



**HAL**  
open science

# Implication d'une subtilase dans les étapes précoces des symbioses actinorhiziennes

Sergio Svistoonoff

► **To cite this version:**

Sergio Svistoonoff. Implication d'une subtilase dans les étapes précoces des symbioses actinorhiziennes. Biologie végétale. Université Montpellier II - Sciences et Techniques du Languedoc, 2003. Français. NNT: . tel-00149614

**HAL Id: tel-00149614**

**<https://theses.hal.science/tel-00149614>**

Submitted on 28 May 2007

**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.

UNIVERSITE MONTPELLIER II – SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC  
UFR DES SCIENCES

THESE

Pour obtenir le grade de  
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II

Discipline : Physiologie Végétale  
Présentée et soutenue publiquement par

**Sergio SVISTOONOFF**  
Le 18 Juin 2003

## **Implication d'une subtilase dans les étapes précoces des symbioses actinorhiziennes**

Directeur de Thèse : Didier BOGUSZ

JURY

Michel LEBRUN	Président
Philippe NORMAND	Rapporteur
Katharina PAWLOWSKI	Rapporteur
Jacques BATUT	Examineur
Didier BOGUSZ	Examineur

## Résumé

---

Les plantes actinorhiziennes sont des non légumineuses appartenant à 8 familles d'angiospermes qui peuvent établir une symbiose fixatrice d'azote avec l'actinomycète du sol *Frankia*. Cette interaction aboutit à la formation de nodules au niveau du système racinaire de la plante. Parmi les gènes qui interviennent au cours des étapes précoces de la symbiose figure *Cg12*, un gène isolé chez l'arbre actinorhizien *Casuarina glauca* qui code une protéase à sérine de la famille des subtilisines (=subtilase). L'objectif de ce travail est la poursuite de la caractérisation de ce gène à travers 4 approches :

(1) Une étude détaillée du profil d'expression de *Cg12* a été réalisée grâce à l'utilisation de Casuarinacées transgéniques contenant des fusions transcriptionnelles entre le promoteur de *Cg12* et des gènes rapporteurs. Cette analyse a permis de montrer que l'expression de *Cg12* est spécifiquement liée à l'infection des cellules par *Frankia* et qu'elle débute dès les premières étapes de la symbiose, quand *Frankia* pénètre dans des poils absorbants déformés.

(2) La protéine CG12 a été mise en évidence dans des extraits protéiques de *C. glauca* en utilisant des anticorps anti-CG12. Ces anticorps ont également été utilisés dans des expériences d'immunolocalisation, ce qui nous a permis de montrer que CG12 se retrouve dans le compartiment extracellulaire, au niveau des parois et du matériel polysaccharidique qui entoure *Frankia*.

(3) Nous avons introduit les fusions transcriptionnelles *Cg12*-gène rapporteur dans la plante modèle *Arabidopsis thaliana* afin d'analyser les voies de transduction impliquées dans l'expression de *Cg12*. Cependant aucune expression des gènes rapporteurs n'a pu être détectée au cours du développement et en réponse à des traitements hormonaux. Nous avons également utilisé *Arabidopsis* afin de mieux comprendre le rôle d'*Ara12*, un gène de subtilase proche de *Cg12*, dont nous avons analysé le profil d'expression chez *Arabidopsis*.

(4) Nous avons étudié l'implication de subtilases dans la symbiose fixatrice d'azote entre la légumineuse *Medicago truncatula* et *Sinorhizobium meliloti*. Pour cela nous avons analysé le profil d'expression des gènes rapporteurs placés sous le contrôle du promoteur de *Cg12* dans des plantes transgéniques de *M. truncatula*. La conservation du profil d'expression de *Cg12* chez *M. truncatula* suggère l'existence d'une voie de transduction indépendante de celle qui est activée par les facteurs Nod. Cette voie de transduction est activée dans les deux systèmes symbiotiques en réponse à l'infection par les bactéries. Nous avons ensuite analysé le profil d'expression de plusieurs gènes de subtilases trouvés dans les banques de séquences de *M. truncatula*. Trois de ces gènes spécifiquement exprimés dans les nodules pourraient être des orthologues de *Cg12* chez *M. truncatula*.

---

## Summary

---

Actinorhizal plants are non legumes that are able to form root nitrogen-fixing nodules in association with the soil actinomycete *Frankia*. The aim of this work is to continue the characterization of *Cg12*, a gene coding for a subtilase, isolated from the actinorhizal tree *C. glauca*. Using transgenic Casuarinaceae containing *Cg12* promoter-reporter fusions we have shown that the expression of *Cg12* starts very early during the symbiotic process and is specifically induced in cells infected by *Frankia*. Using antibodies, *CG12* was detected in protein extracts from *C. glauca* and by immunolocalisation, *CG12* was detected in cell walls and in the polysaccharidic material surrounding *Frankia*. *Cg12*-reporter gene fusions were also introduced in the model plants *A. thaliana* and *M. Truncatula*. No expression was detected in *A. thaliana*. In *M. truncatula*, the conservation of the expression profile suggests that a signalling pathway independent from Nod factors, conserved between the two systems, is activated specifically in cells infected by symbiotic bacteria.

## Remerciements

---

Je remercie le Pr. Emile Duhoux, ancien responsable du laboratoire PCMA de m'avoir accueilli dans son laboratoire, pour son aide et ses conseils.

Je remercie le Dr. Didier Bogusz pour avoir accepté d'encadrer cette thèse, pour son aide et son enthousiasme tout au long de ces trois années.

Je remercie le Dr. Laurent Laplaze pour son enthousiasme, pour son aide et ses conseils, et pour son excellent accueil au cours de mon séjour à Cambridge.

Je remercie le Pr. Michel Lebrun, Professeur à l'université Montpellier II, pour avoir accepté de présider ce jury de thèse.

Je remercie le Dr. Katharina Pawlowski, Professeur à l'université de Göttingen pour les discussions scientifiques que nous avons eues et pour avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse.

Je remercie le Dr. Philippe Normand, Directeur de Recherche au CNRS de Lyon pour avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse. Je remercie également le Dr. Jacques Batut, Directeur de Recherche à l'INRA de Toulouse, pour avoir bien voulu faire partie du jury de thèse.

Merci au Dr. Claudine Franche pour son aide dans les expériences de transformation génétique et ses conseils. Je remercie Florence Auguy pour son aide et ses conseils en biologie moléculaire.

Merci au Dr. Ana Ribeiro pour son excellent accueil au cours de mon séjour à Lisbonne, pour sa participation au comité de thèse et pour la participation de son laboratoire dans la transformation génétique de *Medicago*.

Je tiens à remercier le Dr. Michel Nicole pour son aide et ses conseils en dans les expériences d'immunolocalisation et en microscopie électronique. Je remercie également le Dr. Valérie Hocher, Etienne Delannoy, Jean Paul Brizard, Christelle Sire, Alain Mechulam et Pierre Trouslot, pour leur aide et leurs conseils dans les expériences de biochimie.

Je remercie tous les membres de l'équipe Rhizogénèse : Eric Fontanillas, Carole Santi, Mariana Obertello pour leur aide et pour la bonne ambiance dans laquelle se sont déroulées ces années de thèse. Merci aussi aux autres membres de Genetrop pour leur aide leur bonne humeur

Je remercie le Dr. Robin Duponnois, le Dr. Christian Plenchette pour leur aide avec les expériences de mycorrhization ; le Dr. Jean Denarié et Fabienne Maillet pour leur aide et leurs conseils sur les facteurs Nod.

Je remercie le Dr. Pablo Vera, le Dr. Martin Crespi et le Dr. Julie Cullimore pour leur participation aux comités de thèse.

Je remercie le Pr. Jim Haseloff pour son accueil à Cambridge et le Dr. John Reunions pour son aide en microscopie confocale.

Un grand merci à Ana Jurado pour son soutien tout au long de ces trois années. Merci également pour leur soutien à mes parents et amis.

## Abréviations

---

<b>2,4D</b> : acide 2,4 dichlorophenoxyacétique	<b>kDa</b> : kiloDalton
<b>ABA</b> : acide abscissique	<b>LRR</b> : motifs riches en leucine ("Leucine Rich Repeats")
<b>ADN</b> : acide désoxyribonucléique	<b>MA</b> : millions d'années
<b>ADNc</b> : ADN complémentaire	<b>MAS-7</b> : analogue du mastoparan, agoniste des protéines G
<b>ADNt</b> : ADN de transfert d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<b>MeJa</b> : methyl jasmonate
<b>AIA</b> : acide indole acétique	<b>mF</b> : milli Faraday
<b>ANA</b> : acide naphtalène acétique	<b>µCi</b> : micro Curie
<b>AOS</b> : espèces actives d'oxygène ("Active Oxygen Species")	<b>µE</b> : micro Einstein
<b>ARN</b> : acide ribonucléique	<b>min</b> : minutes
<b>ARNm</b> : ARN messenger	<b>MM</b> : masse moléculaire
<b>AS</b> : acide salicylique	<b>MOPS</b> : acide 3-(N-morpholino) propane sulfonique
<b>ATP</b> : adénosine triphosphate	<b>MPB</b> : membrane peribacteroïdienne
<b>BA</b> : benzylaminopurine	<b>NPA</b> : acide N-1 naphtylphtalamique
<b>CAIA</b> : mélange chloroforme-isoamyl alcool (24:1)	<b>PAGE</b> : électrophorèse sur gel de polyacrylamide
<b>dNTP</b> : désoxyribonucléotide triphosphate	<b>PCR</b> : réaction de polymérisation en chaîne
<b>DTT</b> : dithiothréitol	<b>PM</b> : masse molaire
<b>EDTA</b> : éthylènediamine tétracétate	<b>PR</b> : primordium racinaire
<b>EGTA</b> : acide éthylèneglycol-bis(2-aminoéthyléther)-N,N'-tétraacétique	<b>RLK</b> : récepteur de type kinase ("Receptor-Like Kinase")
<b>EPB</b> : espace peribacteroïdien	<b>RT-PCR</b> : transcription reverse suivie d'une PCR
<b>EPS</b> : exopolysaccharides	<b>SDS</b> : dodécyl sulfate de sodium
<b>EYFP</b> : variante jaune de la GFP	<b>SSC</b> : sodium, citrate de sodium
<b>FITC</b> : fluoro thioisocyanate	<b>TBE</b> : tris-borate EDTA
<b>g</b> : unité de gravitation	<b>TE</b> : tris-EDTA
<b>GA</b> : acide gibberellique	<b>Tris</b> : tris hydroxyméthyl aminométhane
<b>GFP</b> : protéine verte fluorescente d' <i>Aequoria victoriae</i> ("Green Fluorescent Protein")	<b>UV</b> : ultraviolet
<b>GUS</b> : β-glucuronidase d' <i>Escherichia coli</i> codée par le gène <i>uidA</i>	<b>Xgal</b> : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-galactopyranoside
<b>IgG</b> : immunoglobuline G	<b>X-glu</b> : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-glucuronide
<b>IPTG</b> : isopropyl β-D-thiogalactoside	
<b>kb</b> : kilobase, et par extension, kilopaire de base	

## Introduction

---

L'azote est un élément présent en grande quantité chez les êtres vivants. Dans les sols, les quantités d'azote assimilable par les plantes sont faibles, ce qui constitue souvent un des principaux facteurs limitants de la croissance des végétaux. L'azote est cependant très abondant dans l'atmosphère qui contient 78% de diazote, mais les seuls organismes capables de l'utiliser sont les bactéries diazotrophes qui possèdent le complexe enzymatique nitrogénase. Pour certains groupes de végétaux, l'association avec ce type de bactérie leur permet d'améliorer leur nutrition azotée. Quand l'association est très étroite, on parle de symbiose. Deux groupes de végétaux forment des symbioses nodulaires avec des bactéries diazotrophes : les Légumineuses qui s'associent aux rhizobia et les plantes actinorhiziennes, dont les partenaires symbiotiques sont des bactéries du genre *Frankia*. Dans les deux cas, la symbiose avec les bactéries aboutit à la formation d'un organe nouveau au niveau des racines, le nodule fixateur d'azote. Dans les nodules, les bactéries protégées et nourries par la plante lui fournissent en échange de l'azote fixé.

Les symbioses entre les rhizobia et les Légumineuses sont les mieux étudiées. Les mécanismes par lesquels les deux partenaires se reconnaissent commencent à être bien compris, en particulier grâce à la découverte des facteurs Nod, molécules synthétisées par les rhizobia qui permettent leur reconnaissance par la plante. De nombreux gènes exprimés de manière préférentielle ou spécifique dans les nodules ont été caractérisés chez les Légumineuses. Les produits de ces gènes sont appelés nodulines. La caractérisation des gènes de nodulines associée à l'étude de la physiologie des nodules a permis de mieux comprendre le fonctionnement de cet organe symbiotique. Certains de ces gènes de nodulines sont exprimés très tôt au cours de l'interaction. L'étude de ces nodulines précoces a permis de mieux comprendre comment la symbiose se met en place.

En ce qui concerne les symbioses actinorhiziennes, les connaissances sont beaucoup moins nombreuses. En 1994, le premier gène de noduline actinorhizienne a été identifié (Goetting-Minsky et Mullin, 1994). Depuis lors, quelques dizaines de gènes de nodulines ont été caractérisés, la plupart d'entre eux interviennent dans le métabolisme azoté ou carboné qui sont très actifs dans les nodules (Laplaze et coll., sous presse). Les étapes précoces de la symbiose actinorhizienne sont très peu connues. On ignore la nature des signaux qui permettent la reconnaissance de *Frankia* par la plante et les connaissances relatives aux gènes de la plante qui interviennent lors de la mise en place de la symbiose sont très limitées.

En 1995, Ribeiro et coll. ont isolé un gène d'aulne, *Ag12* qui code une protéase à sérine de la famille des subtilisines. *Ag12* s'exprime dans des cellules du nodule qui viennent d'être envahies par *Frankia*, et son expression décroît quand les cellules se différencient et commencent à fixer l'azote. *Ag12* est donc le premier gène de noduline actinorhizienne qui pourrait

être impliqué dans les étapes précoces de l'interaction. En 2000, un homologue de ce gène a été isolé chez une autre plante actinorhizienne, *Casuarina glauca*, l'espèce sur laquelle travaille notre laboratoire (Laplaze et coll., 2000a). Ce gène appelé *Cg12* a le même profil d'expression qu'*Ag12*. Le rôle de ces protéases dans la symbiose est inconnu, mais par comparaison avec celui d'autres protéases de la même famille, un rôle dans la maturation de protéines ou de peptides associés au processus symbiotique a été proposé.

L'objectif de ce travail est la poursuite de la caractérisation de *Cg12*. Dans cet objectif, nous avons choisi trois approches : (1) Obtenir des Casuarinacées transgéniques contenant des fusions promoteur *Cg12*-gène rapporteurs afin d'analyser le profil d'expression de ces gènes, en particulier lors des stades précoces de l'interaction symbiotique et en réponse à des traitements hormonaux, (2) Localiser la protéine CG12 dans des extraits protéiques et au niveau cellulaire en utilisant des anticorps spécifiques, (3) Utiliser les plantes modèles *Arabidopsis thaliana* et *Medicago truncatula* afin d'analyser les voies de transduction qui interviennent dans l'expression de *Cg12* et effectuer une comparaison entre les deux symbioses fixatrices d'azote.

## Étude bibliographique

---

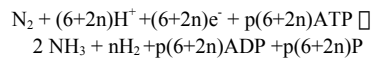
Après l'eau, l'azote est le principal nutriment qui limite la croissance végétale, ce qui est en apparence contradiction avec les très larges quantités d'azote existant sur terre, dans les roches, les sédiments et dans l'atmosphère. En fait la plupart de cet azote est difficilement accessible pour les plantes car elles ne peuvent absorber cet élément que sous forme de nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) ou d'ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ). Or les sols contiennent des quantités relativement limitées d'azote assimilable ( $1,1-1,4 \cdot 10^{16}$  g d'azote) par rapport aux besoins des végétaux dont la biomasse représente  $1,6 \cdot 10^{16}$  g d'azote. De plus, la nitrification et la dénitrification réalisée par des bactéries du sol consomment continuellement une partie de cet azote disponible et le transforment en diazote gazeux. Des apports continus en azote sous forme fixée (nitrate et ammonium) sont donc nécessaires pour compenser la dénitrification et alimenter les besoins des végétaux (Arp, 2000).

La fixation biologique de l'azote atmosphérique constitue le principal mécanisme d'incorporation d'azote fixé dans la biosphère, elle incorpore tous les ans  $1-2 \cdot 10^{14}$  g d'azote. À titre de comparaison, la moitié de cette quantité est fixée industriellement (Arp, 2000).

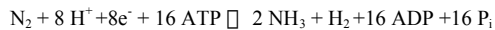
### La fixation biologique de l'azote

La fixation biologique de l'azote atmosphérique est catalysée par un complexe enzymatique appelé complexe nitrogénase. Cette enzyme a été mise en évidence uniquement chez des procaryotes (Eubactéries et Archaea). La réaction catalysée est la

suivante



Le complexe nitrogénase peut également réduire les protons en dihydrogène. La quantité d'ATP nécessaire étant variable suivant les conditions, la stoechiométrie exacte de la réaction reste encore aujourd'hui inconnue. Dans le modèle standard, on considère cependant qu'une mole de dihydrogène est nécessaire pour réduire une mole de diazote et que ceci nécessite l'hydrolyse de 2 moles d'ATP ( $p=2$  et  $n=1$ ), ce qui donne



Le complexe nitrogénase le plus étudié comprend deux composantes metalloprotéiques : une ferroprotéine (protéine Fe) et une ferromolybdoprotéine (protéine FeMo). Les gènes qui codent ces deux protéines et les autres protéines nécessaires à la réaction ou à sa régulation sont groupés dans un même opéron appelé *nif* (pour Nitrogen Fixation). La protéine FeMo est un tétramère de 230 kDa codé par les gènes *nifD* et *nifK*; elle contient le site réducteur du substrat. La protéine Fe est un homodimère de 64 kDa codé par le gène *nifH*, c'est le composant donneur d'électrons, il contient le site de liaison de l'ATP (Rees et Howard, 2000 ; Halbleib et Ludden, 2000).

Le mécanisme réactionnel, basé sur des études réalisées sur *Clostridium*, *Klebsiella* et *Azotobacter* fait intervenir des transferts d'électrons entre la protéine Fe et la protéine FeMo. Le cycle commence avec la liaison d'une molécule d'ATP à la protéine Fe réduite, ce qui provoque un changement conformationnel et permet le transfert d'un électron de la protéine Fe à la protéine FeMo. L'hydrolyse d'un ATP est couplée à ce transfert. Le complexe se dissocie ensuite, la protéine Fe est alors réduite par un donneur d'électrons (ferrédoxine ou flavodoxine) et l'ADP est échangé contre un l'ATP. Le cycle est répété jusqu'à ce que suffisamment d'électrons soient transmis à la protéine FeMo ce qui lui permet, par l'intermédiaire du molybdène de les transférer au diazote ce qui produit de l'ammoniac (Halbleib et Ludden, 2000).

Le complexe nitrogénase est sensible au dioxygène qui l'inactive de manière irréversible. Des mécanismes biologiques existent pour protéger l'enzyme de l'oxygène. La fixation de l'azote est un processus très coûteux en énergie ce qui impose une régulation. La transcription des gènes *nif* est réprimée par l'ammonium, et aussi par le dioxygène, qui rend la fixation impossible en inactivant la nitrogénase. Certains diazotrophes régulent également la fixation au niveau post-traductionnel en inactivant le complexe enzymatique dès que des quantités suffisantes d'ammonium sont présentes ou quand la quantité d'ATP disponible devient insuffisante (Halbleib et Ludden, 2000).

## La symbiose rhizobia - Légumineuses

### ***Le partenaire bactérien: les rhizobia***

Les partenaires bactériens de cette symbiose

connus sous le nom de rhizobia. Les rhizobia forment un groupe paraphylétique où l'on trouve aussi bien des  $\alpha$ -Proteobactéries appartenant aux genres *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Allorhizobium*, *Sinorhizobium* et *Rhizobium* (= *ex-Rhizobium*) (Wang et Martinez-Romero, 2000) et des  $\beta$ -Protéobactéries découvertes récemment appartenant aux entre autres aux genres *Burkholderia* (Moulin et coll., 2001), *Ralstonia* (Chen et coll., 2001) et *Methylotheobacter* (Sy et coll., 2001). Les *ex-Rhizobium* sont regroupés dans la famille des *Rhizobiaceae*, mais des analyses phylogénétiques récentes basées sur l'ARN 16S révèlent que cette famille a des origines multiples et constitue aussi un groupe paraphylétique. Les genres *Azorhizobium* et *Bradyrhizobium* par exemple sont assez éloignés des autres et devraient être placés dans une autre famille (Wang et Martinez-Romero, 2000). Les genres *Allorhizobium* et *Sinorhizobium* sont très proches du genre *Agrobacterium* qui a été classé en dehors des *Rhizobiaceae* en raison de ses caractéristiques pathogènes. Or les gènes qui confèrent aux rhizobia leur capacité symbiotique et ceux qui confèrent à *Agrobacterium* son pouvoir pathogène se situent majoritairement sur des plasmides. Comme les plasmides peuvent être transmis horizontalement entre bactéries de différentes espèces, la prise en compte des caractères codés par les plasmides n'est pas le meilleur moyen pour établir des divisions phylogénétiques. La classification des rhizobia est en constante modification et une nouvelle classification devrait bientôt être adoptée (Wang et Martinez-Romero, 2000).

### ***Le partenaire végétal***

Les plantes qui établissent des symbioses fixatrices d'azote avec les rhizobia appartiennent toutes à la superfamille des Fabacées (= Légumineuses) à l'exception de *Parasponia tomentosa* qui appartient à celle des Ulmacées. La superfamille des Fabacées contient environ 20 000 espèces, elle regroupe 3 sous familles: les Cæsalpiniées, les Mimosacées et les Papilionacées. Les espèces appartenant aux deux premières sous-familles sont surtout des arbres et des arbustes alors que la plupart des espèces de Papilionacées sont herbacées. C'est chez les Papilionacées que l'on trouve des plantes fourragères et productrices de graines d'une grande importance économique (Terefevork et coll., 2000).

Toutes les Légumineuses ne sont pas capables d'établir une symbiose avec des rhizobia et cette caractéristique est inégalement répartie à travers les trois sous familles : 5-10% des genres de Cæsalpiniées, 50% des Mimosacées et presque 90% des genres de Papilionacées contiennent des espèces qui peuvent former des associations symbiotiques avec des rhizobia. (Doyle et Luckow, 2003).

### ***Origine de l'association symbiotique***

En ce qui concerne l'origine évolutive de l'association symbiotique entre les rhizobia et les Légumineuses, deux théories ont été proposées, (1) l'association symbiotique aurait évolué à partir de bactéries diazotrophes du sol qui se seraient associées aux plantes en exploitant partiellement le programme

de la mycorrhization. L'existence de certains mutants incapables d'entrer en symbiose avec des rhizobia et avec des champignons endomycorhiziens corrobore cette idée (Hirsch et coll., 2001). (2) Les ancêtres des bactéries symbiotiques auraient été des bactéries phytopathogènes. Cette hypothèse est avancée en raison d'une part de la proximité phylogénétique entre rhizobia et les *Agrobacterium*, et d'autre part de l'existence d'homologies locales entre les plasmides Vir et Sym et la présence de composants provoquant une réaction hypersensible (HR) chez les rhizobia (Terefework et coll., 2000).

La divergence entre les différents genres de rhizobia est estimée à 200-300 MA, c'est-à-dire bien avant la divergence entre les monocotylédones et les dicotylédones ou l'apparition des Légumineuses. Récemment, la capacité d'une souche de *Burkholderia* à former des nodules fixateurs d'azote en symbiose avec des Légumineuses a été décrite (Moulin et coll., 2001). Ce genre de bactérie est très éloigné des rhizobia, cependant ses gènes de nodulation sont proches de ceux des rhizobia. Ces deux observations suggèrent que la capacité des rhizobia à noduler les légumineuses a été acquise après la divergence des différents genres et a été transmise horizontalement (Hirsch et coll., 2001).

### ***La symbiose***

#### **Établissement de la symbiose**

##### ***Infection intracellulaire***

Le mode d'infection le plus étudié et le plus courant est l'infection intracellulaire où l'entrée des bactéries dans la plante a lieu à travers des poils absorbants. Dans ce cas, l'interaction se manifeste très rapidement en conditions limitantes en azote : de quelques minutes à quelques heures après la mise en contact des deux partenaires des déformations ont lieu au niveau des poils absorbants. Les bactéries s'attachent au niveau des ces poils absorbants déformés et digèrent partiellement la paroi, le plasmalemmes s'invagine et du nouveau matériel pariétal est déposé conduisant à la formation d'une structure tubulaire appelée cordon d'infection qui contient les bactéries et progresse de cellule en cellule en direction du cortex (Pawlowski et Bisseling, 1996). L'infection d'une cellule par les cordons d'infection est précédée d'un réarrangement du cytosquelette, d'un déplacement du noyau vers le centre de la cellule et de la formation d'une structure similaire à un phragmoplaste (van Brussel et coll., 1992). Par la suite, dans les cellules qui seront envahies par les cordons d'infection, la division cellulaire est réactivée mais s'arrête au stade G2 (Yang et coll., 1994). Dans ces cellules a lieu la formation de ponts cytoplasmiques qui constituent des cordons de pré-infection par où passeront les cordons d'infection.

La pénétration des bactéries s'accompagne des divisions cellulaires au niveau du cortex, en face d'un pôle de protoxylème. Ces divisions conduisent à la formation d'un méristème à l'origine d'un primordium

nodulaire qui devient ensuite le lobe nodulaire. Les cellules du lobe nodulaire sont alors envahies par les cordons d'infection. Un processus analogue à une endocytose déverse les bactéries dans le cytosol ; les bactéries sont entourées par un espace peribactéroïdien (EPB) et une membrane peribactéroïdienne (MPB) qui les sépare du cytosol. Elles se différencient alors en leur forme endosymbiotique : les bactéroïdes capables d'initier la fixation d'azote. L'ensemble EPB+MPB+bactéroïde constitue le symbiosome. Chez certaines espèces de Légumineuses et chez *Parasponia*, les rhizobia restent localisés dans les cordons d'infection (Pawlowski et Bisseling, 1996).

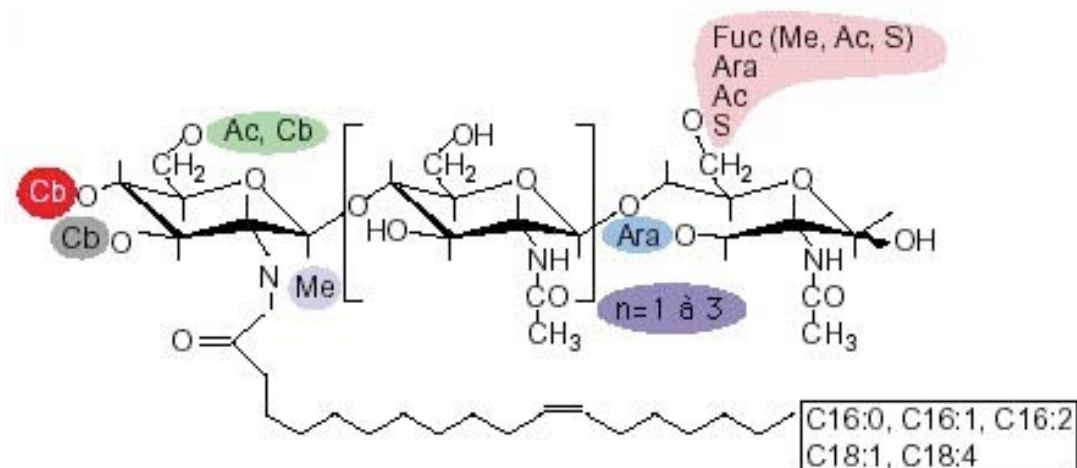
##### ***Infection intercellulaire ou entrée par fissure (= "crack entry")***

Chez les espèces comme *Sesbania rostrata* qui forment des nodules au niveau des tiges, la pénétration des bactéries se fait par des fissures ; l'infection a lieu au niveau de l'émergence des racines latérales et des racines adventives. Chez certaines Légumineuses, l'entrée se fait à travers la lamelle moyenne entre deux cellules du rhizoderme. Les rhizobia progressent ensuite vers le primordium nodulaire de manière intercellulaire ou deviennent intracellulaires en formant des cordons d'infection (Pawlowski et Bisseling, 1996).

#### **Mécanismes de reconnaissance et nodulines précoces**

L'interaction entre le partenaire végétal et les rhizobia débute par un échange de signaux moléculaires. Dans des conditions limitantes en azote, les exsudats racinaires de la plante contiennent plusieurs substances, principalement des flavonoïdes qui sont capables d'activer la transcription des gènes *Nod* chez les rhizobia. Le produit du gène *NodD*, synthétisé de façon constitutive est impliqué dans la reconnaissance de ce signal et dans l'activation de la transcription des autres gènes *Nod*. La transcription des autres gènes *Nod* a pour effet la synthèse des facteurs Nod qui sont les molécules bactériennes reconnues à leur tour par la plante (Miklashevichs et coll., 2001). Les facteurs Nod sont des lipo-chito-oligosaccharides qui comprennent généralement un squelette de 3 à 5 N-acetylglucosamines liées en  $\beta(1-4)$  avec une acétylation sur le sucre non réducteur terminal sur lequel est branché un acide gras insaturé de 16 ou 18 atomes de carbone (Figure 1) (Cullimore et coll., 2001). Selon les espèces de rhizobia, l'acide gras est plus ou moins long, et les sucres comportent différentes décorations. Le (s) type (s) de facteur (s) Nod produit (s) ainsi que leur quantité permettent une reconnaissance spécifique de chaque rhizobia par son partenaire végétal. Leur structure amphiphile leur permet une intégration rapide dans les membranes. Cependant, ils seraient incapables de traverser la membrane végétale, un récepteur membranaire serait donc nécessaire pour permettre leur détection par la plante (Cullimore et coll., 2001).





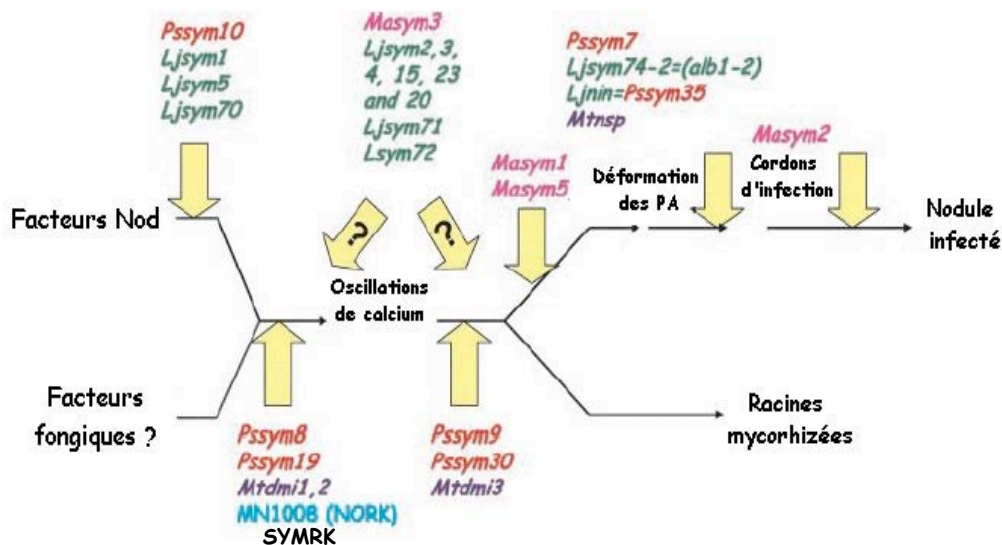
**Figure 1** : Structure chimique d'un facteur Nod générique avec quelques une des substitutions que l'on trouve chez plusieurs espèces de rhizobia. Ac : acetyl, Ara, arabinosyl; Cb, carbonyl; Fuc, fucosyl; Me, methyl; S, sulfuryl (D'après Cullimore et coll., 2001).

