beneficial interactions. *Curr Opin Plant Biol* 2017; **38**: 148–154.
- Moling S, Pietraszewska-Bogiel A, Postma M, Fedorova E, Hink MA, Limpens E, *et al.* Nod factor receptors form heteromeric complexes and are essential for intracellular infection in *Medicago nodules*. *Plant Cell* 2014; **26**: 4188–4199.
- Mönchgesang S, Strehmel N, Schmidt S, Westphal L, Taruttis F, Müller E, *et al.* Natural variation of root exudates in *Arabidopsis thaliana*-linking metabolomic and genomic data. *Sci Rep* 2016; **6**: 29033.

- Mornico D, Miché L, Béna G, Nouwen N, Verméglio A, Vallenet D, *et al.* Comparative genomics of aeschynomene symbionts: insights into the ecological lifestyle of nod-independent photosynthetic bradyrhizobia. *Genes* 2011; **3**: 35–61.
- Nakagawa T, Kaku H, Shimoda Y, Sugiyama A, Shimamura M, Takanashi K, *et al.* From defense to symbiosis: limited alterations in the kinase domain of LysM receptor-like kinases are crucial for evolution of legume-Rhizobium symbiosis. *Plant J* 2011; **65**: 169–180.
- Nelson MS, Sadowsky MJ. Secretion systems and signal exchange between nitrogen-fixing rhizobia and legumes. *Front Plant Sci* 2015; **6**: 491.
- Nguyen HP, Miwa H, Kaneko T, Sato S, Okazaki S. Identification of Bradyrhizobium elkanii Genes Involved in Incompatibility with Vigna radiata. *Genes* 2017; **8**: 374.
- Nguyen HP, Ratu STN, Yasuda M, Göttfert M, Okazaki S. InnB, a Novel Type III Effector of Bradyrhizobium elkanii USDA61, Controls Symbiosis With Vigna Species. *Front Microbiol* 2018; **9**: 3155.
- Noël L, Thieme F, Gäbler J, Büttner D, Bonas U. XopC and XopJ, two novel type III effector proteins from Xanthomonas campestris pv. vesicatoria. *J Bacteriol* 2003; **185**: 7092–7102.
- Notti RQ, Stebbins CE. The Structure and Function of Type III Secretion Systems. *Microbiol Spectr* 2016; **4**.
- Nouwen N, Arrighi J-F, Cartieaux F, Chaintreuil C, Gully D, Klopp C, *et al.* The role of rhizobial (NifV) and plant (FEN1) homocitrate synthases in Aeschynomene/photosynthetic Bradyrhizobium symbiosis. *Sci Rep* 2017; **7**: 448.
- Nutman PS. Some observations on root-hair infection by nodule bacteria. *J Exp Bot* 1959; **10**: 250–263.
- Okazaki S, Kaneko T, Sato S, Saeki K. Hijacking of leguminous nodulation signaling by the rhizobial type III secretion system. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; **110**: 17131–17136.
- Okazaki S, Noisangiam R, Okubo T, Kaneko T, Oshima K, Hattori M, *et al.* Genome analysis of a novel Bradyrhizobium sp. DOA9 carrying a symbiotic plasmid. *PLoS ONE* 2015; **10**: e0117392.

- Okazaki S, Okabe S, Higashi M, Shimoda Y, Sato S, Tabata S, *et al.* Identification and functional analysis of type III effector proteins in *Mesorhizobium loti*. *Mol Plant Microbe Interact* 2010; **23**: 223–234.
- Okazaki S, Tittabutr P, Teulet A, Thouin J, Fardoux J, Chaintreuil C, *et al.* Rhizobium-legume symbiosis in the absence of Nod factors: two possible scenarios with or without the T3SS. *ISME J* 2016; **10**: 64–74.
- Okazaki S, Zehner S, Hempel J, Lang K, Göttfert M. Genetic organization and functional analysis of the type III secretion system of *Bradyrhizobium elkanii*. *FEMS Microbiol Lett* 2009; **295**: 88–95.
- Oldroyd GED, Dixon R. Biotechnological solutions to the nitrogen problem. *Curr Opin Biotechnol* 2014; **26**: 19–24.
- Oldroyd GED, Downie JA. Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu Rev Plant Biol* 2008; **59**: 519–546.
- Oldroyd GED, Murray JD, Poole PS, Downie JA. The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annu Rev Genet* 2011; **45**: 119–144.
- Oldroyd GED. Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nat Rev Microbiol* 2013; **11**: 252–263.
- Oono R, Denison RF. Comparing symbiotic efficiency between swollen versus nonswollen rhizobial bacteroids. *Plant Physiol* 2010; **154**: 1541–1548.
- Ormeño-Orrillo E, Martínez-Romero E. A Genomotaxonomy View of the *Bradyrhizobium* Genus. *Front Microbiol* 2019; **10**: 1334.
- Pallen MJ, Beatson SA, Bailey CM. Bioinformatics, genomics and evolution of non-flagellar type-III secretion systems: a Darwinian perspective. *FEMS Microbiol Rev* 2005; **29**: 201–229.
- Parniske M. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nat Rev Microbiol* 2008; **6**: 763–775.
- Pawlowski K, Demchenko KN. The diversity of actinorhizal symbiosis. *Protoplasma* 2012; **249**: 967–979.

- Pellock BJ, Cheng HP, Walker GC. Alfalfa root nodule invasion efficiency is dependent on Sinorhizobium meliloti polysaccharides. *J Bacteriol* 2000; **182**: 4310–4318.
- Perret X, Staehelin C, Broughton WJ. Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol Mol Biol R* 2000; **64**: 180–201
- Pierre O, Engler G, Hopkins J, Brau F, Boncompagni E, Hérouart D. Peribacteroid space acidification: a marker of mature bacteroid functioning in Medicago truncatula nodules. *Plant Cell Environ* 2013; **36**: 2059–2070.
- Piromyou P, Songwattana P, Teamtisong K, Tittabut P, Boonkerd N, Tantasawat PA, *et al.* Mutualistic co-evolution of T3SSs during the establishment of symbiotic relationships between Vigna radiata and Bradyrhizobia. *Microbiologyopen* 2019; **8**: e781.
- Plet J, Wasson A, Ariel F, Le Signor C, Baker D, Mathesius U, *et al.* MtCRE1-dependent cytokinin signaling integrates bacterial and plant cues to coordinate symbiotic nodule organogenesis in Medicago truncatula. *Plant J* 2011; **65**: 622–633.
- Podlešáková K, Fardoux J, Patrel D, Bonaldi K, Novák O, Strnad M, *et al.* Rhizobial synthesized cytokinins contribute to but are not essential for the symbiotic interaction between photosynthetic Bradyrhizobia and Aeschynomene legumes. *Mol Plant Microbe Interact* 2013; **26**: 1232–1238.
- Pueppke SG, Broughton WJ. Rhizobium sp. strain NGR234 and R. fredii USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges. *Mol Plant Microbe Interact* 1999; **12**: 293–318.
- Radics J, Königsmaier L, Marlovits TC. Structure of a pathogenic type 3 secretion system in action. *Nat Struct Mol Biol* 2014; **21**: 82–87.
- Radutoiu S, Madsen LH, Madsen EB, Felle HH, Umehara Y, Grønlund M, *et al.* Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature* 2003; **425**: 585–592.
- Ramírez-Bahena MH, Peix A, Rivas R, Camacho M, Rodríguez-Navarro DN, Mateos PF, *et al.* Bradyrhizobium pachyrhizi sp. nov. and Bradyrhizobium jicamae sp. nov., isolated from effective nodules of Pachyrhizus erosus. *Int J Syst Evol Microbiol* 2009; **59**: 1929–1934.
- Ramos-Morales F. Impact of Salmonella enterica Type III Secretion System Effectors on the Eukaryotic Host Cell. *ISRN Cell Biology* 2019; **2012**: 787934

- Remigi P, Zhu J, Young JPW, Masson-Boivin C. Symbiosis within Symbiosis: Evolving Nitrogen-Fixing Legume Symbionts. *Trends Microbiol* 2016; **24**: 63–75.
- Rodrigues JA, Lopez-Baena FJ, Ollero FJ, Vinardell JM, del Rosario Espuny M, Bellogin RA *et al.* NopM and NopD are rhizobial nodulation outer proteins: identification using LC-MALDI and LC-ESI with a Monolithic Capillary Column. *J Proteome Res* 2007; **6**: 1029–1037.
- Roine E, Wei W, Yuan J, Nurmiäho-Lassila EL, Kalkkinen N, Romantschuk M, *et al.* Hrp pilus: an hrp-dependent bacterial surface appendage produced by *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 3459–3464.
- Saad MM, Crèvecoeur M, Masson-Boivin C, Perret X. The type 3 protein secretion system of *Cupriavidus taiwanensis* strain LMG19424 compromises symbiosis with *Leucaena leucocephala*. *Appl Environ Microbiol* 2012; **78**: 7476–7479.
- Saad MM, Kobayashi H, Marie C, Brown IR, Mansfield JW, Broughton WJ, *et al.* NopB, a type III secreted protein of *Rhizobium* sp. strain NGR234, is associated with pilus-like surface appendages. *J Bacteriol* 2005; **187**: 1173–1181.
- Saad MM, Staehelin C, Broughton WJ, Deakin WJ. Protein-protein interactions within type III secretion system-dependent pili of *Rhizobium* sp. strain NGR234. *J Bacteriol* 2008; **190**: 750–754.
- Sadowsky MJ, Olson ER, Foster VE, Kossiak RM, Verma DP. Two host-inducible genes of *Rhizobium fredii* and characterization of the inducing compound. *J Bacteriol* 1988; **170**: 171–178.
- Saito K, Yoshikawa M, Yano K, Miwa H, Uchida H, Asamizu E, *et al.* NUCLEOPORIN85 is required for calcium spiking, fungal and bacterial symbioses, and seed production in *Lotus japonicus*. *Plant Cell* 2007; **19**: 610–624.
- Salmond GP, Reeves PJ. Membrane traffic wardens and protein secretion in gram-negative bacteria. *Trends Biochem Sci* 1993; **18**: 7–12.
- Schiessl K, Lilley JLS, Lee T, Tamvakis I, Kohlen W, Bailey PC, *et al.* NODULE INCEPTION Recruits the Lateral Root Developmental Program for Symbiotic Nodule Organogenesis in *Medicago truncatula*. *Curr Biol* 2019; **29**: 1–12.

- Schirrmeister J, Friedrich L, Wenzel M, Hoppe M, Wolf C, Göttfert M, *et al.* Characterization of the self-cleaving effector protein NopE1 of *Bradyrhizobium japonicum*. *J Bacteriol* 2011; **193**: 3733–3739.
- Schraidt O, Marlovits TC. Three-dimensional model of *Salmonella*'s needle complex at subnanometer resolution. *Science* 2011; **331**: 1192–1195.
- Sergeevich SA, Alexandrovich ZV, Yurievna SO, Yurievich BA, IgorAnatolievich T. Nod-Factor Signaling in Legume-Rhizobial Symbiosis. 2015.
- Shaw SL, Long SR. Nod factor elicits two separable calcium responses in *Medicago truncatula* root hair cells. *Plant Physiol* 2003; **131**: 976–984.
- Schell MA. Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. *Annu Rev Microbiol* 1993; **47**: 597–626.
- Silipo A, Vitiello G, Gully D, Sturiale L, Chaintreuil C, Fardoux J, *et al.* Covalently linked hopanoid-lipid A improves outer-membrane resistance of a *Bradyrhizobium* symbiont of legumes. *Nat Commun* 2014; **5**: 5106.
- Simpson FB, Burris RH. A nitrogen pressure of 50 atmospheres does not prevent evolution of hydrogen by nitrogenase. *Science* 1984; **224**: 1095–1097.
- Singh S, Katzer K, Lambert J, Cerri M, Parniske M. CYCLOPS, a DNA-binding transcriptional activator, orchestrates symbiotic root nodule development. *Cell Host Microbe* 2014; **15**: 139–152.
- Skorpil P, Saad MM, Boukli NM, Kobayashi H, Ares-Orpel F, Broughton WJ, *et al.* NopP, a phosphorylated effector of *Rhizobium* sp. strain NGR234, is a major determinant of nodulation of the tropical legumes *Flemingia congesta* and *Tephrosia vogelii*. *Mol Microbiol* 2005; **57**: 1304–1317.
- Soltis DE. Angiosperm phylogeny inferred from 18S rDNA, *rbcL*, and *atpB* sequences. *Bot J Linn Soc* 2000; **133**: 381–461.
- Songwattana P, Noisangiam R, Teamtisong K, Prakamhang J, Teulet A, Tittabutr P, *et al.* Type 3 Secretion System (T3SS) of *Bradyrhizobium* sp. DOA9 and Its Roles in Legume Symbiosis and Rice Endophytic Association. *Front Microbiol* 2017; **8**: 1810.