L'application exogène de facteurs Nod purifiés provoque certaines des réactions qui sont observées en réponse à l'inoculation par des rhizobia (Tableau 1 ; Cullimore et coll., 2001): (1) elle élicite la déformation des poils absorbants, (2) provoque une forte dépolarisation membranaire, accompagnée d'une alcalinisation du cytoplasme et d'une augmentation de la concentration en  $Ca^{2+}$  intracellulaire, sous forme d'oscillations de calcium (Walker et coll., 2000 ; Wais et coll., 2000). (3) Stimule des divisions cellulaires, (4) induit l'expression de gènes *Enod* (Early Nodulin) spécifiquement exprimés dans les nodules et peut même produire dans certains cas (5) la formation de nodules (Miklashevichs et coll., 2001 ; Cullimore, 2001). La plupart de ces réponses ont lieu pour de très faibles concentrations de facteurs Nod (1pM-1nM) et dans la zone de la racine susceptible de former des nodules (Cullimore et coll., 2001). Ces réponses ne

requièrent pas toutes d'un même niveau de spécificité par rapport aux décorations des facteurs Nod. L'existence d'au moins deux récepteurs a donc été proposée : un récepteur peu spécifique pourrait activer la déformation des poils absorbants et la formation du cordon d'infection, tandis qu'un autre récepteur plus spécifique induirait l'expression des gènes *Enod* uniquement en réponse au facteur Nod correspondant au rhizobia compatibles (Miklashevichs et coll., 2001). Outre le calcium, des protéines G pourraient également intervenir dans la transduction du signal produit par les facteurs Nod : une application de mastoparan -un agoniste des protéines G- induit l'expression d'*Enod12* alors que l'application d'un antagoniste des protéines G supprime l'induction de ce même gène par des facteurs Nod (Pingret et coll., 1998).

**Tableau 1** : Réponses des Légumineuses aux facteurs Nod (D'après Cullimore et coll., 2001)

Tissu	Réponse	Délai	Concentration des facteurs Nod	Espèces testées
Epiderme	Flux ioniques	Secondes	nM	<i>Medicago</i>
	Dépolarisation membranaire	Secondes	nM	<i>Medicago</i>
	Augmentation du pH intracellulaire	Secondes	nM	<i>Medicago</i>
	Accumulation de $Ca^{2+}$ à l'extrémité des poils absorbants	Secondes	nM	<i>Medicago</i> , <i>Vigna</i>
	Oscillations de $Ca^{2+}$	10 minutes	nM	<i>Medicago</i> , <i>Pisum</i>
	Expression de gènes de nodulines ( <i>Enod12</i> , <i>Rip</i> )	Minutes-heures	fM-pM	<i>Medicago</i>
	Déformation des poils absorbants	Minutes-heures	nM-µM	Plusieurs
Cortex	Modifications du cytosquelette	Minutes-heures	fM-pM	<i>Phaseolus</i> , <i>Vicia</i>
	Expression de gènes de nodulines ( <i>Enod20</i> )	Heures-jours	pM	<i>Medicago</i>
	Formation de cordons de préinfection	Jours	nM-µM	<i>Vicia</i>
Vasculature	Divisions cellulaires provoquant la formation du primordium nodulaire	Jours	nM-µM	Plusieurs
	Inhibition du transport polaire de l'auxine	Minutes	nM-µM	<i>Trifolium</i>
	Expression de gènes ( <i>Enod40</i> )	24 heures-jours	nM-µM	<i>Glycine</i> , <i>Vicia</i> , <i>Medicago</i>



**Figure 2 :** Voie de signalisation des facteurs Nod. Les mutants de Légumineuses affectés aux différentes étapes de cette voie de signalisation sont indiqués (D'après Hirsch et coll., 2001 ; Stracke et coll., 2002).

Des mutants affectés à différentes étapes du processus ont été caractérisés chez plusieurs espèces de Légumineuses. Selon le mutant, le processus de nodulation est arrêté plus ou moins tôt, ce qui permet de préciser la place que les produits des gènes affectés par ces mutations occupent dans le processus symbiotique (Hirsch et coll., 2001 ; Figure 2). Certains de ces mutants sont également incapables d'établir des symbioses endomycorhiziennes, ce qui suggère l'existence d'une voie de signalisation commune entre les deux symbioses (Hirsch et coll., 2001). Récemment le clonage positionnel de l'un de ces gènes a été réalisé. Ce gène (*Nork* ou *Symrk*) code un récepteur intramembranaire possédant un domaine kinase intracellulaire et un domaine extracellulaire contenant des motifs riches en leucine (LRR) (Endre et coll., 2002 ; Stracke et coll., 2002). La structure de ce récepteur suggère son intervention dans la perception d'un signal extracellulaire et sa transduction à l'intérieur des cellules (Kistner et Pamiške, 2002). Il existe également de nombreux mutants de rhizobia qui sont affectés à différentes étapes du processus symbiotique. Parmi ces mutants figurent les mutants *exo* qui sont affectés dans la synthèse d'exopolysaccharides, ceux-ci permettraient d'inhiber ou de retarder les réponses défensives de la plante en réaction à colonisation bactérienne (Gage et Margollin, 2000). Un rôle des lectines végétales dans la reconnaissance des polysaccharides rhizobiens a été proposé (Hirsch, 1999).

Pendant les phases précoces du processus symbiotique, l'expression de gènes codant des nodulines précoces (*Enod*) est induite. Parmi les nodulines précoces les plus étudiées figurent *Enod12* et *Enod40*. *Enod12* code une protéine riche en hydroxyproline qui interviendrait dans la formation

des parois nouvellement formées en réponse à l'infection de rhizobia (Scheres et coll., 1990). Son expression correspond aux cellules nouvellement infectées par rhizobia et aux cellules non-infectées en face des cordons d'infection. *Enod40* est fortement exprimé dans le péricycle, avant la formation des nodules et est impliqué dans l'organogenèse du nodule (Compaan et coll., 2001).

D'autres molécules produites par les rhizobia pourraient jouer un rôle dans la reconnaissance des bactéries par la plante ou dans l'infection des cellules végétales, parmi ces molécules figurent les lipopolysaccharides, les antigènes K et les glucanes cycliques (Spaink, 2000).

### Structure et développement du nodule

Les nodules des fabacées présentent une structure similaire à celle d'une tige avec des tissus vasculaires périphériques qui se raccordent à ceux de la racine et une zone centrale infectée par les rhizobia.

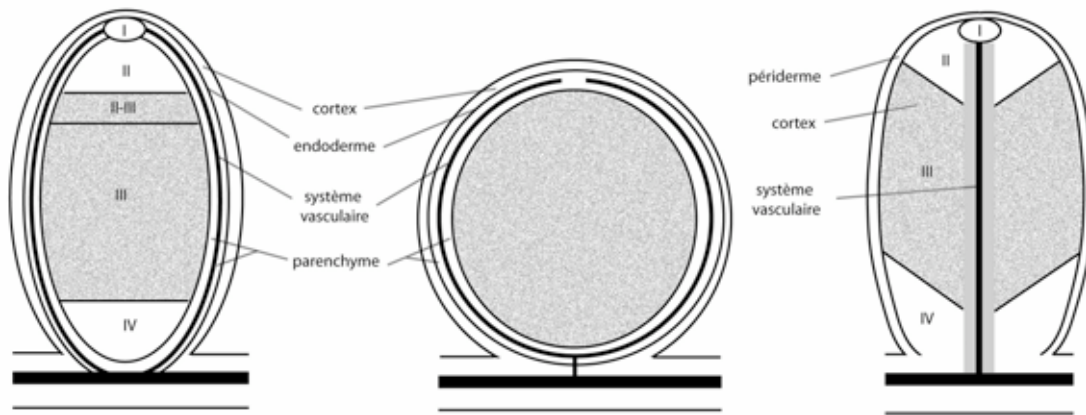
De la périphérie vers l'intérieur du nodule, on trouve (Figure 3) :

- Le cortex externe constitué en majorité par des cellules parenchymateuses.
- Le cortex moyen
- Les tissus vasculaires constitués surtout de phloème et entourés par un endoderme et un péricycle.
- Le cortex interne formé de une à trois couches de cellules
- Le parenchyme central qui contient les cellules infectées par les rhizobia et des cellules non infectées plus petites.

Les nodules sont positionnés sur la racine face aux pôles de xylème. Selon le modèle proposé par Vijn et

coll. (1993), les pôles du xylème stimulent les divisions cellulaires par le biais de l'uridine alors que les pôles du phloème les inhibent en synthétisant de

l'éthylène (Heidstra et coll., 1997). Ceci donne lieu à l'apparition des primordia nodulaires face aux pôles de xylème.



**Figure 3** : Structure des nodules de légumineuses et des plantes actinorhiziennes. **A** : Nodule de Légumineuse de type indéterminé. **B** : Nodule de Légumineuse de type déterminé. **C** : Lobe nodulaire actinorhizien. I : zone méristématique ; II : zone d'infection ; II-III : interzone II-III ; IV : zone de sénescence. (d'après Pawlowski et Bisseling, 1996).

Le nombre et la masse des nodules sont contrôlés par la plante. Deux types de nodule peuvent être distingués : les nodules à croissance indéfinie, retrouvés parmi les espèces des climats tempérés et les nodules à croissance déterminés caractéristique des espèces tropicales (Figure 3). Chez les espèces à nodules déterminés, les divisions cellulaires à l'origine du primordium nodulaire ont lieu au niveau du cortex externe. La persistance du méristème chez ces espèces est très éphémère et la croissance en longueur du nodule est limitée. Une croissance en épaisseur a lieu par hypertrophie des cellules corticales et par des divisions de cellules qui contiennent déjà des rhizobia. Ce processus se traduit par une forme sphérique et un état de différenciation identique pour toutes les cellules (Figure 3).

Chez les espèces à nodules indéterminés, les divisions cellulaires ont lieu au niveau du cortex interne, la zone méristématique qui produit le nodule est persistante. De ce fait, ces nodules ont une croissance indéfinie, ce qui se traduit par une forme allongée. L'infection par les cordons d'infection a lieu à partir de la base du nodule, ce qui établit un gradient de différenciation et plusieurs zones ont pu être définies (Vasse et coll., 1990 ; Figure 3):

La zone I ou zone méristématique correspond à l'apex du nodule et contient des cellules dépourvues de bactéries.

- La zone II ou zone de préfixation contient les cellules corticales nouvellement produites par le méristème qui sont envahies par des cordons d'infection rhizobiens. Les bactéries sont déversées dans les cellules, entourées par le MPB et leur différenciation en bactéroïde commence. À ce stade, elles ne fixent pas encore l'azote.
- Dans l'interzone II-III, la différenciation des bactéroïdes se poursuit et la fixation de l'azote

commence. Cette zone se caractérise par la présence de nombreux amyloplast.

- La zone III ou zone de fixation est celle où les bactéroïdes pleinement différenciés fixent activement l'azote.
- Dans des nodules âgés, la zone IV correspond à une zone de sénescence.

Chez les espèces à nodules déterminés, le même gradient de différenciation peut être observé dans le temps, au cours du développement du nodule (Pawlowski et Bisseling, 1996).

Certaines phytohormones joueraient un rôle important dans le processus d'organogenèse du nodule. L'application exogène de cytokinines ou d'inhibiteurs de transport d'auxine peut conduire à l'apparition de "pseudonodules", structures ressemblant à des nodules mais ne contenant pas de bactéries. Certains des gènes induits par les facteurs Nod sont également induits en réponse à des traitements par des auxines ou des cytokinines, ce qui suggère que certaines des réponses aux facteurs Nod pourraient faire intervenir des modifications de la balance auxine/cytokinine (Miklashevichs et coll., 2001).

#### **Fonctionnement des nodules**

Les nodules sont des organes hautement spécialisés où d'importants échanges ont lieu entre la plante et les bactéries. Ces échanges concernent surtout le métabolisme carboné et le métabolisme azoté.

L'azote est fixé grâce à la nitrogénase contenue dans les bactéroïdes et serait exporté vers le cytosol végétal sous forme d'ammonium. Une activité glutamine synthétase cytoplasmique et une glutamate synthase (GOGAT) plastidique très importantes dans les nodules pourraient incorporer rapidement l'ammonium dans des acides aminés (glutamine et glutamate respectivement). Chez certaines espèces, la

glutamine est exportée directement vers le reste de la plante (Pawlowski, 1997 ; Kahn et coll., 1998). Des études récentes ont cependant montré que c'est plutôt un échange d'acides aminés entre le bactéroïde et le cytoplasme (Glu/Gln ; Asp/Asn) qui permet d'exporter l'azote vers la cellule végétale et le xylème (Lodwig et coll., 2003).

L'exportation de l'azote se fait surtout sous forme d'amides (asparagine surtout, accessoirement glutamine) pour les nodules de Légumineuses tempérées. La synthèse d'asparagine consomme de l'aspartate (ou ses précurseurs, malate et oxaloacétate) qui seraient synthétisés par une PEP carboxylase et une malate déshydrogénase à partir du CO<sub>2</sub>. 9-30% du CO<sub>2</sub> provenant de la respiration serait recyclé par ce mécanisme (Kahn et coll., 1998).

Chez les Légumineuses tropicales, les formes prépondérantes de transport de l'azote sont les uréides (allantoïne et acide allantoïque) dont la production implique la synthèse *de novo* de purine (Kahn et coll., 1998). L'exportation de l'azote vers le reste de la plante se fait via le xylème

L'énergie nécessaire à la fixation de l'azote par les bactéroïdes est fournie par la plante sous forme de carbone réduit. La plante fournit du saccharose à travers le phloème. Des fortes activités sucrose synthase et invertase sont présentes dans le cytosol des cellules infectées, permettant l'hydrolyse du saccharose en glucose. Le glucose est ensuite métabolisé en phosphoénol pyruvate, en oxaloacétate, en malate et en succinate. Ces deux derniers composants sont la principale source carbonée des bactéroïdes (Kahn et coll., 1998).

Le fonctionnement de la nitrogénase exige une faible concentration en O<sub>2</sub>. Or l'ensemble des phénomènes décrits précédemment nécessite de grandes quantités d'O<sub>2</sub> pour alimenter les chaînes respiratoires qui fournissent l'ATP. Au niveau du parenchyme nodulaire plusieurs couches de cellules limitent la diffusion de l'oxygène vers l'intérieur du nodule. La forte respiration des bactéroïdes consomme également une grande quantité d'oxygène empêchant des pressions partielles d'O<sub>2</sub> (ppO<sub>2</sub>) trop importantes. La présence dans les nodules de grandes quantités d'hémoglobine (=leghémoglobine) permettrait d'assurer un transport efficace de l'oxygène jusqu'aux chaînes respiratoires mitochondriales tout en maintenant une ppO<sub>2</sub> faible compatible avec l'activité nitrogénase (Appleby, 1988).

Ces dernières années, le développement de programmes de séquençage d'EST a permis d'étudier les modifications du transcriptome pendant le processus symbiotique. Le développement des nodules induit la transcription de certains groupes de gènes, en particulier ceux qui interviennent dans la synthèse de protéines et des composants pariétaux, dans le métabolisme carboné et azoté, dans le métabolisme secondaire et dans les réactions de défense (Journet et coll., 2003). Au niveau protéique, une analyse récente du protéome des membranes peribactéroïdiennes a permis de mettre en évidence la présence de nombreux transporteurs, de protéines associées aux réactions de défense et de protéines de signalisation comme des

kinases de type récepteur ou les calmodulines (Wienkoop et Saalbach, 2003). Le développement de ces nouvelles techniques d'analyse globale de l'expression du génome permettra dans les années qui viennent d'obtenir de grande quantité d'informations sur le processus symbiotique.

## Les symbioses actinorhiziennes

On appelle symbioses actinorhiziennes les associations formées entre environ 260 espèces d'angiospermes et des bactéries fixatrices d'azote du genre *Frankia* qui aboutissent à la formation de nodules au niveau du système racinaire de la plante (Dommergues et coll., 1998).

### *Frankia*

#### Isolement et culture

Même si les microorganismes responsables de la formation de nodules chez les plantes actinorhiziennes avaient été classés parmi les actinomycètes dès 1933, leur isolement fut impossible jusqu'en 1959, quand Pommer reporta l'isolement en culture pure d'une souche isolée à partir de l'aulne (Wall, 2000). L'isolat de *Frankia* fut perdu par la suite et ce n'est qu'en 1978, à la suite du travail de Callaham et coll. qu'une souche isolée de *Comptonia peregrina* a été isolée. Cette difficulté est due principalement à la lenteur de croissance de *Frankia* et aux problèmes rencontrés pour éliminer les contaminations. Aujourd'hui quelques centaines de souches provenant de nombreuses espèces ont été isolées. Cependant, l'isolement n'a pas été tenté pour toutes les espèces de plantes actinorhiziennes et pour certaines espèces comme *Datisca glomerata*, l'isolement s'est révélé infructueux malgré les nombreux essais, ce qui suppose l'existence de facteurs nécessaires à la croissance de ces souches de *Frankia* en culture qui n'ont pas encore été découverts (Wall, 2000 ; Dommergues et coll., 1998).

Le plus souvent *Frankia* est cultivé en milieu liquide avec du propionate comme source de carbone. Dans les conditions optimales, son temps de génération est de 15 heures (3 heures pour rhizobia). Pour certaines souches, l'addition de lipides extraits de plantes de certains acides gras ou l'oxygénation du milieu à l'aide d'un agitateur favorisent la croissance (Wall, 2000). Certaines souches de *Frankia* peuvent aussi être cultivées sur boîte. Des colonies à partir d'une seule spore ont été obtenues récemment, ouvrant la voie à l'obtention de mutants (Lumini et Bosco, 1996).

#### Classification

En raison de caractères morphologiques biochimiques, de la teneur élevée de son ADN en (G+C) et de la séquence de son ARN 16S, *Frankia* a été classé dans le groupe des actinomycètes. Le genre *Frankia* se distingue d'autres genres d'actinomycètes par des caractères morphologiques et biochimiques et par la capacité des *Frankia* de fixer l'azote atmosphérique en s'associant dans certains cas avec des partenaires végétaux (Mullin et Dobritsa, 1996). Une classification en espèces n'est pas encore disponible en raison du faible nombre de caractères

phénotypiques permettant de différencier les souches entre elles. Des analyses par hybridation ADN-ADN ont permis de définir des espèces génomiques. Des analyses par PCR basées sur la séquence de l'ARN 16S ont permis d'inclure des souches de *Frankia* non encore isolées et de réaliser des arbres phylogénétiques incluant des *Frankia* de tous les groupes de plantes actinorhiziennes (Mullin et Dobritsa, 1996 ; Wall, 2000 ; Figure 4). Cet arbre fait

apparaître 4 groupes, les groupes I et II contiennent des *Frankia* qui ont pu être isolés, le groupe III des *Frankia* non encore isolés et le groupe IV des actinomycètes proches de *Frankia* mais ne nodulant aucune plante. Des correspondances existent entre la phylogénie des *Frankia* et celle des plantes hôtes (Wall, 2000 ; Figure 4).



Figure 5 : A : *Casuarina glauca* ; B : *Allocasuarina verticillata* ; C : nodule de *C. glauca* ; D : *Frankia* en culture ; E : nodule de *A. verticillata*. RN : racine nodulaire ; RL : racine latérale ; LN : lobe nodulaire ; hy : hyphes végétatifs ; ve : vésicule. C, E : barre = 1 mm ; D : barre = 5 mm.

## **Morphologie**

En culture liquide, *Frankia* différencie trois sortes de structures (Figure 5D): les hyphes végétatifs, les sporanges et les diazovésicules. Les hyphes sont des filaments peu ramifiés de 0,5-2  $\mu$ m de diamètre. Les diazovésicules et les sporanges sont portés par les hyphes. Les sporanges ont une taille de 10-40  $\mu$ m, ils contiennent des milliers de spores qui sont les formes de dissémination et de résistance. En conditions de carence en azote se différencient les diazovésicules, des structures sphériques de 2-6  $\mu$ m de diamètre à l'intérieur desquelles se trouve la nitrogénase responsable de la fixation de l'azote (Dommergues et coll., 1998). L'enveloppe des diazovésicules contient des fortes quantités de lipides hopanoïdes qui limitent les échanges gazeux, protégeant ainsi la nitrogénase de l'oxygène (Berry et coll., 1993). Dans les nodules de certains genres comme *Casuarina* et *Allocasuarina*, *Frankia* ne développe jamais de diazovésicules, ce qui suppose l'existence d'autres mécanismes pour la protection de la nitrogénase contre l'oxygène (Dommergues et coll., 1998).

## **Les plantes actinorhiziennes**

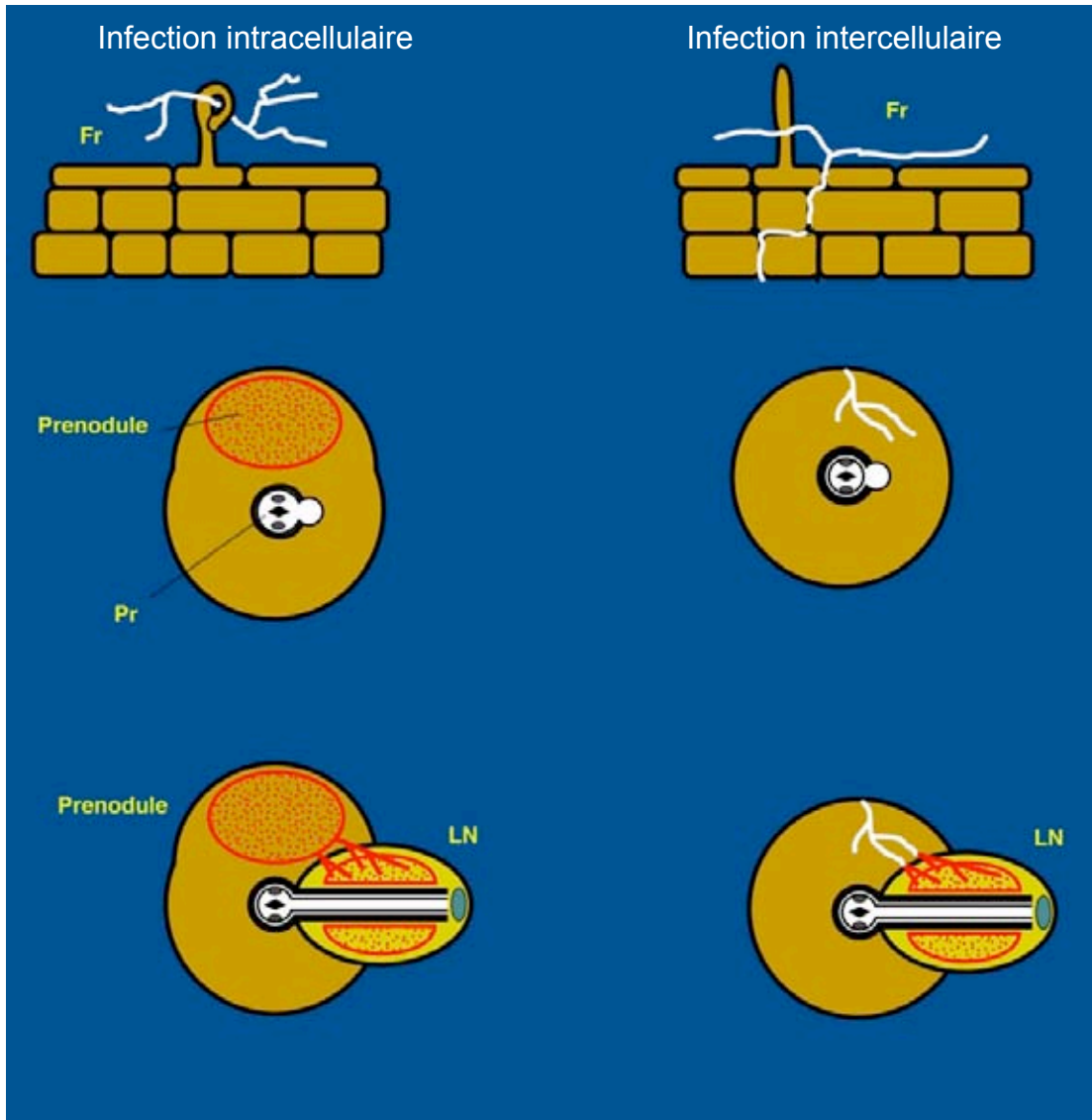
Environ 260 à 280 espèces d'angiospermes réparties dans 25 genres sont connues pour former des symbioses actinorhiziennes avec *Frankia* (Moiroud, 1996 ; Figure 4). Ce sont des espèces ligneuses, sauf pour le genre *Datisca*. Elles se trouvent à l'état spontané dans tous les continents à l'exception de l'antarctique, mais elles sont plus fréquentes dans les zones tempérées froides (Moiroud, 1996). Dans les conditions naturelles, elles sont associées à des champignons ecto- ou endomycorhiziens, ce qui améliore leur nutrition minérale et leur permet une résistance accrue à la sécheresse (Moiroud, 1996). Généralement les plantes actinorhiziennes sont des espèces pionnières pouvant coloniser des sols pauvres ou dépourvus de végétation où les conditions nutritionnelles sont difficiles comme les moraines glaciaires, les dépôts torrentiels, les dépôts volcaniques récents, des dunes de sable ou les sols mis à nu par les incendies (Moiroud 1996). Ce sont des plantes édificatrices, elles peuvent apporter des quantités considérables de litière riche en azote (jusqu'à 30 t/ha/mois), ce qui favorise les processus pédogénétiques conduisant à la formation d'un sol plus favorable à d'autres espèces (Moiroud, 1996). Comme les plantes actinorhiziennes sont en général héliophiles, elles supportent mal la vie en sous-bois et disparaissent une fois que le sol formé permet à la végétation de se densifier (Moiroud, 1996).

Leur capacité fixatrice d'azote est élevée, elle peut atteindre le même niveau que celui des Légumineuses les plus fixatrices (Torrey, 1976) allant jusqu'à 300 kg N<sub>2</sub>/ha/an pour l'aulne rouge (Zavitovski et Newton, 1968). Dans certaines régions comme en Scandinavie ou en Nouvelle-Zélande, où les légumineuses sont rares, les plantes actinorhiziennes sont les principales sources d'azote fixé (Benson et Clawson, 2000). Certaines sont adaptées à la vie dans des marais ou des étangs comme *Myrica gale* (Moiroud, 1996) ou

poussent le long des cours d'eau comme les différentes espèces d'aulne. À l'opposé, d'autres plantes actinorhiziennes sont résistantes à la sécheresse, c'est le cas de plusieurs espèces de *Cercocarpus* qui colonisent des canyons et des montagnes semi-arides de l'Arizona et du Nouveau-Mexique. En Australie, *Allocasuarina decaisneana* est réputée pour sa résistance à la sécheresse (Moiroud, 1996). Certaines espèces, en particulier chez les Casuarinacées, sont résistantes à la salinité et aux métaux lourds, ce qui rend possible leur utilisation pour réhabiliter des sols dégradés, pour fixer des dunes de sable le long des côtes, pour prévenir la désertification, ou pour la mise en valeur de sols impropres à l'agriculture (Dommergues et coll., 1998 ; Dawson, 1990). Les plantes actinorhiziennes sont également utilisées en agroforesterie pour la production de pâte à papier, de charbon de bois ou comme plantes ornementales (Dommergues et coll., 1998)

Du point de vue phylogénétique, la répartition des plantes actinorhiziennes semble assez disparate. La capacité de former une symbiose avec *Frankia* ne se retrouve pas forcément au niveau d'une famille ni même d'un genre. Par exemple *Dryas drumondii* est la seule espèce actinorhizienne de ce genre. Dans la famille des Betulacées, des genres très proches comme *Alnus* et *Betula* ne partagent pas la capacité de fixer l'azote (Huss-Dannel, 1997). Cependant une étude phylogénétique basée sur la séquence du gène *rbcl* a montré que toutes les plantes actinorhiziennes peuvent être regroupées dans un même clade, celui des Rosid I, qui inclut les Légumineuses et des plantes non-symbiotiques. Il existerait donc une prédisposition à la symbiose au sein de ce groupe (Soltis et coll., 1995). L'interprétation la plus parcimonieuse de la phylogénie des plantes actinorhiziennes prévoit que l'association avec *Frankia* se serait produite de manière indépendante au moins 4 fois au cours de l'évolution (Swensen, 1996).

Les traces les plus anciennes de plantes appartenant à des familles où l'on trouve actuellement des plantes actinorhiziennes sont des grains de pollen de Myricacées et de *Alnus* datant de la fin du crétacé (87,5-84 MA) ou du début du tertiaire (87,5-66 MA). Du pollen caractéristique des Casuarinacées est abondant pendant le paléocène (66-58 MA). Pour les Datiscacées, des mégafossiles correspondent à 55-39 MA et pour les autres familles de plantes actinorhiziennes, les traces fossiles sont plus récentes : 39-23,5 MA pour Eleagnacées, Rhamnacées et Rosacées, 11-5 MA pour Coriariacées (Figure 4). Il n'y a pas de preuve que ces plantes aient établi des symbioses actinorhiziennes dès le début, mais comme les fossiles retrouvés correspondent dans la plupart des cas à des milieux aux conditions nutritionnelles difficiles comme ceux colonisés par les plantes actinorhiziennes actuelles, cette hypothèse semble probable (Benson et Clawson, 2000). Après les glaciations, les plantes actinorhiziennes ont pu jouer un rôle écologique considérable en colonisant les moraines et les terres récemment mises à nu par la fonte des glaciers (Benson et Clawson, 2000).



**Figure 6** : Représentation schématique des deux modes d'infection des plantes actinorhiziennes par *Frankia*. Infection intracellulaire : *Myrica*, *Comptonia*, *Alnus*, *Allocasuarina* et *Casuarina*. Infection intercellulaire : *Eleagnus*, *Ceanothus*, *Cercocarpus*. Fr : hyphes de *Frankia*, Pr : protoxylème, LN : lobe nodulaire (d'après Franche et coll., 1998).

## ***L'établissement de la symbiose***

### **L'infection**

Deux modes d'infection ont été décrits chez les plantes actinorhiziennes: (1) l'infection intracellulaire et (2) l'infection intercellulaire.

#### **(1) Infection intracellulaire (Figure 6).**

L'infection de type intracellulaire a été décrite pour les genres *Myrica*, *Comptonia*, *Alnus*, *Casuarina* et *Allocasuarina* (Berry et Sunnel, 1990 ; Laplaze et coll., 1999). Elle débute par une déformation des poils absorbants environ 6-10 h après l'inoculation de *Frankia* (van Ghelue et coll., 1997 ; Cérémonie et coll., 1999). Certains de ces poils absorbants déformés, environ 1 sur cent sont ensuite envahis par des filaments de *Frankia* qui digèrent partiellement la paroi et pénètrent à l'intérieur (Callaham et Torrey, 1977). Dans les cellules végétales, les filaments de *Frankia* sont entourés par une matrice

polysaccharidique d'origine végétale et de composition semblable à celle des parois végétales : elle est formée principalement de cellulose, de xylanes et de pectine (Berg et McDowell, 1987 ; Berg, 1990). Les hyphes de *Frankia* forment des cordons d'infection qui progressent de cellule en cellule de manière intracellulaire en digérant les parois cellulaires (Berg, 1999).

Au niveau du cortex sous-jacent au poil absorbant infecté, des divisions cellulaires sont induites, ce qui conduit à la formation d'un renflement, appelé pré-nodule. Certaines des cellules du pré-nodule s'hypertrophient et sont infectées par des filaments de *Frankia* provenant du poil absorbant infecté. La présence de diazovésicules fixatrices d'azote décrite chez l'aulne (Callaham et Torrey, 1977), associée à un fort pouvoir réducteur d'acétylène (Callaham et Torrey, 1977) et l'expression dans les cellules hypertrophiées du gène *nifH* (Laplaze et coll., 2000b)

ont permis de conclure que le prénodule, tout comme le nodule mature est capable de fixer de l'azote. Il pourrait s'agir d'un reste évolutif d'une symbiose plus primitive qui aurait existé avant l'apparition des nodules (Laplaze et coll., 2000b).

De manière concomitante à la formation du prénodule, des divisions cellulaires sont induites au niveau du péricycle, face à un pôle de protoxylème. Ces divisions cellulaires conduisent alors à la formation d'une structure proche d'une racine latérale, le lobe nodulaire. L'infection du lobe nodulaire se fait par des cordons d'infection de *Frankia* qui progressent du prénodule vers la base du lobe nodulaire naissant (Berry et Sunnel, 1990).

## **(2) Infection intercellulaire (Figure 6)**

Chez *Eleagnus*, *Hippophae*, *Shepherdia*, *Ceanothus*, *Discaria* et *Cercocarpus* l'infection est de type intercellulaire (Miller et Baker, 1985 ; Berry et Sunnel, 1990 ; Valverde et Wall, 1999). Chez ces plantes, les hyphes de *Frankia* pénètrent entre deux cellules du rhizoderme de la racine et progressent dans l'apoplaste. Des cordons d'infection intracellulaires apparaissent postérieurement. Dans ce cas, il n'y a pas de formation de prénodule, mais des divisions cellulaires corticales peuvent avoir lieu, comme chez *Ceanothus* (Liu et Berry, 1991). Les cellules issues de ces divisions restent toutefois dépourvues de *Frankia*. Comme pour l'infection intracellulaire, des divisions sont induites au niveau du péricycle et donnent naissance à un lobe nodulaire, dont le cortex est envahi par des cordons d'infection de *Frankia*.

### **Formation et structure du nodule**

Les nodules actinorhiziens sont formés de plusieurs lobes qui apparaissent successivement à la base du premier lobe et se ramifient en formant une structure coralloïde. Leur nombre varie selon les espèces. La structure du lobe nodulaire est celle d'une racine latérale dépourvue de coiffe avec un système vasculaire central, un cortex et un périderme (Figure 3).

Chez *Myrica* et *Casuarina*, les lobes nodulaires sont prolongés par une racine nodulaire qui possède un gravitropisme négatif (Figure 5C). La racine nodulaire possède un aérénchyme développé qui pourrait faciliter les échanges gazeux (Sylvester et coll., 1990). Chez *Allocasuarina* ou *Alnus* les lobes nodulaires ne possèdent pas ou très rarement de racine nodulaire (Figure 5E).

Les jeunes lobes nodulaires possèdent à leur extrémité une zone méristématique, de ce fait ils ont une croissance indéterminée. Les filaments de *Frankia* colonisent le cortex du lobe nodulaire à partir de la base, et seules certaines cellules corticales sont envahies. Du fait de l'infection acropète de *Frankia* et de la production de nouvelles cellules non-infectées par le méristème apical, un gradient de différenciation s'établit entre le pôle apical et la base du lobe nodulaire (Figure 3 ; Figure 6). Différentes zones ont été définies dans les lobes nodulaires qui correspondent aux différents stades de différenciation de la symbiose (Figure 3):

- La zone I correspond à la zone méristématique

apicale et les cellules non-infectées et peu différenciées issues de ce méristème.

- La zone II est la zone d'infection. Dans cette zone, certaines des cellules corticales issues de la zone méristématique commencent à être envahies par des cordons d'infection de *Frankia* (Berg, 1999). Les cellules corticales qui contiennent des filaments de *Frankia* ne sont pas encore très hypertrophiées ; les filaments de *Frankia* sont septés et ne fixent pas d'azote. Chez les espèces qui forment des diazovésicules, celles-ci ne sont pas encore différenciées. Cette zone correspond au premier contact à l'échelle du lobe nodulaire entre les cellules végétales et *Frankia*.

- La zone III correspond à la zone de fixation. Elle contient des cellules infectées et non-infectées différenciées. Les cellules infectées de cette zone sont remplies de filaments bactériens et fixent activement l'azote (Pawlowski et Bisseling, 1996 ; Huss-Daniell et Bergman, 1990). Chez les Casuarinacées, les parois des cellules infectées de cette zone sont autofluorescentes en raison d'un dépôt de lignine. Dans ces cellules, le réticulum endoplasmique, les vacuoles et les polyribosomes régressent au profit des filaments de *Frankia* qui envahissent progressivement toute la cellule. Les mitochondries développent un grand nombre de crêtes (Berg et McDowell, 1987)

- La zone IV n'est présente que dans les lobes nodulaires âgés et correspond à une zone de sénescence où la fixation d'azote cesse et les cellules meurent.

Un deuxième niveau de compartimentation a été décrit récemment pour les nodules de *C. glauca*. L'accumulation de composés phénoliques en particulier de flavanes dans les petites cellules non infectées du nodule alignées selon l'axe longitudinal du nodule conduit à la formation de compartiments contenant les cellules infectées. Comme certains composés phénoliques peuvent limiter la croissance de *Frankia in vitro* (Perradin et al., 1982), ces compartiments pourraient restreindre l'infection de *Frankia* à certaines parties de nodule. Il pourrait aussi d'agir de barrières permettant de protéger les cellules fixatrices d'azote de l'oxygène (Laplaze et coll., 1999).

### **Fonctionnement du nodule**

La zone I est responsable de la croissance en longueur du lobe nodulaire et de sa ramification car elle contient les cellules méristématiques qui se divisent indéfiniment. Un seul gène exprimé dans cette zone a été isolé jusqu'à présent, il s'agit de *Dg93*, un gène de *Datisca glomerata* qui code une protéine similaire à 74% avec celle codée par la noduline précoce *Enod93* de soja dont la fonction reste inconnue (Okubara et coll. 2000). *Dg93* est également exprimé dans les cellules infectées et dans le système vasculaire.

Dans la zone II ont lieu les premiers contacts entre les cellules issues du méristème et les filaments de *Frankia*. Les cellules infectées de cette zone entrent donc dans le processus de différenciation : c'est dans cette zone où s'initie leur hypertrophie et le remplissage de leur cytoplasme par les filaments de *Frankia*. Trois gènes exprimés dans la zone II ont été



isolés jusqu'à présent : *Dg93*, qui s'exprime dans la zone II en plus du méristème, les gènes *Ag12/Cg12* codant deux subtilases d'aulne et *Casuarina* qui seront décrites plus loin et *AgNt84/Ag164*, deux gènes très proches avec le même profil d'expression isolés chez l'aulne (Pawlowski et coll., 1997). *AgNt84/Ag164* ne sont exprimés que dans la zone II dans des cellules envahies par *Frankia* qui ne fixent pas encore l'azote. Ils codent des protéines riches en glycine et histidine d'environ 10 kDa qui seraient envoyées dans le compartiment extracellulaire en raison de la présence d'un peptide signal dans la partie N terminale des protéines correspondant aux gènes. La présence d'une glycine N-terminale suggère l'existence d'une myristilation. Ces protéines possèdent en outre plusieurs sites de phosphorylation. Un fragment d'AGNT84 produit dans *Escherichia coli* possède une forte affinité pour le nickel, suggérant une possible implication de ces protéines dans la fixation d'ions métalliques. Dans le contexte des symbioses fixatrices d'azote, il pourrait s'agir du cobalt, seul élément minéral essentiel à la symbiose (Pawlowski et coll., 1997).

Dans la zone III a lieu la fixation de l'azote. Chez certaines espèces de plantes, *Frankia* développe des diazovésicules dans cette zone. La plupart des gènes spécifiques de nodules actinorhiziens isolés actuellement ont une expression restreinte à la zone de fixation. Parmi ces gènes, on peut distinguer trois classes majoritaires qui ont à voir avec les fonctions essentielles du nodule:

### 1. Les gènes du métabolisme de l'azote :

Comme chez les Légumineuses, l'azote fixé par *Frankia* est exporté dans le cytoplasme sous forme d'ammonium et métabolisé en acides aminés par des activités GS et GOGAT pour ensuite être exporté vers le reste de la plante sous forme d'acides aminés et d'amides (Dommergues et coll., 1998). Des gènes codant des enzymes du métabolisme azoté (GS, GOGAT, glutamate synthase, acetylornithine transaminase (AOTA) asparagine synthétase (AS)) surexprimés dans la zone de fixation des nodules ont été caractérisés chez plusieurs plantes actinorhiziennes (Guan et coll., 1996 ; Franche et coll., 1998a).

### 2. Les gènes du métabolisme carboné

La forte consommation d'énergie associée à la fixation de l'azote nécessite d'un métabolisme carboné important. Chez l'aulne, des gènes codant une sucrose synthase (SUSY) et une énoïase d'aulne sont fortement exprimés dans les cellules infectées et dans le péricycle (van Ghelue et coll., 1996). D'autres gènes codant des enzymes de la glycolyse, du cycle de Calvin et du cycle de Krebs ont été caractérisés ces dernières années (Mullin et Dobritsa, 1996). Une ACP (acyl carrier protein) a été isolée chez *C. glauca* qui pourrait participer à la synthèse d'acides gras (Laplaze et coll., 1998).

### 3. Autres gènes de nodulines actinorhiziennes

Comme chez les Légumineuses, de l'hémoglobine est présente dans les nodules des plantes actinorhiziennes. L'expression des gènes d'hémoglobine est restreinte à la zone de fixation. Comme chez les Légumineuses, l'hémoglobine

actinorhizienne aurait pour rôle le transport d'O<sub>2</sub> vers les mitochondries et vers *Frankia*, tout en maintenant des pressions partielles d'O<sub>2</sub> suffisamment basses pour ne pas inactiver la nitrogénase (Franche et coll., 1998b).

Un gène de métallothionéine de *C. glauca* exprimé fortement dans les cellules infectées et dans les racines pourrait jouer un rôle dans le transport de métaux ou dans la protection des cellules des espèces actives d'oxygène (AOS) induites en réponse à *Frankia* (Laplaze et coll., 2002).

Dans la zone de sénescence des gènes codant une protéase à cystéine et une protéine riche en proline-glutamate ont été caractérisés, ils pourraient jouer un rôle dans la défense et la dégradation respectivement (Pawlowski, 1997 ; Goetting-Minesky et Mullin, 1994) Chez *Eleagnus* deux gènes codant des protéines de défense, *EuNodcht1* et *EuNodcht2* codent des chitinases (Kim et An, 2002).

### Les subtilases

Les peptidases ou protéases sont les enzymes qui catalysent l'hydrolyse de ponts peptidiques. Si elles agissent aux extrémités de la chaîne polypeptidique, elles sont appelées exopeptidases ; si elles le font de manière interne, elles sont appelées endopeptidases ou protéinases. Selon leur mécanisme catalytique, les endopeptidases ont été classées en 6 groupes ( NC-IUBMB, 1992):

- Les protéinases à thréonine (EC 3. 4. 25)
- Les métalloprotéases (EC 3. 4. 24) : contiennent un atome métallique, généralement du Zn qui intervient dans le mécanisme catalytique
- Les protéinases à aspartate (EC 3. 4. 23) font intervenir une paire d'aspartates
- Les protéinases à cystéine (EC 3. 4. 22) font intervenir une histidine et une cystéine
- Les protéinases à sérine (EC 3. 4. 21) font intervenir une « triade catalytique » comprenant un aspartate, une histidine et une sérine.
- Les endoprotéases pour lesquelles le mécanisme catalytique est inconnu sont classées dans un groupe à part (EC 3. 4. 99)

Les protéinases à sérine appartiennent à six classes, parmi lesquelles les plus importantes sont celles de la carboxypeptidase, de la chymotrypsine et de la subtilisine. Ces classes diffèrent par l'arrangement de la triade catalytique : un arrangement feuillet  $\square / \square$  / feuillet  $\square$  pour les protéinases de la famille de la chymotrypsine et un arrangement hélice  $\square / \square$  / feuillet  $\square$  pour celles de la famille de la subtilisine.

Les protéinases à sérine de la famille des subtilisines sont également appelées subtilases. Elles ont d'abord été isolées et caractérisées chez les eubactéries puis chez les *Archaeae*, les protozoaires, les champignons, les plantes et les animaux (Siezen et Leunissen, 1997). Ces enzymes sont donc présentes chez tous les organismes et leur rôle est extrêmement varié.

Selon leur spécificité de substrat, deux classes fonctionnelles de subtilases peuvent être distinguées :

(1) Les subtilases dégradatives ont une faible spécificité de substrat, elles interviennent dans des dégradations protéiques peu spécifiques souvent associées à la digestion ou à la dégradation de protéines. Dans ce groupe, on trouve surtout des subtilases bactériennes.

(2) Les subtilases de maturation ou maturases clivent des protéines ou des polypeptides à certains résidus spécifiques. De ce fait, elles interviennent en général dans l'activation ou l'inactivation spécifique de polypeptides bioactifs.

Une analyse phylogénique récente a permis classer les subtilases en 6 familles (Figure 7 ; Siezen et Leunissen 1997) :

(1) Les subtilisines : ce groupe comprend des subtilases proches de la subtilisine de *Bacillus subtilis*. C'est le groupe le mieux connu, avec plusieurs enzymes cristallisées dont la structure tridimensionnelle est connue avec précision. Il contient uniquement des subtilases de microorganismes, surtout de bactéries et ce sont des subtilases de type dégradatif.

(2) Les thermitases : ce groupe comprend uniquement des subtilases de microorganismes de type dégradatif.

(3) Les protéinases K : ce sont des protéinases sécrétées par des champignons et des bactéries. Certaines sont de type maturase.

(4) Les peptidases de lantibiotiques : ce sont des subtilases exclusivement bactériennes spécialisées dans le clivage des peptides signal de polypeptides antimicrobiens appelés lantibiotiques. Ce sont toutes des subtilases de maturation.

(5) Les kexines : Ce groupe contient des subtilases de bactéries mais surtout d'eucaryotes où celles de champignons et de mammifères sont bien représentées. Ce sont toutes des subtilases de maturation, elles clivent leurs substrats après une paire de résidus basiques. Certaines de ces subtilases sont particulièrement étudiées en raison de l'importance des phénomènes biologiques dans lesquels elles interviennent. C'est le cas par exemple pour la subtilase *kex-2* de levure qui intervient dans la maturation du facteur  $\beta$ , la phéromone d'accouplement (Brake et coll., 1984) ou des proprotéines convertases qui interviennent dans l'activation d'hormones peptidiques, de neuropeptides et de facteurs de croissance chez les mammifères (Seidah et Chrétien, 1999).

(5) Les pyrolysines : ces subtilases forment un groupe peu connu et hétérogène où l'on trouve des subtilases bactériennes, de mammifères et toutes les subtilases de plantes. Elles se caractérisent par des grandes insertions ou des extensions C-terminales. Ce groupe contient des subtilases de type dégradatif et de maturation (Siezen et Leunissen, 1997).

### Les subtilases végétales

Aucun gène codant une subtilase n'avait été isolée chez les plantes jusqu'en 1994, quand le groupe de Yamagata réussit l'isolement du gène codant la cucumisine, une subtilase du melon. Depuis lors, quelques dizaines de gènes de subtilases ont été isolées

et caractérisées chez de nombreuses espèces (Tableau 2). Les subtilases d'*Arabidopsis* et de tomate sont les mieux étudiées. Les connaissances relatives aux subtilases de plantes sont donc récentes, et leur fonction précise reste inconnue à l'exception de deux subtilases d'*Arabidopsis*, SDD1 et ALE1 pour lesquelles le phénotype de mutants a pu être analysé. Les deux gènes correspondants interviennent dans le développement, *Sdd1* intervient dans la régulation de la répartition des stomates et *Ale1* dans la formation de l'épiderme au cours de l'embryogénèse (Berger et Altman 2000 ; Tanaka et coll., 2001).

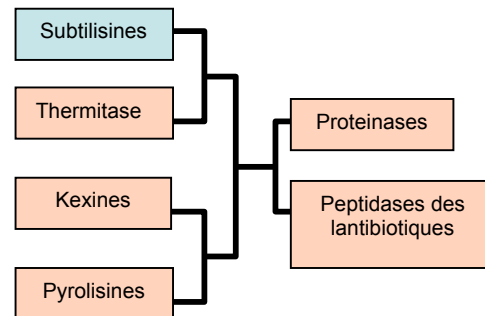


Figure 7: Relations phylogénétiques entre les 6 groupes de subtilases (D'après Siezen et Leunissen, 1997).

Une grande partie du travail concernant les subtilases végétales a été effectuée chez la tomate où 17 gènes ont été isolés et caractérisés (Meichtry et coll., 1999 ; Jorda et coll., 2000). Deux de ces gènes de tomate, *P69B* et *P69C* sont induits lors d'interactions avec des agents pathogènes et par des traitements à l'acide salicylique, ce qui suggère leur implication dans les réactions de défense de la plante contre les agents pathogènes (Tornero et coll., 1996a ; Jorda et coll., 1999 ;). *In vivo*, *P69B* serait responsable de la maturation de la protéine LRP, une protéine à motifs riches en leucine (LRR) qui intervient également dans les réactions aux agents pathogènes (Tornero et coll., 1996b). Chez la tomate, une activité protéasique immunologiquement proche des subtilisines est responsable de la maturation de la systémine, l'hormone qui est synthétisée en réponse aux attaques de ravageurs et qui induit la synthèse dans toute la plante d'inhibiteurs de protéases (Schaller et Ryan, 1994). Il semble donc que certaines des subtilases végétales soient spécialisées dans les réactions de défense des plantes.

Pour les autres gènes étudiés jusqu'à présent de très nombreuses fonctions ont été proposées (Tableau 2). Beaucoup de ces subtilases interviennent dans le développement : c'est le cas pour LIM9, une subtilase d'Iris qui interviendrait dans la maturation des microspores (Taylor et coll., 1997), pour AIR3, une subtilase d'*Arabidopsis* qui interviendrait dans la formation de la racine latérale (Neuteboom et coll., 1999), de SCS1, subtilase de soja qui jouerait un rôle dans la différenciation des cellules du parenchyme de la graine (Batchelor et coll., 2000) et des deux subtilases d'*Arabidopsis*, SDD1 et ALE1 citées auparavant.

**Tableau 2 : Subtilases végétales les mieux connues : mutants (m), genes (g), protéines (p) ou activités enzymatiques (a)**

Origine	Nom	Localisation	Fonction	Type de protéase	Références
Melon	Cucumisine (g, p, a)	Fruits	Maturation des fruits	Dégradative	Yamagata et coll., 1994, Kaneda et coll., 1995, Arima et coll., 2000a, Uchikoba et coll., 1995, Yonezawa et coll., 1995a, Yonezawa et coll., 1995b, Yonezawa et coll., 2000, Yamagata et coll., 2002...
Tomate	<i>Tmp</i> (g)	Anthères	Développement des microspores	Dégradative?	Meichtry et coll., 1999, Riggs et Horsch
	<i>SBP50</i> (a)	Induit par une attaque pathogène	Défense contre les attaques pathogènes ; Maturation de la systémine	Maturase	Meichtry et coll., 1999, Janzik et coll., 2000
	<i>LeSbt1</i> (g, p, a)	Extracellulaire (?), racines, tiges, fleurs		Maturase	Meichtry et coll., 1999, Janzik et coll., 2000
	<i>LeSbt2</i> (g)	Cultures cellulaires, cotyledons, feuilles		?	
	<i>LeSbt3</i> (g)	Cultures cellulaires, racines, cotyledons(-), feuilles(-)		?	
	<i>LeSbt4 A, B, C, D</i> (g)	Fleurs(-), cotyledons(-), feuilles(-)		?	
	<i>P69A</i> (g)	Feuilles et tiges infectées par un viroïde	Constitutive ( <i>Arabidopsis</i> )	Maturase?	Tornero et coll., 1996a, Tornero et coll., 1996b, Tornero et coll., 1997, Meichtry et coll., 1999, Jorda et Vera 2000, Jorda et coll., 1999
	<i>P69B</i> (g, a)	Feuilles et tiges infectées par un viroïde	Défense contre les agents pathogènes Maturation de LRP (protéine à LRR)	Maturase	Jorda et coll., 2000
	<i>P69C</i> (g, a)	Réponse aux agents pathogènes		Maturase	
	<i>P69D</i> (g)	Pendant le développement des feuilles		Maturase?	
<i>Arabidopsis</i>	<i>P69E</i> (g)	Racines, germination		Maturase?	
	<i>P69F</i> (g)	Hydathodes		Maturase?	
	<i>Sdd1</i> (l, g)	Feuilles et siliques en développement ; méristémoïdes de l'épiderme	Signalisation intercellulaire pendant le développement	Maturase?	Berger et Altman 2000, Von Groll et coll., 2002
	<i>Ale1</i> (l, g)	Cellules de l'endosperme adjacentes à l'embryon	Formation de la cuticule embryonnaire	Maturase?	Tanaka et coll., 2001
	<i>AIR3</i> (g)	Couches extérieures de la racine principale pendant l'émergence de la racine latérale	Formation de la racine latérale affaiblissement des liaisons entre cellules, mort cellulaire programmée.	?	Neuteboom et coll., 1999a, Neuteboom et coll., 1999b
	<i>XSP1</i> (g)	Xylème	Développement du bois	?	Zhao et coll., 2000
Iris	<i>LIM9</i> (g)	Anthères : cellules du tapis quand les microspores sont au stade tetrad	Elongation des tissus	Dégradative	Ribeiro et coll., 1995, Yamagata et coll., 2000 Hamilton et coll., 2002 Taylor et coll., 1997
Riz	<i>RSP1</i> (g)	Fleurs	Dégradation protéique associée à l'élongation des cellules ?	Dégradative?	Yoshida et Kuboyama 2001, Yamagata et coll., 2000
Tabac	Activité de type KEX2 (a)	Extrait extracellulaires de feuilles; appareil de golgi	Maturation de peptides inconnus	Maturase	Kinal et coll., 1995, Jiang et Rogers 1999
<i>A. glutinosa/ C. glauca</i>	<i>Ag12/ Cg12</i> (g)	Cellules en cours d'infection du nodule	Dégradation de la paroi associée à l'infection ; maturation de peptides ou protéines de signalisation en réponse à <i>Frankia</i> ?		Ribeiro et coll., 1995 ; Laplaze et coll., 2000a
Soja	<i>SCS1</i> (g)	Tégument des graines	Différenciation des cellules du parenchyme		Batchelor et coll., 2000
	<i>SLP1, SLP2</i> (g, p, a)	Tégument des graines			Beilinson et coll., 2002
<i>Hordeum vulgare</i>	<i>SEP1</i> (p, a)	Graines en germination		Dégradative ?	Fontanini et Jones, 2002
Haricot	<i>KLSP</i> (p, a)	feuilles		Maturation	Popovic et coll., 2002
<i>Plantago maior</i>	Plantagolisine (a)	feuilles		Dégradative	Bogacheva et coll., 2001
<i>Taraxacum officinale</i>	Taraxalisine ; n. d. (a)	latex		Dégradative.	Bogacheva et coll., 1999, Bogacheva et coll., 2001, Arima et coll., 2000b
<i>Cucurbita ficifolia</i>					
<i>Euphorbia supina</i>					
<i>Benicasa cerifera</i> , <i>Benicasa hispida</i>	n.d. ; Macluralisine (a)	Fruit		Dégradative?	Bogacheva et coll., 2001, Dyer et coll., 1999, Uchikoba et coll., 1998, Rudenskaya et coll., 1995
<i>Aleurites fordii</i> (tung) <i>Maclura pomifera</i>					

Généralement les subtilases végétales appartiennent à des vastes familles multigéniques. Chez *Arabidopsis*, il existe au moins une cinquantaine de gènes. Plusieurs dizaines d'EST se retrouvent dans les bases de données de riz et de *Medicago truncatula*. Cependant il existerait une spécialisation de chaque gène dans une fonction particulière. Chez la tomate, le profil d'expression de chacun des 17 gènes connus est différent, et même des gènes très proches comme ceux de la famille P69 montrent des fortes différences en matière d'expression (Meichtry et coll., 1999 ; Jorda et coll., 2000). Chez *Arabidopsis*, une mutation dans un des 50 gènes de subtilases suffit à produire des dérégulations importantes du développement (Berger et Altman, 2000 ; Tanaka et coll., 2001). Cette spécificité d'action pourrait correspondre à l'intervention de subtilases végétales dans des processus clés de signalisation cellulaire, analogues à ceux où interviennent les proprotéines convertases des mammifères.

Les données concernant la spécificité de clivage des subtilases végétales sont peu abondantes. Les premières études ont été faites sur la cucumisine et diverses subtilases exprimées dans les fruits (Tableau 2). Celles-ci sont très peu spécifiques, ce qui est en accord avec leur fonction supposée dans la dégradation protéique qui a lieu pendant la maturation des fruits. On a supposé alors que les subtilases végétales étaient toutes de type dégradatif. Or ceci est en contradiction avec l'existence chez le tabac d'une activité de type KEX-2, capable de cliver spécifiquement une toxine que l'on a fait surproduire par la plante (Kinal et coll., 1995) et l'existence chez la tomate d'une protéase ayant une parenté immunologique avec les subtilases, responsable de la maturation de la systémine (Schaller et Ryan, 1994). Les résultats cités antérieurement qui montrent une implication probable de nombreuses subtilases dans des processus du développement confortent aussi l'idée de l'existence de subtilases végétales de maturation. Récemment, la spécificité de deux subtilases qui n'interviennent pas dans la maturation des fruits a été analysée : LESBT1 et ARA12, sont des subtilases de tomate et d'*Arabidopsis* respectivement qui ont révélé une forte spécificité de substrat (Janzik et coll., 2000 ; Hamilton et coll., 2003). KLSP, une subtilase de haricot, possède une forte spécificité de clivage similaire à celle de KEX2 (Popovic et coll., 2002). Au moins certaines des subtilases végétales sont donc de type maturase et pourraient avoir un rôle similaire à celui des kexines chez d'autres eucaryotes.

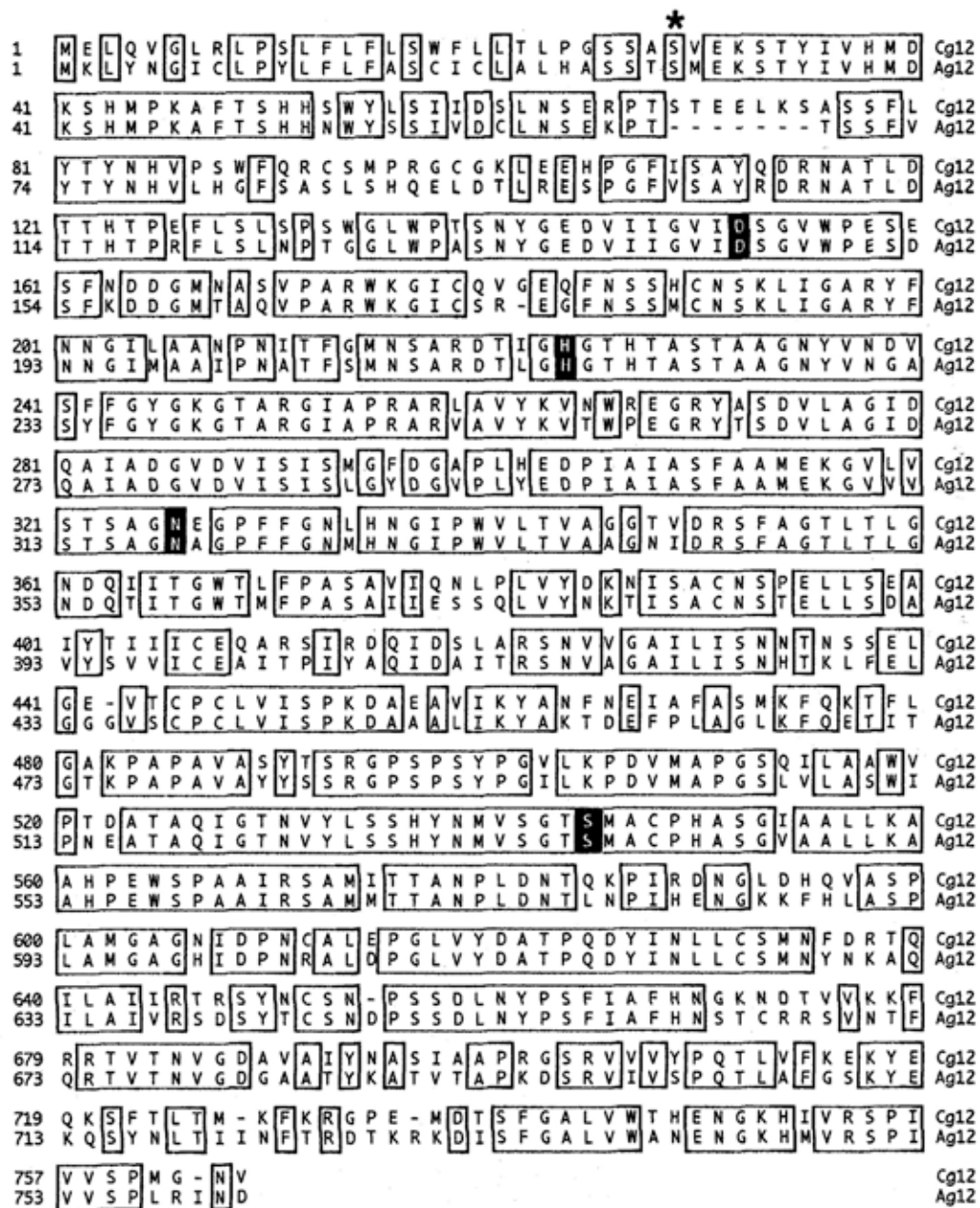
### **Cg12/Ag12**

*Ag12* a été identifié chez l'aulne (*Alnus glutinosa*) en criblant de manière différentielle une banque d'ADNc de nodules avec de l'ADNc synthétisé à partir d'ARN extrait de nodules ou de racines. La séquence

protéique déduite de ce gène correspond à une subtilase de 761 acides aminés (Figure 8). Elle contient un peptide signal qui enverrait la protéine mature dans le compartiment extracellulaire. Par hybridation ADN/ADN il a été montré que ce gène appartient à une famille multigénique d'au moins 5 membres. Il est exprimé faiblement dans les bourgeons et très fortement dans les nodules, au niveau des cellules infectées par *Frankia* de la zone d'infection et plus faiblement dans les cellules infectées de la zone de fixation (Ribeiro et coll., 1995).

Chez l'aulne très peu d'outils moléculaires sont disponibles, et en particulier aucun protocole de transformation génétique n'a été décrit pour cette espèce. Le gène orthologue de *Ag12* a donc été recherché chez *C. glauca*, un arbre actinorhizien qui peut être transformé génétiquement à l'aide d'*Agrobacterium tumefaciens* (Smouni et coll., 2002). Des amorces correspondant à des parties conservées entre *Ag12* et une subtilase d'*Arabidopsis*, *Ara12* ont été utilisées pour amplifier de l'ADNc de nodules de *C. glauca*. Un gène codant une subtilase de 765 acides aminés et ayant 85 % de similarité au niveau protéique avec *Ag12* a ainsi été cloné et appelé *Cg12* (Laplaze et coll., 2000a ; Figure 8). *Cg12* possède les mêmes propriétés qu'*Ag12* : un signal peptide est présent et son profil d'expression est identique. Cependant, contrairement à *Ag12*, *Cg12* n'appartiendrait pas à une famille multigénique (Laplaze et coll., 2000a). Des informations supplémentaires concernant *Cg12* sont disponibles par rapport à *Ag12* : son profil d'expression a été étudié dans les prénodules où il s'exprime dans certaines des cellules infectées, qui pourraient être l'équivalent des cellules de la zone de fixation du nodule (Laplaze et coll., 2000b).