- Sprent JI. Which steps are essential for the formation of functional legume nodules? *New Phytologist* 1989; **111**: 129–153.
- Stacey G, McAlvin CB, Kim S-Y, Olivares J, Soto MJ. Effects of endogenous salicylic acid on nodulation in the model legumes *Lotus japonicus* and *Medicago truncatula*. *Plant Physiol* 2006; **141**: 1473–1481. Cardenas null, Feijo null, Kunkel null, Sanchez null, Holdaway-Clarke null, Hepler null, *et al.* Rhizobium nod factors induce increases in intracellular free calcium and extracellular calcium influxes in bean root hairs. *Plant J* 1999; **19**: 347–352.
- Staelin C, Krishnan HB. Nodulation outer proteins: double-edged swords of symbiotic rhizobia. *Biochem J* 2015; **470**: 263–274.
- Steenkamp ET, Stepkowski T, Przymusiak A, Botha WJ, Law IJ. Cowpea and peanut in southern Africa are nodulated by diverse Bradyrhizobium strains harboring nodulation genes that belong to the large pantropical clade common in Africa. *Mol Phylogenet Evol* 2008; **48**: 1131–1144.
- Stepkowski T, Hughes CE, Law IJ, Markiewicz Ł, Gurda D, Chlebicka A, *et al.* Diversification of lupine Bradyrhizobium strains: evidence from nodulation gene trees. *Appl Environ Microbiol* 2007; **73**: 3254–3264.
- Stock AM, Robinson VL, Goudreau PN. Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem* 2000; **69**: 183–215.
- Süb C, Hempel J, Zehner S, Krause A, Patschkowski T, Göttfert M. Identification of genistein-inducible and type III-secreted proteins of *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Biotechnol.* 2006; **126**: 69-77.
- Sugawara M, Epstein B, Badgley BD, Unno T, Xu L, Reese J, *et al.* Comparative genomics of the core and accessory genomes of 48 Sinorhizobium strains comprising five genospecies. *Genome Biol* 2013; **14**: R17.
- Sugawara M, Takahashi S, Umehara Y, Iwano H, Tsurumaru H, Odake H, *et al.* Variation in bradyrhizobial NopP effector determines symbiotic incompatibility with Rj2-soybeans via effector-triggered immunity. *Nat Commun* 2018; **9**: 3139.
- Szczyglowski K, Shaw RS, Wopereis J, Copeland S, Hamburger D, Kasiborski B, *et al.* Nodule organogenesis and symbiotic mutants of the model legume *Lotus japonicus*. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* 1998; **11**: 684–697

- Tadege M, Wang TL, Wen J, Ratet P, Mysore KS. Mutagenesis and beyond! Tools for understanding legume biology. *Plant Physiol* 2009; **151**: 978–984.
- Tampakaki AP. Commonalities and differences of T3SSs in rhizobia and plant pathogenic bacteria. *Front Plant Sci* 2014; **5**: 114.
- Tanaka K, Nguyen CT, Liang Y, Cao Y, Stacey G. Role of LysM receptors in chitin-triggered plant innate immunity. *Plant Signal Behav* 2013; **8**: e22598.
- Tilman D, Cassman KG, Matson PA, Naylor R, Polasky S. Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* 2002; **418**: 671–677
- Tilman D, Reich PB, Knops J, Wedin D, Mielke T, Lehman C. Diversity and Productivity in a Long-Term Grassland Experiment. *Science* 2001; **294**: 843–845.
- Timmers AC, Auriac MC, Truchet G. Refined analysis of early symbiotic steps of the Rhizobium-Medicago interaction in relationship with microtubular cytoskeleton rearrangements. *Development* 1999; **126**: 3617–3628.
- Tirichine L, Sandal N, Madsen LH, Radutoiu S, Albrektsen AS, Sato S, *et al.* A gain-of-function mutation in a cytokinin receptor triggers spontaneous root nodule organogenesis. *Science* 2007; **315**: 104–107.
- Tohge T, de Souza LP, Fernie AR. Current understanding of the pathways of flavonoid biosynthesis in model and crop plants. *J Exp Bot* 2017; **68**: 4013–4028.
- Tsukui T, Eda S, Kaneko T, Sato S, Okazaki S, Kakizaki-Chiba K, *et al.* The type III Secretion System of Bradyrhizobium japonicum USDA122 mediates symbiotic incompatibility with Rj2 soybean plants. *Appl Environ Microbiol* 2013; **79**: 1048–1051.
- Tsurumaru H, Hashimoto S, Okizaki K, Kanesaki Y, Yoshikawa H, Yamakawa T. A Putative Type III Secretion System Effector Encoded by the MA20_12780 Gene in Bradyrhizobium japonicum Is-34 Causes Incompatibility with Rj4 Genotype Soybeans. *Appl Environ Microbiol* 2015; **81**: 5812–5819.
- Turgeon BG, Bauer WD. Ultrastructure of infection-thread development during the infection of soybean by *Rhizobium japonicum*. *Planta* 1985; **163**: 328–349.

- Udvardi M, Poole PS. Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses. *Annu Rev Plant Biol* 2013; **64**: 781–805.
- Van de Velde W, Zehirov G, Szatmari A, Debreczeny M, Ishihara H, Kevei Z, *et al.* Plant peptides govern terminal differentiation of bacteria in symbiosis. *Science* 2010; **327**: 1122–1126.
- Van Gijsegem F, Gough C, Zischek C, Niqueux E, Arlat M, Genin S, *et al.* The hrp gene locus of *Pseudomonas solanacearum*, which controls the production of a type III secretion system, encodes eight proteins related to components of the bacterial flagellar biogenesis complex. *Mol Microbiol* 1995; **15**: 1095–1114.
- van Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol* 2006; **44**: 135–162.
- van Noorden GE, Ross JJ, Reid JB, Rolfe BG, Mathesius U. Defective long-distance auxin transport regulation in the *Medicago truncatula* super numeric nodules mutant. *Plant Physiol* 2006; **140**: 1494–1506.
- Vance CP. Symbiotic Nitrogen Fixation and Phosphorus Acquisition. Plant Nutrition in a World of Declining Renewable Resources. *Plant Physiol* 2001; **127**: 390–397.
- VanInsberghe D, Maas KR, Cardenas E, Strachan CR, Hallam SJ, Mohn WW. Non-symbiotic Bradyrhizobium ecotypes dominate North American forest soils. *ISME J* 2015; **9**: 2435–2441.
- Venkateshwaran M, Jayaraman D, Chabaud M, Genre A, Balloon AJ, Maeda J, *et al.* A role for the mevalonate pathway in early plant symbiotic signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015; **112**: 9781–9786.
- Vinuesa P, León-Barrios M, Silva C, Willems A, Jarabo-Lorenzo A, Pérez-Galdona R, *et al.* Bradyrhizobium canariense sp. nov., an acid-tolerant endosymbiont that nodulates endemic genistoid legumes (Papilionoideae: Genisteae) from the Canary Islands, along with Bradyrhizobium japonicum bv. genistearum, Bradyrhizobium genospecies alpha and Bradyrhizobium genospecies beta. *Int J Syst Evol Microbiol* 2005; **55**: 569–575.
- Viprey V, Del Greco A, Golinowski W, Broughton WJ, Perret X. Symbiotic implications of type III protein secretion machinery in Rhizobium. *Mol Microbiol* 1998; **28**: 1381–1389.

- Waelkens F, Voets T, Vlassak K, Vanderleyden J, van Rhijn P. The nodS gene of *Rhizobium tropici* strain CIAT899 is necessary for nodulation on *Phaseolus vulgaris* and on *Leucaena leucocephala*. *Mol Plant Microbe Interact* 1995; **8**: 147–154.
- Wagner S, Grin I, Malmshaimer S, Singh N, Torres-Vargas CE, Westerhausen S. Bacterial type III secretion systems: a complex device for the delivery of bacterial effector proteins into eukaryotic host cells. *FEMS Microbiol Lett* 2018; **365**.
- Wang Q, Yang S, Liu J, Terecskei K, Ábrahám E, Gombár A, *et al.* Host-secreted antimicrobial peptide enforces symbiotic selectivity in *Medicago truncatula*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2017; **114**: 6854–6859.
- Wassem R, Kobayashi H, Kambara K, Le Quéré A, Walker GC, Broughton WJ, *et al.* TtsI regulates symbiotic genes in *Rhizobium* species NGR234 by binding to tts boxes. *Mol Microbiol* 2008; **68**: 736–748.
- Wenzel M, Friedrich L, Göttfert M, Zehner S. The type III-secreted protein NopE1 affects symbiosis and exhibits a calcium-dependent autocleavage activity. *Mol Plant Microbe Interact* 2010; **23**: 124–129.
- Werner GDA, Cornwell WK, Sprent JI, Kattge J, Kiers ET. A single evolutionary innovation drives the deep evolution of symbiotic N₂-fixation in angiosperms. *Nat Commun* 2014; **5**: 1–9.
- Wiesand U, Sorg I, Amstutz M, Wagner S, van den Heuvel J, Lührs T, *et al.* Structure of the type III secretion recognition protein YscU from *Yersinia enterocolitica*. *J Mol Biol* 2009; **385**: 854–866.
- Wongdee J, Songwattana P, Nouwen N, Noisangiam R, Fardoux J, Chaintreuil C, *et al.* nifDK Clusters Located on the Chromosome and Megaplasmid of *Bradyrhizobium* sp. Strain DOA9 Contribute Differently to Nitrogenase Activity During Symbiosis and Free-Living Growth. *Mol Plant Microbe Interact* 2016; **29**: 767–773.
- Xiao TT, Schilderink S, Moling S, Deinum EE, Kondorosi E, Franssen H, *et al.* Fate map of *Medicago truncatula* root nodules. *Development* 2014; **141**: 3517–3528.
- Xin D-W, Liao S, Xie Z-P, Hann DR, Steinle L, Boller T, *et al.* Functional analysis of NopM, a novel E3 ubiquitin ligase (NEL) domain effector of *Rhizobium* sp. strain NGR234. *PLoS Pathog* 2012; **8**: e1002707.

- Xu C-C, Zhang D, Hann DR, Xie Z-P, Staehelin C. Biochemical properties and in planta effects of NopM, a rhizobial E3 ubiquitin ligase. *J Biol Chem* 2018; **293**: 15304–15315.
- Xu LM, Ge C, Cui Z, Li J, Fan H. Bradyrhizobium liaoningense sp. nov., isolated from the root nodules of soybeans. *Int J Syst Bacteriol* 1995; **45**: 706–711.
- Yahara T, Javadi F, Onoda Y, Queiroz LP de, Faith DP, Prado DE, *et al.* Global legume diversity assessment: Concepts, key indicators, and strategies. *Taxon* 2013; **62**: 249–266.
- Yang S, Tang F, Gao M, Krishnan HB, Zhu H. R gene-controlled host specificity in the legume-rhizobia symbiosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; **107**: 18735–18740.
- Yang S, Wang Q, Fedorova E, Liu J, Qin Q, Zheng Q, *et al.* Microsymbiont discrimination mediated by a host-secreted peptide in Medicago truncatula. *Proc Natl Acad Sci USA* 2017; **114**: 6848–6853.
- Yano K, Shibata S, Chen W-L, Sato S, Kaneko T, Jurkiewicz A, *et al.* CERBERUS, a novel U-box protein containing WD-40 repeats, is required for formation of the infection thread and nodule development in the legume-Rhizobium symbiosis. *Plant J* 2009; **60**: 168–180.
- Yano K, Yoshida S, Müller J, Singh S, Banba M, Vickers K, *et al.* CYCLOPS, a mediator of symbiotic intracellular accommodation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 20540–20545.
- Yeats C, Bateman A. The BON domain: a putative membrane-binding domain. *Trends Biochem Sci* 2003; **28**: 352–355.
- Zarivach R, Deng W, Vuckovic M, Felise HB, Nguyen HV, Miller SI, *et al.* Structural analysis of the essential self-cleaving type III secretion proteins EscU and SpaS. *Nature* 2008; **453**: 124–127.
- Zehner S, Schober G, Wenzel M, Lang K, Göttfert M. Expression of the Bradyrhizobium japonicum type III secretion system in legume nodules and analysis of the associated tts box promoter. *Mol Plant Microbe Interact* 2008; **21**: 1087–1093.
- Zhang L, Chen X-J, Lu H-B, Xie Z-P, Staehelin C. Functional analysis of the type 3 effector nodulation outer protein L (NopL) from Rhizobium sp. NGR234: symbiotic effects, phosphorylation, and interference with mitogen-activated protein kinase signaling. *J Biol Chem* 2011; **286**: 32178–32187.
- Zhang X-C, Wu X, Findley S, Wan J, Libault M, Nguyen HT, *et al.* Molecular evolution of lysin motif-type receptor-like kinases in plants. *Plant Physiol* 2007; **144**: 623–636.

- Zhang Y, Liu X, Chen L, Fu Y, Li C, Qi Z, *et al.* Mining for genes encoding proteins associated with NopL of *Sinorhizobium fredii* HH103 using quantitative trait loci in soybean *Glycine max* (Merr.) recombinant inbred lines. *Plant Soil* 2018; **431**: 245–255.
- Zhao R, Liu LX, Zhang YZ, Jiao J, Cui WJ, Zhang B, *et al.* Adaptive evolution of rhizobial symbiotic compatibility mediated by co-evolved insertion sequences. *ISME J* 2018; **12**: 101–111.
- Zhu H, Riely BK, Burns NJ, Ané J-M. Tracing nonlegume orthologs of legume genes required for nodulation and arbuscular mycorrhizal symbioses. *Genetics* 2006; **172**: 2491–2499.
- Zipfel C, Oldroyd GED. Plant signalling in symbiosis and immunity. *Nature* 2017; **543**: 328–336.
- Zipfel C. Combined roles of ethylene and endogenous peptides in regulating plant immunity and growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; **110**: 5748–5749.

Annexe

ORIGINAL ARTICLE

Rhizobium–legume symbiosis in the absence of Nod factors: two possible scenarios with or without the T3SS

Shin Okazaki¹, Panlada Tittabutr², Albin Teulet³, Julien Thouin³, Joël Fardoux³, Clémence Chaintreuil³, Djamel Gully³, Jean-François Arrighi³, Noriyuki Furuta¹, Hiroki Miwa¹, Michiko Yasuda¹, Nico Nouwen³, Neung Teaumroong² and Eric Giraud³

¹Department of International Environmental and Agricultural Science, Graduate School of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, Tokyo, Japan; ²Institute of Agricultural Technology, School of Biotechnology, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand and ³IRD, Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes, UMR IRD/SupAgro/INRA/UM2/CIRAD, Campus International de Baillarguet, TA A-82/J, Montpellier, France

The occurrence of alternative Nod factor (NF)-independent symbiosis between legumes and rhizobia was first demonstrated in some *Aeschynomene* species that are nodulated by photosynthetic bradyrhizobia lacking the canonical *nodABC* genes. In this study, we revealed that a large diversity of non-photosynthetic bradyrhizobia, including *B. elkanii*, was also able to induce nodules on the NF-independent *Aeschynomene* species, *A. indica*. Using cytological analysis of the nodules and the nitrogenase enzyme activity as markers, a gradient in the symbiotic interaction between bradyrhizobial strains and *A. indica* could be distinguished. This ranged from strains that induced nodules that were only infected intercellularly to rhizobial strains that formed nodules in which the host cells were invaded intracellularly and that displayed a weak nitrogenase activity. In all non-photosynthetic bradyrhizobia, the type III secretion system (T3SS) appears required to trigger nodule organogenesis. In contrast, genome sequence analysis revealed that apart from a few exceptions, like the *Bradyrhizobium* ORS285 strain, photosynthetic bradyrhizobia strains lack a T3SS. Furthermore, analysis of the symbiotic properties of an ORS285 T3SS mutant revealed that the T3SS could have a positive or negative role for the interaction with NF-dependent *Aeschynomene* species, but that it is dispensable for the interaction with all NF-independent *Aeschynomene* species tested. Taken together, these data indicate that two NF-independent symbiotic processes are possible between legumes and rhizobia: one dependent on a T3SS and one using a so far unknown mechanism.

The ISME Journal (2016) 10, 64–74; doi:10.1038/ismej.2015.103; published online 10 July 2015

Introduction

The legume-rhizobium symbiosis is of immense biological and ecological importance. It is a major contributor to the global nitrogen cycle, and serves as a model to study plant–microbe interactions. A major advance in our understanding of the legume–rhizobium symbiosis was the discovery, in the early 1990s, that this interaction relies on the exchange of diffusible signal molecules between the two partners (Lerouge *et al.*, 1990). Flavonoids secreted by the host plant roots activate in rhizobia the expression of nodulation genes necessary for the

synthesis and secretion of lipochitooligosaccharides, named Nod factors (NFs). In return, the perception of NFs by LysM-receptor-like kinase (LysM-RLKs) induces a signal transduction cascade that is required for infection and nodule organogenesis (Oldroyd, 2013). For a long time, this molecular dialogue was assumed to be a universal paradigm for all legume–rhizobium interactions. However, in 2007, it has been shown that some photosynthetic *Bradyrhizobium* strains that are able to induce nitrogen-fixing nodules on some *Aeschynomene* species lack the canonical *nodABC* genes required for NF synthesis (Giraud *et al.*, 2007). This indicated, for the first time, that an alternative symbiotic interaction independent of NFs was possible between a legume and a rhizobium strain.