Ces deux gènes présentent donc des profils d'expression particulièrement intéressants en relation avec les étapes précoces du processus symbiotique. En effet, les cellules dans lesquelles l'expression de *Cg12/Ag12* est la plus forte sont celles qui viennent d'entrer en contact avec la bactérie. C'est donc dans ces cellules qu'ont lieu les phénomènes précoces de reconnaissance entre les deux partenaires qui vont aboutir à la différenciation de celles-ci et à l'établissement de la symbiose. En plus leur signal peptide laisse supposer que les protéines matures seraient actives dans le compartiment extracellulaire, qui pourrait être la capsule qui entoure *Frankia*. Dans ce contexte, il a été proposé que ces subtilases agissent en maturant des polypeptides de l'hôte ou de la bactérie qui se trouvent dans la capsule, à l'interface entre les deux partenaires de la symbiose (Laplaze et coll., 2000a ; Ribeiro et coll., 1995).



**Figure 8 :** Alignement des séquences peptidiques déduites de AG12 et CG12. Les acides aminés conservés sont encadrés. Le site potentiel de clivage du peptide signal est indiqué par une étoile. Les résidus conservés du site actif sont écrits en blanc (D'après Laplaze et coll. , 2000a).

## Description des objectifs de la thèse

L'objectif de ce travail est de poursuivre la caractérisation du gène *Cg12*. Trois approches ont été choisies :

### 1-Etude de l'expression du gène *Cg12*

Afin de poursuivre l'étude de l'expression de *Cg12*, en particulier pendant les étapes précoces de l'interaction, son promoteur a été cloné et fusionné à des gènes rapporteurs. Ces fusions transcriptionnelles ont été introduites dans *C. glauca* et une espèce proche, *A. verticillata*, les seules espèces actinorhiziennes pour lesquelles il existe un protocole de transformation génétique. L'expression des gènes rapporteurs a été analysée dans les plantes transgéniques au cours du processus symbiotique.

Les plantes transgéniques ont également été utilisées pour identifier les facteurs qui conduisent à l'expression des gènes rapporteurs. L'implication de facteurs diffusibles de *Frankia*, des facteurs Nod de rhizobia, de différentes hormones et des protéines G a été analysée.

Une comparaison entre la symbiose actinorhizienne et les symbioses mycorrhiziennes a également été réalisée en inoculant des plantes transgéniques avec des champignons ecto- ou endomycorhiziens.

### 2-Localisation de la protéine *CG12*

Des anticorps anti-*CG12* ont été utilisés pour localiser la protéine *CG12* dans des extraits protéiques. *CG12* a également été localisée sur des coupes de nodules au niveau cellulaire et ultrastructural par immunolocalisation.

### 3. Utilisation des plantes modèles

Afin d'étudier les voies de signalisation qui conduisent à l'expression de *Cg12*, les fusions transcriptionnelles *Cg12*-gène rapporteur ont été introduites dans deux espèces modèles : *Arabidopsis thaliana* et *Medicago truncatula*.

Le profil d'expression des gènes rapporteurs a été étudié chez *Arabidopsis* au cours du développement et en réponse à différents traitements hormonaux.

Chez *M. truncatula*, l'expression a été analysée en particulier en réponse à l'inoculation par *Sinorhizobium meliloti*, lors de la formation des nodules. Ces plantes transgéniques ont également été utilisées pour étudier les facteurs impliqués dans l'induction de l'expression des gènes rapporteurs en présence de facteurs Nod purifiés ou en utilisant des mutants de rhizobia affectés dans les voies de synthèse des EPS.

Afin de connaître la fonction de gènes proches de *Cg12* chez ces deux espèces, l'expression d'un gène de subtilase d'*Arabidopsis* et de trois gènes de subtilases de *M. truncatula* a été étudiée.

## Première partie : Analyse de l'expression de *Cg12*

### Introduction

Une des approches pour étudier la fonction d'un gène consiste à déterminer avec précision son profil d'expression. Les données concernant l'expression de *Cg12* proviennent tout d'abord d'expériences de northern-blot et de RT-PCR réalisées sur des nodules, des racines non-infectées et des rameaux de *C. glauca*. Celles-ci ont permis de mettre en évidence une forte expression dans les nodules, une absence d'expression dans les racines et une très faible expression dans les rameaux, détectable uniquement par RT-PCR. Par hybridation *in situ*, il a ensuite été montré que *Cg12* est exprimé dans les nodules, dans les cellules nouvellement envahies par *Frankia* de la zone d'infection et plus faiblement dans les cellules infectées de la zone de fixation (Laplaze et coll., 2000a). L'expression de *Cg12* a également été mise en évidence dans certaines des cellules infectées des pré-nodules (Laplaze et coll., 2000b).

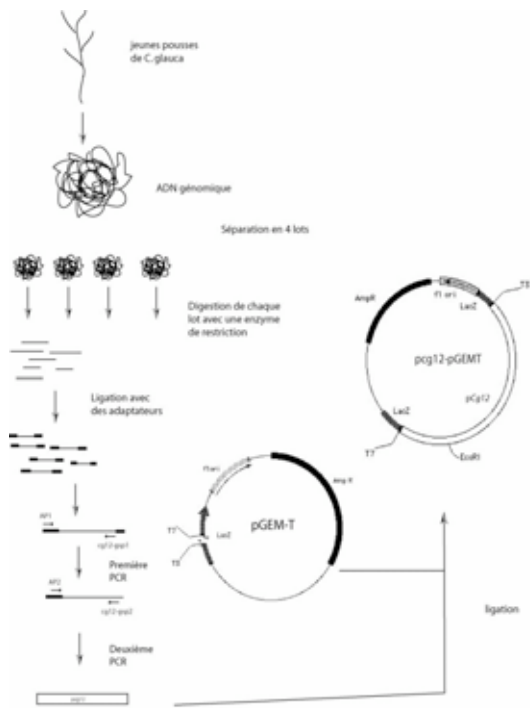
Ce profil d'expression est particulièrement intéressant en relation avec les étapes précoces du processus symbiotique car les cellules dans lesquelles l'expression de *Cg12* est la plus forte sont celles qui viennent d'entrer en contact avec la bactérie. C'est dans ces mêmes cellules que pourraient avoir lieu les phénomènes précoces de reconnaissance entre les deux partenaires ce qui permettrait ensuite l'établissement de la symbiose. Avec *AgN164/Ag164*, *Cg12* est un des

rare gènes symbiotiques caractérisés jusqu'à présent qui est exprimé spécifiquement dans cette zone. Une meilleure caractérisation du profil d'expression de *Cg12* nous a donc semblé nécessaire.

La mise au point d'un protocole efficace de transformation génétique et régénération pour *C. glauca* (Smouni et coll., 2000) et une espèce très proche, *A. verticillata* (Franche et coll., 1997) a ouvert des nouvelles possibilités pour l'analyse de l'expression de gènes chez les plantes actinorhiziennes, en rendant possible notamment l'analyse du profil d'expression conféré par des promoteurs à des gènes rapporteurs. Nous avons donc utilisé cette technique pour préciser le profil d'expression de *Cg12*. Son promoteur a été cloné et fusionné à des gènes rapporteurs (*Gus* et *Gfp*). Ces constructions ont été introduites dans *A. verticillata* et *C. glauca*, et des plantes transgéniques exprimant les gènes rapporteurs sous le contrôle du promoteur de *Cg12* ont été régénérées. Ces plantes transgéniques ont ensuite servi pour analyser de manière détaillée le profil d'expression de *Cg12* au cours du processus symbiotique avec *Frankia*, en particulier lors des stades très précoces qui n'avaient pas été étudiés auparavant. L'implication de facteurs diffusibles émis par *Frankia* dans l'induction de *Cg12* a également pu être étudiée. Les plantes transgéniques ont aussi été utilisées pour étudier l'expression de *Cg12* dans d'autres interactions symbiotiques comme les ecto- ou

endomycorhizes et en réponse à des traitements par des facteurs Nod de rhizobia.

Finalement, nous avons étudié les processus de signalisation conduisant à l'expression de *Cg12* en analysant l'expression des gènes rapporteurs dans les plantes transgéniques en réponse à des traitements par des phytohormones et un agoniste des protéines G.



**Figure 9** : Clonage du promoteur de *Cg12*. f1 : origine de la réplication pour *E. coli*. AmpR: gène de résistance à l'ampicilline.

## Résultats

### Isolement et analyse du promoteur de *Cg12*

#### Isolement du promoteur de *Cg12*

La région promotrice en 5' de *Cg12* a été isolée en utilisant la technique de marche chromosomique. Pour cela, nous avons utilisé le kit "universal genome walker" (Clontech). Le principe de cette technique et la stratégie de clonage sont présentés sur la Figure 9. Une banque d'ADN génomique de *C. glauca* a été construite et digérée par 5 enzymes de restriction différentes. Des adaptateurs ont été rajoutés aux fragments digérés d'ADN. Une amplification par PCR sur cet ADN a été réalisée en prenant comme amorces une séquence présente dans les adaptateurs (P1) et d'autre part une séquence située dans la région 5' de la partie codante de l'ADNc de *Cg12*. Pour les 5 banques plusieurs bandes ont été obtenues à l'issue de cette première amplification. Une deuxième amplification ou "Nested PCR" avec une autre paire d'amorces a été effectuée par la suite ce qui permet d'accroître la

spécificité (Figure 9). Lors de la deuxième amplification, des bandes dont la taille varie entre 0,6 et 1,7 kb ont été obtenues pour les 5 banques. Le produit de plus grande taille a été ensuite cloné dans le vecteur pGEM-T et séquencé. L'analyse de la séquence de ce fragment de 1,7 kb a permis d'identifier la zone de recouvrement avec l'ADNc de *Cg12* correspondant aux 221 nucléotides de l'ARN messager transcrit mais non traduit en amont du début du codon d'initiation de la transcription et les premiers 11 codons correspondant à la séquence protéique de l'extrémité N terminale de CG12 (Figure 10). La taille de la région 5' en amont du codon d'initiation de la traduction est de 1632 pb.

```

nod
-1632 GGGAGAGATGTAGACGAGGAGGAGAGAGAGGAGAGAGCCAGGATTAGGAAAAACGGTGAACCGAACTC
P
-1492 AATGTTGCCATGCCCACCTTGGATTGGCTAAGAAAGGATTTCTTTACTTTGGTAGACCAAAATGAA
P
-1422 CTTTATGACGTTTTGTCTCTTTTTTCAATAGGTGGGTTGGCAATAGGCCCTTCACTGCTCTCTCTCT
-1352 TCCATTTATTTATCATGTGGGACAGTAAAGTCTTTCTTCTGTTCTTTCTTTAATGCAAGGAATGCAT
-1282 AGTTTTATGACCAATCCAGAAATTTGGGAGGTTCACTTTGTCTTTCCAGGCATAAAAACCAAAATGAA
-1212 TCGAAGTACAGATGCCGACAGATTAAAGCATGTGGCTCACTGTAATCTATGCCACTGAAAAATTTTA
nod SBF-1 SBF-1
-1142 AGTTTAAACCTTAACCTCTTACACCTTCAAGTATTAATAAAAAAATTTATGGTAAAAAAA)AACAGA
-1072 GAACACAATGTGTGAGAAAAAAGTTAACAGTTGAATTTTTCTTTCTTTTAAACATATGTATCAATGT
-1002 GTTATGAGATTATGTGCGTTTTGATGAGAAATGATTTTGAAGCAGTTTTCTTACATATTTGTTTTCT
-932 GGGACATAAAATTTATTCATTTGAAOTACCTATGTGTCAAAAGTATATCTAACCCATAAAAAATATTT
nod P
-862 AGAGACATTTTCAAACCTCAGGATGATTACCCCTTCCGACACA)CTTAAACCA)ATGATGGTCAAGAAAA
-792 AAAATATTAGTAGAAGATTGGCTGATGCCAATTTCTTCCGCGCCCTAAGTATGTCTCTATAAAACATTC
-722 CTAATAGAAAACTTGAACAATTTGCTCTTCAATCAACAAGAAATGAGTACATAGTTTACCATGACA
-652 TCAAAATAAAATCTTAAATCTAAATTTAATACCTTGAATTTGGCAACAATAGCAATATACAAGT
nod
-582 AATAACTAATATTTACTTTTCTCTTCTTACATAAAGATGATGATTAATAGTATTTGATGATGAAT
SBF-1
-512 CAATATTCAATGTATTGGATTTCACTTTTATGATGAAATATTAACACT)AATAAAAAAATACATTC
-442 ATTTTGTTAACTTTTGAGAAACCGTGGCTTGGAAATATTTCTTCCAGCTCATACATAAAAAAAG
-372 TATATTACATACATGAATTTTTAGCCTGGAATTTCTTGGTAATAGATTTGATCATTTCTTAACT
CAAT
-302 CTGCTTACTGGACCA)CAATTTTGAACCAATACACATCTTCACTCAATCATCTAGATAGTTTTCAT
nod TATA
-232 CACTCTTGGTCTCACTTTGCA)ATATA)TTTTCTTATTGGGTGCTCACTGTTAAACCACTATAAGGG
-162 TTCTGTCATTTGTAGAGGCAAAAAGTTAATGTTCTTAATTAATAAAAGAAACCACTCTTAAATCCTT
-92 CAACATTCATTTGCTGTCATTTGCTATATAACTAGTATAGACCTCTTCACTTTGCACTTTAAAGTGC
-22 AATTCTTATTAGAGAAAAAATGGAGCTCAAGTTGGGCTTGGCTTCTCTCC
M E L Q V G L R L P S
+1

```

**Figure 10** : Séquence nucléotidique de la partie 5' du gène *Cg12*. La numérotation a été réalisée par rapport au site d'initiation de la traduction (+1, en gras). Des boîtes TATA et CAAT potentielles sont encadrées ainsi que les motifs spécifiques des nodules (CTCTT), les boîtes P et SBF-1. La séquence correspondant aux 221 premières bases de l'ADNc de *Cg12* est soulignée.

### Analyse de la séquence du promoteur de *Cg12*

#### Promoteur minimal

Nous avons tout d'abord recherché des éléments caractéristiques des séquences promotrices comme les boîtes TATA et CAAT qui interviennent dans l'initiation de la transcription. Une boîte TATA potentielle a été identifiée à la position -211. D'autres séquences qui ressemblent à des boîtes TATA sont

présentes encore plus en amont de l'ADNc. Une boîte CAAT potentielle se situe à la position -275 (Figure 10).

### **Séquences caractéristiques de promoteurs d'autres gènes**

Nous avons ensuite cherché si des séquences caractéristiques de régions promotrices d'autres gènes sont présentes dans le promoteur de *Cg12*. Pour cela des banques de données de sites de liaison de facteurs de transcription (TRANSFAC et EPD) ont été interrogées. Des consensus noduline (CTCTT) ont été recherchés manuellement.

Des consensus noduline ont été trouvés aux positions -231,-566;-871,-1137,-1376 et -1555. Trois sites *SBF1* sont présents aux positions -474,-1103 et -1122 par rapport au début de la traduction (Figure 10). Ces sites *SBF1* présentent une forte ressemblance avec les sites GT-1 trouvés dans de nombreux promoteurs de gènes de plantes inductibles par la lumière (Lawton et coll., 1991). Les sites *SBF1* sont présents dans le promoteur du gène de la chalcone synthase de soja où ils sont reconnus par le facteur de transcription *SBF1* qui agirait comme répresseur transcriptionnel (Lawton et coll., 1991). Trois sites reconnus par l'activateur P de maïs (positions -1479,-1385,-818, Figure 10) ont été identifiés. Ce facteur de transcription P contrôle la pigmentation dans les organes floraux de maïs en activant la voie de biosynthèse des flavonoïdes (Grotewold et coll., 1994). De très nombreux sites de reconnaissance pour les protéines DOF ont été trouvés. Ce sont des protéines à doigts de zinc intervenant dans la régulation de l'expression de nombreux gènes de maïs (Yanagisawa et coll., 1999).

### **Profil d'expression pendant le développement du nodule**

Les constructions *Cg12-Gus*, *Cg12-Gfp* et *Cg12-Eyfp* ont été introduites dans *A. verticillata* à l'aide d'*A. tumefaciens*. La construction *Cg12-Gus* a aussi été introduite dans *C. glauca*. 6-8 mois après la transformation, 45, 35 et 20 lignées transgéniques indépendantes d'*A. verticillata* contenant respectivement les constructions *Cg12-Gus*, *Cg12-Gfp* et *Cg12-Eyfp* ont été obtenues. 2 lignées transgéniques indépendantes ont été obtenues pour *C. glauca*. L'expression des gènes rapporteurs a d'abord été étudiée pour 2-5 plantes de chaque lignée transgénique. Au moins 5 plantes provenant de 10 lignées indépendantes ont été utilisées pour des analyses détaillées.

### **Expression dans les tissus non-symbiotiques et dans les plantes non transformées**

L'expression des gènes rapporteurs a été examinée dans les cals, les rameaux et des racines de chacune des lignées obtenues et des plantes non-transformées. Aucune expression de gènes rapporteurs n'a été détectée dans les tissus non-symbiotiques (Figure

11A-B). Aucune expression n'a été détectée non plus dans les plantes témoin inoculées par *Frankia* (Figure 11, c).

### **Expression précoce**

Une déformation des poils absorbants est détectée 2-3 jours après l'inoculation par *Frankia*. Parallèlement, un brunissement des racines latérales a été observé ainsi qu'un allongement et une déformation très prononcés de certains poils absorbants situés sur de racines latérales courtes. Aucune expression des gènes rapporteurs n'a pu être détectée à ce stade. 15 jours après l'inoculation, l'observation des plantes *Cg12-Gfp* et *Cg12-Eyfp* a permis de détecter une fluorescence dans quelques poils absorbants déformés situés sur des courtes racines latérales (Figure 11D). L'analyse des plantes *Cg12-Gus* correspondantes a permis de confirmer ce résultat. Ces poils absorbants ont été examinés à fort grossissement en contraste interférentiel, ce qui a permis de mettre en évidence la présence de filaments bactériens à l'intérieur (Figure 11F). Trois semaines après l'inoculation de *Frankia*, des renflements sont apparus à la base de ces poils absorbants exprimant *Gfp* ou *Eyfp*, il s'agit des prénodules. Afin de préciser la localisation de l'expression, des coupes transversales et longitudinales épaisses de ceux-ci ont été réalisées. Les gènes rapporteurs sont très fortement exprimés dans certaines des grosses cellules corticales de pré-nodule qui sont infectées par des filaments bactériens (Figure 11G-I). Les autres cellules du pré-nodule n'expriment pas les gènes rapporteurs (Figure 11G-I).

### **Expression dans les nodules**

4 semaines après l'inoculation par *Frankia*, les pré-nodules ont donné naissance à des lobes nodulaires (Figure 11I ; Figure 12). Des coupes longitudinales fines et épaisses ont été réalisées sur ceux-ci pour étudier précisément le profil d'expression des gènes rapporteurs. Dans les lobes nodulaires jeunes (4-6 semaines), une très forte expression des gènes rapporteurs a été observée dans des cellules corticales infectées par *Frankia* situées dans la partie apicale du nodule qui correspondent à la zone d'infection. Une plus faible expression a aussi été détectée dans les cellules plus basales qui correspondent à la zone de fixation. Aucune expression n'a été observée dans d'autres types cellulaires du nodule (Figure 12A)

Dans les lobes nodulaires matures (6-8 semaines), l'expression des gènes rapporteurs dans les cellules corticales infectées s'étend tout au long du lobe nodulaire, avec un maximum dans la zone d'infection et une faible expression dans la zone de fixation qui décroît vers la base du lobe nodulaire (Figure 12B). L'expression des gènes rapporteurs décroît ensuite lentement avec le temps. Dans des nodules âgés de 6 mois ou plus, une faible expression est encore visible dans les cellules corticales qui se situent plus près du pôle apical du lobe nodulaire (Figure 12E).



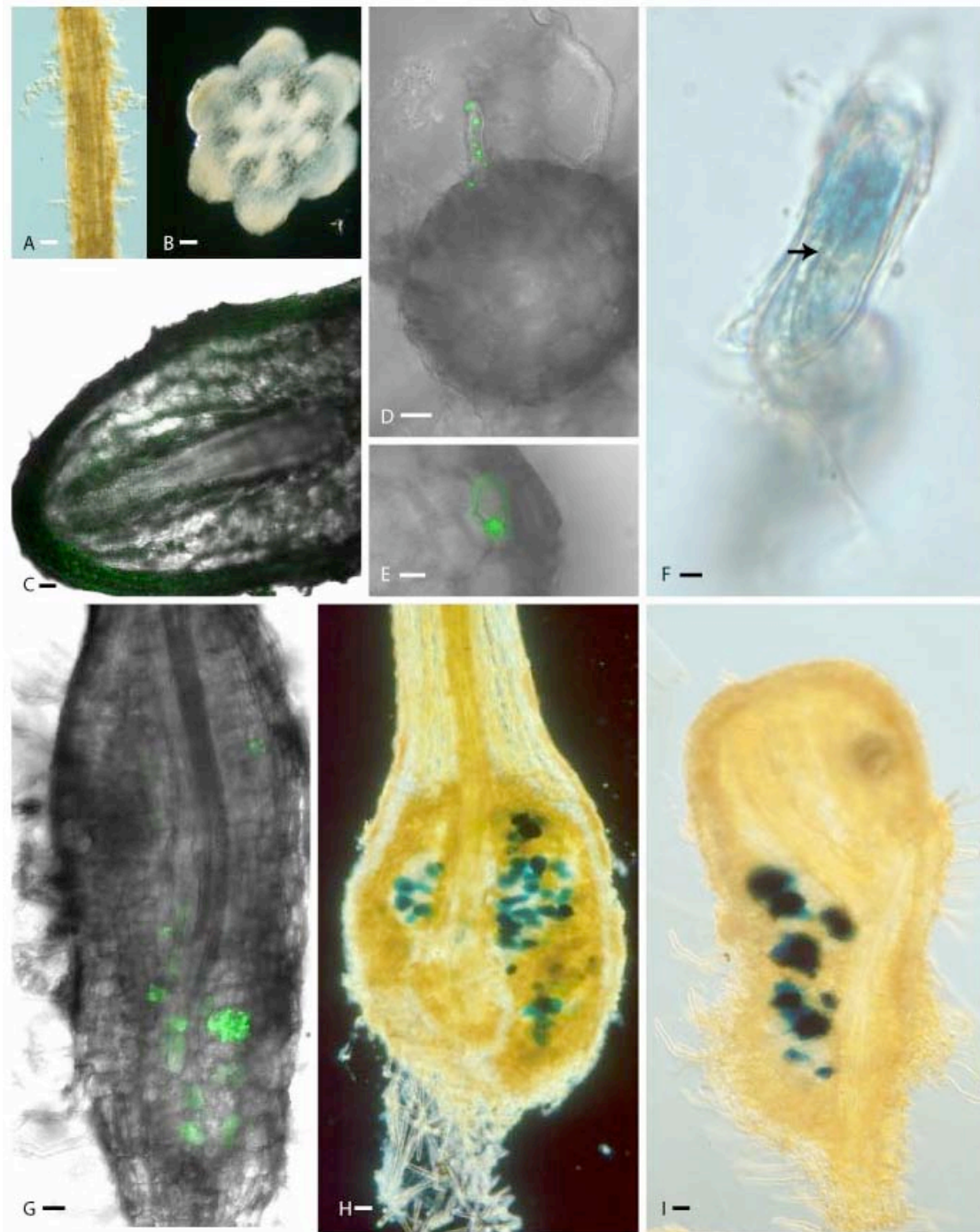


Figure 11 : Analyse de l'expression des gènes rapporteurs Gus et Gfp dans des Casuarinacées. A : racine non inoculée ; B : coupe transversale de rameau ; C : coupe longitudinale de nodule d'une plante non transformée ; D-E coupes transversales de racines d'une plante inoculée avec Frankia 20 jours après inoculation. F : détail d'un poil absorbant contenant des filaments de Frankia à l'intérieur (signalé par une flèche) ; G-H coupes longitudinales de prénodules ; A,B, F, H, I : plantes contenant la construction pCg12-Gus ; D, E, H : plantes contenant la construction pCg12-Gfp ; C : plante témoin non transformée. A, B, C, D, E, G, I : *A. verticillata* ; F, H : *C. glauca* ; C, D, E, G : microscopie confocale. A : barre = 200 mm B, D, H, I : barre = 100 mm ; E, G : barre = 50 mm ; F : barre = 5 mm.



**Figure 12** : Analyse de l'expression des gènes rapporteurs Gus et Gfp dans les Casuarinacées (suite). Coupes longitudinales de lobes nodulaires A : lobe nodulaire de *C. glauca* ; B-E : lobes nodulaires de *A. verticillata*. C : lobe nodulaire d'une plante pCg12-Gfp observé au microscope à épifluorescence. D : détail de (C) ; la flèche indique une paroi lignifiée ; E : lobe nodulaire de *A. verticillata* âgé de 6 mois. A, B, D : plantes contenant la construction pCg12-Gus ; C, D : plante contenant la construction pCg12-Gfp. A-C, E : barre = 200  $\mu$ m D : barre = 50  $\mu$ m.

### ***Etat de différenciation des cellules végétales***

Afin de disposer d'un marqueur de l'état de différenciation des cellules du lobe nodulaire et du prénodule, l'autofluorescence de la lignine a été examinée en parallèle à la fluorescence de la GFP. En effet, lorsque les cellules infectées commencent à fixer

l'azote, leur paroi devient plus épaisse et lignifiée chez *C. glauca* et *A. verticillata* (Berg et McDowell, 1987). L'examen de coupes de prénodules et de lobes nodulaires de plantes *Cg12-Gfp* sous lumière bleue avec un filtre qui laisse passer l'autofluorescence de la lignine au même temps que celle de la GFP permet de constater un gradient inverse entre la fluorescence des parois des cellules corticales et la fluorescence de la GFP (Figure 12C-D).

## Voies de signalisation conduisant à l'expression de *Cg12*

### ***Nature du signal inducteur émis par Frankia***

Les résultats précédents montrent que l'expression des gènes rapporteurs est induite uniquement dans des cellules nouvellement envahies par des filaments de *Frankia*. Cela conduit à l'hypothèse de l'existence d'un signal émis par *Frankia* qui induirait l'expression de *Cg12*.

### ***Induction par des facteurs diffusibles de Frankia***

#### **Spécificité de souche**

Afin d'analyser si des souches de *Frankia* qui n'infectent pas les Casuarinacées peuvent induire une expression de *Cg12*, des plantes transgéniques ont été inoculées avec la souche Ac50-1 isolée chez *Alnus cuminata* et incapable de noduler *A. verticillata*. En parallèle, des plantes ont aussi été inoculées avec la souche Allo2 qui nodule *A. verticillata*.

Les plantes ont été examinées tous les jours pendant deux semaines, puis toutes les semaines pendant deux mois. Les plantes inoculées avec Ac50-1 n'ont pas montré les déformations de poils absorbants observées chez celles inoculées avec Allo2. 2 mois après l'inoculation avec la souche Ac50-1, aucun nodule ou pré-nodule a été observé alors que des nodules étaient apparus sur les plantes inoculées avec Allo2 au bout de 3 semaines. Des amas de *Frankia* étaient cependant visibles autour des racines et leur examen au microscope a permis de confirmer qu'il s'agissait d'hyphes de *Frankia*.

Aucune induction de gènes rapporteurs sous le contrôle du promoteur de *Cg12* n'a pu être observée pendant 2 mois après inoculation de *Frankia* Ac50-1.

#### **Intervention de facteurs diffusibles de *Frankia***

Afin de savoir si des facteurs diffusibles sécrétés par la souche de *Frankia* nodulant *A. verticillata* sont responsables de l'induction de *Cg12*, des racines de plantes transgéniques ont été incubées avec le surnageant de culture de *Frankia* filtré sur un filtre de 0,2  $\mu$ m. Les plantes ont été examinées pendant un mois après l'incubation. Un jour après le traitement, des déformations de poils absorbants semblables à celles obtenues lors d'une inoculation de *Frankia* ont été observées. Cependant aucune expression de gène rapporteur n'a pu être détectée.

#### **Nécessité d'une communication chimique entre les deux partenaires.**

La production de certains facteurs pourrait être induite uniquement en réponse à des facteurs provenant de la plante hôte. C'est le cas par exemple pour les facteurs Nod des Légumineuses dont la production a lieu en réponse à une stimulation par des flavonoïdes en provenance de la plante. Dans ce contexte, un inoculum de *Frankia* a été placé dans une membrane de dialyse au contact de racines de plantes transgéniques. Comme avec le filtrat de culture, des déformations de poils absorbants ont été observées,

mais aucune expression de gènes rapporteurs n'a pu être détectée.

### ***Induction par des facteurs Nod de rhizobia***

Chez les Légumineuses, l'expression de nombreux gènes de nodulines précoces peut être induite par l'application exogène de facteurs Nod purifiés (Miklashevichs et coll., 2001). *MtEnod11*, par exemple, est induit dans tout l'épiderme racinaire si des racines de *M. truncatula* sont traitées par des facteurs Nod purifiés (Cullimore et coll., 2001). De même, l'expression de *Enod5* dans les poils absorbants peut être induite par une application exogène de facteurs Nod (Horvath et coll., 1993). Chez les plantes actinorhiziennes, les équivalents des facteurs Nod n'ont pas encore été isolés. Cependant, comme de nombreux mécanismes communs existent entre les deux symbioses, il se pourrait que l'expression de certaines nodulines actinorhiziennes soit activée par des facteurs Nod. Afin de déterminer la possibilité d'une induction de *Cg12* par des facteurs Nod de Légumineuses, des plantes transgéniques ont été traitées avec différentes concentrations (1 nM-1  $\mu$ M) de facteurs Nod purifiés à partir de la souche de *Sinorhizobium fredii* NGR234. Cette souche a été utilisée car elle possède un très large spectre d'hôte chez les Légumineuses, elle est également capable de noduler la non Légumineuse *Parasponia*.

L'expression des gènes rapporteurs a été suivie toutes les heures pendant les 6 premières heures, tous les jours pendant une semaine et toutes les semaines pendant un mois. Aucune expression des gènes rapporteurs et aucune déformation de poils absorbants n'a pu être détectée.

### ***Implication de phytohormones***

L'expression de certaines nodulines de Légumineuses peut être induite en réponse à l'application exogène d'hormones. C'est le cas par exemple chez *Trifolium repens* où l'expression de *Enod40* est induite par l'application d'auxine (Mathesius et coll., 2000). Afin de savoir si des traitements hormonaux peuvent induire l'expression de *Cg12*, des plantes transgéniques ont été mises en contact avec différentes concentrations d'hormones végétales (Tableau 3).

Les systèmes racinaires mis en présence de 10  $\mu$ M de 2,4D ont développé de nombreuses racines latérales une semaine après le début de l'expérience (Figure 13 A-B). Un mois après, des racines latérales se sont épaissies en prenant un aspect semblable à celui des nodules (Figure 13C). Des coupes réalisées sur ces racines épaissies ont permis de constater une structure semblable à un nodule : ces racines ne possèdent pas de coiffe ni de poils absorbants, ont un cortex très développé, une stèle centrale et un périoderme épais (Figure 13D). Une coloration de ces coupes au bleu de toluidine a permis de vérifier l'absence de *Frankia* à l'intérieur et une importante lignification de périoderme (Figure 13E). En présence d'inhibiteurs de transport d'auxine les systèmes racinaires ont développé très peu de racines latérales. Les racines existantes ont continué à grandir sans former de racines latérales

(Figure 13F). Deux mois après le traitement, aucune structure ressemblant à un nodule n'a pu être observée. En présence de cytokinine, certaines racines ont développé des épaississements. Contrairement aux plantes mises en présence d'auxines, les épaississements observés ici se situent sur des racines préexistantes (Figure 13G). Dans certains cas, des cals sont apparus sur quelques racines (Figure 13G). La présence d'acide abscissique et d'acide gibbérellique n'a pas produit d'effets phénotypiques. Pour l'ensemble de ces expériences, aucune expression des gènes rapporteurs n'a pu être détectée.

**Tableau 3** Traitements réalisés sur les plantes transgéniques d'*A. verticillata*

Traitement	Concentration finale
Acide 1,4-dichlorophenoxyacétique (2,4D) (Sigma-Aldrich, Allemagne)	1 $\mu$ M (en solution sur les racines) 10 $\mu$ M (en solution sur les racines)
Méthyl jasmonate (MeJa) (Interchim, Montluçon, France)	10 $\mu$ M (en solution sur les racines) 10 $\mu$ L déposés dans une boîte de 3 litres
Acide Gibbérellique (GA) (Sigma-Aldrich)	10 $\mu$ M (en solution sur les racines)
Benzylaminopurine (BA) (Sigma-Aldrich)	10 $\mu$ M (en solution sur les racines) 100 $\mu$ M (en solution sur les racines)
Acide Cis-trans-abscissique (ABA) (Sigma-Aldrich)	10 $\mu$ M (en solution sur les racines)
Acide Salicylique (AS) (Prolabo, France)	1 mM (en solution sur les racines) 1 mM avec 0.01% (V/V) de Silwett L77 (aspersion)
Acide N-1 Naphthylphthalamic (NPA) (Sigma-Aldrich)	10 $\mu$ M (en solution sur les racines) 100 $\mu$ M (en solution sur les racines)
Facteurs Nod de la souche NGR234 de <i>Sinorhizobium fredii</i> (fournis par W. J. Broughton).	1 $\mu$ M (en solution sur les racines) 1 $\mu$ M (en solution sur les racines)
Mas-7 (BioMol res. Labs, Plymouth ... USA)	0.2 $\mu$ M (en solution sur les racines) 2 $\mu$ M (en solution sur les racines)

Lors des premières étapes de la symbiose rhizobia-Légumineuses, des réactions similaires aux réactions de défense ont lieu dans la plante. Par ailleurs, l'expression de *Cg12* dans les cellules infectées pourrait correspondre à une réaction de défense. Afin de savoir si l'expression de *Cg12* est induite au cours de réactions de défense, deux hormones qui induisent des réactions de défense ont été appliquées sur des plantes transgéniques : l'acide salicylique et un analogue de l'acide jasmonique, le méthyl jasmonate (Tableau 3). L'aspersion d'acide salicylique sur les parties aériennes des plantes transgéniques a provoqué un dessèchement des rameaux suivi à certains points d'une nécrose semblable à une réaction hypersensible. Le méthyl jasmonate n'a pas produit d'effets phénotypiques. Aucune de ces deux hormones n'a induit l'expression des gènes rapporteurs.

## Implication des protéines G

Chez *M. sativa*, il a été montré récemment que certains agonistes des protéines G comme le Mastoparan ou le MAS-7 induisent l'expression de la noduline précoce *Enod12*, laissant supposer un rôle des protéines G dans la transduction du message qui active la transcription de *MtEnod12* (Pingret et coll., 1998). Afin de savoir si des protéines G interviennent dans l'induction de l'expression de *Cg12*, les systèmes racinaires de plantes transgéniques ont été mis en présence de MAS-7 et l'expression des gènes rapporteurs a été suivie pendant 1 mois. Aucune expression des gènes rapporteurs n'a pu être détectée.

## Induction pendant la mycorhization

Chez les Légumineuses, de nombreuses nodulines sont exprimées lors de la formation d'endomycorhizes (Miklashevichs et coll., 2001). Des mutants de pois (*PsSym8*, *PsSym1*...) ou de *M. truncatula* (*MtDmi1*, *MtDmi2* ou *MtDmi3*) sont incapables de former des nodules et des mycorhizes, ce qui montre l'existence de mécanismes communs entre les deux types de symbiose (Hirsch et coll., 2001). Afin d'analyser si *Cg12* est exprimé pendant les symbioses mycorhiziennes, l'expression des gènes rapporteurs a été analysée dans des plantes transgéniques mycorhizées.

## Effet de l'ectomycorhization

10 plantes transgéniques de *A. verticillata* ont été inoculées avec le champignon ectomycorhizien *Pisolithus alba* et l'expression des gènes rapporteurs a été examinée pendant un mois au cours de la formation des ectomycorhizes.

Une semaine après l'inoculation, des filaments mycéliens ont commencé à entourer des jeunes racines latérales et à constituer le réseau mycorhiziens (Figure 13H). Deux semaines après l'inoculation des racines entièrement mycorhizées étaient visibles (Figure 13J). Des coupes transversales réalisées sur ces racines ont permis de déceler l'organisation habituelle de racines ectomycorhizées avec le manteau fongique à la surface de la racine et le réseau de Hartig entre les cellules épidermiques (Figure 13I).

Aucune activité GUS et aucune fluorescence de GFP ou EYFP n'a pu être détectée chez ces plantes, ce qui suggère que *Cg12* ne s'exprime pas au cours de la symbiose ectomycorhizienne.

## Effet de l'endomycorhization

18 plantes transgéniques d'*A. verticillata* et 2 plantes transgéniques de *C. glauca* ont été inoculées avec des spores du champignon endomycorhizien *Glomus intraradices*. 6 semaines après l'inoculation, des arbuscules et des diazovésicules ont pu être observés dans les racines des plantes transgéniques (Figure 13K). Aucune expression de gènes rapporteurs n'a pu être détectée.

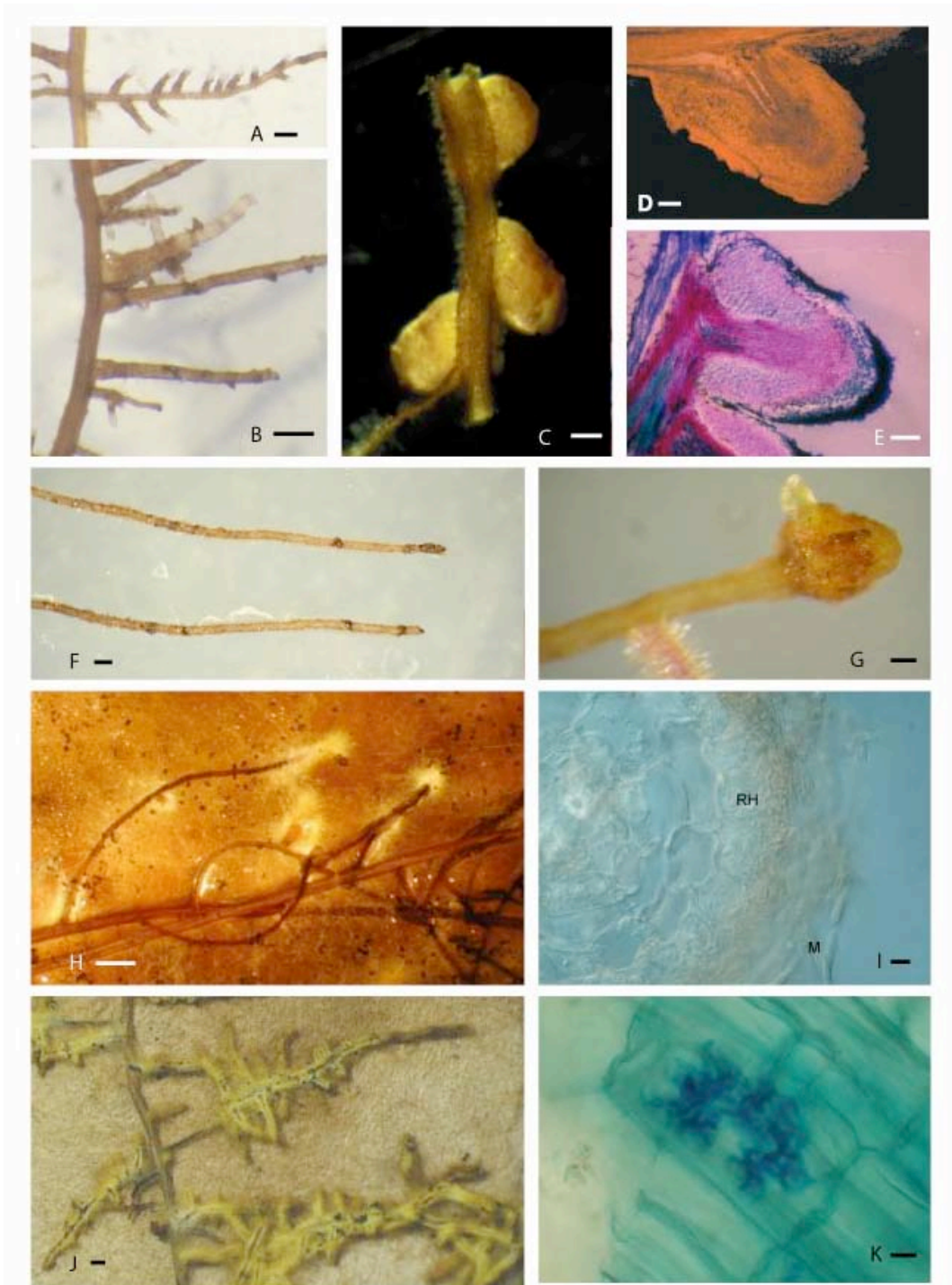


Figure 13 : A-E : Effets provoqués par l'incubation de racines d'*A. verticillata* en présence d'auxine (2,4D, 10 mM). Une semaine après le traitement de nombreuses racines latérales (rl) se développent (A) ; deux semaines après la base des racines latérales s'épaissit (B) pour donner des pseudonodules (C-E) un mois après. D, E : coupes de longitudinales de pseudonodules ; D : sans coloration ; E : coloré au bleu de toluidine. F, G : racines d'*A. verticillata* un mois après incubation avec un inhibiteur de transport d'auxine (TIBA, 10 mM) (F) ou une cytokinine (BA, 10 mM). H-J : ectomycorhization des racines d'*A. verticillata* : les hyphes mycéliens entourent les racines latérales une semaine après inoculation (H) ; des racines latéralement ectomycorhizées sont visibles deux semaines après (J). I : coupe transversale d'une racine ectomycorhizée. RH : réseau de Hartig. M : manteau fongique. K : arbuscule endomycorhizien coloré au bleu trypan 2 mois après l'inoculation d'*A. verticillata* par *Glomus intraradices*. A , B, H-J : barre = 500  $\mu$ m ; C, F, G : barre = 200  $\mu$ m ; D-E : barre = 100  $\mu$ m ; I, K barre = 10  $\mu$ m.

## Discussion

### Analyse de la séquence du promoteur

Les séquences consensus de gènes de nodulines trouvés dans la séquence du promoteur de *Cg12* sont conservés chez la plupart des gènes de nodulines des Légumineuses. Ils pourraient contribuer à la spécificité nodulaire des gènes qui codent la leghémoglobine de soja et de *Sesbania rostrata*, des gènes *N20*, *N23*, *N23*, *N24* et *Enod2* de soja et de l'aspartate aminotransférase de luzerne (Sandal et coll., 1987 ; Yoshioka et coll., 1999). Ces motifs sont aussi présents dans des gènes spécifiquement exprimés dans les nodules actinorhiziens comme ceux des gènes codant l'hémoglobine symbiotique ou la métallothionéine *CgMt1* de *C. glauca*, où ils pourraient jouer le même rôle que chez les Légumineuses (Franche et coll., 1998b ; Laplace et coll., 2002). La présence de ces séquences dans la région promotrice de *Cg12* pourrait également contribuer à sa spécificité nodulaire.

Plusieurs sites caractéristiques de gènes qui interviennent dans la biosynthèse des flavonoïdes ont été trouvés dans le promoteur de *Cg12*. Les sites *SBF1* présentent une forte ressemblance avec les sites *GT-1* trouvés dans de nombreux promoteurs de gènes de plantes inductibles par la lumière (Lawton et coll., 1991). Ces sites sont présents dans le promoteur du gène de la chalcone synthase de soja où ils sont reconnus par le facteur de transcription *SBF1* qui agirait comme répresseur transcriptionnel (Lawton et coll., 1991). Des sites de liaison pour le facteur de transcription qui contrôle la pigmentation dans les organes floraux de maïs en activant la voie de biosynthèse des flavonoïdes ont été identifiés (Grotewold et coll., 1994). Les flavonoïdes jouent un rôle très important dans les interactions plantes-microorganismes. La synthèse de flavonoïdes est induite en réponse aux attaques des pathogènes (Dixon et coll., 1995). Chez les Légumineuses, les flavonoïdes sécrétés par les racines induisent la transcription des gènes de nodulation des rhizobia (gènes *Nod*). Les produits des gènes *Nod* interviennent dans la biosynthèse des facteurs de nodulation (facteurs *Nod*) indispensables pour la reconnaissance de la bactérie par la plante hôte et l'induction de la morphogenèse nodulaire. Chez les plantes actinorhiziennes, peu de choses sont actuellement connues sur l'implication des composés phénoliques au cours de l'interaction symbiotique entre les deux partenaires. Récemment, Laplace et coll. (1999) ont étudié l'accumulation des composés phénoliques au cours de l'interaction *C. glauca*-*Frankia*. Ces auteurs ont montré que les flavonoïdes s'accumulent dans les nodules en délimitant des compartiments qui pourraient restreindre l'invasion des endophytes et aussi former une barrière à la diffusion de l'oxygène. Ces auteurs ont également mis en évidence une expression spécifique du gène de la chalcone synthase, enzyme clé de la voie de biosynthèse des flavonoïdes, dans des cellules spécialisées du nodule qui accumulent les flavanes (Laplace et coll., 1999). Il est intéressant de noter que *Cg12* est exprimé dans les cellules en cours

d'infection qui sont également le siège d'une faible expression de chalcone synthase.

De très nombreux sites de reconnaissance pour les protéines DOF ont été trouvés. Ce sont des protéines à doigts de zinc intervenant dans la régulation de l'expression de nombreux gènes de maïs (Yanagisawa et coll., 1999). Des sites de reconnaissance pour des protéines "Myb-like" ont aussi été trouvés avec des scores très élevés. Les protéines "myb-like" sont des facteurs de transcription caractérisés en particulier chez le Pétunia, spécifiques de l'épiderme (Solano et coll., 1995). Ce sont des motifs intéressants également car ils sont présents aussi dans les promoteurs de gènes régulés par les gibbérellines, hormones qui interviendraient aussi dans les symbioses actinorhiziennes (Hirsch et coll., 1992).

### *Cg12* est exprimé dans les cellules en cours d'infection

En utilisant des Casuarinacées transgéniques, le profil d'expression conféré par le promoteur de *Cg12* à des gènes rapporteurs a été étudié. Nous avons montré que l'expression a lieu dans poils absorbants infectés par *Frankia* et dans les cellules infectées du pré-nodule et du cortex nodulaire.

### ***Une expression précoce liée à l'infection des poils absorbants***

L'expression des gènes rapporteurs commence deux semaines après l'inoculation, dans les poils absorbants déformés qui contiennent des filaments de *Frankia*. *Cg12* s'exprime donc dès les premières étapes de l'infection, quand les filaments de *Frankia* infectent des poils absorbants. Parmi les gènes de nodulines actinorhiziennes caractérisées jusqu'à présent, *Cg12* est celle qui est détectée le plus tôt au cours du processus symbiotique.

L'expression a été mise en évidence dans très peu de poils absorbants. Chez une espèce proche de *C. glauca*, *C. cunninghamiana*, des filaments de *Frankia* ont été détectés dans environ un poil absorbant sur 100 (Torrey, 1976). Ce résultat est en accord avec la fréquence d'expression des gènes rapporteurs dans les poils absorbants de *A. verticillata* et suggère que leur infection est liée l'expression de *Cg12*. En absence d'outils génétiques permettant de transformer *Frankia* et d'avoir un marquage spécifique, nous n'avons pas pu détecter l'existence de poils absorbants infectés qui n'expriment pas les gènes rapporteurs.

### ***Une expression dans les cellules en cours d'infection du nodule et du pré-nodule***

Une forte expression des gènes rapporteurs a été détectée dans les nodules et les pré-nodules de *A. verticillata* et *C. glauca*. Dans les nodules, l'expression est forte dans les cellules infectées de la zone d'infection et décroît dans la zone de fixation. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par hybridation *in situ* (Laplace et coll., 2000a ; Laplace et coll., 2000b). Dans les nodules et pré-nodules des plantes transformées avec la construction *Cg12-Gfp*, la fluorescence de GFP est élevée dans des cellules

infectées peu lignifiées, elle est plus faible dans les cellules à parois plus épaisses et lignifiées. La fixation de l'azote dans les cellules infectées est corrélée à l'épaississement et à la lignification de leurs parois (Berg et McDowell, 1987). Dans le pré-nodule ou le nodule, *Cg12* est donc fortement exprimé dans des cellules infectées par *Frankia* en cours de différenciation qui ne fixent pas encore l'azote, l'expression diminue dès que les cellules sont différenciées et fixent l'azote.

L'expression des gènes rapporteurs dans les pré-nodules est donc comparable à celle observée dans les nodules. Dans les deux cas, l'expression est détectée dans deux types de cellules infectées : dans les cellules peu différenciées l'expression est forte et dans les cellules plus différenciées l'expression devient plus faible. Le pré-nodule est un organe symbiotique fonctionnel qui contient des cellules fixatrices d'azote semblables à celles que du cortex des nodules (Laplaze et coll., 2000b). Nos résultats confirment la ressemblance entre ces deux organes : le contexte transcriptionnel des cellules infectées du nodule est le même, en ce qui concerne *Cg12*, que celui du pré-nodule.

Dans le système que nous avons utilisé la croissance des lobes nodulaires s'arrête dès que ceux-ci ont atteint 5-6 mm de longueur. Dans les nodules âgés (>6 mois) il n'y a donc plus de zone d'infection car le méristème ne fonctionne plus et l'infection des cellules corticales est terminée. L'expression des gènes rapporteurs dans ces nodules est faible, limitée à quelques cellules infectées ou inexistante. Les cellules qui continuent à exprimer *Cg12* à ce stade seraient les dernières à avoir été envahies. Cette expression résiduelle est l'équivalent de celle observée dans la zone de fixation de lobes nodulaires plus jeunes. Dans ces nodules âgés, la zone de sénescence est importante. Chez l'aulne, le gène *AgNOD-CP1* qui code une protéase à cystéine est exprimé dans les nodules. Un rôle de cette protéase dans la sénescence a été proposé (Goetting-Minesky et Mullin, 1994). Aucune expression de gènes rapporteurs n'a été détectée au niveau de la zone de sénescence chez *A. verticillata*, ce qui suggère que *Cg12*, contrairement à *AgNOD-CP1* ne serait pas impliqué dans ce phénomène.

### **Une expression spécifique des tissus symbiotiques**

Aucune expression des gènes rapporteurs n'a pu être détectée dans les tissus non symbiotiques. Or une faible expression de *Cg12* a été mise en évidence dans les rameaux de *C. glauca* par RT-PCR (Laplaze et coll., 2000a). Ce résultat pourrait être dû à la plus forte sensibilité de la technique RT-PCR par rapport à celle des gènes rapporteurs : le niveau d'expression de *Cg12* au niveau des rameaux serait trop faible pour produire une quantité de GUS ou de GFP détectable. Comme plusieurs dizaines de gènes codant des subtilases sont généralement présents chez les plantes, il est possible également que le signal détecté par RT-PCR au niveau des rameaux corresponde à l'expression d'un gène différent.

## **Etude des voies de signalisation**

La nature du signal qui induit l'expression de *Cg12* dans les cellules en cours d'infection par *Frankia* a été étudiée en traitant les plantes transgéniques avec des composés inducteurs potentiels.

### **Signal non diffusible lié à l'infection**

Des déformations de poils absorbants ont été détectées 8 heures après l'inoculation de *Frankia*. Cependant aucune expression de gènes rapporteurs n'a pu être détectée avant 2 semaines. En outre, un filtrat de culture de *Frankia* ou des *Frankia* séparés des racines par une membrane de dialyse provoquent des déformations de poils absorbants mais n'induisent pas l'expression des gènes rapporteurs. Ces résultats suggèrent la nécessité d'un contact très étroit entre les cellules de la plante et les hyphes de *Frankia* pour induire l'expression de *Cg12*. Le signal de *Frankia* qui déclenche l'expression de *Cg12* est différent du signal diffusible responsable de la déformation des poils absorbants. L'inoculation avec la souche Ac50-1 n'induit pas non plus l'expression des gènes rapporteurs. Ceci est également en accord avec une expression de *Cg12* spécifiquement liée à la pénétration des hyphes de *Frankia* dans les cellules végétales car cette souche est incapable d'infecter les racines d'*A. verticillata*.

### **Les facteurs Nod de rhizobia ne sont pas reconnus**

Les facteurs Nod jouent un rôle important dans la symbiose rhizobia-Légumineuses, de très faibles quantités (< 1 nM) suffisent pour induire l'expression de nodulines précoces et parfois l'organogénèse de nodules chez les Légumineuses (Miklashevichs et coll., 2001). Récemment, le clonage positionnel d'une kinase de type récepteur qui intervient dans la transduction du signal provoqué par les facteurs Nod a été réalisé. Cette protéine intervient également dans la transduction d'un signal requis pour la symbiose endomycorhizienne, il existe donc des mécanismes communs de reconnaissance pour les deux symbioses (Endre et coll., 2002 ; Stracke et coll., 2002). Chez le riz, l'expression de gènes rapporteurs sous le contrôle du promoteur de *MtEnod12* de *M. truncatula* peut être induite en réponse à un traitement avec des facteurs Nod de rhizobia (Reddy et coll., 1998). Des espèces relativement éloignées des Légumineuses comme le riz sont donc capables de répondre à une induction des facteurs Nod.

Nous avons cherché à savoir si l'induction de *Cg12* pouvait être déclenchée chez *A. verticillata* par une application exogène de facteurs Nod purifiés. Aucune transcription de gènes rapporteurs n'a pu être détectée après des traitements aux facteurs Nod, ce qui suggère que les facteurs Nod ne sont pas reconnus chez *A. verticillata* comme un signal inducteur de l'expression de *Cg12*. Chez l'aulne et chez *C. glauca*, les facteurs Nod ne provoquent aucune réaction morphologique (Van Ghelue et coll., 1997 ; Cérémonie et coll., 1999 ; C. Santi, communication personnelle) et des différences structurelles et fonctionnelles existent entre les facteurs Nod et les facteurs déformants de

*Frankia* (Cérémonie et coll., 1999). Des essais de complémentation de mutants de rhizobia affectés dans la synthèse de facteurs Nod par de l'ADN de *Frankia* n'ont jamais abouti (Cérémonie et coll., 1998). Ces résultats sont en accord avec l'absence d'induction de *Cg12* par des facteurs Nod : les deux symbioses ne partageraient pas les mêmes molécules de signalisation précoce.

### **Les phytohormones ne sont pas impliquées**

Les phytohormones jouent un rôle important dans l'organogenèse des nodules. Chez l'aulne, l'application de cytokinines conduit à l'apparition de pseudonodules (Rodriguez-Barrueco et Bermudez de Castro, 1973). L'application d'inhibiteurs de transport d'auxines comme le NPA ou le TIBA conduit également à l'apparition de pseudonodules chez *C. glauca* et *A. verticillata* (C. Santi, communication personnelle). La ressemblance morphologique entre les pseudonodules et les nodules permet de penser que certains des gènes qui interviennent dans organogenèse des nodules sont exprimés dans les pseudonodules.

En présence de fortes concentrations d'auxines et de cytokinines, des pseudonodules ont été obtenus chez *A. verticillata*. Les pseudonodules induits par les traitements auxiniques sont très semblables aux nodules symbiotiques : ce sont des racines latérales modifiées dépourvues de coiffe avec une stèle centrale, un périoderme périphérique épais et lignifié et un cortex très développé. Aucune expression de gènes rapporteurs n'a pu être détectée dans les pseudonodules, ce qui suggère que la transcription de *Cg12* n'est pas activée lors de organogenèse des pseudonodules. Nous avons montré auparavant que l'expression de *Cg12* est liée à l'infection des cellules par *Frankia*. Il est possible que l'absence d'induction de l'expression des gènes rapporteurs dans les pseudonodules soit due à l'absence de bactéries dans les cellules.

Chez les Légumineuses, l'expression de nombreuses nodulines précoces est induite par des traitements hormonaux. L'expression d'*Enod2*, *Enod12* et *Enod40* par exemple est induite par des traitements de cytokinines ou des inhibiteurs de transport d'auxine (Hirsch et coll., 1997 ; Bauer et coll., 1996 ; Scheres et coll., 1992 ; Assad et coll., 1994 ). En utilisant les plantes transgéniques nous avons étudié l'effet de plusieurs hormones végétales sur l'induction de l'expression de *Cg12*. Aucun des traitements avec des phytohormones n'induit l'expression des gènes rapporteurs chez *A. verticillata*, ce qui suggère que ces hormones ne sont pas directement impliquées dans l'induction de *Cg12*.

### **L'expression de *Cg12* n'est pas associée aux réactions de défense**

Lors des premières étapes de la symbiose rhizobia-Légumineuses, des réactions similaires aux réactions de défense ont lieu dans la plante. Chez *M. truncatula*, les protéines de défense comme *MtN1* et *MtN2* sont exprimées (Gamas et coll., 1998) ; chez *M. sativa*, une production d'AOS est déclenchée (Mithofer et coll., 2002). Chez les plantes actinorhiziennes, l'expression

de certains gènes dans les nodules a été associée à un mécanisme de défense : c'est le cas du gène *AgNod-CP1* qui code une protéase à cystéine d'aulne (Goetting-Minesky et Mullin, 1994), du gène *EuNodCHT2* qui code une chitinase d'*E. umbellata* (Kim et An, 2002) et du gène *CgCHS* qui code une chalcone synthase de *C. glauca* (Laplaze et coll., 1999). Chez la tomate, l'expression de certains gènes codant des subtilases est induite par une attaque pathogène ou l'application exogène d'acide salicylique (Jorda et coll., 1999). Certaines subtilases comme SBP50 ou P69 pourraient intervenir dans les réactions de défense des plantes (Schaller et Ryan, 1994 ; Jorda et coll., 1999). Nous avons montré que chez *A. verticillata*, l'application de d'acide salicylique ou de méthyl jasmonate ne provoque pas l'expression des gènes rapporteurs. Aucune expression de gènes rapporteurs n'a lieu non plus en réponse à des blessures. Ces résultats suggèrent que la voie de signalisation qui conduit à l'expression de *Cg12* est indépendante de celles qui sont activées en réponse à des attaques pathogènes ou aux blessures.

### **L'expression de *Cg12* ne dépend pas de l'activation de protéines G**

Les récepteurs des facteurs Nod sont encore inconnus chez les Légumineuses. Par une approche pharmacologique, Pingret et coll. (1998) ont montré que des agonistes des protéines G comme le mastoparan ou le MAS-7 induisent l'expression de nodulines précoces comme *MtEnod12*, de manière analogue à une application exogène de facteurs Nod. Des antagonistes des protéines G suppriment l'effet d'une application de facteurs Nod. Nous avons montré que chez *A. verticillata*, l'application exogène de MAS-7 n'induit pas l'expression des gènes rapporteurs, ce qui suggère que les protéines G ne sont pas directement impliquées dans l'activation de la transcription de *Cg12*.

### **L'expression de *Cg12* n'est pas induite dans les mycorhizes**

Nous avons étudié l'expression des gènes rapporteurs dans des plantes transgéniques ecto- ou endomycorhizées. Dans les deux cas, aucune expression de gènes rapporteurs n'a pu être détectée, ce qui suggère que l'expression de *Cg12* n'est pas induite lors des symbioses mycorhiziennes. Les signaux qui induisent l'expression de *Cg12* en réponse à *Frankia* ne seraient donc pas présents pour les symbioses mycorhiziennes et *Cg12* ne serait pas impliqué dans celles-ci.

L'expression de nombreuses nodulines de Légumineuses est induite au cours de l'endomycorhization. C'est le cas pour *Enod2*, *Enod5* ou *Enod40* (Van Rhijn et coll., 1997 ; Albrecht et coll., 1998). De plus certains mutants comme *PsSym8* ou *PsSym1* chez le pois ou (*MtDmi1*, *MtDmi2* et *MtDmi3*) chez *M. truncatula* sont incapables de former des nodules et des mycorhizes, ce qui montre l'existence d'une voie de signalisation partagée par les deux symbioses (Hirsch et coll., 2001).

Chez les plantes actinorhiziennes, l'expression de



nodulines dans des racines mycorhizées n'a pas été décrite. Nos résultats concernant *Cg12* suggèrent qu'il existe au moins une voie de signalisation activée en

réponse à *Frankia* qui n'est pas activée lors de la mycorhization.

## Deuxième partie : Localisation de la protéine CG12

---

### Introduction

---

Dans le chapitre précédent a été décrite l'analyse du profil d'expression de *Cg12* grâce à l'utilisation de plantes transgéniques contenant des fusions promoteur *Cg12*-gène rapporteur. Cela nous a permis de décrire de façon précise la régulation transcriptionnelle de *Cg12*. Cependant la régulation de l'expression d'un gène peut se faire également au niveau post-transcriptionnel. Aucune donnée concernant la régulation post-transcriptionnelle de l'expression de *Cg12* n'était disponible au début de cette étude.

Afin de pouvoir détecter la protéine CG12, il faut disposer d'anticorps spécifiques. Ceux-ci ont été obtenus à partir de peptides de synthèse correspondant à des sites potentiellement antigéniques de CG12 qui ont été couplés à une protéine porteuse et injectés à un lapin. Le sérum correspondant a ensuite été utilisé pour détecter la protéine CG12 dans des extraits protéiques de rameaux, de feuilles et de nodules de *C. glauca*. Les anticorps anti-CG12 ont également été utilisés sur des coupes de nodules de *C. glauca* pour immunolocaliser la protéine CG12.

La présence d'un signal peptide potentiel sur la séquence protéique déduite de *Cg12* suggère que dans les cellules qui expriment *Cg12*, la protéine mature est excrétée au niveau du compartiment extracellulaire. Afin de vérifier cette hypothèse, des coupes de nodules de *C. glauca* incubées avec les anticorps anti-CG12 ont été examinées au microscope à fluorescence et au microscope électronique à transmission.

### Résultats

---

#### Spécificité et purification des anticorps anti-CG12

Afin d'évaluer la spécificité de reconnaissance des anticorps anti-CG12, les peptides de synthèse ayant servi à obtenir les anticorps ont été couplés à une membrane de nitrocellulose. Parallèlement, des extraits protéiques de rameaux, de racines et de nodules ont été déposés.

Après avoir incubé la membrane avec le sérum, la présence d'immunoglobulines de lapin ayant reconnu les peptides ou les protéines liées à la membrane a été révélée avec un anticorps secondaire qui reconnaît les IgG de lapin couplé à la peroxidase. Un fort signal a

été obtenu pour les dépôts correspondant aux deux peptides et pour les extraits de nodules. Le signal au niveau des feuilles et des racines est très faible, le sérum utilisé contient donc des anticorps qui reconnaissent les peptides de synthèse et des protéines présentes dans les nodules.

Afin de disposer d'anticorps purifiés, le sérum a été purifié sur une colonne d'affinité qui permet de cribler uniquement les IgG. Une purification des deux types d'anticorps présents dans le sérum, correspondant à chacun des deux peptides de synthèse a été réalisée en couplant chacun des deux peptides à une colonne d'affinité.