Since this discovery, two other examples of NF-independent symbiosis have been reported. In the model plant *Lotus japonicus*, which uses normally a classical NF-dependent symbiotic process,

Correspondence: E Giraud, Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes, IRD, LSTM-Campus International de Baillarguet, TA A-82/J, 34398 Montpellier, France.

E-mail: eric.giraud@ird.fr

Received 11 March 2015; revised 28 April 2015; accepted 8 May 2015; published online 10 July 2015

it has been observed that double mutant lines affected in some key determinants of the NF signaling pathway were occasionally able to form infected nodules when the plants were inoculated with a compatible rhizobium strain unable to produce NF (Madsen *et al.*, 2010). More recently, it has been shown that a NF-deficient mutant of *Bradyrhizobium elkanii* could induce nodules on *Glycine max* cv. Enrei mutated or not in the LysM-RLK *nfr1* Nod factor receptor (Okazaki *et al.*, 2013). In the later case, this NF-independent symbiosis was shown to be only possible if the bacteria possessed a functional type III secretion system (T3SS). This secretory machinery initially identified in animal and plant pathogens permits the delivery of effector molecules inside the host cells that suppress plant defense response system and favor the infection (Hueck, 1998). It is proposed that in *B. elkanii*, T3SS effectors could also activate host nodulation signaling by bypassing NF recognition (Okazaki *et al.*, 2013).

These two examples of NF-independent symbiosis which were put forward in an artificial system, using plant and bacterial mutant backgrounds, appear weakly efficient. Indeed, the frequency of nodulated plants, the number of nodules formed per plant and the level of infection of these nodules were drastically reduced in comparison with the normal context in which plant and bacteria are not altered in the NF signaling pathway. In addition, these interactions do not involve the formation of infection threads in either root hairs or nodule tissues but use an intercellular infection mode that is considered more ancestral. This suggests that the NF-independent process may constitute the ground state of rhizobium-legume symbiosis which has been maintained in legumes during evolution but which was overridden by the acquisition of a more sophisticated process involving NF signaling and infection thread formation.

In the *Aeschynomene* genus, only a monophyletic clade encompassing 12 species, including *A. indica* and *A. evenia*, were found to be nodulated by *nod* gene-lacking photosynthetic bradyrhizobia (Chaintreuil *et al.*, 2013). In contrast to other legumes, the NF-independent pathway appears to be dominant in this clade and most probably exclusive because most of the natural symbionts either lack *nod* genes or they can be inactivated without effect on the efficiency of nodule formation (Bonaldi *et al.*, 2011). Furthermore, besides lacking *nod* genes, most photosynthetic bradyrhizobia lack a T3SS. Again the ORS285 strain is an exception and probably acquired *nod* and T3SS genes simultaneously by lateral gene transfer (Mornico *et al.*, 2011). This indicates that photosynthetic bradyrhizobia could interact with *Aeschynomene* using another pathway than the one operating during the interaction between a NF-deficient *B. elkanii* mutant and soybean.

To clarify the different alternative NF-independent pathways, we examined in this study the ability of a

large collection of rhizobia to interact symbiotically with *A. indica*. We found that a large number of non-photosynthetic bradyrhizobia are able to induce nodules on *A. indica* but that the bacterial infection and nitrogen fixation largely differed between species. By mutagenesis, we demonstrated for two strains (*B. elkanii* and *Bradyrhizobium* sp. STM6978) that the T3SS has an essential role in nodule organogenesis. In parallel, we examined the symbiotic role of the T3SS in the interaction of *Bradyrhizobium* sp. ORS285 with various NF-dependent and NF-independent *Aeschynomene* species. The obtained data indicate that photosynthetic and non-photosynthetic *Bradyrhizobium* strains can nodulate *Aeschynomene* species via two NF-independent processes that differ in the requirement of a T3SS.

Materials and methods

Bacterial strains and growth conditions

All tested bacterial strains are listed in Table 1 and Supplementary Table S1. Strains were grown in YM medium at 28 °C (Vincent, 1970). The mutants of *B. elkanii* USDA61 (BEnodC, BErhcJ and BEttsnod) were previously obtained (Okazaki *et al.*, 2013). The GusA- and GFP-tagged strains of USDA61 were obtained by introducing plasmids pCAM120 (Wilson *et al.*, 1995) and pDG70 (Gage 2002), respectively. For their culture, appropriate antibiotics were added as indicated in (Okazaki *et al.*, 2013). The ORS285ΔT3SS and STM6978ΔT3SS mutants were constructed for this study (see Supplementary Method). For their culture, the medium was supplemented with kanamycin (50 μg ml⁻¹) and cefotaxime (20 μg ml⁻¹), respectively.

Research of the presence of a T3SS by PCR

The presence of a T3SS gene cluster in the various *Bradyrhizobium* strains was analyzed by PCR. Two pairs of degenerated primers were designed from conserved regions of *rhcN* genes of *B. elkanii* USDA61, *B. japonicum* USDA110 and *Bradyrhizobium* sp. ORS285: *rhcN.univ.f1* (5'-GGRGAACDTG CYTVYTGCAGGATC-3')/*rhcN.univ.r1* (5'-CCATAR ATTCCRATCCGCTGRCCTTC-3') and *rhcN.univ.f2* (5'-TGGTGCTYAGGCCBARGT NATCGGT-3')/*rhcN.univ.r2* (5'-GCTCGCCCATRCCGGCKGCTCCAAC-3'). In the case of a positive result, the PCR product obtained was sequenced to analyze the amplification specificity.

Molecular phylogeny of internal transcribed spacer

For bacterial strains for which no internal transcribed spacer sequence was available, the 16–23S rDNA internal transcribed spacer region was amplified and sequenced as described by Guye *et al.*, 2009. The resulting sequences were aligned with ClustalX (Thompson *et al.*, 2002), and subsequently used to

Table 1 Symbiotic properties of various *Bradyrhizobium* strains on *Aeschynomene indica*

Strain	Accession	Nodulation ^a	Infection ^b	ARA activity ^c	T3SS ^d
<i>B. betae</i>	LMG 21987 T	0	—	0	—
<i>B. canariense</i>	LMG 22265 T	0	—	0	—
<i>B. elkanii</i>	USDA61	20.6	Inter	0	GS
<i>B. elkanii</i>	USDA76	14.6	Inter	0	GS
<i>B. elkanii</i>	USDA94	25	Inter	0	GS
<i>B. japonicum</i>	USDA4	0	—	0	GS
<i>B. japonicum</i>	USDA110	0	—	0	GS
<i>B. japonicum</i>	USDA38	0	—	0	GS
<i>B. japonicum</i>	USDA122	0	—	0	GS
<i>B. japonicum</i>	USDA124	0	—	0	GS
<i>B. liaoningense</i>	LMG 18230 T	0	—	0	+
<i>B. yuanmingense</i>	LMG 21825	0	—	0	+
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	DOA9	0	—	0	+
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	ORS86	19	ND	0	+
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	ORS101	0	—	0	+
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	ORS110	14.4	ND	0	+
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	ORS111	17.6	ND	0	+
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	ORS112	15.6	ND	0	+
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	ORS121	6.6	inter	0	+
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	ORS149	0	—	0	+
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	ORS159	0	—	0	+
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	ORS162	0	—	0	+
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	ORS163	0	—	0	+
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	ORS186	0	—	0	+
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	ORS187	0	—	0	+
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	ORS278	21.6	intra	100%-5/5	—
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	ORS1824	19.6	ND	0	+
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	ORS1836	0	—	0	+
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	STM3557	4.6	intra	0	+
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	STM3560	9.2	inter	0	+
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	STM3561	7.5	intra	8.5%-3/5	+
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	STM3562	10.4	inter	0	+
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	STM3564	0	—	0	—
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	STM3565	0	—	0	—
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	STM3566	0	—	0	+
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	STM3567	10.6	inter	0	+
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	STM3569	25.8	inter	0	+
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	STM3571	9	intra	7.2%-3/5	+
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	STM6978/ORS3257	12	intra	14%-4/5	+
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	STM6980/ORS3409	12.5	intra	0	+

^aNumber of nodules per plant (mean estimated on five plants). ^binter, intercellular; intra, intracellular; ND, no bacteria detected in the nodule tissue; —, No nodule formed. ^cFirst, relative acetylene reduction activity (percentage of ORS278) estimated on 5 whole plants; Second, number of plants displaying an acetylene reduction assay (ARA) activity on the five plants tested. ^dPresence of T3SS (GS, deduced from the genome sequence; +, PCR using universal primers positive; —, PCR using universal primers negative).

construct a phylogenetic tree using the Neighbor Joining method (Saitou and Nei, 1987). A bootstrap confidence analysis was performed on 1000 replicates to determine the reliability of the obtained phylogenetic tree (Felsenstein, 1985).

Plant cultivation and symbiotic analysis

The accessions of *Aeschynomene* species used in this study, their geographic origin and their sources are listed in Supplementary Table S2. Seed sterilization and plant culture was performed as before (Bonaldi *et al.*, 2011). Four days after the transfer of the plantlets to test tubes covered by aluminium foil to protect root system from light, each seedling was inoculated with 1 ml of cell suspension resulting from a 4-day-old bacterial culture washed in buffered nodulation medium and adjusted to reach an optical density of one at 600 nm. Fourteen days after

inoculation, five plants were analyzed for the presence of root nodules and nitrogenase enzyme activity as previously described (Bonaldi *et al.*, 2010).

Cytological analysis of the nodules

Semi-thin nodule sections (30–40- μ m-thick) were prepared using a vibratome (VT1000S; Leica, Nanterre, France). Nodules elicited by the ORS285 GFP-tagged strain were analyzed as previously described (Bonaldi *et al.*, 2011). For the nodules elicited with the non-tagged strains, the nodule sections were incubated for 15 min in live/dead staining solution (5 μ M SYTO 9 and 30 μ M propidium iodide in 50 mM Tris pH 7.0 buffer; Live/Dead BacLight, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Sections were then removed and incubated an additional 15 min in 10 mM phosphate saline buffer containing calcofluor white M2R (Sigma, Munich, Germany) to

a final concentration of 0.01% (wt/vol) to stain the plant cell wall (Nagata and Takebe, 1970). Analyses were carried out using a confocal laser-scanning microscope (Carl Zeiss LSM 700, Jena, Germany). Calcofluor was excited at 405 nm with emission signal collection at 405–470 nm. For SYTO 9 and propidium iodide, an excitation wavelength of 488 and 555 nm was used with emission signal collection at 490–522 nm and 555–700 nm, respectively. Images were obtained using the ZEN 2008 software (Zeiss, Oberkochen, Germany).

Results

B. elkanii is able to induce nodules on some NF-independent *Aeschynomene* species in a T3SS-dependent manner

We first analyzed the ability of *B. elkanii* USDA61 and its derivatives BEnodC ($\Delta nodC$), BErhcJ ($\Delta rhcJ$, a T3SS-deficient mutant) and the double mutant BEttsnod to nodulate the NF-independent *A. indica* species. Nodulation was analyzed 14 days post inoculation, a lapse of time during which photosynthetic bradyrhizobia are able to establish a functional

symbiosis with this species (Bonaldi *et al.*, 2011). As shown in Figure 1a, the *B. elkanii* wild-type (WT) strain was able to elicit a comparable number of ‘nodules’ on *A. indica* roots as compared with the photosynthetic *Bradyrhizobium* ORS278 strain that was used as control for a natural host bacterium. As observed for ORS278, these nodules were formed at the emergence of lateral root but they differed by their size, which was slightly smaller, and their shape, which was not perfectly spherical (Figures 1c and f).

When we analyzed the BEnodC, no effect of the mutation was detected, that is, the number of nodules and their shape was comparable with that obtained with the WT strain, confirming the absence of a recruitment for NFs during the interaction of *B. elkanii* with *A. indica* (Figures 1a and d). In contrast, no nodules were formed when the plants were inoculated with BErhcJ or BEttsnod (Figures 1a and e). This indicates that the T3SS is absolutely required to initiate the symbiotic interaction with *A. indica*.

Despite the presence of nodules, *A. indica* plants inoculated by *B. elkanii* showed typical nitrogen starvation symptoms, that is, foliar chlorosis and

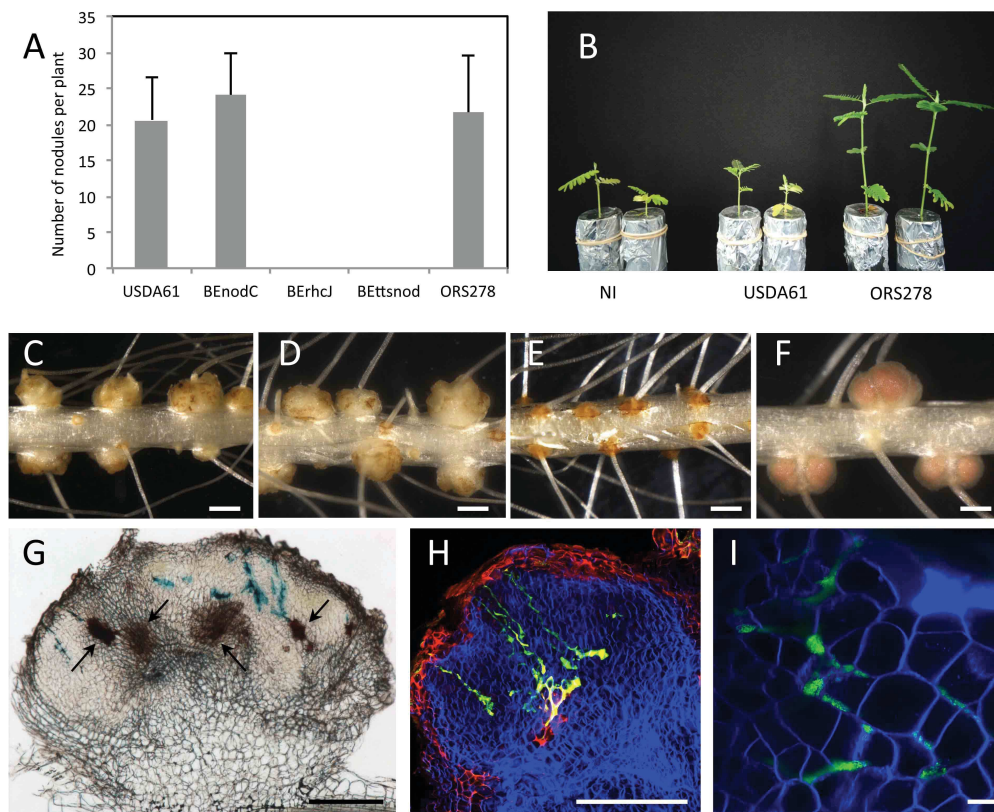


Figure 1 *Bradyrhizobium elkanii* is able to induce nodules on *Aeschynomene indica* in a T3SS-dependent manner. (a) Number of nodules per plant elicited by *B. elkanii* USDA61, BEnodC, BErhcJ, BEttsnod and *Bradyrhizobium* ORS278 strain on *A. indica* plants at 14 days post inoculation (d.p.i.). Error bars represent s.d. (n = 5). (b) Comparison of the growth of the plants (aerial part), non-inoculated (NI) or inoculated with *B. elkanii* USDA61 and *Bradyrhizobium* ORS278 (at 14 d.p.i.). (c–f) Nodules elicited by *B. elkanii* USDA61 (c), BEnodC (d), BErhcJ (e), ORS278 (f). Bars, 1 mm. (g) Transversal section of a nodule elicited by *B. elkanii* tagged with *gusA* and stained with X-Gluc. Bar, 200 μ m. Black arrows indicate the presence of necrotic area. (h and i) Confocal microscopy observation of nodules elicited by *B. elkanii* tagged with GFP. Bars, 200 μ m (h) and 10 μ m (i). A full colour version of this figure is available at the ISME journal online.

reduced plant growth, indicating that the formed nodules were non-effective (Figure 1b). In agreement, no nitrogenase activity could be detected on these plants using the acetylene reduction assay (Table 1). To examine the level of infection of these nodules, we performed cytological analysis of nodules elicited by a GFP or GusA-tagged WT strain using optical and confocal microscopy. As shown in Figures 1g–i, we observed that the nodules were only weakly infected and contained bacteria that proliferated in enlarged intercellular spaces between host cells. Neither intracellular infection nor the formation of infection threads was detected. Noteworthy is the occurrence of brown necrotic areas in almost all the nodules, suggesting the induction of a plant defense response when *B. elkanii* cells enter the nodule tissue (Figure 1g). Taken together, these data indicate that *B. elkanii* is able to initiate nodule organogenesis in *A. indica* plants through a T3SS-dependent-NF-independent process but the bacterial infection is rapidly arrested likely owing to the elicitation of plant defense reactions.

We next addressed the question whether other NF-independent *Aeschynomene* species would be more permissive and allow a more intimate contact with *B. elkanii*. For this purpose, 12 additional *Aeschynomene* accessions corresponding to 9 different species and 4 different ecotypes of *A. evenia* spp. *evenia* were inoculated with the GFP-tagged *B. elkanii* strain. We observed that only 7 out of the 12 tested accessions were nodulated and more unexpectedly among the four *A. evenia* spp. *evenia* ecotypes tested, only two were nodulated by *B. elkanii* (Supplementary Figures 1A and M). Thus, a high specificity of recognition which controls the triggering of nodule organogenesis exists between *B. elkanii* and the *Aeschynomene* species. On the other hand, cytological analysis of the nodules elicited on the compatible *Aeschynomene* species, showed that in all cases, the infection was restricted to the intercellular space (Supplementary Figures 1N and Q). This indicates that *B. elkanii* does not possess all the keys to establish a functional endosymbiosis with *Aeschynomene* plants.

The ability to induce nodules on NF-independent Aeschynomene species is widespread among Bradyrhizobium species

The increasing availability of genome sequences has revealed that the presence of a T3SS is frequent among rhizobia (Tampakaki, 2014). We therefore hypothesized that some strains could be able to exploit this T3SS machinery to develop a more compatible symbiotic relationship with *Aeschynomene*. To examine this possibility, we screened a large collection of rhizobium strains belonging to the *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* genus as well as some Beta-rhizobia for their ability to induce nodules on *A. indica*. Among the 72 strains

tested, only strains belonging to the *Bradyrhizobium* genus were able to elicit nodules (Supplementary Table S1 and Table 1). A phylogenetic tree based on the internal transcribed spacer region showed that the nodulation-positive strains, representing ~50% of the *Bradyrhizobium* strains tested, do not form a specific clade but are scattered within the genus (Figure 2). This indicates that the ability to nodulate NF-independent *Aeschynomene* species is a widespread character among the *Bradyrhizobium* species and that it is not strictly correlated with a specific phylogenetic position. By PCR and sequencing, using universal primers targeting the canonical *rhcN* gene required for the functioning of the T3SS injectisome, we confirmed that all the positive strains contained a T3SS (Table 1). However, the presence of a T3SS is not the unique criteria required to induce nodules on *A. indica* because among the strains unable to induce nodules on this species, a large number, including the *B. japonicum* strains, do contain a T3SS. This suggests that the positive strains, beside a T3SS apparatus, produce specific type III effectors that are necessary to initiate nodule organogenesis.

Some non-photosynthetic Bradyrhizobium strains induce nitrogen-fixing nodules on A. indica in a T3SS-dependent manner

Among the positive strains, several, like STM6978, induced on *A. indica* larger nodules than those observed with *B. elkanii* USDA61 (Figure 3e). These nodules displayed an irregular shape with several deformations suggesting perturbations in nodule development (Figures 3e and f). However, hand-sectioning of those nodules showed, similar as the control ORS278 strain, a central tissue with a light pink color suggesting the presence of leghemoglobin, an indicator of nitrogenase activity (Figures 3i and j). In agreement, acetylene reduction assays showed that some plants inoculated with some of these strains displayed a weak nitrogenase activity that represented at maximum (for strain STM6978) 10–15% of the one obtained with the ORS278 strain (Table 1). Although, this activity was not sufficient to support plant growth (Figure 3d), these data indicate that several non-photosynthetic *Bradyrhizobium* strains are able to establish a more intimate symbiotic relation with *A. indica* as compared with *B. elkanii* USDA61.

Using the live-dead staining protocol (Haag et al., 2011), a systematic cytological analysis was performed by confocal microscopy on the nodules elicited by all the positive strains. As observed previously for *B. elkanii* USDA61, some strains, such as STM3560, only infected the nodule tissue intercellularly and induced plant defense reactions (Figures 3b, c and h and Table 1). In contrast, other strains, such as STM6978, formed nodules with a central tissue completely infected by bacteria as observed for nodules formed by the ORS278 strain (Figures 3f, g and n and Table 1). The host cells were filled with viable bacteria as indicated by the green

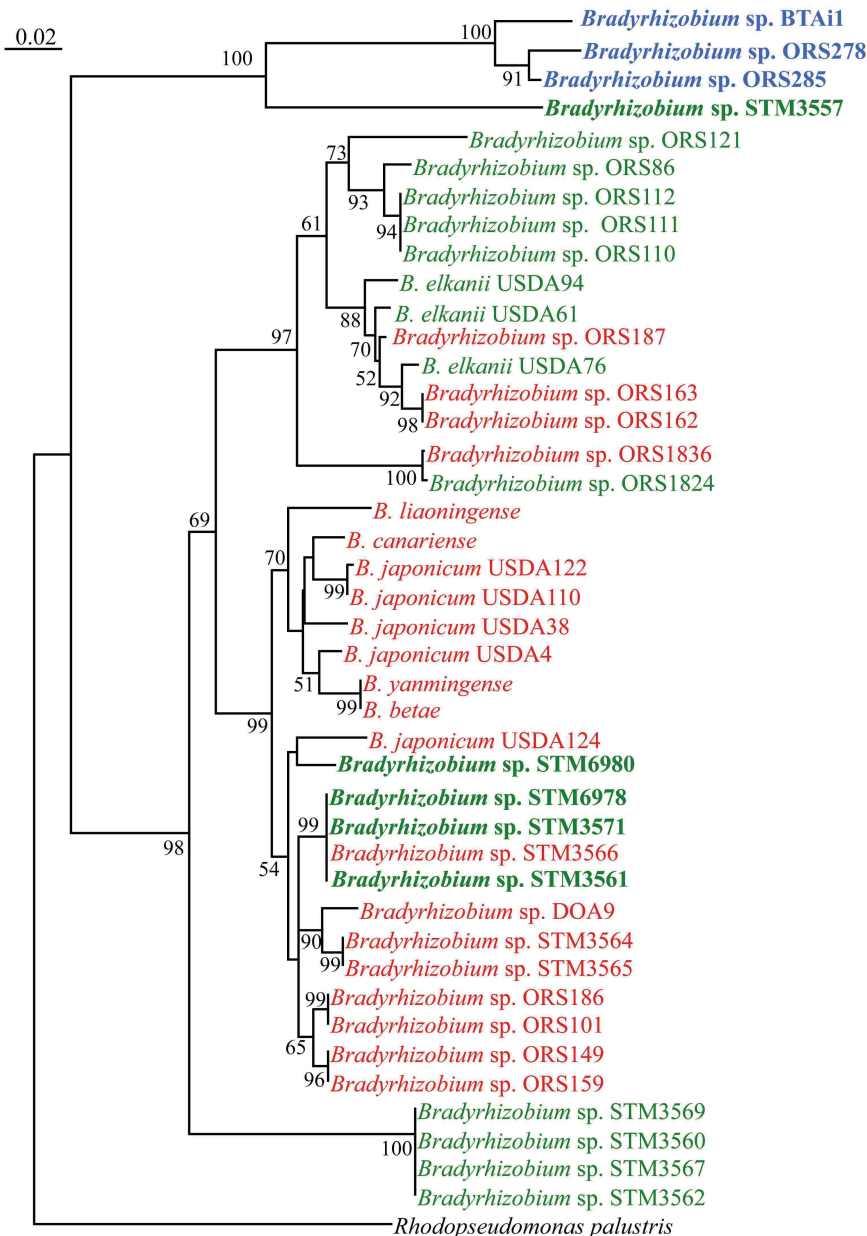


Figure 2 The ability to induce nodules on NF-independent *Aeschynomene* species is widespread among *Bradyrhizobium* species. Neighbor joining phylogenetic relationship among the *Bradyrhizobium* strains tested for their ability to form nodules on *A. indica* based upon aligned sequences of 16S-23S rDNA IGS regions. Percent of bootstrap replicates (1000 replicates) are indicated at each tree node (only if > 50%). In red, negative strain; in green, positive strains; in blue, photosynthetic *Bradyrhizobium* strains that are able to induce nitrogen-fixing nodules on *A. indica*; in bold, strains for which an intracellular infection is observed. A full colour version of this figure is available at the *ISME* journal online.

SYTO9 staining (Figures 3g and l). However, in contrast to nodules induced by the ORS278 strain, the morphological bacterial transition from a rod to a spherical shape during bacteroid differentiation (Figure 3o) was very rarely observed with the other *Bradyrhizobium* strains and when it occurred, the spherical bacteroids were stained red by propidium iodide, indicating that the bacteria were dead (Figure 3m).

We also tested whether the STM6978 strain could induce more efficient nodules on other *Aeschynomene* species. Of the 12 additional species tested, 7 were nodulated and for 4 of them, an intracellular invasion

of plant cells could be observed (Supplementary Figure 2). However, only with one species, *A. scabra*, a nitrogenase activity could be detected. Similarly as observed with *A. indica*, this activity remained weak and the same disorder in bacteroid differentiation was observed (Supplementary Figure 2). This indicates that although the STM6978 strain is recognized as friendly and internalized by the plant host cells in some *Aeschynomene* species, it is blocked at the bacteroid differentiation step which has been shown to go along with the establishment of nitrogenase activity (Bonaldi *et al.*, 2011).

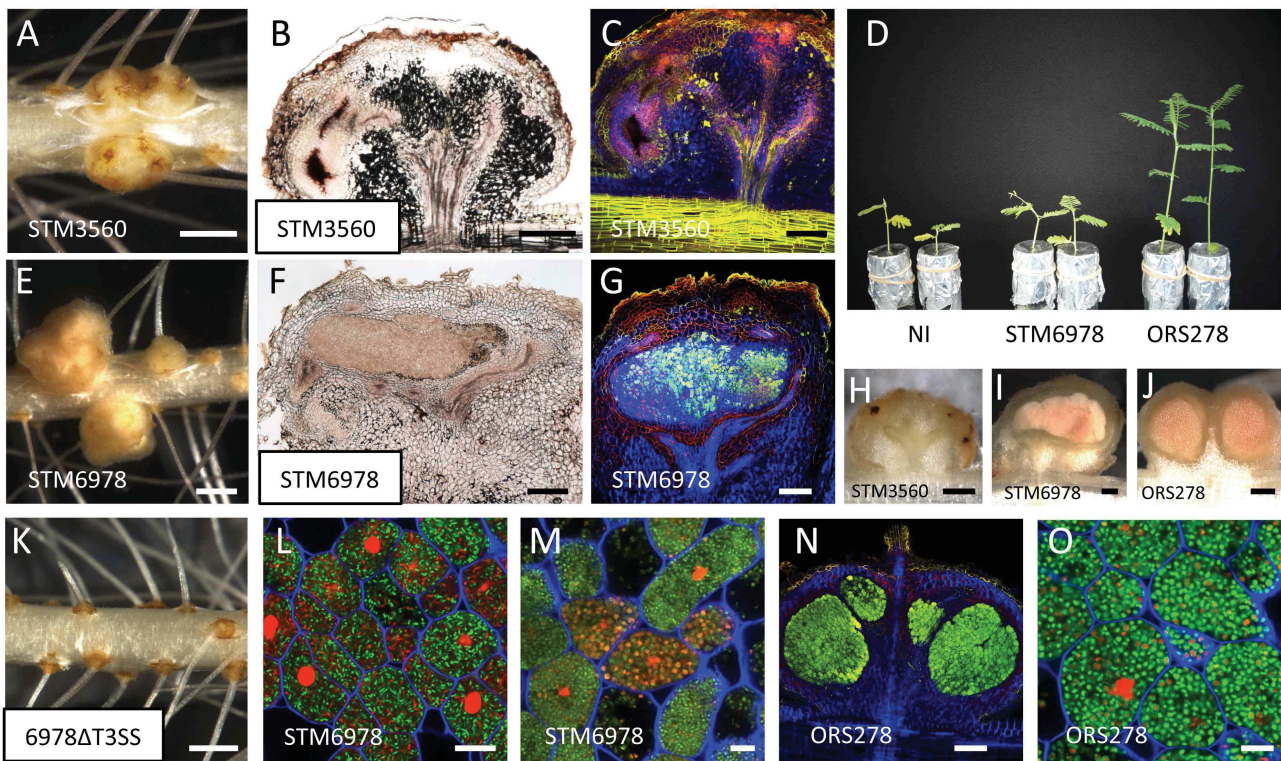


Figure 3 Symbiotic phenotypes of *Bradyrhizobium* STM3560 and STM6978 on *A. indica*. (a and e) Nodules elicited by *Bradyrhizobium* STM3560 (a) and STM6978 (e). Bars, 1 mm. (b, f and h–j) Transversal section of nodules elicited by *Bradyrhizobium* STM3560 (b and h), STM6978 (f and i) and ORS278 (j). Bars, 200 μ m. (d) Comparison of the growth of the plants (aerial part), non-inoculated (NI) or inoculated with STM6978, and *Bradyrhizobium* ORS278 (at 14 d.p.i.). (c, g and n) Confocal microscopy observation of nodules elicited by *Bradyrhizobium* STM3560 (c), STM6978 (g) and ORS278 (n). (l, m and o) Confocal microscopy images showing the morphology of the intracellular bacteria. Note that STM6978 bacteroids showed mainly a rod shape (l) and rarely a spheric shape (m) whereas the ORS278 bacteroids were all spherical (o). Live bacteria are stained green, whereas dead bacteria stain red owing to uptake of propidium iodide. Bars, 200 μ m (c, g and n) and 10 μ m (l, m and o). (k) *A. indica* roots inoculated with *Bradyrhizobium* STM6978 Δ T3SS. Bar, 1 mm. A full colour version of this figure is available at the ISME journal online.