#### Localisation de CG12 par Western-Blot

Comme les dépôts sur membrane (DOT BLOT) ne donnent aucune information sur la taille des protéines détectées par les anticorps, les anticorps anti-CG12 ont ensuite été utilisés pour détecter la protéine CG12 au niveau d'extraits protéiques séparés par SDS-PAGE (Figure 14). Afin de déterminer si les anticorps anti-CG12 reconnaissent des protéines de *Frankia*, des extraits protéiques de *Frankia* ont également été analysés.

Les anticorps anti-CG12 reconnaissent une bande à environ 95-100 kD pour les extraits de nodules. Aucun signal ne peut être détecté pour les extraits de feuilles ou de racines non infectées. Pour les extraits de *Frankia*, des protéines de 90, 80 et 60 kDa sont reconnues par les anticorps anti-CG12.

Afin de d'accroître la spécificité du signal détecté, les anticorps ont été purifiés sur des colonnes sur lesquelles les peptides de synthèse utilisés pour produire les anticorps ont été fixés. Cela nous a permis de disposer d'anticorps qui reconnaissent spécifiquement les épitopes correspondants à chacun des deux peptides de synthèse (Ac1 et Ac2). Les anticorps ainsi purifiés ont ensuite été utilisés comme précédemment sur des extraits protéiques de nodules, de rameaux et de *Frankia*. Les résultats présentés à la figure 14 montrent que les deux types d'anticorps reconnaissent une protéine dans les nodules d'un PM de environ 95-100 kDa. Les anticorps Ac1 reconnaissent une protéine d'environ 90 kDa dans les extraits de *Frankia*, alors que les anticorps Ac2 reconnaissent en plus deux autres protéines, de 60 et 80 kDa.

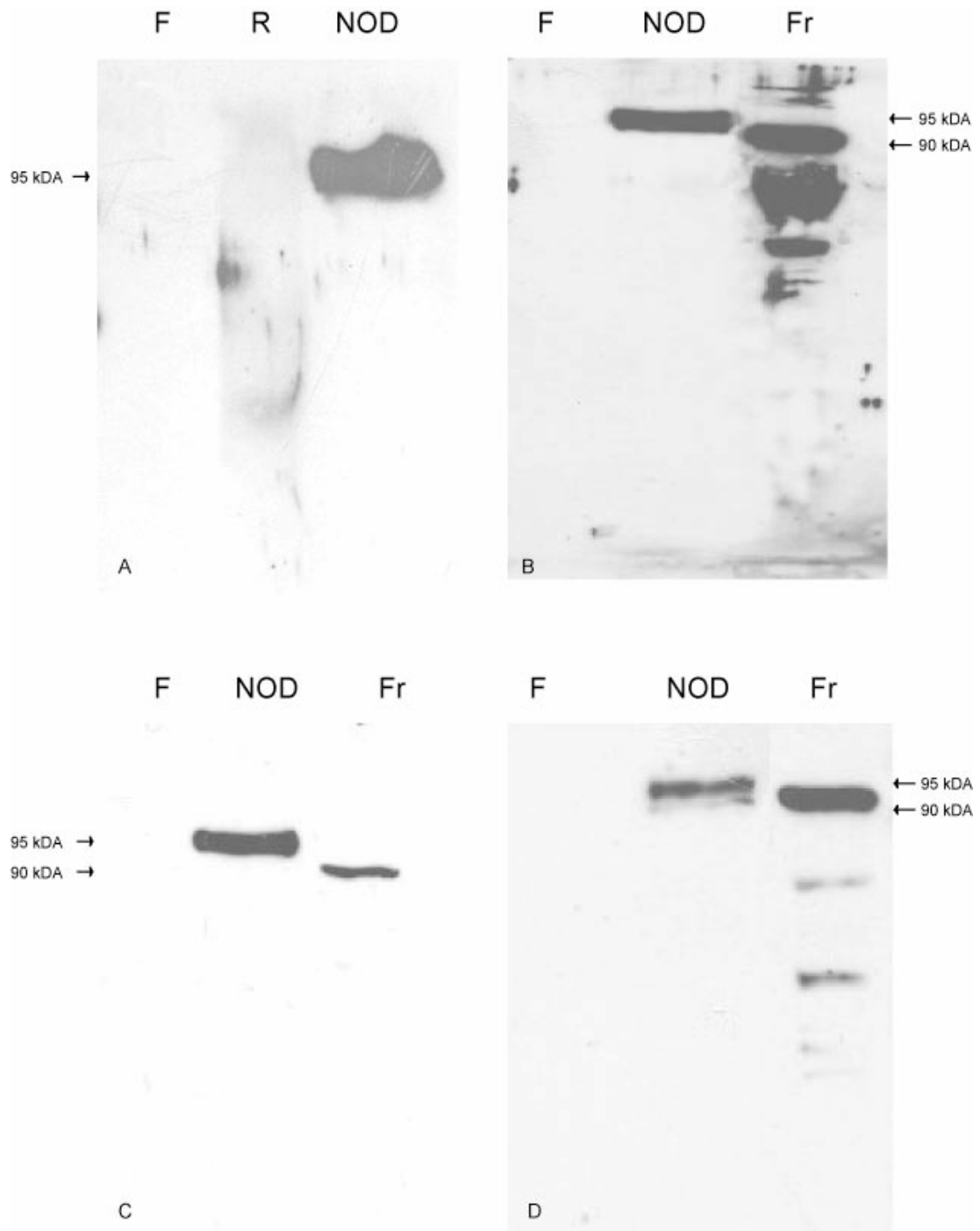


Figure 14 : Localisation de CG12 par Western-Blot dans des extraits protéiques de Nodules (Nod), de racines (R), de feuilles (F) et de Frankia (Fr). A, B : anticorps totaux purifiés sur une colonne protéine A. C, D : anticorps purifiés contre les peptides de synthèse (Ac1 et Ac2 respectivement).

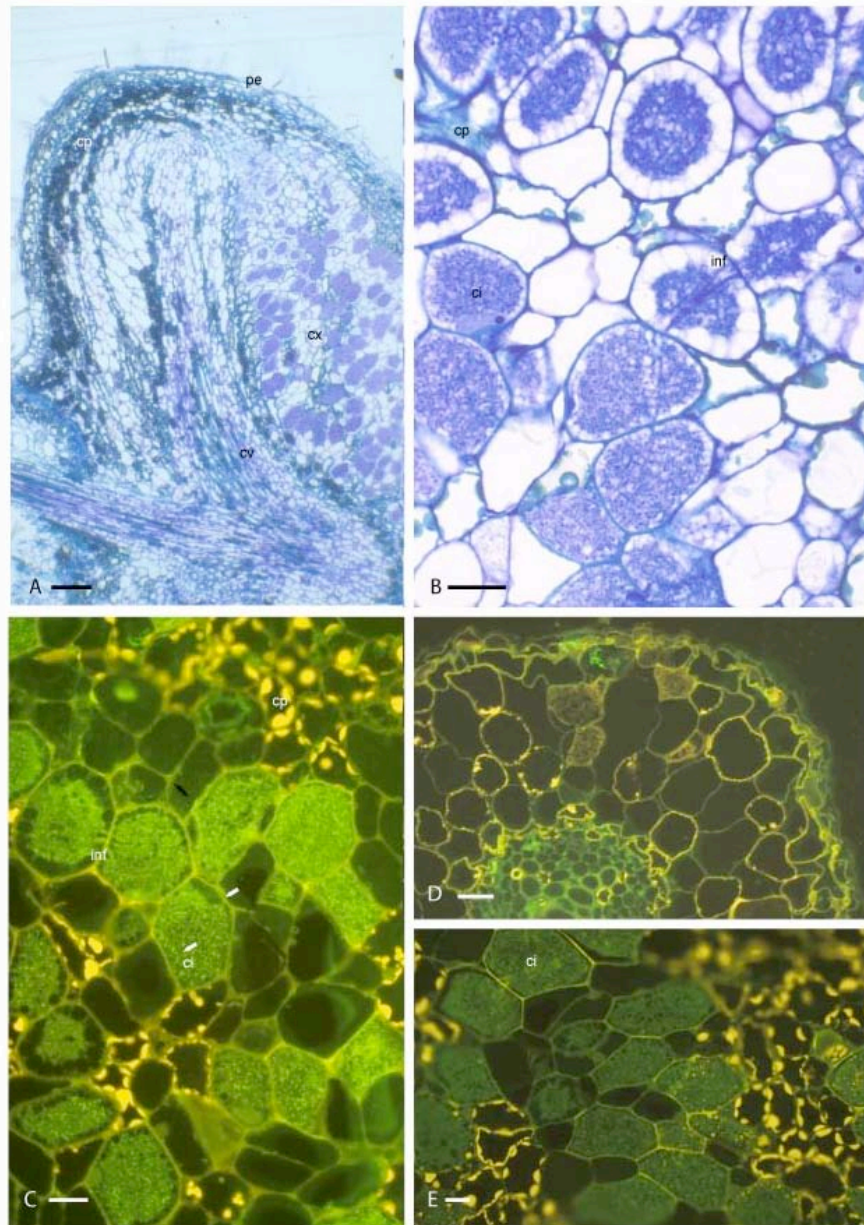


Figure 15 : A-D : coupes longitudinales de lobes nodulaires de *C. glauca*. A, B coloration au bleu de toluidine. Pe : periderme; cv : cylindre vasculaire ; cx : cortex ; ci : cellules infectées ; cp : composés phénoliques ; inf : cordons d'infection. C : immunomarquage avec le sérum anti-CG12 non purifié. Le marquage FITC est visualisé en jaune-vert (flèches). D : Immunomarquage avec l'anticorps secondaire seul. E : Immunomarquage avec le sérum anti-CG12 sur une coupe transversale de racine de *C. glauca* non inoculée avec *Frankia*. A : barre = 250  $\mu\text{m}$  ; B-E : barre = 20  $\mu\text{m}$ .

### Immunolocalisation de la protéine CG12

Afin d'identifier les cellules qui contiennent la protéine CG12, nous avons utilisé le sérum anti-CG12 pour des expériences d'immunomarquage. Des coupes de jeunes nodules de *C. glauca* et de racines non inoculées ont été réalisées et colorées au bleu de toluidine. Des coupes de nodules présentant de nombreuses cellules infectées, ainsi que des cordons d'infection (Figure 15A-B) ont été identifiées et des coupes adjacentes ont été utilisées pour l'immunomarquage.

Après l'incubation avec le sérum anti-CG12 et avec

l'anticorps secondaire couplé au FITC, un marquage fluorescent très intense est observé pour les coupes de nodules, dans les cellules infectées par *Frankia*. Le marquage est plus intense au niveau des hyphes de *Frankia* (Figure 15C). La fluorescence est très faible pour des coupes incubées en absence d'anticorps primaire (anticorps secondaire seul ; Figure 15E). Aucune fluorescence FITC n'a été observée dans des racines non inoculées ou dans les cellules du nodule dépourvues de *Frankia* (Figures 15D, 15C).

### Localisation cellulaire de CG12

L'immunolocalisation de CG12 nous a permis de

constater que les cellules infectées contiennent des fortes quantités de protéines reconnues par le sérum anti-CG12. Afin de déterminer la localisation cellulaire de ce marquage, des coupes ultrafines de nodules ont été réalisées sur le même matériel utilisé

pour le marquage fluorescent. Après l'immunomarquage avec le sérum anti-CG12, les coupes de nodules ont été observées au microscope électronique à transmission.

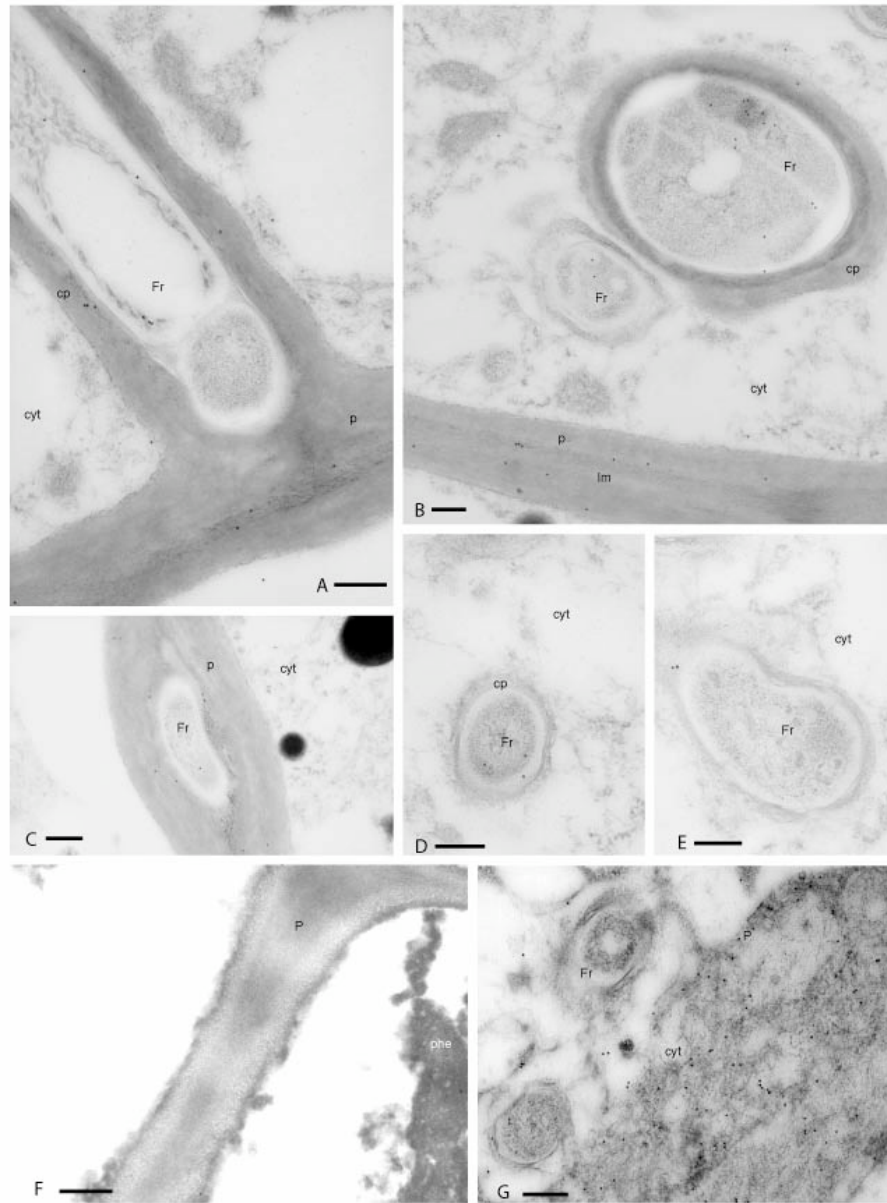


Figure 16 : Immunolocalisation de CG12 sur des coupes ultrafines de nodules de *C. glauca* ; A-F : anticorps Ac2 G: anticorps Ac1 ; A : cordon d'infection de Frankia proche d'une paroi végétale ; B : hyphes de Frankia ; l'hyphe de plus grand diamètre serait un cordon d'infection C : hyphe de Frankia apoplastique D , E : hyphes de Frankia ; F : parois d'une cellule non infectée par Frankia où le marquage est absent G : hyphe de Frankia associé à la paroi. Les billes noires correspondent au marquage à l'or colloïdal. Fr : Frankia, cp : capsule p : paroi végétale, lm : lamelle moyenne, cyt : cytoplasme, cp : composés phénoliques, inf : cordons d'infection, phe : composés phénoliques . Barre = 250 nm.

Les observations ont été faites à des grossissements de 5 000 à 29 000. Des nombreux filaments de *Frankia* ont pu être observés, ceux ci ont généralement une forme arrondie, de 0,3 à 2  $\mu$ m de diamètre (Figure 16). La plupart de ces filaments sont localisés à l'intérieur des cellules (Figures 16A, 16B, 16D, 16E,

16G) ; parfois certains filaments forment des cordons d'infection qui traversent la paroi végétale pour coloniser la cellule adjacente (Figure 16A-B). Ces filaments intracellulaires de *Frankia* sont entourés d'une capsule, une matrice un peu plus opaque aux électrons, qui a la même texture que les parois

végétales. L'épaisseur des capsules varie de 34 à 200 nm. Entre la capsule et les filaments un espace de 40 nm est généralement présent. A plusieurs occasions, des filaments de *Frankia* intercellulaires ont pu être observés (Figure 16C). Ceux-ci sont logés dans la lamelle moyenne, entre deux parois végétales déformées.

Dans un premier temps, nous avons utilisé le sérum anti-CG12 non purifié. Le marquage correspondant se situe alors dans les cellules infectées par *Frankia*, au niveau du cytoplasme, des mitochondries, de la paroi, de la capsule entourant *Frankia* et à l'intérieur des filaments de *Frankia*. Afin d'accroître la spécificité du marquage, nous avons utilisé par la suite les anticorps purifiés par immunoaffinité contre les deux peptides de synthèse (Ac1 et Ac2).

La figure 16 montre les résultats obtenus avec les anticorps purifiés. Le marquage obtenu avec Ac1 (dilution 1:1) est très proche de celui qui est observé pour le sérum brut. : celui-ci est présent au niveau du cytoplasme et des mitochondries, de la paroi, de la capsule qui entoure *Frankia* et à l'intérieur de *Frankia* (Figure 16G).

Le marquage obtenu avec le deuxième anticorps (Ac2) est plus restreint. Très peu de particules d'or sont présentes au niveau des mitochondries ou du cytoplasme (Figure 16A-E). Un marquage faible est présent autour de *Frankia* : les particules d'or se retrouvent souvent sur la capsule (Figures 16A, 16B, 16D, 16E), dans l'espace qui sépare la capsule de *Frankia* (Figure 16D) et sur la paroi de *Frankia* (Figure 17A). Un marquage à l'intérieur des filaments de *Frankia* est également présent (Figure 16A-E). La plus forte concentration de particules est retrouvée dans les parois des cellules infectées, en particulier au niveau de la lamelle moyenne (Figure 16A-C). Dans les cellules non infectées, pratiquement aucun marquage n'est détecté (Figure 16F). Le bruit de fond obtenu avec cet anticorps est très faible (Figure 16A-F).

## Discussion

### Le sérum reconnaît des protéines dans les tissus symbiotiques

#### ***Des protéines végétales et de Frankia sont reconnues***

A l'aide de peptides de synthèse, des anticorps anti-CG12 ont été produits. Par des expériences de Dot-Blot, nous avons pu vérifier la présence d'immunoglobulines reconnaissant les deux peptides de synthèse dans le sérum anti-CG12. Ce sérum a ensuite été utilisé pour détecter CG12 dans des extraits protéiques de racines non inoculées par *Frankia*, de rameaux et de nodules par western-blot. Les résultats correspondants montrent que les anticorps reconnaissent une protéine d'une masse moléculaire d'environ 95 kDa présente uniquement dans les extraits protéiques de nodules. Le sérum anti-CG12 a également été utilisé pour détecter CG12 au niveau cellulaire. L'immunolocalisation de CG12 au microscope photonique montre un marquage

uniquement dans les cellules infectées par *Frankia*. La protéine n'est pas détectée dans les tissus non symbiotiques. Au niveau protéique CG12 ne se retrouverait donc qu'au niveau des tissus symbiotiques, dans les cellules qui contiennent des filaments de *Frankia*. CG12 ne serait pas présente dans organes non symbiotiques ou au niveau des cellules non infectées du nodule. Ces résultats sont en accord avec le profil d'expression du gène décrit à partir d'expériences de northern-blot et hybridation *in situ* et avec ceux discutés au chapitre précédant obtenus avec les plantes transgéniques.

### ***Analyse de la protéine détectée dans les nodules***

Le PM théorique déduit de la séquence nucléotidique traduite de CG12 est de 87 kDa, ce qui est légèrement inférieur au PM de la protéine reconnue par les anticorps dans les expériences de western-blot. Plusieurs sites potentiels de glycosylation sont présents dans la séquence de CG12, la glycosylation de CG12 pourrait donc expliquer la différence de PM observée. Des expériences complémentaires pour vérifier cette hypothèse sont en cours.

Les anticorps anti-CG12 reconnaissent également plusieurs protéines présentes dans des extraits protéiques d'une culture pure de *Frankia*. Le sérum anti-CG12 ne reconnaît donc pas que CG12. La purification du sérum nous a permis d'obtenir des globulines qui reconnaissent spécifiquement les épitopes correspondant à chacun des deux peptides employés pour leur synthèse. Malgré cette purification, des protéines de *Frankia* sont reconnues par les anticorps purifiés, ce qui suggère qu'au moins une protéine de *Frankia* possède ces épitopes. La taille des protéines de *Frankia* reconnues est cependant inférieure à celle de la protéine reconnue dans les extraits de nodules. La nature de la protéine reconnue par les anticorps anti-CG12 dans les extraits protéiques de nodules et de *Frankia* ne sera déterminée avec certitude qu'après avoir séquencé la bande correspondante.

### Localisation cellulaire des protéines détectées

La présence d'un peptide signal dans la séquence protéique déduite de CG12 suggère qu'il s'agit d'une protéine excrétée. L'absence de signal d'adressage vers les mitochondries ou vers les plastes et l'absence d'un signal de rétention dans le réticulum suggère que la protéine mature se retrouve au niveau du compartiment extracellulaire. Dans les cellules infectées par *Frankia*, le compartiment extracellulaire correspond à deux localisations : (1) la paroi végétale et l'espace intercellulaire ou (2) la structure semblable à une paroi végétale qui entoure les filaments de *Frankia*. Les séquences d'adressage des protéines végétales vers chacune de ces deux localisations ne sont pas connues, il n'est donc pas possible de prévoir la localisation de CG12 uniquement à partir de sa séquence. Nous avons donc réalisé des expériences d'immunomarquage sur des coupes ultrafines de nodules que nous avons ensuite observées au

microscope électronique à transmission afin de déterminer précisément la localisation cellulaire de CG12 dans les cellules infectées du nodules.

Les résultats obtenus montrent que le sérum anti-CG12 ne marque pas uniquement la protéine CG12 : des protéines de *Frankia* sont également reconnues ainsi que des protéines des mitochondries et du cytoplasme. Cette localisation est différente de celle prévue à partir de la séquence de CG12. Cela suggère que les épitopes reconnus par ces anticorps sont présents dans des protéines différentes de CG12, parmi lesquelles figurent des protéines de *Frankia* et peut être aussi des protéines végétales.

Avec le deuxième anticorps, le marquage correspondant aux mitochondries et au cytoplasme est très faible et peu différent du bruit de fond. Même si le marquage persiste à l'intérieur de *Frankia*, la plupart des particules d'or se retrouvent au niveau du compartiment extracellulaire des cellules infectées, que ce soit sur la capsule qui entoure *Frankia* ou sur les parois cellulaires. Ce marquage pariétal n'est présent que pour les cellules infectées. Nous avons montré précédemment que le gène *Cg12* n'est exprimé que dans les cellules qui contiennent des filaments de *Frankia*. Le marquage pariétal spécifique des cellules

infectées est donc en accord avec le profil d'expression du gène *Cg12*. Cela suggère que la protéine CG12 est présente dans les cellules infectées par *Frankia* dans tout le compartiment extracellulaire, au niveau des parois et de la capsule qui entoure *Frankia*.

Chez *C. glauca*, le mécanisme d'infection qui a été décrit est de type intracellulaire (Berry et Sunnel, 1990). Dans les nodules de *C. glauca*, les cordons d'infection de *Frankia* forment des structures rectilignes à croissance apicale qui infectent des nouvelles cellules en digérant la paroi végétale et passant ainsi de cellule en cellule (Berg, 1999). Lors du passage d'une cellule à une autre, certains cordons d'infection donneraient naissance à des filaments de *Frankia* apoplastiques (Berg, 1999). Lors de nos observations, ont été identifiés des cordons d'infection de *Frankia* traversant des cellules végétales et également des filaments de *Frankia* apoplastiques. Dans les cellules infectées, l'ensemble du compartiment extracellulaire correspond donc à l'interface entre la cellule végétale et le microsymbiote. CG12 pourrait donc agir au niveau de ce compartiment où nous avons détecté le marquage le plus important.

## Troisième partie : Utilisation d' *Arabidopsis*

---

### Introduction

---

Chez *Arabidopsis*, de nombreux outils moléculaires ont été développés ces dernières années. La séquence complète du génome est connue, la transformation génétique par trempage floral est très simple et des programmes de mutagenèse à grande échelle rendent possible l'obtention de mutants d'insertion pour de nombreux gènes, ce qui permet de les caractériser au point de vue fonctionnel. Par ailleurs, l'étude des voies de signalisation qui conduisent à l'expression d'un gène peut être abordée chez cette plante modèle grâce à l'emploi des nombreux mutants et plantes transgéniques disponibles et caractérisés qui sont affectés dans les différentes voies de signalisation.

Chez les plantes actinorhiziennes, ces outils moléculaires n'ont pas été développées. Cependant, les plantes modèles comme *Arabidopsis* peuvent être utilisées pour caractériser les gènes de plantes actinorhiziennes. Les mutants affectés dans les différentes voies de signalisation peuvent servir à étudier les voies impliquées dans l'expression d'un gène dont le promoteur a été introduit fusionné à un gène rapporteur chez les plantes modèles. Afin d'étudier la régulation de l'expression de *Cg12*, nous avons donc introduit les fusions transcriptionnelles promoteur *Cg12*-gène rapporteur dans *Arabidopsis*.

Un autre moyen d'utiliser les plantes modèles pour comprendre la fonction des gènes de plantes actinorhiziennes est de rechercher un gène homologue chez la plante modèle et d'étudier sa fonction. Pour la

plupart des gènes de nodulines, il existe des gènes similaires chez des plantes non symbiotiques, ce qui permet de penser que chez les ancêtres des plantes actinorhiziennes, des gènes non symbiotiques auraient été recrutés pour des fonctions symbiotiques. La connaissance de la fonction non symbiotique d'un gène similaire à un gène de noduline peut donc fournir des indications concernant sa fonction symbiotique. Afin de mieux comprendre le rôle de *Ara12*, un gène d'*Arabidopsis* proche de *Cg12*, nous avons introduit des fusions transcriptionnelles promoteur *Ara12*-gène rapporteurs dans *Arabidopsis*, ce qui nous a permis d'étudier son profil d'expression.

### Résultats

---

#### Expression des gènes rapporteurs chez *Arabidopsis* sous le contrôle du promoteur de *Cg12*

Afin de pouvoir profiter de l'ensemble d'outils disponibles chez *Arabidopsis* pour étudier les voies de transduction qui interviennent dans l'expression de *Cg12*, des plantes d'*Arabidopsis* ont été transformées par trempage floral avec les fusions transcriptionnelles promoteur *Cg12-Gus*, promoteur *Cg12-Eyfp* et promoteur *Cg12-Gfp*. Trois lignées GUS, une lignée EYFP et 14 lignées GFP ont été obtenues. Deux séries de criblages ont été réalisées sur deux générations afin d'obtenir des lignées homozygotes.

Afin de vérifier la présence des constructions géniques dans le génome des plantes testées, l'ADN a

été extrait et une amplification par PCR avec des amorces correspondant au promoteur de *Cg12* et aux gènes rapporteurs a été réalisée. Les résultats de ces PCR ont montré que les plantes avaient intégré dans tous les cas les constructions *Cg12*-gène rapporteur.

L'expression des gènes rapporteurs a été étudiée au cours du développement des plantes et en réponse à différents traitements hormonaux (Tableau 4). Différentes conditions de culture ont été utilisées : culture en boîte de Pétri sur milieu solide, en milieu liquide agité et pour l'AS et le MeJa, culture sur terreau. Aucune expression de gènes rapporteurs n'a pu être détectée.

**Tableau 4.** Traitements effectués sur les *Arabidopsis* transgéniques contenant les fusions promoteur *Cg12*-gène rapporteur

Phytohormone	Concentration finale
2,4 D	1 mM 10 mM
MeJa	10 mM
GA	10 mM
BA	10 mM
SA	10 mM 100 mM

### Etude du profil d'expression d'un gène proche de *Cg12*: *Ara12*

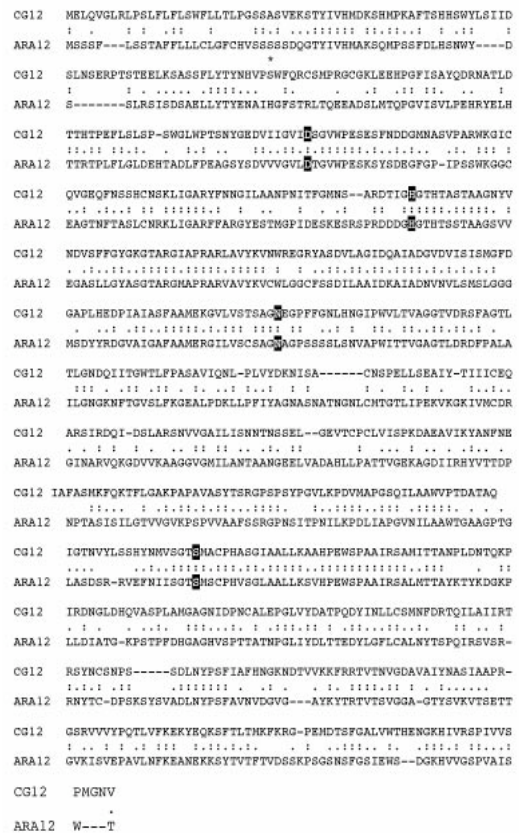
Quand le gène *Ag12* a été isolé chez l'aune, la séquence d'un gène *d'Arabidopsis* ayant une similarité protéique de 61% avec AG12 a été trouvée dans les banques d'EST accessibles en ligne (Ribeiro et coll., 1995). Cette subtilase présente une similarité de 82 % avec CG12 (Figure 17). Afin de mieux comprendre la fonction du gène qui code cette subtilase non symbiotique proche de *Ag12/Cg12*, le profil d'expression d'*Ara12* a été étudié dans des plantes transgéniques contenant les fusions transcriptionnelles promoteur *Ara12-Gus* et promoteur *Ara12-Gfp*. 10 lignées indépendantes ont été obtenues pour chaque construction.

#### Profil d'expression pendant le développement

Toutes les lignées montrent un profil d'expression similaire. Aucune activité de gènes rapporteurs n'est détectée avant la germination des graines. Dans les graines en germination, une intense expression est visible dans de la radicule, au niveau du système vasculaire (Figure 18A). Dans les plantules de quelques jours, l'activité est intense au niveau de l'apex de la racine principale et dans le bourgeon terminal (Figure 18E). L'expression est limitée aux tissus conducteurs et n'est pas visible dans les cotylédons ni dans le méristème racinaire. Dans des plantules plus âgées, et jusqu'à l'apparition de fleurs, l'expression des gènes rapporteurs est limitée aux tissus vasculaires jeunes, au niveau des racines latérales émergentes (Figure 18B-D) ou dans les jeunes feuilles (Figure 18 F). Dans les jeunes feuilles, une expression dans les trichomes est également détectée (Figure 18G). Les feuilles âgées cessent d'exprimer les gènes rapporteurs, tant au niveau des

tissus conducteurs comme des trichomes (Figure 18H). Quand les plantes fleurissent, l'expression des gènes rapporteurs est détectée dans les jeunes siliques, dans le système vasculaire des pédicelles, dans les pétales et les sépales (Figure 18I-J). L'expression décroît quand les siliques mûrissent.

Au niveau des racines, l'expression est détectée seulement sur quelques millimètres, près de l'apex des racines (Figure 18B). Des coupes transversales à ce niveau montrent que les cellules exprimant les gènes rapporteurs se situent au centre de la stèle et sont généralement au nombre de trois (Figure 18C). Il s'agit des cellules qui donneront naissance au métaxylème.



**Figure 17 :** Aligment des séquences protéiques de CG12 et ARA12. (\*) : site de clivage potentiel du peptide signal est signalé par une étoile . Les acides aminés qui forment le site actif des subtilases sont figurés sur fond noir.

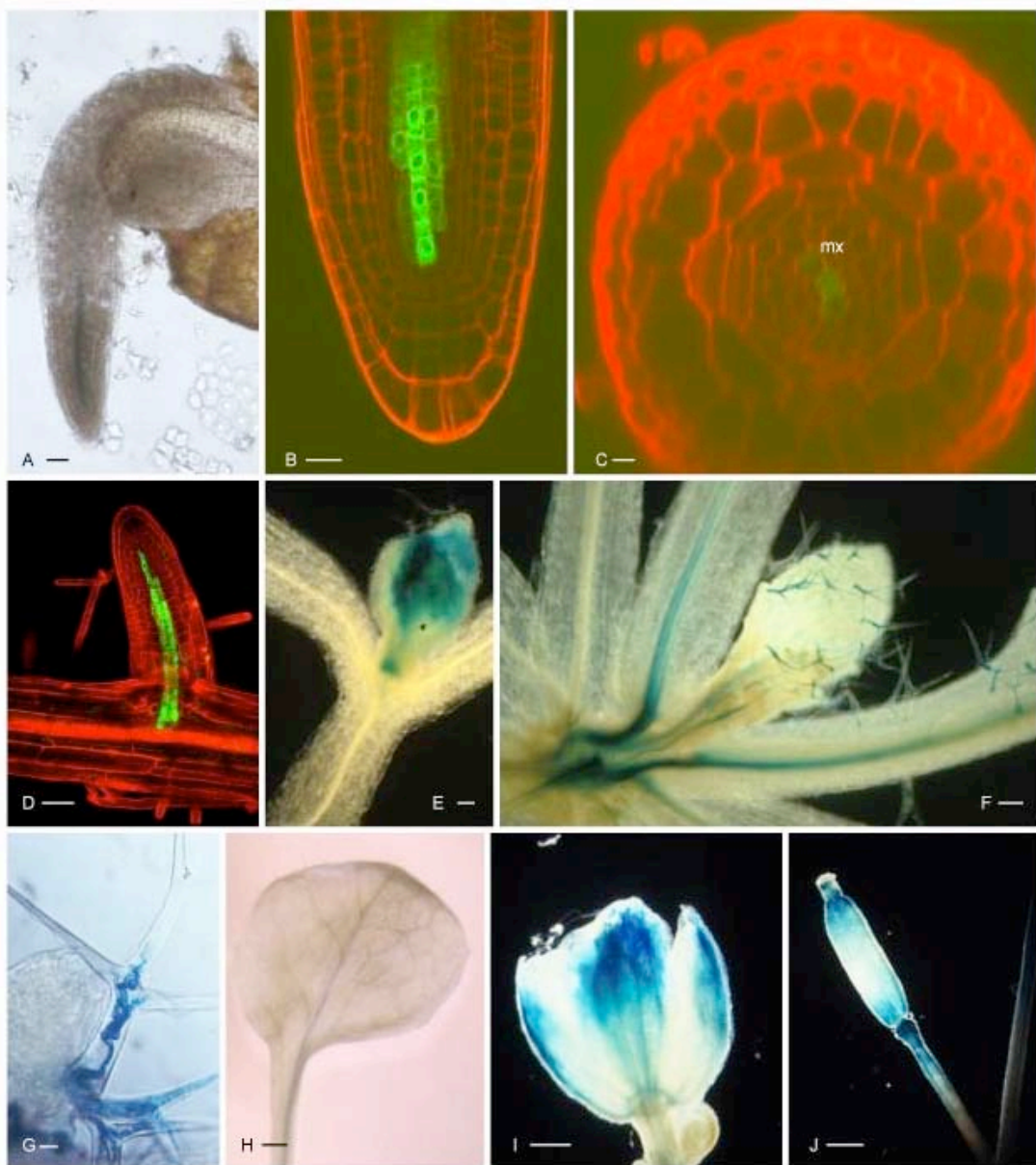


Figure 18 : Profil d'expression des gènes rapporteurs Gus et Gfp sous le contrôle du promoteur d'Ara12 chez *Arabidopsis*. A : Au niveau du système racinaire une forte expression Gus est observée dans le système vasculaire des radicules des graines en germination. B-D : racines colorées au iodyure de propidium observées en microscopie confocale ; B : coupe longitudinale au niveau de l'apex racinaire ; C : coupe transversale près de l'apex racinaire ; D : racine latérale E : bourgeon terminal d'une plantule d'une semaine ; F : plante âgée de 3 semaines ; G : détail de (F) : trichome ; feuille âgée d'une plante de 3 semaines ; G : fleurs ; H : jeune siliques. mx : métaxylème ; pc : péricycle. A, D : barre = 50  $\mu$ m ; B, G : barre = 10  $\mu$ m ; C : barre = 5  $\mu$ m ; E, F, I : barre = 200  $\mu$ m ; H, J : barre = 500  $\mu$ m.

## Discussion

### Le promoteur de *Cg12* n'est pas reconnu chez *Arabidopsis*

En 1999, Jorda et coll. ont montré que le profil d'expression de gènes de subtilases de tomate de la famille *P69* est bien conservé chez *Arabidopsis*. Afin d'utiliser les mutants disponibles chez *Arabidopsis* pour étudier les voies de signalisation qui conduisent à l'expression de *Cg12*, les fusions transcriptionnelles

entre le promoteur de *Cg12* et des gènes rapporteurs ont été introduites dans cette espèce. L'expression des gènes rapporteurs a été analysée pendant le développement et en réponse à plusieurs traitements hormonaux. Aucune expression n'a pu être détectée. Le promoteur de *Cg12* ne serait donc pas reconnu par les facteurs de transcription d'*Arabidopsis*.

Nous avons montré que chez *A. verticillata* et *C. glauca*, le promoteur de *Cg12* active la transcription des gènes rapporteurs uniquement dans les cellules infectées par *Frankia*. Par ailleurs, l'expression n'est



pas inductible par des traitements hormonaux ou par des facteurs Nod. L'expression de *Cg12* serait donc très spécifique d'un contexte cellulaire particulier : des cellules végétales nouvellement envahies par des bactéries symbiotiques. L'absence d'expression des gènes rapporteurs chez *Arabidopsis* suggère que ce contexte cellulaire nécessaire à l'expression de *Cg12* n'est pas reproduit chez *Arabidopsis* ni au cours du développement ni en réponse aux traitements hormonaux réalisés.

### *Ara12* est exprimé au niveau du métaxylème

Afin de mieux comprendre la fonction d'*Ara12* chez *Arabidopsis*, nous avons étudié le profil d'expression de gènes rapporteurs placés sous le contrôle de son promoteur et introduits dans *Arabidopsis*. Tout au long du développement, l'expression des gènes rapporteurs est détectée dans les tissus jeunes, au niveau du système vasculaire et dans les trichomes des feuilles. Ces résultats sont en accord avec des études d'expression antérieures (Ribeiro et coll., 1995 ; Yamagata et coll., 2000).

La localisation de la protéine ARA12 a été étudiée récemment par Hamilton et coll. (2003). En utilisant des anticorps anti-ARA12, ces auteurs ont montré la présence de fortes quantités de protéine au niveau des siliques et des pédicelles, dans les espaces intercellulaires. La protéine n'a pas été détectée dans des extraits protéiques de racines. Ces résultats ne sont pas en accord avec la forte expression des gènes rapporteurs que nous avons observé dans les apex racinaires. Comme l'expression racinaire que nous avons observé est très localisée, limitée à quelques cellules du métaxylème, il se peut que la quantité de

protéine ARA12 dans un extrait de racine total soit insuffisante pour pouvoir être détectée par Western-Blot. Dans les tiges, ARA12 a été détectée par immunolocalisation, mais le type cellulaire où la protéine a été détectée n'est pas identifié. Nos résultats suggèrent que dans la tige il s'agirait du métaxylème. Il aurait été intéressant de savoir si dans des coupes longitudinales d'apex racinaires la protéine ARA12 peut être détectée par immunolocalisation.

Quelle pourrait être la fonction d'une subtilase exprimée spécifiquement dans le métaxylème? La spécificité de clivage d'ARA12 a été également examinée par Hamilton et coll. (2003). Ces auteurs ont montré que le clivage protéique est favorisé quand les résidus Phe, Ala et Asp se retrouvent en position P1. ARA12 présente donc une spécificité de clivage et pourrait appartenir au groupe des maturases. Dans ce cas, ARA12 pourrait participer à la maturation de protéines ou de polypeptides situés dans l'espace intercellulaire des cellules du métaxylème. Chez *Arabidopsis*, deux gènes de subtilases interviennent dans des processus du développement : *Sdd1* intervient dans la régulation de la distribution des stomates (Berger et Altman, 2000) et *Ale1* intervient dans la formation de l'épiderme embryonnaire (Tanaka et coll., 2001). Tout comme ALE1 et SDD1, ARA12 pourrait jouer un rôle dans le développement, en maturant des protéines ou des peptides qui interviennent dans le développement du métaxylème ou dans la transduction de signaux intercellulaires associés. Comme ARA12 est une des subtilases d'*Arabidopsis* qui présente le plus de similarité au niveau protéique avec CG12, CG12 pourrait être également une protéase impliquée dans un processus de ce type.

## **Quatrième partie: Implication de subtilases dans la symbiose *S. meliloti*- *M. truncatula***

---

### Introduction

Le modèle *Arabidopsis* n'est pas adapté à l'étude des interactions symbiotiques du fait de l'absence de symbioses fixatrices d'azote ou mycorhiziennes dans la famille des Brassicacées. Pour l'étude des symbioses mycorhiziennes et des symbioses fixatrices d'azote, deux espèces de Légumineuses sont devenues des espèces modèles, il s'agit de *M. truncatula* et *Lotus japonicus*. De plus en plus d'outils moléculaires du même type que ceux qui existent pour *Arabidopsis* sont progressivement mis en place chez ces deux espèces (Stoutgaard, 2000).

Pour l'étude des symbioses actinorhiziennes, l'utilisation des Légumineuses présente deux avantages majeurs : (1) l'interaction symbiotique des Légumineuses avec les rhizobia permet de comparer les deux types de symbioses fixatrices d'azote et (2) les Légumineuses appartiennent au même clade que les plantes actinorhiziennes et sont donc beaucoup plus

proches phylogénétiquement, de celles-ci par rapport aux Brassicacées.

Afin de comparer les facteurs qui interviennent dans la régulation de l'expression de *Cg12* chez *C. glauca* avec ceux des Légumineuses, les fusions promoteur *Cg12*-gène rapporteurs ont été introduites dans *M. truncatula*. Nous avons utilisé ces plantes transgéniques pour comparer le profil d'expression des gènes rapporteurs pendant le développement des nodules et en réponse aux facteurs Nod de *S. meliloti* avec celui que nous avons décrit pour les Casuarinacées transgéniques.

Pour la plupart des nodulines actinorhiziennes tardives il existe un gène homologue chez les Légumineuses qui a une fonction similaire; c'est le cas par exemple pour les gènes qui codent l'hémoglobine, la glutamine synthase ou la sucrose synthase (Pawlowski, 1997). Concernant les nodulines précoces, des homologues d'*Enod12*, *Enod11* ou *Enod5* n'ont pas été isolés chez les plantes

actinorhiziennes. Cependant une noduline actinorhizienne précoce, *Dg93* isolée chez *D. glomerata*, possède une similarité de 74% avec la noduline précoce de soja *Enod93* (Okubara et coll., 2000). En ce qui concerne les gènes similaires à *Cg12*, des gènes de subtilases exprimés dans les graines de soja ont été caractérisés (Batchelor et coll., 2000 ; Beilinson et coll., 2002) et une subtilase a été isolée à partir de feuilles de haricot (Popovic et coll., 2002). Par ailleurs l'existence de nombreux autres gènes de subtilases chez les Légumineuses est attestée par la présence de quelques centaines d'EST correspondant à des subtilases dans les banques de séquences de Légumineuses. Parmi ces séquences, certaines proviennent de banques d'ADNc de nodules, mais aucune information supplémentaire pour ces gènes n'est disponible. Il serait intéressant de savoir si parmi ces gènes, certains ont le même profil d'expression que *Cg12* ; dans ce cas, ces gènes pourraient avoir une fonction similaire à celle de *Cg12* chez *C. glauca*. Nous avons donc recherché parmi ces gènes de subtilases de *M. truncatula* ceux qui ont le même profil d'expression que *Cg12*.

## Résultats

### Expression des gènes rapporteurs dans

#### *M. truncatula*

Les fusions transcriptionnelles promoteur *Cg12-Gus* et promoteur *Cg12-Gfp* ont été introduites dans *M. truncatula*, en collaboration avec le laboratoire d'A. Ribeiro (Oeiras, Portugal). 1 et 4 lignées transgéniques indépendantes ont été obtenues pour les constructions *Cg12-Gfp* et *Cg12-Gus* respectivement. L'expression des gènes rapporteurs a été analysée dans des plantes multipliées en culture *in vitro* correspondant aux 5 lignées.

#### ***Etude du profil d'expression***

##### ***Dans les tissus non symbiotiques***

Le profil d'expression a été analysé dans les racines non inoculées, les feuilles, les tiges et les fleurs des plantes *Cg12-gus* et *Cg12-Gfp*. Au moins 2 plantes de chacune des lignées ont été testées, avec des résultats similaires pour toutes les lignées. Aucune fluorescence GFP n'a pu être détectée dans ces organes non symbiotiques. Pour les plantes *Cg12-gus*, une faible activité GUS a été détectée dans le système vasculaire des racines. Celle-ci n'est visible qu'avec des temps d'incubation relativement longs (8-12 h) et avec des quantités de FeCN faibles (0,5-2 mM).

##### ***Au cours de la nodulation***

##### **Obtention de Nodules**

La nodulation des plantes transgéniques a été réalisée en chambre de culture, dans des sacs en papier-cellophane ou dans des boîtes de pétri maintenues verticalement. Le temps nécessaire à l'obtention de nodules est différent selon le système utilisé : environ 4-5 jours pour les sacs en papier, au moins 1 semaine pour les boîtes de pétri.

##### **Stades précoces : poils absorbants, primordia nodulaires**

La première expression de gènes rapporteurs a été détectée dans les poils absorbants, de 3 à 8 jours après l'inoculation selon le système utilisé. Pour les plantes *Cg12-Gus*, certains des poils absorbants déformés montrent une activité GUS. Chez les plantes *Cg12-Gfp*, la fluorescence GFP a également été détectée dans certains des poils absorbants déformés en microscopie à fluorescence et en microscopie confocale (Figure 19A). Les poils absorbants exprimant les gènes rapporteurs sont très peu nombreux. L'expression des gènes rapporteurs est ensuite détectée au niveau du cortex racinaire (Figure 19B), puis au niveau du primordium nodulaire. Une faible activité GUS a été détectée au niveau du péricycle situé en face du primordium nodulaire (Figure 19B).

##### **Expression dans les nodules**

Les jeunes nodules ont une forme sphérique. Des coupes longitudinales de jeunes nodules montrent une forte expression des gènes rapporteurs dans les cellules infectées par les rhizobia de la partie apicale (Figure 19D). La coloration bleue pour les plantes promoteur *Cg12-Gus* est visible même après une courte incubation avec le substrat (20 minutes) et en présence de 5 mM de FeCN. L'expression devient plus faible dans les cellules de la base du nodule et n'est pas détectable au niveau du méristème (Figure 19D).

Plus les nodules deviennent âgés, plus leur forme est allongée. Dans des nodules ayant environ 2-3 semaines, une forte expression des gènes rapporteurs a été détectée dans les cellules infectées de la zone II. L'expression dans l'interzone II-III et dans la zone III est beaucoup plus faible (Figure 19 E-F).

Dans les nodules de *M. truncatula*, une accumulation importante d'amyloplastes a lieu dans l'interzone II-III (Vasse et coll., 1990). Afin de localiser l'activité GUS par rapport aux différentes zones du nodule, un traitement au liquide de lugol a été réalisé sur des sections de nodules de plantes transgéniques après l'incubation avec le substrat Xgluc. Dans les jeunes nodules, l'interzone II-III n'est pas encore bien différenciée, de nombreux amyloplastes sont répartis dans toutes les zones du nodule (Figure 19D). Dans les nodules matures, une bande noire correspondant à l'interzone II-III est clairement visible (Figure 19E-F). L'activité GUS qui est forte dans la zone II s'affaiblit dès que des amyloplastes apparaissent dans les cellules (Figure 19F), ce qui correspond au passage de la zone II à l'interzone II-III.

##### ***Etude des voies de transduction***

##### ***Rôle des facteurs Nod***

Afin de déterminer si chez *M. truncatula* les facteurs Nod de *S. meliloti* jouent un rôle dans l'induction de l'expression des gènes rapporteurs, les racines de 10 plantes transgéniques ont été traitées avec des facteurs Nod purifiés de *S. meliloti*. L'expression des gènes rapporteurs a été analysée 4, 9, 24 et 36 h après le traitement, puis tous les deux jours pendant 10 jours. Des déformations des poils absorbants ont été détectées dès les premières heures après le traitement. Aucune fluorescence GFP n'a pu être détectée. Pour les plantes *Gus*, une faible

coloration bleue peut être observée au niveau du système vasculaire des racines, à condition d'incuber les racines plus de 6h en présence de faibles

concentrations de FeCN. La distribution et l'intensité de cette activité GUS est similaire à celle obtenue pour des plantes témoin non traitées.

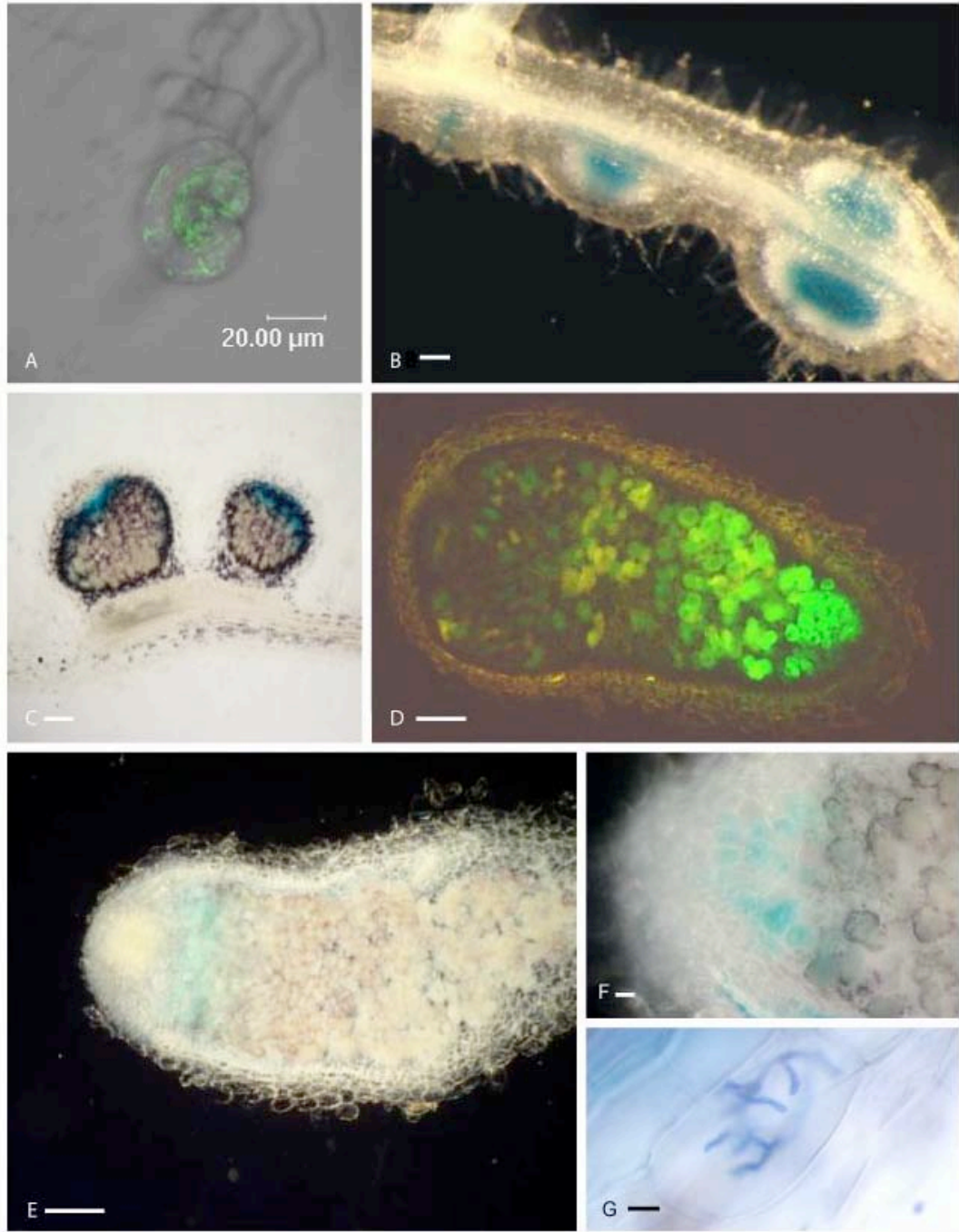


Figure 19 : Analyse de l'expression des gènes rapporteurs Gus et Gfp dans *M. truncatula*. A : poil absorbant 10 jours après l'inoculation par *S. meliloti* ; B : racine latérale montrant trois stades de développement des nodules C : jeunes nodules colorés après incubation avec le liquide de lugol (qui colore l'amidon en noir) ; D-E : coupes longitudinales de nodules matures ; E : coloration au liquide de lugol ; F : détail d'une coupe de nodule colorée au liquide de lugol ; G : détail d'une cellule corticale d'une racine inoculée avec *G. mossae* et colorée au bleu trypan. A, D : plantes contenant la construction pCg12-Gfp ; B, C, E, F, G : plantes contenant la construction pCg12-Gus après révélation de l'activité GUS. C-E : barre = 200  $\mu$ m ; B, F : barre = 50  $\mu$ m ; G : barre = 10  $\mu$ m.

## Intervention des protéines G

Comme pour *A. verticillata*, nous avons cherché à savoir si des protéines G interviennent dans la voie de signalisation qui induit l'expression des gènes rapporteurs dans les cellules infectées. L'incubation des racines de 10 plantes transgéniques avec le MAS-7 n'a conduit à aucune augmentation de la transcription des gènes rapporteurs par rapport aux plantes non traitées.

## Expression au cours de la symbiose endomycorhizienne

Comme lors de l'étude des Casuarinacées transgéniques, nous avons cherché à savoir si chez *M. truncatula* la voie de signalisation qui active l'expression des gènes rapporteurs dans les cellules infectées par *S. meliloti* est induite lors de la symbiose endomycorhizienne. Pour cela 10 plantes transgéniques contenant les fusions promoteur *Cg12-Gus* et promoteur *Cg12-Gfp* ont été inoculées avec les champignons endomycorhiziens *G. mosseae*, *G. deserticola* et *G. rosea*. Un mois après l'inoculation aucune fluorescence GFP n'a été détectée au niveau des racines des plantes *pCg12-Gfp*. Pour les plantes *pCg12-Gus*, une faible activité GUS est visible au niveau du système vasculaire, son niveau est comparable à celui obtenu pour les plantes témoin non inoculées.

Afin de confirmer l'endomycorhization des plantes transgéniques, les racines ont été colorées au bleu trypan après l'analyse de l'expression des gènes rapporteurs. Des arbuscules et des vésicules ont été détectés dans les racines de toutes les plantes inoculées (Figure 19H).

## Recherche d'orthologues de *Cg12* chez *M. truncatula*

Aucune subtilisine exprimée dans les nodules n'a été caractérisée chez les Légumineuses, mais de nombreuses EST correspondant à des subtilases figurent dans les banques de séquences de Légumineuses. Nous avons cherché à déterminer si parmi les gènes correspondant à des subtilases de *M. truncatula* se trouve un gène "*Mt12*" ayant le même profil d'expression que *Cg12*.

## Recherche de subtilases similaires de *Cg12* dans les banques d'EST

En effectuant une recherche sur l'ensemble des EST disponibles pour *M. truncatula* avec le logiciel TBLASTN, nous avons identifié une cinquantaine de séquences qui sont proches de *Cg12*. La plupart de ces séquences sont annotées comme de subtilases, et certaines proviennent de banques d'ADNc de nodules (Figure 20). Pour plus de simplicité, ces séquences ont été rebaptisées "*Mt12-x*" où x correspond au rang de cette séquence sur la sortie de TBLASTN.

## Profil d'expression de ces 10 gènes

10 séquences parmi celles qui étaient les plus proches de *Cg12* ou qui se retrouvent au moins une fois dans une banque d'ADNc de nodule ont été choisies. A partir de ces séquences, des amorces

spécifiques ont été dessinées afin de pouvoir analyser le profil d'expression des gènes correspondants par RT-PCR.

Les RT-PCR ont été réalisées sur de l'ARN extrait de nodules, de racines non inoculées, de feuilles, de tiges et des bourgeons de *M. truncatula*. Comme beaucoup de gènes de subtilases ne contiennent pas d'intron, l'ARN a été traité à la RNase, et des témoins sans transcription reverse ont été réalisés pour chaque réaction. L'amplification a également été faite sur l'ADN génomique. Les quantités d'ARN ont été calibrées en utilisant des amorces correspondant à un gène d'actine qui est exprimé de façon constitutive (Cohn et coll., 2001). Les résultats correspondants sont présentés à la figure 21.

Rang	Nom de la séquence	score	e-value
1	NF022G11RT1F1084	257	3e-68
2	NF003F02FL1F1027	212	1e-54
3	BG581229 lcl 2946	211	2e-54
4	NF011H12PH1F1101	207	3e-53
5	BF003469 lcl 73997	206	9e-53
6	BI310642 lcl 19651	178	1e-51
7	NF006H03ST1F1000	187	2e-47
8	AW559414 lcl 29826	184	3e-46
9	BI310362 lcl 19931	178	6e-46
10	BG583920 lcl 2055	182	1e-45
11	BG588700 lcl 75740	182	1e-45
12	NF014F01IN1F1013	181	2e-45
13	BF520174 lcl 10062	181	2e-45
14	BG645086 lcl 805	143	7e-45
15	NF101F08PL1F1073	177	4e-44
16	NF038H12DT1F1101	176	6e-44
17	AW257362 lcl 23946	174	3e-43
18	BG604219 lcl 33473	172	1e-42
19	AW736045 lcl 27599	169	7e-42
20	AW773858 lcl 26718	169	1e-41
21	NF027F09FL1F1078	168	2e-41
22	BG588099 lcl 76341	168	2e-41
23	BG585528 lcl 37978	158	7e-41
24	NF044D07FL1F1061	132	9e-41
25	AL374594 lcl 50412	166	1e-40
26	NF093H12ST1F1103	165	1e-40
27	BG586808 lcl 36698	101	3e-40
28	BG580583 lcl 3592	161	2e-39
29	BE204920 lcl 17562	159	9e-39
30	NF025C11DT1F1083	124	2e-38
31	AW299160 lcl 23644	158	2e-38
32	BG644585 lcl 1690	154	2e-38
33	BI311573 lcl 21004	111	3e-38
34	NF056G08IN1F1067	157	5e-38
35	NF038A09FL1F1069	154	3e-37
...			
57	CON_001_75059	95	4e-17

Figure 21 : Sortie du logiciel TBLASTN. La séquence donnée en entrée est celle de la protéine CG12. La recherche a été effectuée sur toutes les banques d'EST disponibles sur le serveur du "Medicago Genome initiative database" (<https://xgi.ncgr.org/mgi/>). Ne sont figurées que les 35 premières séquences et la séquence 57. Les séquences retrouvées au moins une fois dans une banque d'ADNc de nodule ou de racines inoculées avec *S.meliloti* sont indiquées sur fond noir.

Pour *Mt12-1* et *Mt12-2*, aucune amplification n'a été obtenue. Pour les autres séquences, une amplification est obtenue dans tous les cas pour l'ADN génomique et aucune amplification n'est visible pour l'ARN non transcrit en ADN. Pour *Mt12-3* et *Mt12-4* la taille de l'ADN génomique amplifié est supérieure par rapport à celle des amplifications d'ADNc, ce qui suggère la présence d'introns dans les gènes

correspondants. Pour les autres gènes, la taille correspondant à l'ADN génomique et à l'ADNc est la même, ces gènes ne possèderaient donc pas d'introns, du moins dans la partie qui est amplifiée. Trois groupes de gènes peuvent être distingués:

-*Mt12-6* est un gène exprimé constitutivement dans tous les organes testés

-*Mt12-3*, *Mt12-4*, *Mt12-8*, *Mt12-17* et *Mt12-57* ont une expression spécifique de quelques organes.

-*Mt12-13* et *Mt12-24* ne sont exprimés que dans les nodules.

Pour *Mt12-57*, une bande intense est présente pour les nodules, mais une faible amplification est

également obtenue pour les racines. Les gènes *Mt12-24*, *Mt12-57* et *Mt12-13* qui sont exprimés surtout dans les nodules sont des orthologues potentiels de *Cg12*.

Comme la séquence de ces subtilases sont très proches entre elles, la réaction de RT-PCR peut conduire à l'amplification non spécifique à partir d'autres ARN. Afin de vérifier que les produits obtenus correspondent aux séquences à partir desquelles les amorces ont été dessinées, les produits d'amplification ont été clonés dans pGEM-T<sub>E</sub> et séquencés. Dans tous les cas, la correspondance a été vérifiée.

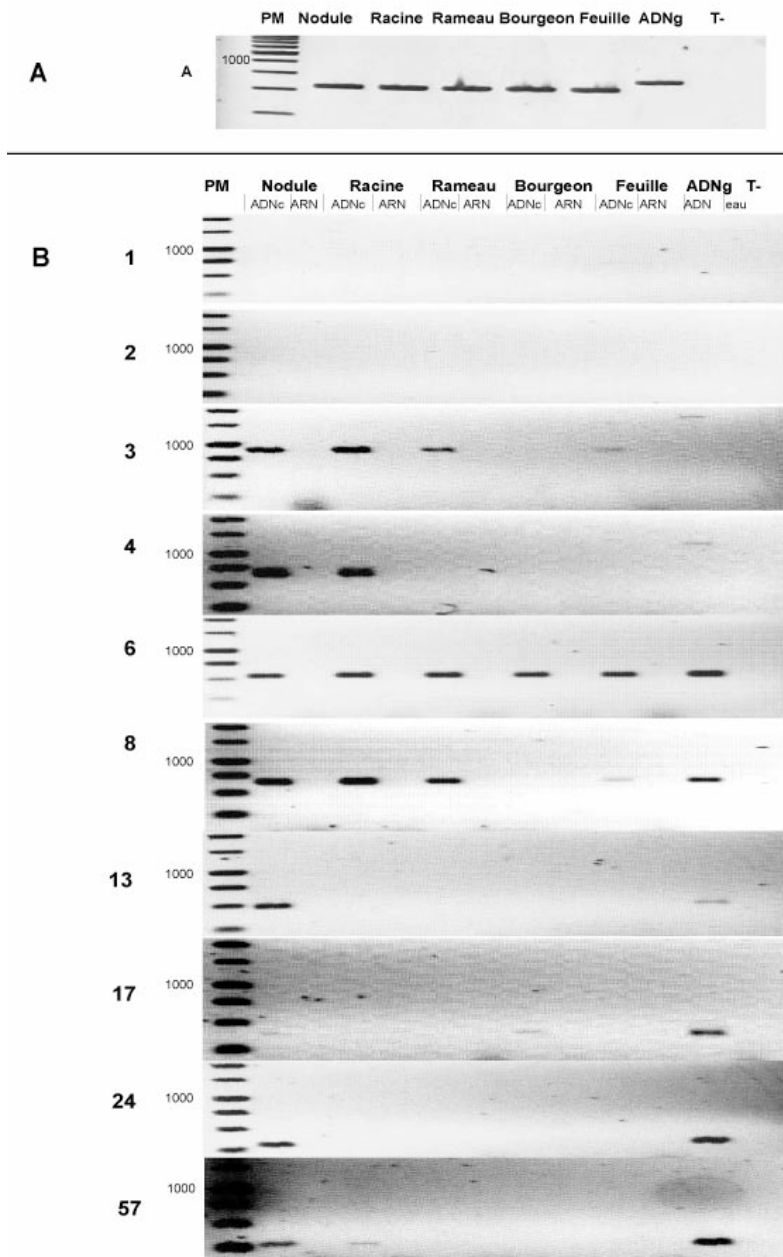


Figure 21 : Profil d'expression des gènes de subtilases de *M. truncatula* proches de *Cg12* analysé par RT-PCR. Des paires d'amorces spécifiques du gène de l'actine (contrôle interne) et chaque gène de subtilase ont été utilisés pour amplifier l'ADN correspondant. A: amplification de l'actine. dépôts 1-5 : ARN transcrit en ARN (ADNc); dépôt 6 : amplification sur l'ADN génomique; dépôt 7 : témoin négatif d'amplification. B : amplifications correspondant aux amorces de gènes de subtilases. Dépôt 1 : témoins de poids moléculaire (PM); dépôts 2, 4, 6, 8, 10 : amplifications sur l'ARN transcrit en ADN (ADNc); dépôts 3, 5, 7, 9, 11 : amplifications sur l'ARN non transcrit; dépôt 12 : amplifications sur l'ADN génomique; dépôt 13 : témoins négatifs d'amplification sans ADN.