To confirm that the T3SS is required for the establishment of this more intimate symbiotic relationship, we constructed a T3SS mutant of the STM6978 strain. This mutant strain had completely lost its ability to induce nodules whatever the *Aeschynomene* species tested (Figure 3k).

The T3SS of the photosynthetic Bradyrhizobium ORS285 strain is not required for NF-independent symbiosis but contributes to the NF-dependent nodulation

Unlike other photosynthetic *Bradyrhizobium* strains with sequenced genomes, the ORS285 strain contains *nod* genes and a T3SS gene cluster (Mornico et al., 2011). The composition and organization of this T3SS cluster is exactly the same as found in *B. elkanii* and *B. japonicum* USDA110 suggesting that it is functional (Supplementary Figure 3). This raises the question whether this T3SS has a symbiotic role. To examine this, we constructed a 285 Δ rhcN mutant and analyzed its symbiotic properties on various NF-dependent and NF-independent *Aeschynomene* species. On the three NF-independent species tested (*A. indica*, *A. evenia* and *A. sensitiva*), no effect of the T3SS mutation was observed. The number of nodules per plant, the morphology of the

nodules and the nitrogenase activity of the plants were comparable between the WT strain and the T3SS mutant (Figure 4a). In contrast, on NF-dependent hosts plants, various effects of the Δ rhcN mutation were observed (Figures 4a and b): (i) no effect on *A. nilotica*, (Figures 4a–c and h), (ii) a positive effect on *A. uniflora*, that is, the mutant induced a higher number of nodules per plant which were more developed (Figures 4a, b, d and i)—however, like for the WT strain, nodules induced by the Δ rhcN mutant are not efficient in nitrogen fixation—and (iii) a negative effect on *A. afraspera*, that is, the mutant induced less nodules as compared with the WT strain (Figure 4a).

On *A. afraspera* plants, we previously noticed that the ORS285 strain induces atypical nodules characterized by the presence of an outgrowth on the top of the nodules which is constituted by giant plant cells infected by the bacteria (Bonaldi et al., 2011), (Figures 4e–g). In contrast to bacteria in the infected central tissue, the bacteria in the outgrowth remain enclosed in large tubular structures of plant origin that look like permanent infection threads (Bonaldi et al., 2011). Interestingly, besides forming fewer nodules, we observed that the nodules elicited by the 285 Δ T3SS mutant lack this unusual infected tissue

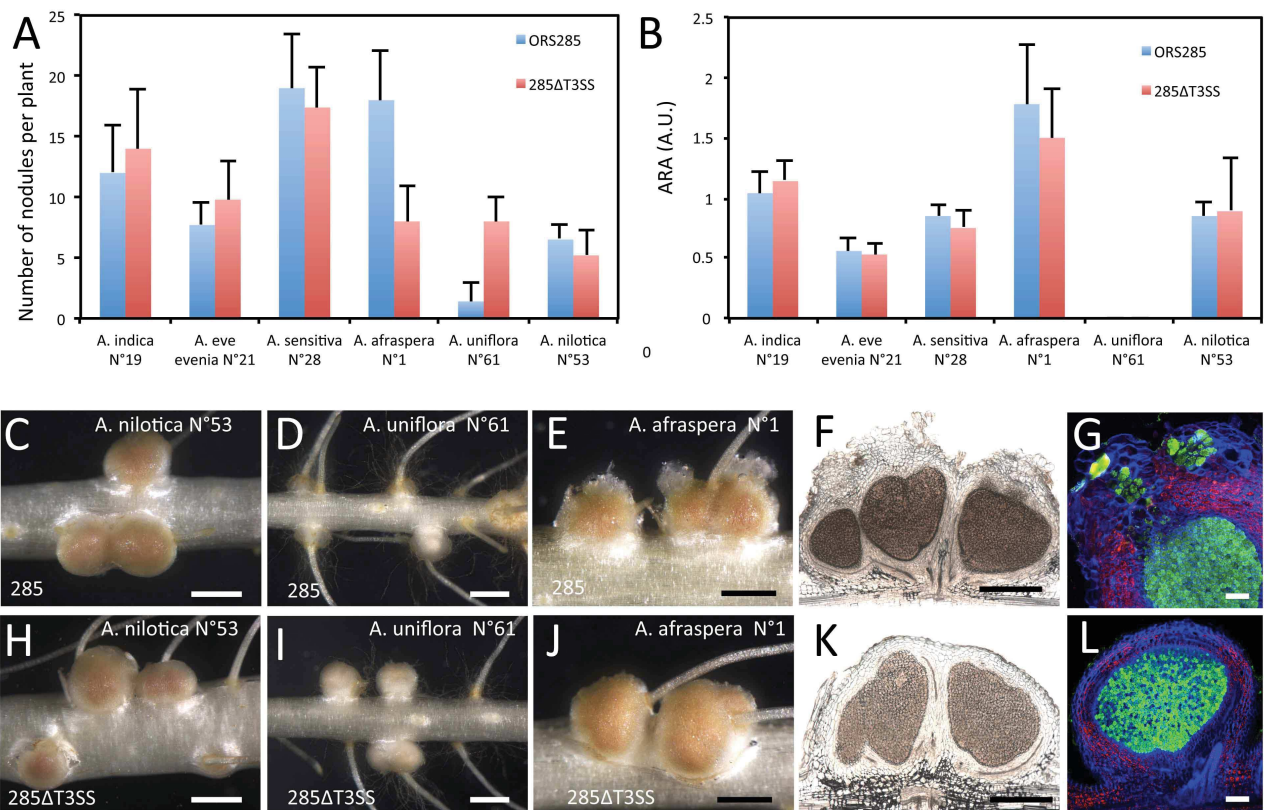


Figure 4 Comparison of the symbiotic properties of *Bradyrhizobium* ORS285 and the Δ T3SS mutant on various NF-dependent and NF-independent *Aeschynomene* species. (a) Number of nodules per plant elicited by *Bradyrhizobium* ORS285 (blue bars) and ORS285 Δ T3SS (red bars) on various *Aeschynomene* species. (b) Acetylene-reducing activity (ARA) in various *Aeschynomene* plants inoculated with *Bradyrhizobium* ORS285 (blue bars) and ORS285 Δ T3SS (red bars). A.U., Arbitrary Unit. Error bars in a and b represent s.d. ($n=5$). (c–e, h–j). Aspect of the nodules elicited by ORS285 and 285 Δ T3SS on *A. nilotica* (c and h), *A. uniflora* (d and i) and *A. afraspera* (e and j). Bars, 1 mm. (f–k, g–l) Cytological observations of the *A. afraspera* nodules elicited by ORS285 (f and g) and 285 Δ T3SS (k and l). Bars, 500 μ m (f and g) and 100 μ m (g and l). A full colour version of this figure is available at the ISME journal online.

suggesting that its formation is dependent of the T3SS (Figures 4j–l). We also examined the ability of *B. elkanii* USDA61 and strain STM6978 to nodulate *A. afraspera* (Supplementary Figure 4). Both strains were able to induce efficient nodules on this species, but unlike ORS285 and similar to the 285 Δ T3SS strain, these nodules lack this unusual outgrowth (Supplementary Figures 4C–E). In addition, inactivation of the T3SS in these two strains did not affect the interaction with *A. afraspera* (Supplementary Figures 4A and B).

Altogether, these data suggest that the ORS285 strain possesses a specific cocktail of T3SS effectors that can have an impact on the nodulation of NF-dependent hosts but that do not have a crucial role on the nodulation of NF-independent ones.

Discussion

In this study, we demonstrate that NF-independent *Aeschynomene* species can be nodulated and infected by highly diverse *Bradyrhizobium* strains via two distinct processes that differ by the requirement of a T3SS.

This observation is rather puzzling considering that in nature, mainly photosynthetic *Bradyrhizobium* strains, lacking a T3SS, were isolated from root and stem nodules of NF-independent *Aeschynomene* species (Lorquin *et al.*, 1993; Molouba *et al.*, 1999; Montecchia *et al.*, 2002). Nevertheless, one study reported the isolation of a few non-photosynthetic *Bradyrhizobium* strains isolated from *A. indica* species growing in French Guiana (Miché *et al.*, 2010). These strains efficiently induce nodules on both the root and the stem of *Aeschynomene* and occupy a distinct phylogenetic position between photosynthetic and classical bradyrhizobia. They may, thus, represent a new *Bradyrhizobium* species. However, genome sequence analysis of one representative strain (STM3843) revealed the absence of the canonical *nodABC* genes as well as a T3SS gene cluster (Mornico *et al.*, 2011). This suggests that these bacteria use a NF-independent T3SS-independent process, probably similar to the one used by photosynthetic bradyrhizobia, to interact symbiotically with *Aeschynomene* plants. Therefore, it remains unclear whether the ability of non-photosynthetic bradyrhizobia to nodulate *A. indica* using a T3SS does exist in natural settings,

considering the weak nitrogen fixation activity of the positive strains identified in this study in comparison with the photosynthetic ones.

Several observations emphasize a very high specificity of the NF-independent T3SS-dependent interaction: (i) despite the frequent presence of a T3SS among the rhizobia tested, only *Bradyrhizobium* strains are found to be able to induce nodules on *Aeschynomene*, (ii) similarly, not all of the tested *Bradyrhizobium* strains possessing a T3SS, such as *Bradyrhizobium japonicum* strains, are able to nodulate *A. indica*, (iii) the host spectra of *B. elkanii* and strain STM6978 towards NF-independent *Aeschynomene* species do not overlap perfectly and (iv) most surprisingly, different ecotypes of the same *A. evenia* spp. *evenia* species respond differently to the *Bradyrhizobium* strains. To explain the high specificity of the T3SS-dependent interaction, some parallels with the conventional NF-dependent symbiosis can be advanced. The involvement of plant flavonoids to trigger the expression of the T3SS genes might constitute a first level of specificity. Indeed, it has been demonstrated in rhizobia that the expression of most T3SS genes encoding the transport machinery and secreted effectors is dependent on plant flavonoids which trigger a regulatory cascade controlled by the transcriptional activators NodD1, NodD2, SyrM2 and TtsI (Wassem *et al.*, 2008). We examined this possibility during the interaction of *B. japonicum* USDA110 with *A. indica* or *A. evenia* by adding genistein to the plant culture medium, a flavonoid known to induce T3SS genes in this bacterium (Zehner *et al.*, 2008). However, no effect of genistein was observed, suggesting that *B. japonicum* is hampered at another level to interact positively with these *Aeschynomene* species. A second possible level of specificity is the plant immune system that confers to the host the capacity to recognize and respond to bacterial infection (For review, Wang *et al.*, 2012; Gourion *et al.*, 2014). The perception of microbe-associated molecular patterns (MAMPs) by host pattern recognition receptors triggers MAMP-triggered immunity. It is suggested that rhizobial surface polysaccharides (exopolysaccharide, capsular polysaccharide or lipopolysaccharide) could suppress or help to evade this first basal defense (Frayse and Couderc, 2003; D'Haese and Holsters, 2004; Aslam *et al.*, 2008). In addition, this MAMP-triggered immunity could be dampened by T3SS effectors delivered into the host cell. In turn, plants also have the ability to recognize these effector proteins through the direct or indirect action of resistance (R) genes to initiate a second barrier of defense, the so-called effector-triggered immunity. The effector-triggered immunity is much stronger and faster than MAMP-triggered immunity and often involves a form of localized cell death called the hypersensitive response (Dodds and Rathjen, 2010). The necrotic tissues observed in the *A. indica* nodules elicited by *B. elkanii* and others strains are reminiscent to hypersensitive response and could

also be the result of T3SS effectors recognized by *R* gene products of the host. If that would be the case, the T3SS permits nodulation but, at the same time, inhibits the intracellular colonization by eliciting defense reactions in developed nodules. Taken together, all the different plant and bacterial actors susceptible to modulate the plant immune response could constitute key determinants governing this host specificity.

Besides interfering with the plant immunity system, we hypothesize that the non-photosynthetic *Bradyrhizobium* strains nodulating *Aeschynomene* also possess effectors able to activate the symbiotic signaling pathways. In conventional rhizobium-legume symbiosis, Nod factors activate two distinct spatial and temporal programs: bacterial infection and nodule organogenesis (Oldroyd *et al.*, 2011). Among the non-photosynthetic bradyrhizobia able to induce nodules on *Aeschynomene* through their T3SS, two distinct classes could be distinguished: a first group, including *B. elkanii* strains, for which the infection remains limited to intercellular spaces, and a second group, including STM6978, for which the host cells are infected intracellularly. It is tempting to speculate that the bacteria of these two groups share in common some effectors that trigger the nodule organogenesis signaling pathway. On the other hand, bacteria of the second group could possess other specific effectors able to trigger an infection program or additional signals such as exopolysaccharide suggested to have a direct signaling role in bacterial release (Kelly *et al.*, 2013).

Although we identified some non-photosynthetic *Bradyrhizobium* strains able to go very far in the symbiotic relationship with *Aeschynomene*, we observed that these bacteria are unable to fix nitrogen efficiently. This is surprising because all the conditions appear to be gathered in the nodule for an efficient nitrogen fixation. The host cells are filled with bacteria indicating that the plant furnished appropriate nutrients for bacterial multiplication and leghemoglobin synthesis is observed indicating that the partial oxygen tension should be suitable for a nitrogenase activity. However, our cytological observations indicate that these bacteria are compromised in the differentiation step as in contrast to photosynthetic *Bradyrhizobium* strains for which the rod-shaped bacteria transform into spherical bacteroids, this morphological change is rarely observed in the nodules infected with the non-photosynthetic *Bradyrhizobium* strains. Recent data suggested that *Aeschynomene* species impose a differentiation process on their endosymbionts through the use of a class of nodule-specific cysteine rich peptides (NCR) (Czernic P, personal communication), a *modus operandi* which is very similar to the one described in *Medicago* species (Van de Velde *et al.*, 2010). NCRs are related to antimicrobial peptides of innate immunity that target the bacteria and convert them in a differentiated, enlarged and polyploid state (Van de Velde *et al.*, 2010).

It is possible that the impairment of non-photosynthetic *Bradyrhizobium* strains to differentiate in *Aeschynomene* results from a higher sensitivity of the bacteria to the NCR peptides. In accordance, the few bacterial cells displaying a spherical shape are dead as indicated by their red staining owing to propidium iodide uptake. Alternatively, it is also possible that the NCRs are not imported in the bacterial cell owing to the lack of a specific transporter or that the NCRs do not find the appropriate bacterial targets to trigger the differentiation process. Further studies are necessary to clarify the mode of action of the NCRs and to determine whether they constitute specificity determinants for the nitrogen fixation stage.

How the photosynthetic bradyrhizobia interact symbiotically with *Aeschynomene* plants remains unknown. Up to date, the different mutagenesis strategies (random or targeted) that have been used have failed in the isolation of a strict nodulation minus mutant (Giraud *et al.*, 2007; Bonaldi *et al.*, 2010). Furthermore, we do not have any experimental evidence indicating that a diffusible bacterial signal molecule triggers early symbiotic responses as observed for NFs. It is therefore tempting to speculate that the triggering of the symbiotic program involves a direct contact between the plant and the bacterium, probably through the perception of a bacterial surface component by a plant receptor. Increasing evidence now suggests that NFs perception might have evolved from plant innate immunity signaling and the possibility has been evoked that the first function of Nod factors was to suppress defense reaction (Liang *et al.*, 2014). The presented results that non-photosynthetic bradyrhizobia can interact symbiotically in the absence of NFs but through a T3SS which is also known to interfere with the plant immunity reinforces the hypothesis that the suppression of the MAMP-triggered immunity constituted the first evolutionary step towards symbiosis. It therefore makes sense to hypothesize that the NF-independent symbiosis between photosynthetic bradyrhizobia and *Aeschynomene* involves the activation of a common symbiotic program but relies first on a specific mechanism of MAMP-triggered immunity suppression. Two elements led us suppose a co-evolution between photosynthetic *Bradyrhizobium* strains and NF-independent *Aeschynomene* species; (i) photosynthetic bradyrhizobia are the main natural symbionts of *Aeschynomene* and these bacteria were not found to be able to nodulate other legume species and (ii) both photosynthetic *Bradyrhizobium* strains and NF-independent *Aeschynomene* species form a monophyletic group (Chaintreuil *et al.*, 2013). We therefore hypothesize that the co-evolution between these two partners has involved the modification of a specific MAMP signal and its cognate plant receptor to avoid the development of plant defense reactions during the interaction.

The deciphering of the molecular basis of these two alternative NF-independent symbiotic processes

should shed new light on the evolution of the rhizobium-legume interaction and might deepen our knowledge on how the plant evolved symbiosis from pathogen resistance mechanisms.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

This work was supported by grant from the French national research agency (ANR-BugsInaCell-13-BSV7-0013) and the Franco-Thai PHC Siam program (project SIAM N°29589XA). We thank P Mergaert (ISV, CNRS, Gif-sur-Yvette, France) for criticisms and corrections of the manuscript. We thank Tatiana Krassova-Wade (LCM, IRD, Dakar, Senegal) for providing some *Bradyrhizobium* strains.

References

- Aslam SN, Newman MA, Erbs G, Morrissey KL, Chinchilla D, Boller T *et al.* (2008). Bacterial polysaccharides suppress induced innate immunity by calcium chelation. *Curr Biol* **18**: 1078–1083.
- Bonaldi K, Gargani D, Prin Y, Fardoux J, Gully D, Nouwen N *et al.* (2011). Nodulation of *Aeschynomene afraspera* and *A. indica* by photosynthetic *Bradyrhizobium* sp. strain ORS285: the Nod-dependent versus the Nod-independent symbiotic interaction. *Mol Plant Microbe Interact* **24**: 1359–1371.
- Bonaldi K, Gourion B, Fardoux J, Hannibal L, Cartieaux F *et al.* (2010). Large-scale transposon mutagenesis of photosynthetic *Bradyrhizobium* sp. strain ORS278 reveals new genetic loci putatively important for Nod-independent symbiosis with *Aeschynomene indica*. *Mol Plant Microbe Interact* **23**: 760–770.
- Chaintreuil C, Arrighi JF, Giraud E, Miché L, Moulin L, Dreyfus B *et al.* (2013). Evolution of symbiosis in the legume genus *Aeschynomene*. *New Phytol* **200**: 1247–1259.
- D’Haeze W, Holsters M. (2004). Surface polysaccharides enable bacteria to evade plant immunity. *Trends Microbiol* **12**: 555–561.
- Dodds PN, Rathjen JP. (2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nat Rev Genet* **11**: 539–548.
- Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**: 424–429.
- Frayssé N, Couderc F, Poinso V. (2003). Surface polysaccharide involvement in establishing the rhizobium-legume symbiosis. *Eur J Biochem* **270**: 1365–1380.
- Gage DJ. (2002). Analysis of infection thread development using Gfp- and DsRed-expressing *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **184**: 7042–7046.
- Giraud E, Moulin L, Vallenet D, Barbe V, Cytryn E, Avarre JC *et al.* (2007). Legumes symbioses: absence of Nod genes in photosynthetic bradyrhizobia. *Science* **316**: 1307–1312.
- Gourion B, Berrabah F, Ratet P, Stacey G. (2014). Rhizobium-legume symbioses: the crucial role of plant immunity. *Trends Plant Sci pii*: S1360–S1385 (14)00297-0.

- Gueye F, Moulin L, Sylla S, Ndoye I, Béna G. (2009). Genetic diversity and distribution of *Bradyrhizobium* and *Azorhizobium* strains associated with the herb legume *Zornia glochidiata* sampled from across Senegal. *Syst Appl Microbiol* **32**: 387–399.
- Haag AF, Baloban M, Sani M, Kerscher B, Pierre O, Farkas A et al. (2011). Protection of *Sinorhizobium* against host cysteine-rich antimicrobial peptides is critical for symbiosis. *PLoS Biol* **9**: e1001169.
- Hueck CJ. (1998). Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 379–433.
- Kelly SJ, Muszyński A, Kawaharada Y, Hubber AM, Sullivan JT, Sandal N et al. (2013). Conditional requirement for exopolysaccharide in the *Mesorhizobium-Lotus* symbiosis. *Mol Plant Microbe Interact* **26**: 319–329.
- Lerouge P, Roche P, Faucher C, Maillet F, Truchet G, Promé JC et al. (1990). Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature* **344**: 781–784.
- Liang Y, Tóth K, Cao Y, Tanaka K, Espinoza C, Stacey G. (2014). Lipochitooligosaccharide recognition: an ancient story. *New Phytol* **204**: 289–296.
- Lorquin J, Molouba F, Dupuy N, Ndiaye S, Alazard D, Gillis M et al. Diversity of photosynthetic *Bradyrhizobium* strains from stem nodules of *Aeschynomene* species. In Palacios R, Mora J, Newton WE (Eds) (1993). *New Horizons in Nitrogen Fixation*. Boston: Kluwer, **17**: 683–689.
- Madsen LH, Tirichine L, Jurkiewicz A, Sullivan JT, Heckmann AB, Bek AS et al. (2010). The molecular network governing nodule organogenesis and infection in the model legume *Lotus japonicus*. *Nat Commun* **1**: 10.
- Miché L, Moulin L, Chaintreuil C, Contreras-Jimenez JL, Munive-Hernández JA, Del Carmen Villegas-Hernandez M et al. (2010). Diversity analyses of *Aeschynomene* symbionts in Tropical Africa and Central America reveal that Nod-independent stem nodulation is not restricted to photosynthetic bradyrhizobia. *Environ Microbiol* **12**: 2152–2164.
- Molouba F, Lorquin J, Willems A, Hoste B, Giraud E, Dreyfus B et al. (1999). Photosynthetic bradyrhizobia from *Aeschynomene* spp. are specific to stem-nodulated species and form a separate 16 S ribosomal DNA restriction fragment length polymorphism group. *Appl Environ Microbiol* **65**: 3084–3094.
- Montecchia MS, Kerber NL, Pucheu NL, Peticari A, García AF. (2002). Analysis of genomic diversity among photosynthetic stem-nodulating rhizobial strains from northeast Argentina. *Syst Appl Microbiol* **25**: 423–433.
- Mornico D, Miché L, Béna G, Nouwen N, Verméglio A, Vallenet D et al. (2011). Comparative genomics of *Aeschynomene* symbionts: insights into the ecological lifestyle of Nod-independent photosynthetic bradyrhizobia. *Genes* **3**: 35–61.
- Nagata T, Takebe L. (1970). Cell wall regeneration and cell division in isolated tobacco mesophyll protoplasts. *Planta* **92**: 301–308.
- Okazaki S, Kaneko T, Sato S, Saeki K. (2013). Hijacking of leguminous nodulation signaling by the rhizobial type III secretion system. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**: 17131–17136.
- Oldroyd GE, Murray JD, Poole PS, Downie JA. (2011). The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annu Rev Genet* **45**: 119–144.
- Oldroyd GE. (2013). Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nat Rev Microbiol* **11**: 252–263.
- Saitou RR, Nei M. (1987). A neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **44**: 406–425.
- Tampakaki AP. (2014). Commonalities and differences of T3SSs in rhizobia and plant pathogenic bacteria. *Front Plant Sci* **5**: 114.
- Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG (2002). Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. *Curr Protoc Bioinformatics*. Chapter 2: Unit 2.3.
- Van de Velde W, Zehirov G, Szatmari A, Debreczeny M, Ishihara H, Kevei Z et al. (2010). Plant peptides govern terminal differentiation of bacteria in symbiosis. *Science* **327**: 1122–1126.
- Vincent JM. (1970). *A Manual for the Practical Study of Root-Nodule Bacteria*. Blackwell Scientific Publications: Oxford, United Kingdom.
- Wang D, Yang S, Tang F, Zhu H. (2012). Symbiosis specificity in the legume: rhizobial mutualism. *Cell Microbiol* **14**: 334–342.
- Wassem R, Kobayashi H, Kambara K, Le Quéré A, Walker GC, Broughton WJ et al. (2008). TtsI regulates symbiotic genes in *Rhizobium* species NGR-234 by binding to tts boxes. *Mol Microbiol* **68**: 736–748.
- Wilson KJ, Sessitsch A, Corbo JC, Giller KE, Akkermans AD, Jefferson RA. (1995). β -Glucuronidase (GUS) transposons for ecological and genetic studies of rhizobia and other Gram-negative bacteria. *Microbiology* **141**: 1691–1705.
- Zehner S, Schober G, Wenzel M, Lang K, Göttfert M. (2008). Expression of the *Bradyrhizobium japonicum* type III secretion system in legume nodules and analysis of the associated tts box promoter. *Mol Plant Microbe Interact* **21**: 1087–1093.

Supplementary Information accompanies this paper on The ISME Journal website (<http://www.nature.com/ismej>)

Supplementary information for

Rhizobium-legume symbiosis in absence of Nod factors : two possible scenario with or without the T3SS

Shin Okazaki¹, Panlada Tittabutr², Albin Teulet³, Julien Thouin³, Joël Fardoux³,
Clémence Chaintreuil³, Djamel Gully³, Jean- François Arrighi³, Noriyuki Furuta¹,
Hiroki Miwa¹, Michiko Yasuda¹, Nico Nouwen³, Neung Teaumroong² and Eric Giraud³

* Corresponding author: eric.giraud@ird.fr

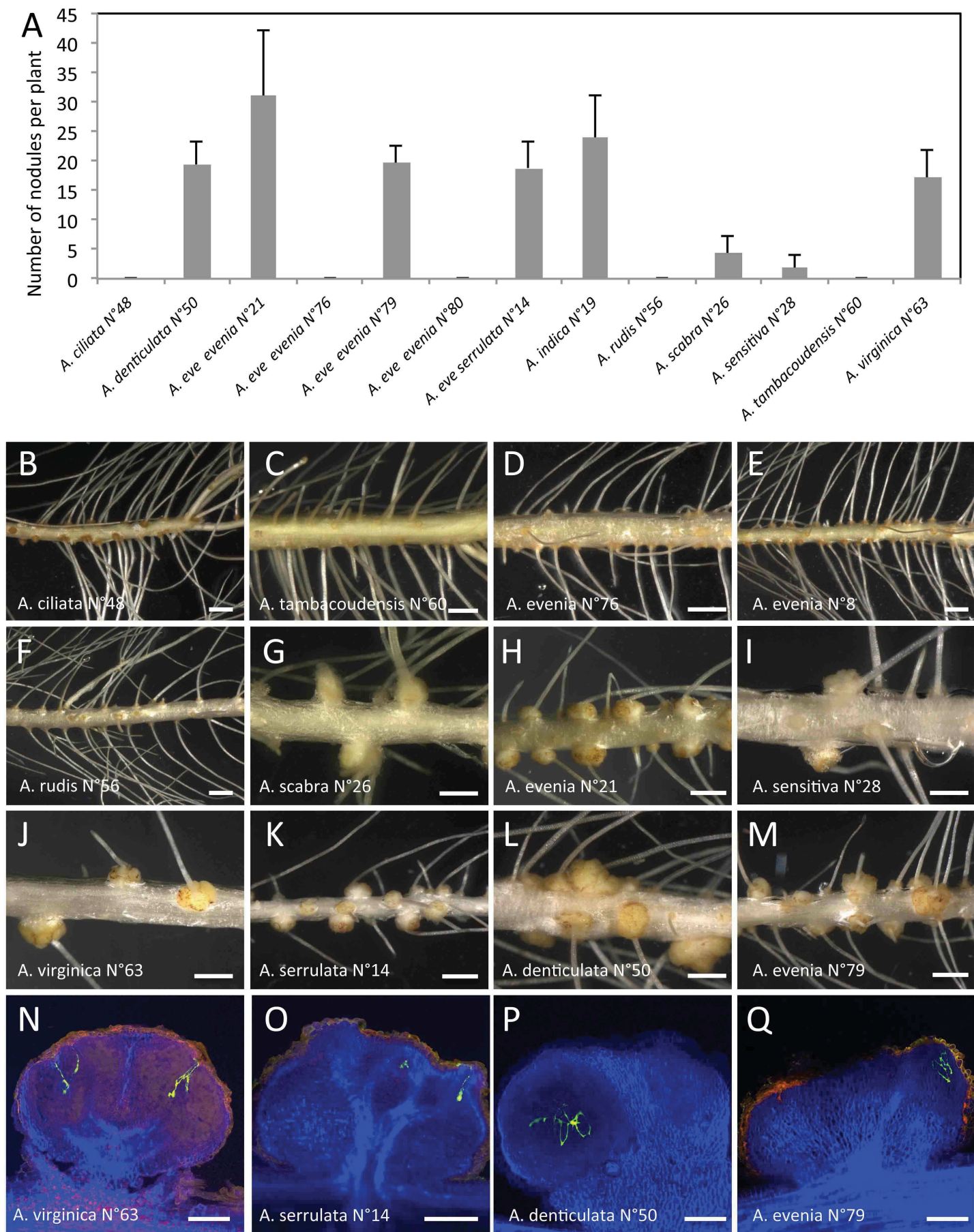


Figure S1. Host spectrum of *Bradyrhizobium elkanii* on various NF-independent *Aeschynomene* species.
A. Number of nodules per plant elicited by *B. elkanii* USDA61 on various NF-independent *Aeschynomene* species. Error bars represent s.d. (n=5). **B-M.** Root systems of various *Aeschynomene* species inoculated with *B. elkanii* USDA61 at 14dpi. Bars, 1 mm. **N-Q.** Confocal microscopy observation of nodules elicited by *B. elkanii* tagged with GFP on various *Aeschynomene* species. Bars, 200 μ m.

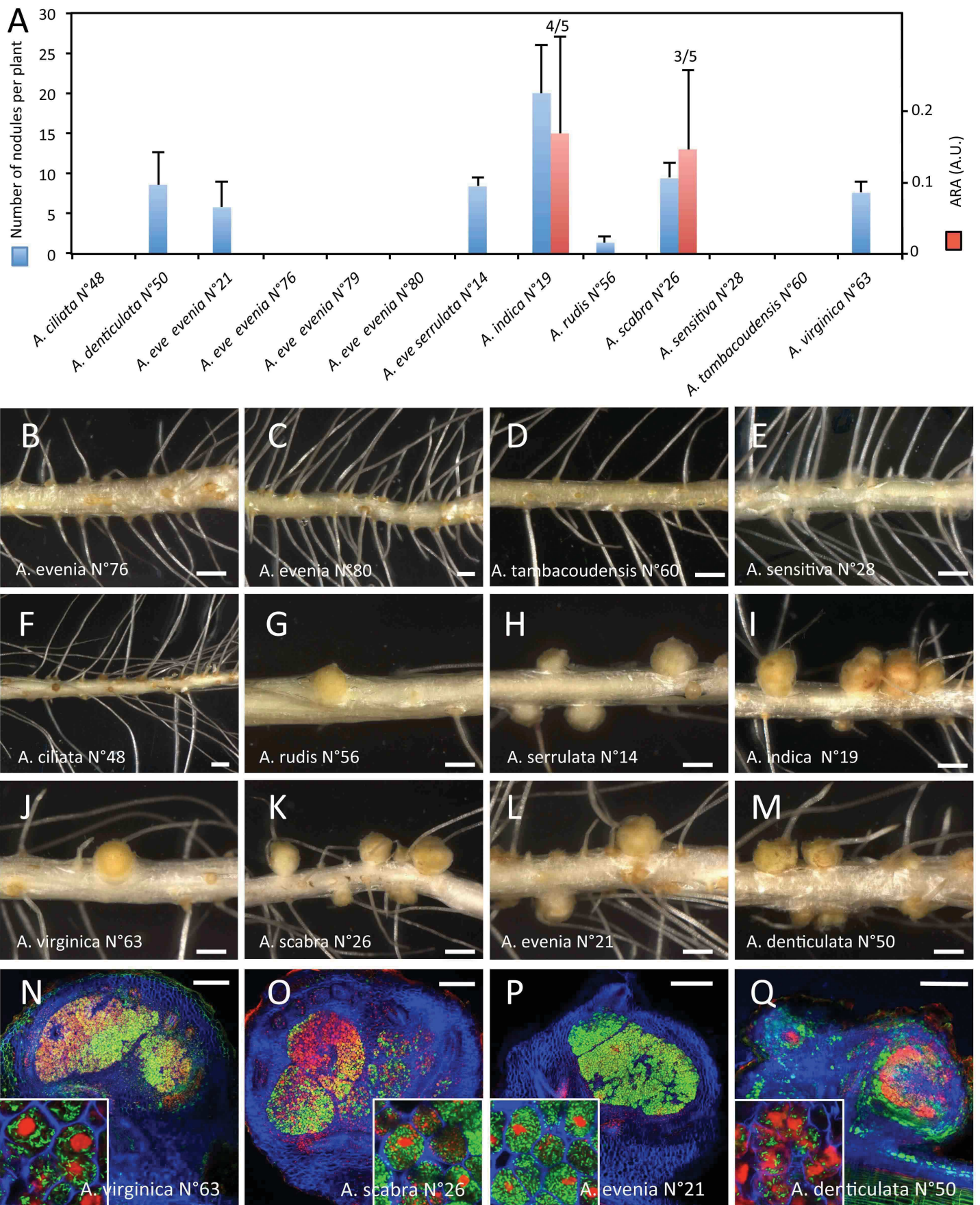
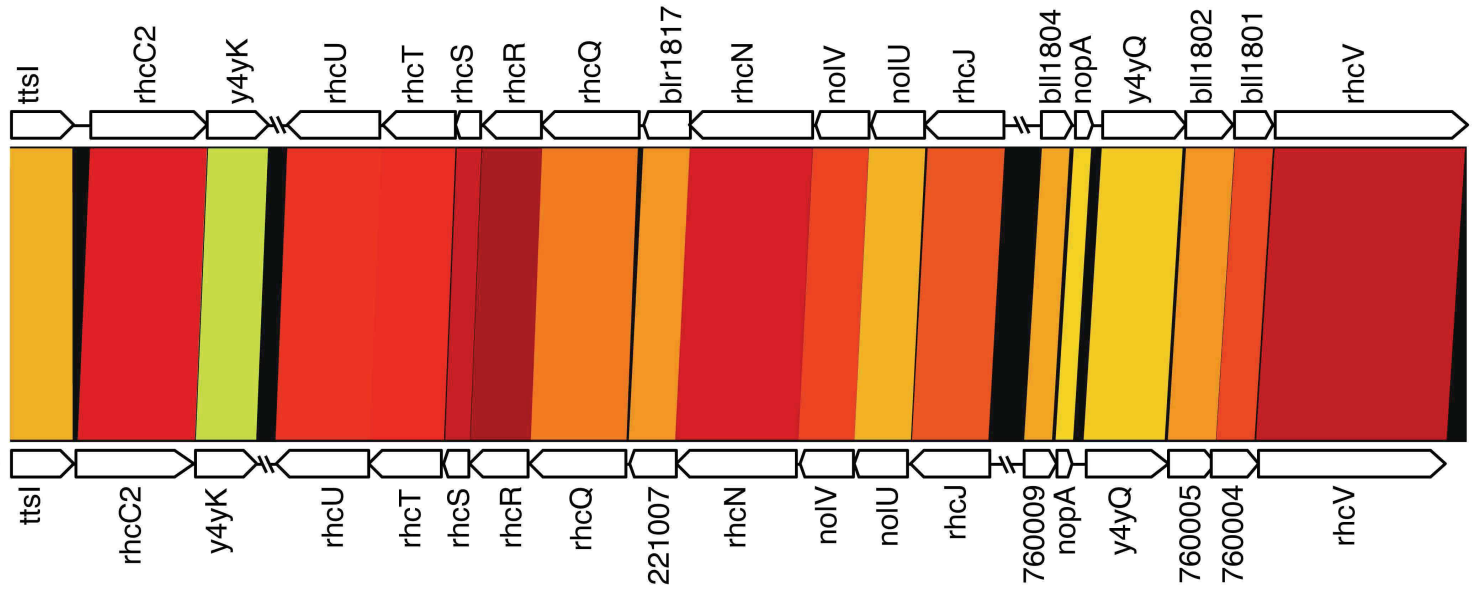


Figure S2. Host spectrum of *Bradyrhizobium* STM6978 on various NF-independent *Aeschynomene* species.

A. Symbiotic properties of *Bradyrhizobium* STM6978 on various NF-independent *Aeschynomene* species, number of nodules per plant (blue bar) and nitrogenase activity of the plant (red bar). A.U., Arbitrary Unit. Error bars in A represent s.d. (n=5). On the top of the ARA bars is indicated the number of plants displaying an ARA activity of the five plants tested. **B-M.** Root system of various *Aeschynomene* species inoculated with *Bradyrhizobium* STM6978 at 14dpi. Bars, 1 mm. **N-Q.** Confocal microscopy observation of nodules elicited by *Bradyrhizobium* STM6978 on various *Aeschynomene* species. Inset: morphology of the bacteria. Bars, 200 μ m.

B. japonicum USDA110



Bradyrhizobium sp. ORS285



Figure S3: Genetic organisation and comparison of the type III secretion gene clusters in *Bradyrhizobium* ORS285 and *B. japonicum* USDA110.

Colored strips represent the conserved gene regions between the compared strains, and the color indicates the percentage similarity, as detailed in the key.

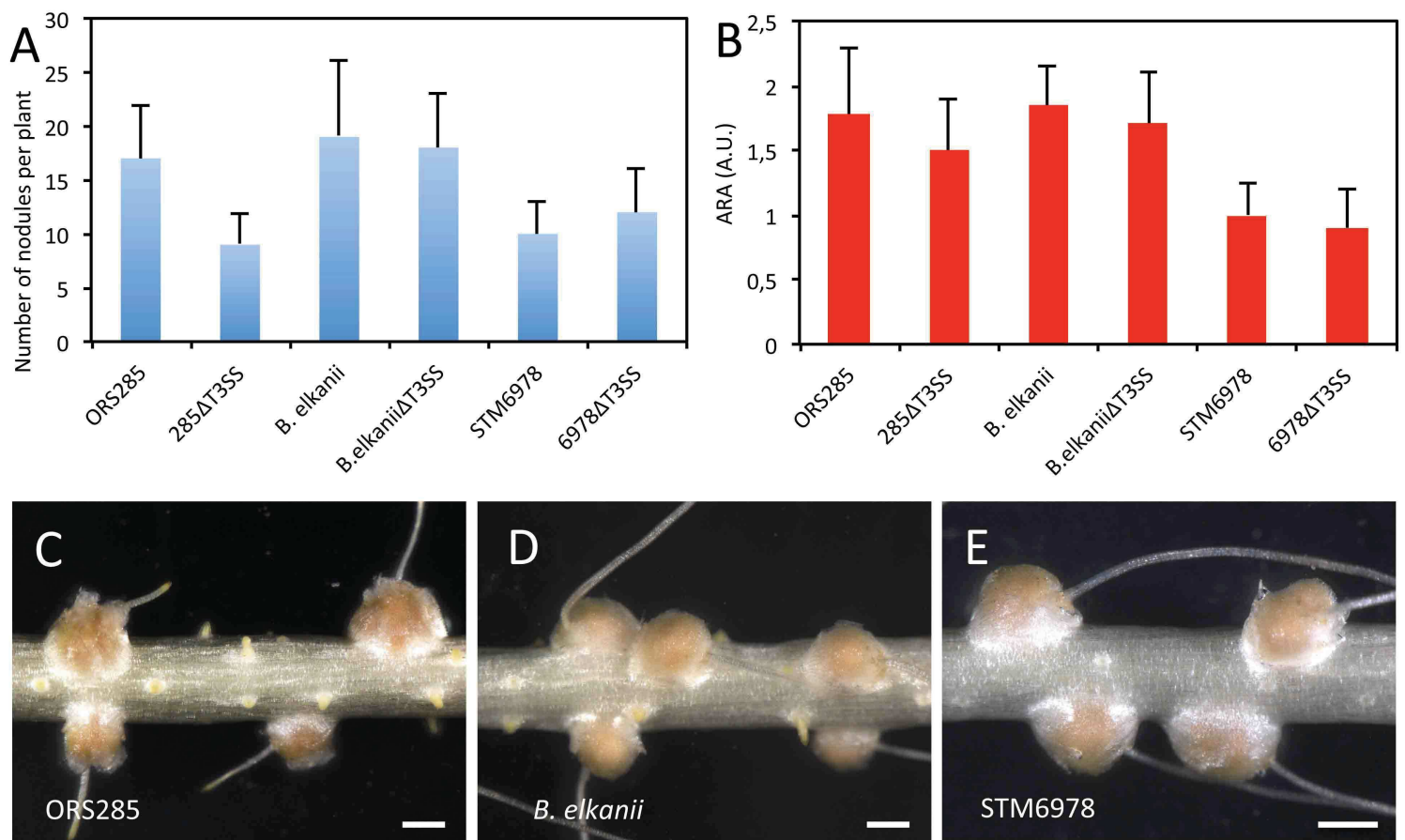


Fig. S4. Comparison of the symbiotic properties of *Bradyrhizobium* ORS285, *B. elkanii* USDA61, STM6978 and their mutant T3SS derivatives on *A. afraspera*. A. Number of nodules per plant elicited by *Bradyrhizobium* ORS285, *B. elkanii*, STM6978 and their derivative T3SS mutants. B. Acetylene-reducing activity (ARA) in *A. afraspera* plants inoculated with *Bradyrhizobium* ORS285, *B. elkanii* and STM6978 and their derivative T3SS mutants. Error bars in A,B represent s.d. (n=5). A.U., Arbitrary Unit. (C-E). Aspect of the nodules elicited by ORS285, *B. elkanii* and STM6978, bars are 1 mm.

Table S1 : Rhizobium strains tested found unable to nodulate *A. indica*

Strain	Accession
Allorhizobium	
<i>A. undicola</i>	LMG 11853
Azorhizobium	
<i>A. caulinodans</i>	ORS571
Mesorhizobium	
<i>M. amorphae</i>	LMG 18932
<i>M. huakuii</i>	GMI65
<i>M. loti</i>	CIAM 1801
<i>M. mediterraneum</i>	LMG 17148T
<i>M. thiogangeticum</i>	STM1027
Methylobacterium	
<i>M. nodulans</i>	ORS2060
Rhizobium	
<i>R. elti</i> bv. <i>phaseoli</i>	LMG 11937
<i>R. galegae</i> bv. <i>officinalis</i>	HAMBI1207
<i>R. galegae</i> bv. <i>orientalis</i>	HAMBI1174
<i>R. gallicum</i> bv. <i>gallicum</i>	R602T
<i>R. gallicum</i> bv. <i>phaseoli</i>	STM853
<i>R. huautlense</i>	LMG 18254T
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	ANU843
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	LMG 14904T
<i>R. tropici</i>	GMI9777
Sinorhizobium	
<i>S. adhaerens</i>	LMG 20216T
<i>S. arboris</i>	LMG 14919T
<i>S. fredii</i>	LMG 16217T
<i>Sinorhizobium</i> sp.	NGR234
<i>S. kostiense</i>	HAMBI 1505
<i>S. medicae</i>	LMG 19920T
<i>S. meliloti</i> bv. <i>acaciae</i>	LMG 6133T
<i>S. meliloti</i> bv. <i>meliloti</i>	GMI49
<i>S. morelense</i>	LMG 21331T
<i>S. sahelense</i> bv. <i>sesbaniae</i>	LMG 7837T
<i>S. teranga</i> bv. <i>acaciae</i>	LMG 7834T
Burkholderia	
<i>B. caribensis</i>	TJ182
<i>B. cepacia</i>	ATCC 25416
<i>B. tuberum</i>	LMG 21444T
<i>B. phymatum</i>	STM815
<i>B. nodosa</i>	LMG 23741

Table S2 : Accessions and origin of *Aeschynomene* species used in this study.

Species	LSTM- Accession	Other Germplasm- Accession	Origin
<i>A. afraspera</i>	N°01	-	Senegal
<i>A. ciliata</i>	N°48	IRRI-013078	Republic of Colombia
<i>A. denticulata</i>	N°50	IRRI-013003	Brazil
<i>A. evenia</i> spp. <i>evenia</i>	N°21	USDA-PI225551	Zambia
<i>A. evenia</i> spp. <i>evenia</i>	N°76	CIAT-22838	Malawi
<i>A. evenia</i> spp. <i>evenia</i>	N°79	CIAT-08251	Brazil
<i>A. evenia</i> spp. <i>evenia</i>	N°80	CIAT-08232	Brazil
<i>A. evenia</i> spp. <i>serrulata</i>	N°14	USDA-PI572567	USA
<i>A. indica</i>	N°19	-	Senegal
<i>A. nilotica</i>	N°53	IRRI-014040	Senegal
<i>A. rudis</i>	N°56	Matt Lavin	USA
<i>A. scabra</i>	N°26	-	Mexique
<i>A. sensitiva</i>	N°28	-	Senegal
<i>A. tambacoudensis</i>	N°60	-	Senegal
<i>A. uniflora</i>	N°61	IRRI 013158	Republic of Zaire
<i>A. virginica</i>	N°63	Matt Lavin	USA

Construction of the STM6978ΔT3SS and ORS285ΔT3SS mutants

To be able to construct a GFP tagged T3SS mutant of ORS285 and a T3SS mutant of STM6978, two derivative forms of the non-replicative pVO155 plasmid (Oke and Long, 1999) were constructed. Strain STM6978 is resistant to most classical antibiotics, except for the third generation beta-lactam cefotaxim. For this reason, a pVO155 derivative was constructed that contains the cefotaximase gene to confer resistance to cefotaxim. To this end, the cefotaximase CTX-M-15 from *Escherichia coli* strain 25104 was amplified and fused by overlapping PCR to the constitutive npt2 promoter using the primers: Cefo-M15-f (5'- CAGGATACATGCATAGGAGGAATCCCATGGTTAAAAAATCACTGC -3')/ Cefo-M15-r (5'- CGTTAAGCTTTTACAAACCGTCGGTGACGATTTTAGC-3') and pm-npt2-f (5'- GCTAAGCTTCCACGCTGCCGCAAGCACTCAGG -3')/ pm-npt2-r (5'- ATGGGATTCTCCTATGCATGTATCCTGTCTCTTGATCAG -3'). The resulting PCR fragment was cloned into the HindIII site of pVO155 resulting in pVO155-npt2-Cefo. To be able to obtain a GFP tagged T3SS mutant, a pVO155 derivative containing the *gfp* gene was constructed. For this purpose, the npt2-GFP containing region from plasmid pMG103-npt2-GFP (Bonaldi et al, 2010) was isolated after KpnI digestion and subsequently cloned into the KpnI site present in pVO155 resulting in pVO155-npt2-GFP. For the construction of the T3SS mutants, a DNA region of around 400-bp inside the *rhcN* gene from STM6978 and ORS285 were then amplified using the primers: RhcN-6978-f (5'- GATAGCGTCGACGAGATTCGCAGCAAAGGATGTC -3')/ RhcN-6978-r (5'- GAAGTCCTCTAGACACGCGAACGCCAAGCGGAAAC -3') and RhcN-285-f (5'- CATTGCTCGAGGTGCCGTCGCGCCGAATCAC-3')/ RhcN-285-r (5'- GAAATCTAGACTCAATCCCACGCCTCTTCATAG -3'). The resulting DNA fragment from STM6978 was digested with Sall and XbaI and cloned into Sall/XbaI linearised pVO155-npt2-Cefo. The resulting *rhcN* fragment from ORS285 was digested by XhoI and XbaI and cloned into plasmid pVO155-npt2-GFP that had been linearized with Sall/XbaI. The resulting plasmids were then transferred into *E. coli* S17-1 strain to introduce the construction in ORS285 or STM6978 strain by mating as previously

described (Giraud et al, 2010). For STM6978, mutant selection was done on YM medium complemented with nalidixic acid (20µg/ml) and cefotaxim (20µg/ml).

References

- Bonaldi K, Gherbi H, Franche C, Bastien G, Fardoux J *et al.* (2010). The Nod factor-independent symbiotic signaling pathway: development of *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation for the legume *Aeschynomene indica*. *Mol Plant Microbe Interact* 23: 1537-1544.
- Oke V, Long SR (1999) Bacterial genes induced within the nodule during the Rhizobium-legume symbiosis. *Mol. Microbiol.* 1999, 32, 837–849.
- Giraud E, Lavergne J, Vermeglio, A. (2010). Characterization of bacteriophytochromes from photosynthetic bacteria: Histidine kinase signaling triggered by light and redox sensing. *Methods Enzymol* 471:135–159.

Liste des publications et présentations orales

Publications scientifiques

Teulet A, Gully D, Rouy Z, Koebnik R, Giraud E, Lassalle F. Phylogenetic distribution and evolutionary dynamics of *nod* and T3SS genes in the genus *Bradyrhizobium*. En cours de soumission

Teulet A, Fardoux J, Busset N, Gully D, Chaintreuil C, Cartieaux F, Jauneau A, Okazaki S, Gressent F, Nouwen N, Arrighi JF, Koebnik R, Mergaert P, Deslandes L, Giraud E. The rhizobial type III effector ErnA triggers nodulation in legumes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2019; **116**: 1-11

Songwattana P, Tittabutr P, Wongdee J, Teamtisong K, Wulandari D, Teulet A, Fardoux J, Boonkerd N, Giraud E, Neung Teaumroong N. Symbiotic properties of a chimeric Nod-independent photosynthetic *Bradyrhizobium* strain obtained by lateral transfer of a symbiotic plasmid. *Environ Microbiol* 2019 **21**: 3442-3454

Le Quéré A, Gully D, Teulet A, Navarro E, Gargani D, Fardoux J, Cruveiller S, Neyra M, Giraud E, Krasova Wade T. Complete genome sequence of *Bradyrhizobium* sp. ORS3257, an elite nitrogen fixing bacterium isolated from cowpea in Senegal. *Microbiol Resour Announc* 2019 **8**:e01449_18

Gully D, Teulet A, Busset N, Nouwen N, Fardoux J, Rouy Z, Vallenet D, Cruveiller S, Giraud E. Complete genome sequence of *Bradyrhizobium* sp. ORS285, a photosynthetic strain able to establish Nod factor-dependent or Nod factor-independent symbiosis with *Aeschynomene* legumes. *Genome Announc* 2017; **5**: 30

Songwattana P, Noisangiam R, Teamtisong K, Prakamhang J, Teulet A, Tittabutr P, Piromyou P, Boonkerd N, Giraud E, Teaumroong N. Type 3 Secretion System (T3SS) of *Bradyrhizobium* sp. DOA9 and its roles in legume symbiosis and rice endophytic association. *Front Microbiol* 2017; **8**:1810

Okazaki S, Tittabutr P, Teulet A, Thouin J, Fardoux J, Chaintreuil C, Gully D, Arrighi JF, Furuta N, Miwa H, Yasuda M, Nouwen N, Teaumroong N, Giraud E. Rhizobium–legume symbiosis in the absence of Nod factors: two possible scenarios with or without the T3SS. *ISME J* 2016; **10**: 64-74

Communications orales

Teulet A, Fardoux J, Chaintreuil C, Jauneau A, Busset N, Deslandes L, Koebnik R, Mergaert P, Giraud E
- Identification of *Bradyrhizobium* sp. ORS3257 strain T3SS effectors required for Nod-Factor independent nodulation of *Aeschynomene* plants - **13th European Nitrogen Fixation Conference (ENFC), Stockholm (Suède) , Août 2018**

Teulet A, Fardoux J, Chaintreuil C, Jauneau A, Busset N, Deslandes L, Koebnik R, Mergaert P, Giraud E
- ET-Nod : a novel type III secreted effector triggering nodulation without Nod-Factors – **10^{ième} Edition du Printemps de Baillarguet, Montpellier (France), Mai 2018**

Teulet A, Fardoux J, Chaintreuil C, Jauneau A, Busset N, Deslandes L, Koebnik R, Mergaert P, Giraud E
-The Nod-factor independent T3SS-dependent symbiosis: Research of T3SS effectors in *Bradyrhizobium* ORS3257 triggering nodulation in *Aeschynomene* sp.- **13^{ième} Rencontre Plantes-Bactéries, Aussois (France), Février 2018**

Teulet A, Fardoux J, Chaintreuil C, Jauneau A, Busset N, Deslandes L, Koebnik R, Mergaert P, Giraud E
- A cocktail of type III effectors controls the symbiotic interaction between *Aeschynomene* and non-photosynthetic Bradyrhizobia – **5th Meeting on Molecular Mechanisms in Nitrogen-Fixing Root Endosymbioses, Toulouse (France), Octobre 2017**

Teulet A, Fardoux J, Chaintreuil C, Jauneau A, Busset N, Deslandes L, Koebnik R, Mergaert P, Giraud E
- When rhizobia develops a symbiosis with legumes thanks their T3SS instead of Nod factors – **10th Effectome meeting, Banyuls (France), Septembre 2017**

Teulet A, Fardoux J, Chaintreuil C, Jauneau A, Busset N, Deslandes L, Koebnik R, Mergaert P, Giraud E
- Dissection moléculaire d'un processus symbiotique alternatif entre des légumineuses et des *Bradyrhizobium* impliquant le système de sécrétion de type III mais pas la synthèse de facteurs Nod -
– **9^{ième} Edition du Printemps de Baillarguet, Montpellier (France), Mai 2016**

Characterization of an alternative symbiotic process between legumes and *Bradyrhizobium* involving the Type 3 secretion system (T3SS) but not the Nod factor synthesis.

Abstract

Bradyrhizobia are soil bacteria able to establish a symbiotic interaction with a wide range of legume species. This symbiosis leads to the formation of a new organ, the nodule, in which the bacteria can fix atmospheric dinitrogen for the plant's benefit. This interaction largely depends on the plant recognition of bacterial signal molecules, the Nod factors (NFs), that control the infection and nodule organogenesis processes. Recently, it has been demonstrated that some non-photosynthetic *Bradyrhizobium* strains, such as *B. elkanii* USDA61 and *Bradyrhizobium* sp. ORS3257, are capable to nodulate some legumes (*Glycine max*, *Aeschynomene indica*) in the absence of NFs and that this capacity is due to their type III secretion system (T3SS). This discovery suggests that some effectors secreted by this secretory machinery, initially believed to solely play a role in the suppression of plant immunity, can directly activate the nodulation by bypassing the early stages of the symbiotic signaling pathway activated by the NFs. The main objective of this thesis was to progress in the understanding of the mechanisms involved in this novel NF-independent T3SS-dependent interaction using as model the interaction of the strain ORS3257 with the tropical legume *A. indica*. It has been shown that this symbiotic process relies on a cocktail of at least 5 effectors that play distinct and synergistic roles in the processes of infection, nodule organogenesis and suppression of the plant immune response. In particular, a novel nuclear effector, that we named ErnA for "Effector required for nodulation-A", is widely distributed in the *Bradyrhizobium* genus and was identified as the main inducer of nodule organogenesis. In addition, we have conducted a comparative genomic analysis of 146 *Bradyrhizobium* genomes in order to better understand the distribution of T3SS and the main effectors identified to date. This showed that the T3SS is widespread in the *Bradyrhizobium* genus and shares a common evolutionary history with the *nod* genes. This thesis work constitutes a first step in the understanding of the molecular mechanisms involved in this NF-independent T3SS-dependent nodulation and suggests that the T3SS of bradyrhizobia could play a much larger symbiotic role than originally thought.

Key words: *Bradyrhizobium*, T3SS, symbiosis, signal molecule, effector

Caractérisation d'un processus symbiotique alternative entre légumineuses et *Bradyrhizobium* impliquant le système de sécrétion de type III (T3SS) mais pas la synthèse de facteurs Nods

Résumé

Les *Bradyrhizobium* sont des bactéries du sol ayant la capacité d'établir une interaction symbiotique avec de nombreuses légumineuses. Cette symbiose conduit à la formation d'un nouvel organe, le nodule, au sein duquel la bactérie peut fixer le diazote atmosphérique au bénéfice de la plante. Cette interaction repose largement sur la reconnaissance par la plante de molécules signal, les facteurs Nods (FNs) produits par la bactérie qui contrôlent les processus d'infection et d'organogénèse nodulaire. Récemment, il a été démontré que certaines souches de *Bradyrhizobium* non-photosynthétiques, telles que les souches *B. elkanii* USDA61 et *Bradyrhizobium* sp. ORS3257, possèdent la capacité de noduler certaines légumineuses (*Glycine max*, *Aeschynomene indica*) en l'absence de facteurs Nods grâce à leur système de sécrétion de type III (T3SS). Cette découverte suggère que certains effecteurs sécrétés par cette machinerie de sécrétion, initialement connus pour jouer un rôle dans la répression du système immunitaire de la plante hôte, peuvent directement activer la nodulation en court-circuitant les premières étapes de la voie de signalisation initiée par les FN. Dans un premier temps, l'objectif principal de ce travail de thèse a consisté à avancer dans la compréhension des mécanismes mis en jeu lors de cette nouvelle interaction FN-indépendante T3SS-dépendante en utilisant la souche ORS3257 en interaction avec la légumineuse tropicale *A. indica*. Il a été démontré que ce processus symbiotique repose sur un cocktail d'au moins 5 effecteurs qui jouent un rôle distinct et complémentaire dans les processus d'infection, d'organogénèse des nodules et de répression de la réponse immune. Plus particulièrement, un nouvel effecteur nucléaire appelé ErnA pour « Effector required for nodulation-A » et largement distribué chez les *Bradyrhizobium*, a été identifié comme étant le principal inducteur de l'organogénèse nodulaire. Dans un second temps, nous avons mené une analyse génomique comparative sur 146 génomes de *Bradyrhizobium* afin de mieux comprendre la distribution du T3SS et des principaux effecteurs identifiés à ce jour. Il a été mis notamment en évidence que le T3SS est très répandu dans le genre *Bradyrhizobium* et qu'il partage une histoire évolutive commune avec les gènes de nodulation *nod*. L'ensemble de ce travail de thèse constitue une première étape dans la compréhension des mécanismes moléculaire recrutés pour la mise en place d'un nouveau processus de nodulation indépendante d'une signalisation FN et suggère, par ailleurs, que le T3SS des *Bradyrhizobium* pourrait jouer un rôle symbiotique bien plus important qu'estimé jusqu'alors.

Mots clés : *Bradyrhizobium*, T3SS, symbiose, molécule signal, effecteur