## Discussion

### L'expression des gènes rapporteurs est associée à l'infection chez *M. truncatula*

Nous avons montré que chez *M. truncatula*, le promoteur de *Cg12* dirige l'expression des gènes rapporteurs très tôt au cours de l'interaction, dès l'infection des poils absorbants par des cordons d'infection bactériens. L'expression des gènes rapporteurs est ensuite détectée au niveau du primordium nodulaire, dans le péri-cycle et dans le massif de cellules nouvellement formées. Dans les nodules, l'expression est forte dans les cellules récemment envahies par des cordons d'infection de la zone d'infection, et décroît dès que ces cellules commencent leur différenciation et les bactéries fixent l'azote. L'expression des gènes rapporteurs serait donc associée aux étapes précoces de l'infection des cellules par des cordons d'infection rhizobiens. Dans le but de vérifier si cette expression est spécifique des cellules infectées, des expériences de co-localisation de la fluorescence GFP et des rhizobia seront réalisées en inoculant les plantes *Cg12-Gfp* avec des rhizobia qui expriment une protéine fluorescente rouge (DsRed) de façon constitutive (Gage, 2002).

La coloration de l'amidon des nodules a permis de montrer que l'expression du gène *Gus*, très forte dans la zone II s'affaiblit dès l'apparition des premiers amyloplastes dans les cellules infectées, ce qui correspond au passage de la zone II à l'interzone II-III. L'expression disparaît complètement dans la zone III. L'état de différenciation des bactéroïdes présents dans les différentes zones du nodule est décrit dans Vasse et coll. (1990). Dans la zone II, seuls des bactéroïdes de type 1 et 2 sont présents. Les bactéroïdes de type 1 sont ceux qui viennent d'être libérés des cordons d'infection, ils ne sont pas différenciés et peuvent se diviser. Ce type de bactéroïde n'est présent que dans la zone II, ce qui suggère que la libération des bactéroïdes par les cordons d'infection n'a lieu que dans cette zone (Vasse et coll., 1990). Les bactéroïdes de type 1 donnent naissance aux bactéroïdes de type 2, des bactéroïdes en différenciation incapables de se diviser mais aussi de fixer l'azote. Dans l'interzone II-III des bactéroïdes présents sont de type 3, ils sont d'avantage différenciés, ont atteint l'élongation maximale et commencent à fixer l'azote (Vasse et coll., 1990). L'expression des gènes rapporteurs dans les nodules de *M. truncatula* est donc induite dans les cellules récemment envahies par des cordons d'infection qui contiennent des bactéroïdes de type 1 et 2 et diminue considérablement dès que les bactéroïdes deviennent suffisamment différenciés pour fixer de l'azote.

Chez les plantes *pCg12-Gus*, une faible activité GUS est observée au niveau du système vasculaire des racines. On observe également une activité GUS au niveau du péri-cycle, en face des primordia nodulaires. Dans les deux cas, ce sont des cellules qui ne contiennent pas des bactéries. Ces résultats sont différents de ceux observés chez *A. verticillata* et *C. glauca*. La faible expression dans les racines non inoculées pourrait provenir d'une reconnaissance

imparfaite des éléments régulateurs du promoteur de *Cg12* chez *M. truncatula*. L'expression dans le péri-cycle, face au primordium nodulaire traduit des différences dans les mécanismes de la mise en place du nodule chez les deux espèces. Chez les plantes actinorhiziennes, le primordium nodulaire est formé à partir de divisions cellulaires du péri-cycle. Chez les Légumineuses, le péri-cycle ne participe pas directement à la formation des nodules, mais des gènes codant nodulines comme *Enod40* sont fortement exprimés dans les cellules du péri-cycle situées en face du primordium nodulaire. Le contexte transcriptionnel de ces cellules est donc modifié par l'interaction symbiotique, dans ce contexte, la transcription des gènes rapporteurs placés sous le contrôle de *Cg12* pourrait être activée.

### Facteurs intervenant dans l'induction du promoteur de *Cg12* chez *M. truncatula*

L'expression des gènes rapporteurs chez *M. truncatula* correspond aux cellules infectées, récemment envahies par les rhizobia qui ne fixent pas encore l'azote. Nous avons étudié les voies de signalisation qui induisent l'expression des gènes rapporteurs spécifiquement dans ces cellules.

#### ***L'expression des gènes rapporteurs n'est pas induite par les facteurs Nod***

L'incubation des racines avec des facteurs Nod de *S. meliloti* s'est traduite par des déformations de poils absorbants. Cependant aucune expression de gènes rapporteurs n'a pu être détectée pendant la semaine qui a suivi l'incubation. De même, aucune expression des gènes rapporteurs n'a pu être détectée dans les racines endomycorhizées des plantes transgéniques.

Chez les Légumineuses, l'incubation des racines avec des facteurs Nod induit l'expression de nombreux gènes codant des nodulines précoces ; c'est le cas pour *Enod5*, *MtEnod11*, *Enod12*, *Enod12A*, *Enod20*, *Enod40*, *Lb1*, *Ann1* ou *rip* (Miklashevichs et coll., 2001). Grâce à l'analyse de mutants pour lesquelles la réponse aux facteurs Nod est bloquée à différentes étapes, une voie de signalisation où interviennent les gènes correspondants a été proposée (Figure 2, Hirsch et coll., 2001). Comme certains de ces mutants sont également incapables d'établir des symbioses mycorhiziennes, une partie de cette voie serait commune aux deux symbioses (Hirsch et coll., 2001). Nos résultats concernant l'expression des gènes rapporteurs en réponse aux facteurs Nod et dans les racines endomycorhizées suggèrent que dans les cellules récemment infectées par les cordons d'infection de *S. meliloti*, une autre voie de signalisation que celle activée par les facteurs Nod ou la symbiose mycorhizienne intervient dans l'induction de l'expression des gènes rapporteurs.

#### ***Les protéines G n'interviennent pas***

Comme avec *A. verticillata*, nous avons étudié l'intervention de protéines G dans l'induction de l'expression des gènes rapporteurs en incubant les plantes transgéniques avec un agoniste des protéines G, le MAS-7. Aucune expression des gènes

rapporteurs n'a pu être détectée. Chez *M. sativa*, protéines G interviendraient dans la voie de signalisation induite par les facteurs Nod (Pingret et coll., 1998). Nos résultats suggèrent que l'activation de la transcription des gènes rapporteurs dans les cellules infectées par *S. meliloti* est due à une autre voie de signalisation que celle induite par les facteurs Nod, et que cette autre voie ne fait pas intervenir une activation des protéines G.

### A la recherche d'un orthologue de *Cg12*

Nous avons montré que chez *M. truncatula*, il existe une voie de signalisation qui active l'expression de gènes rapporteurs placés sous le contrôle du promoteur de *Cg12* dans les cellules en cours d'infection par *S. meliloti*. Cela suggère l'existence chez *M. truncatula* de gènes qui ont le même profil d'expression que *Cg12* chez *C. glauca*. Parmi ces gènes pourraient se trouver le gène orthologue de *Cg12* chez *M. truncatula*. Afin d'identifier ces orthologues potentiels de *Cg12* chez *M. truncatula*, nous avons donc recherché des gènes qui ont un profil d'expression similaire à celui de *Cg12* parmi les gènes de subtilases dont des séquences sont accessibles en ligne dans les banques d'EST.

Par RT-PCR trois candidats ont été identifiés (*Mt12-13*, *Mt12-24* et *Mt12-57*). *Mt12-13* et *Mt12-24* sont exprimés exclusivement dans les nodules. *Mt12-57* présente une forte expression nodulaire et une faible expression racinaire. Ces résultats sont en accord avec la provenance des séquences correspondantes qui figurent dans les bases de données. : *Mt12-24* et *Mt12-57* ne se retrouvent que dans des banques d'ADNc de nodules alors que *Mt12-13* est présent également dans des banques d'ADNc de cultures cellulaires, de racines privées de phosphate ou d'azote et de racines inoculées avec *S. meliloti*. La similarité de la séquence protéique de ces gènes avec *CG12* est de 56, 63 et 73% pour *MT12-24*, *MT12-57* et *MT12-13* respectivement et tout comme *Cg12*, ces trois gènes n'ont pas d'introns. L'ensemble de ces résultats suggère qu'au moins un de ces trois gènes pourrait avoir une fonction similaire à celle de *Cg12* et avoir un profil d'expression semblable à celui de *Cg12*. L'étude de l'expression de ces trois gènes pendant les étapes précoces du processus symbiotique et en réponse aux facteurs Nod de *S. meliloti*, actuellement en cours au laboratoire devrait nous permettre savoir si, comme pour *Cg12*, leur expression est activée précocement, en présence de *S. meliloti*.

## Discussion générale et perspectives

---

### L'expression de *Cg12* dépend d'une voie de signalisation activée en réponse aux bactéries symbiotiques

Au cours de ce travail, nous avons montré que chez *C. glauca* et *A. verticillata*, le promoteur de *Cg12* active l'expression des gènes rapporteurs dans les cellules récemment envahies par *Frankia*. Nous avons obtenu le même résultat au niveau protéique : *CG12* n'est présente que dans des cellules qui contiennent des filaments de *Frankia*. Par ailleurs nous avons montré que la régulation du promoteur de *Cg12* introduit dans *M. truncatula* est conservée : l'expression des gènes rapporteurs n'a lieu que dans les cellules récemment envahies par les bactéries. Que ce soit chez *M. truncatula* ou chez *C. glauca*, l'expression décroît fortement dès que les cellules infectées par les bactéries symbiotiques commencent à fixer l'azote. Dans les deux systèmes, il existe donc une voie de signalisation qui induit l'expression des gènes rapporteurs placés sous le contrôle du promoteur de *Cg12* uniquement dans les cellules en cours d'infection par les bactéries symbiotiques. Nos résultats suggèrent aussi que chez *A. verticillata* comme chez *M. truncatula* cette voie ne peut pas être activée par des facteurs bactériens diffusibles comme les facteurs Nod ou les filtrats de culture de *Frankia*. Dans les deux systèmes, un contact étroit entre les bactéries et les cellules infectées serait donc nécessaire pour l'activation de cette voie de transduction.

Au cours de l'infection des cellules végétales par *Frankia* ou *S. meliloti*, des cordons d'infection

permettent le passage des bactéries de cellule en cellule. Dans les deux systèmes, il s'agit d'invaginations membranaires formant des structures tubulaires recouvertes d'un matériel de composition proche d'une paroi végétale (Pawlowski et Bisseling, 1996). Ce mécanisme d'infection présente des similitudes avec les symbioses endomycorhiziennes. Au cours de l'infection des racines par les filaments mycéliens, ceux-ci progressent de cellule en cellule, entourés par la membrane peri-arbusculaire (MPA), dérivée du plasmalemme végétal. A l'interface entre la paroi du champignon et la MPA un matériel d'origine végétale contenant des composés pariétaux est déposé (Gianiazzi-Pearson, 1996). Dans les deux types de symbiose, la présence intracellulaire des symbiotes induit une accommodation de la cellule végétale et implique l'existence de mécanismes permettant d'éviter le déclenchement des réactions de défense de la plante (Kistner et Parniske, 2002). Les symbioses fixatrices d'azote pourraient utiliser une partie des mécanismes de reconnaissance qui existaient déjà chez les symbioses mycorhiziennes, plus anciennes et largement plus répandues chez les plantes (Hirsch et coll., 2001). L'existence d'au moins une voie de signalisation commune aux deux symbioses est attestée par le fait que de nombreux gènes induits précocement lors de la symbiose Légumineuses-rhizobia le sont également au cours de l'endomycorhization (Miklashevichs et coll., 2001) et par l'identification de mutants *sym* incapables d'établir les deux types de symbiose (Hirsch et coll., 2001). Cette voie de signalisation qui est la mieux connue à l'heure actuelle est celle qui est induite par les facteurs Nod (Figure 2). Il existe aussi des voies spécifiques à

chacune des deux associations mais celles-ci sont peu connues. De nombreux gènes induits lors de la mycorhization ne sont pas induits lors de l'interaction avec les rhizobia (Wulf et coll., 2003), et l'induction de l'expression de certains de ces gènes peut être obtenue en réponse à l'inoculation de champignons endomycorhiziens chez des mutants *sym* affectés dans la voie des facteurs Nod (Kistner et Parniske, 2002). Ces résultats suggèrent l'existence chez les Légumineuses d'une voie de signalisation différente de celle induite par les facteurs Nod et spécifique des symbioses endomycorhiziennes. Notre étude de l'expression des gènes rapporteurs dans des racines mycorhizées de *A. verticillata* et de *M. truncatula* a montré une absence d'induction en réponse à l'ecto- et à l'endomycorhization des racines. La voie responsable de l'induction de *Cg12* dans les cellules infectées par les bactéries ne serait donc pas activée pendant la mycorhization, mais uniquement au d'une infection symbiotique bactérienne.

Quels facteurs pourraient intervenir dans la transduction de ce signal? Nous avons montré qu'il ne s'agit probablement pas d'un signal diffusible agissant à faibles concentrations comme les facteurs Nod. Les différentes hormones utilisées chez *A. verticillata* n'induisent pas l'expression des gènes rapporteurs. Le même, résultat a été obtenu lors de l'incubation des racines de *M. truncatula* ou d'*A. verticillata* avec l'agoniste des protéines G MAS-7. Les phytohormones utilisées et les protéines G n'interviendraient donc pas directement. Ces résultats suggèrent qu'il s'agit probablement d'une voie indépendante celles qui sont induites par les facteurs Nod ou par les phytohormones. De même, l'absence d'expression en réponse aux blessures ou aux hormones de défense suggère qu'il ne s'agit pas non plus d'une voie activée en réponse aux attaques pathogènes ou aux blessures.

Chez *S. meliloti*, les exopolysaccharides (EPS) jouent un rôle important dans l'établissement de la symbiose. Les mutants *exo*, affectés dans leur synthèse sont incapables de noduler efficacement *M. sativa* (Gonzalez et coll., 1996). Un de ces mutants, *exoH* forme des cordons d'infection, mais ceux-ci arrêtent leur croissance très rapidement au niveau des poils absorbants et les nodules formés sont dépourvus de bactéries. Un deuxième signal de reconnaissance, faisant intervenir des EPS et indépendant de celui véhiculé par les facteurs Nod semble donc nécessaire à la poursuite de l'infection (Gonzalez et coll., 1996). La voie de signalisation qui intervient dans l'expression de *Cg12* dans les cellules en cours d'infection pourrait faire intervenir un signal de ce type. L'inoculation des plantes transgéniques de *M. truncatula* avec une souche mutante *exoH* de *S. meliloti*, en cours au laboratoire, devrait nous permettre prochainement de mieux comprendre le rôle des EPS bactériens dans l'induction de *Cg12*. Des mutants de *S. meliloti* affectés dans la synthèse d'autres EPS, ou d'autres molécules qui peuvent jouer un rôle dans la signalisation comme les lipo polysaccharides et les glucanes cycliques pourront également être utilisés. Une autre possibilité qui pourra être exploitée est le croisement des plantes transgéniques avec des mutants de *M. truncatula* affectés à différentes étapes du

processus symbiotique.

Plusieurs autres moyens peuvent être envisagés afin de poursuivre la caractérisation de cette voie de transduction :

- Une analyse par délétion du promoteur de *Cg12* pourrait être réalisée afin d'identifier les éléments nécessaires à la spécificité d'expression de *Cg12*. Si un orthologue de *Cg12* est trouvé dans *M. truncatula*, la comparaison de son promoteur avec celui de *Cg12* permettrait aussi de trouver des motifs communs potentiellement à l'origine de cette spécificité. Par la technique du simple hybride, des facteurs de transcription qui reconnaissent ces motifs pourraient alors être identifiés.
- Une mutagenèse au EMS (Ethyl Methyl Sulfonate) pourrait être réalisée sur des plantes de *M. truncatula* contenant les fusions transcriptionnelles promoteur *Cg12*-gènes rapporteurs. L'isolement de mutants avec des profils d'expression de gènes rapporteurs altérés permettrait alors d'identifier des gènes qui interviennent dans cette voie de signalisation. Le séquençage du génome de *M. truncatula*, actuellement en cours facilitera ce type d'approche.

## Une fonction des subtilases commune aux deux symbioses fixatrices d'azote?

---

Chez *M. truncatula*, nous avons montré qu'il existe plusieurs gènes codant des subtilases dont l'expression est spécifique des nodules. Il pourrait donc exister un orthologue de *Cg12* chez *M. truncatula*. L'analyse du profil d'expression détaillé de ces gènes lors des premières étapes du processus symbiotique et en réponse aux facteurs Nod de *S. meliloti*, en cours au laboratoire, devrait nous permettre de vérifier cette hypothèse. Des expériences d'hybridation *in situ* permettront ensuite de vérifier que dans les nodules de *M. truncatula*, l'expression de ce gène est restreinte à la zone II. Si les résultats de ces expériences montrent un profil d'expression identique à celui de *Cg12*, on pourrait supposer que les subtilases de type *Cg12* ont une fonction similaire dans les deux systèmes symbiotiques. Dans ce contexte, il serait intéressant d'identifier des gènes homologues à *Cg12* chez d'autres plantes actinorhiziennes qui ont des mécanismes d'infection différents comme *Discaria trinervis* (infection intercellulaire ; Valverde et Wall, 1999) ou *Datisca glomerata* (pas de formation de ponts cytoplasmiques au cours de l'infection ; Berg et coll., 1999).

Quelle fonction commune aux deux systèmes pourraient accomplir ce type de subtilases dans les cellules en cours d'infection par des bactéries symbiotiques? L'analyse des peptides signal retrouvés dans les séquences peptidiques déduites d'*Ag12* et de *Cg12* prévoit une localisation extracellulaire pour les protéines matures. Nos résultats concernant l'immunolocalisation de *CG12* suggèrent également



une localisation de CG12 dans le compartiment extracellulaire, au niveau des parois végétales et de la matrice polysaccharidique qui entoure les filaments de *Frankia*. Deux hypothèses peuvent être envisagées concernant le rôle que pourraient avoir ces subtilases au niveau des parois ou de la matrice qui entoure les bactéries :

(1) Si ces subtilases ont une faible spécificité de substrat et appartiennent au groupe des subtilases dégradatives, elles pourraient participer à la dégradation de protéines associées à la paroi végétale pendant l'infection bactérienne. Cette dégradation pourrait conduire à l'affaiblissement ou au remodelage des parois associée au passage des cordons d'infection de *Frankia* ou de rhizobia d'une cellule à une autre. Si ces subtilases sont actives au niveau des cordons d'infection, la dégradation de protéines associées à ceux-ci pourrait également être liée à des changements morphologiques des cordons d'infection pendant l'infection des cellules.

(2) Si ces subtilases ont une forte spécificité de substrat et appartiennent au groupe des maturases, elles pourraient participer à la maturation de protéines ou de peptides, donnant naissance à des molécules bioactives qui pourraient faire partie d'une cascade de signalisation activée en réponse à l'infection bactérienne.

Pour CG12, la spécificité de clivage de n'est pas connue, cependant elle a été étudiée récemment pour deux subtilases proches de CG12: LESBT1 et ARA12. Ces deux subtilases présentent un profil d'expression restreint à quelques organes, et ont une forte spécificité de substrat. Un rôle dans les mécanismes de signalisation a été proposé. La proximité de ces deux subtilases avec *Cg12* (57 % et 58 % de similarité au niveau protéique avec CG12 pour ARA12 et LESBT1 respectivement) permet de supposer que *Cg12* serait également spécifique et interviendrait dans les processus de signalisation associés à la pénétration de *Frankia*. La caractérisation biochimique de CG12 serait cependant nécessaire pour vérifier cette hypothèse.

Dans le but d'étudier la spécificité de clivage de CG12, nous avons utilisé un système baculoviral pour produire la protéine. Ce système a l'avantage de permettre l'obtention de larges quantités de protéine comportant toutes les étapes de maturation post-transcriptionnelles nécessaires à l'obtention d'une protéine active. La protéine a été détectée dans le surnageant de cultures d'insecte, et sa purification est en cours. La spécificité de clivage de CG12 sera étudiée en digérant des peptides comme le glucagon ou l'insuline par CG12 et en effectuant une analyse par MALDI-TOF ("Matrix Assisted Laser Desorption – Ionization Time Of Flight mass spectrometry") des produits de digestion. Cette approche, déjà été utilisée pour LESBT1 (Janzik et coll., 2000) devrait nous permettre de déduire la spécificité de clivage de CG12.

Les informations disponibles concernant les substrats des subtilases végétales sont peu nombreuses, elles concernent deux subtilases de tomate : SBP50 et P69. SBP50 est une protéase à

sérine ayant une parenté immunologique avec les subtilases ; elle est responsable de la maturation la systémine, l'hormone peptidique qui active de manière systémique la production d'inhibiteurs de protéases chez la tomate (Schaller et Ryan, 1994). P69 est une subtilase induite spécifiquement en réponse à une attaque pathogène ; elle intervient dans la maturation de LRP, une protéine à motifs riches en leucine (LRR) intervenant dans les réactions aux attaques pathogènes (Torner et coll., 1996b).

Récemment deux gènes de Légumineuses (*Nork/Symrk*) qui interviennent dans la voie de signalisation activée en réponse aux facteurs Nod ont été isolés par clonage positionnel (Endre et coll., 2002 ; Stracke et coll., 2002). Ces gènes codent des protéines intermembranaires semblables à des récepteurs kinase avec un domaine à motifs riches en leucine (LRR-RLK). Les protéines de type LRR-RLK sont largement répandues chez les plantes -216 membres ont été identifiés chez *Arabidopsis*- et jouent des rôles importants dans différents processus de signalisation. Parmi les LRR-RLK les mieux étudiées figurent CLAVATA1, qui régule le développement méristématique ; XA21 et FLS2, des récepteurs d'éliciteurs bactériens, et les récepteurs de plusieurs hormones peptidiques végétales : celui des phytosulfokines, celui des brassinostéroïdes et celui de la systémine. Les voies de signalisation faisant intervenir des LRR-RLK sont donc très répandues chez les plantes, et semblent jouer un rôle important en particulier dans la reconnaissance des microorganismes, pathogènes ou symbiotiques (Kistner et Parniske, 2002). Les données concernant SBP50 et P69 montrent que des clivages spécifiques réalisés par des subtilases peuvent être associés à ce type de voie de signalisation, soit à travers une maturation des protéines à LRR comme celle qui a lieu pour LRP, soit en amont des protéines à LRR, à travers la production d'un peptide reconnu par la protéine à LRR, c'est le cas pour la systémine. Des subtilases comme CG12 pourraient jouer des rôles similaires dans les voies de signalisation activées pendant la symbiose en générant des peptides reconnus par des protéines à LRR-RLK du type NORK ou en maturant des protéines de ce type.

Si CG12 possède une forte spécificité de substrat, il serait donc très intéressant de chercher des substrats potentiels. Cela pourrait être réalisé par exemple en digérant des extraits de protéines de *Frankia* ou des extraits de protéines extracellulaires de nodules de *C. glauca* avec CG12. La comparaison des profils protéiques correspondants sur des gels bidimensionnels avec ceux d'extraits protéiques non digérés permettrait d'identifier des protéines de plante et de la bactérie qui peuvent être digérées par CG12.

Chez les Légumineuses, le gène *Enod5* présente un profil d'expression voisin de celui que nous avons décrit pour *Cg12*. Des transcrits d'*Enod5* peuvent être détectés quelques heures après une infection par les rhizobia au niveau des poils absorbants (Horvath et coll., 1993). Dans les nodules, l'expression d'*Enod5* est restreinte aux cellules récemment infectées par les cordons d'infection de la zone II (Scheres et coll., 1990). Contrairement à d'autres gènes de nodulines

précoces comme *Enod12* ou *Enod40*, l'expression d'*Enod5* n'est décelée que dans des cellules qui contiennent des bactéries. Même si une faible induction d'*Enod5* par les facteurs Nod a été décrite (Heidstra et coll., 1997), son expression est fortement corrélée à l'infection des cellules par les bactéries. L'existence d'un signal bactérien agissant à courte distance a été proposée pour expliquer ce profil d'expression. ENOD5 serait active dans le compartiment extracellulaire, elle présente des similarités avec des protéines à arabinogalactane (AGP) qui jouent des rôles importants dans la signalisation intercellulaire, la différenciation cellulaire, le développement des tissus et l'embryogenèse somatique (Fruhling et coll., 2000). CG12 pourrait intervenir également dans des processus de signalisation intercellulaire. Chez le vertébrés, l'intervention de subtilases dans la communication intercellulaire est bien documentée : les proprotéines convertases interviennent en particulier dans maturation de neurohormones (Seidah et Chrétien, 1999), des cadhérines (Posthaus et coll., 2003) et dans la régulation des récepteurs aux sémaphorines (Artigiani et coll., 2003).

L'analyse des propriétés biochimiques de CG12 et la recherche de son substrat fournirait des informations importantes en ce qui concerne le rôle de cette protéine au niveau moléculaire. Cependant, pour avoir accès à la fonction globale que de ce gène, il serait très utile d'altérer les niveaux d'expression endogènes. Cela pourrait être fait grâce à une approche ARN antisens ou d'interférence d'ARN (RNAi) afin de diminuer le niveau d'expression de *Cg12* chez *C. glauca* pour ensuite analyser les effets phénotypiques qui en résultent. L'analyse de plantes qui surexpriment *Cg12* pourrait également être envisagée. Si un orthologue de *Cg12* est trouvé chez *M. truncatula*, il serait très intéressant de rechercher une lignée de *M. truncatula* mutée dans ce gène, dans les collections de mutants qui seront bientôt disponibles. La connaissance de la fonction de cette subtilase de *M. truncatula* serait alors d'une grande utilité pour comprendre celle de CG12 chez *C. glauca*.

## Une origine évolutive commune pour les deux symbioses

En introduisant les fusions promoteur *Cg12*-gène rapporteurs dans *M. truncatula*, nous avons montré que le profil d'expression de ces gènes chez *M. truncatula* est très semblable à celui obtenu chez les plantes actinorhiziennes. Une approche similaire a été utilisée pour d'autres gènes de nodulines. Des fusions entre les promoteurs des gènes d'hémoglobine de lotier ou de *C. glauca* avec le gène rapporteur *Gus* ont été réalisés et introduites dans *A. verticillata* (Franche et coll., 1998b) et dans le lotier (Jacobsen-Lyon et coll., 1995). Dans les deux cas, l'activité GUS a été retrouvée au niveau des cellules infectées de la zone

de fixation, ce qui correspond au profil d'expression des gènes d'hémoglobine endogènes. Cela suggère que les facteurs de transcription qui dirigent l'expression de gènes de nodulines tardives comme l'hémoglobine sont conservés entre les deux systèmes symbiotiques (Franche et coll., 1998b). En ce qui concerne les gènes de nodulines précoces, peu d'informations sont disponibles. Récemment des fusions entre le gène *Gus* et les promoteurs des gènes *Enod12* et *Enod40* ont été introduites chez *A. verticillata*. Pour *Enod12*, l'activité GUS est retrouvée dans cellules infectées de la zone de fixation, alors que chez les Légumineuses *Enod12* est surtout exprimé dans la zone d'infection (Laplace et al., sous presse). Pour *Enod40*, l'expression dans les stades précoces n'est pas non plus conservée (C. Santi, communication personnelle). Cela suggère que les facteurs qui interviennent dans régulation de l'expression de ces gènes de nodulines précoces chez les Légumineuses ne sont pas totalement conservés chez les plantes des nodules actinorhiziens.

L'expression d'*Enod12* et d'*Enod40* est induite chez les Légumineuses par les facteurs Nod (Miklashevichs et coll., 2001). Or aucun effet provoqué par des facteurs Nod de rhizobia n'a pu être mis en évidence chez les plantes actinorhiziennes (Cérémonie et coll., 1998 ; Van Ghelue et coll., 1997). Certaines des voies de signalisation induites en réponse aux bactéries, dont celle qui est activée par les facteurs Nod ne seraient donc pas conservées entre les deux symbioses. Nos résultats concernant *Cg12* montrent une étroite conservation du profil d'expression des gènes rapporteurs entre les deux systèmes. Cette voie de signalisation, activée très précocement en réponse à l'infection bactérienne et différente de celle induite par les facteurs Nod serait bien conservée entre les deux symbioses. Si un orthologue de *Cg12* est identifié chez *M. truncatula*, il sera intéressant d'introduire une fusion entre son promoteur et un gène rapporteurs dans *A. verticillata* afin de le vérifier. La conservation de voies de signalisation entre les deux systèmes symbiotiques pourrait s'expliquer par une origine évolutive commune (Soltis et coll., 1995).

Pour la plupart des gènes de nodulines, un gène similaire ayant une fonction non symbiotique a été découvert. Des gènes codant des hémoglobines, par exemple ont été retrouvés dans des plantes incapables d'établir des symbioses fixatrices d'azote comme *Arabidopsis* (Hunt et coll., 2001). Cela suggère que les gènes qui aujourd'hui interviennent dans la symbiose auraient pu être recrutés parmi des gènes non symbiotiques. Cette hypothèse semble plausible pour *Cg12* : de nombreux gènes de subtilases sont généralement présents dans le génome des plantes ; un de ces gènes aurait pu être recruté pour une nouvelle fonction symbiotique.

## Matériel et méthodes

### Matériel

#### Matériel végétal

Les graines de *Casuarina glauca* et de *Allocasuarina verticillata* ont été fournies respectivement par le Desert Development Center (Le Caire, Egypte) et par les établissements Versepuy (Le Puy en Velay, France. ). Les plantes de *C. glauca* ont été cultivées en serre entre 25 et 30°C. Les graines ont été mises à germer en terrine, sur un mélange vermiculite-terreau 1:1. Pour l'obtention de nodules, les plantes âgées de 2 mois sont transférées dans un système hydroponique avec du milieu BD (Tableau 5). Après l'inoculation, celui-ci est remplacé par du milieu BD sans azote.

Les graines d'*Arabidopsis thaliana* ecotype Col-0 ont été fournies par le Nottingham *Arabidopsis* Stock Center (NASC ; <http://nasc.nott.ac.uk/>). Les graines de *Medicago truncatula* ecotype Jemalong utilisées pour les expériences de RT-PCR ont été fournies par J. M. Prospero (INRA, Montpellier).

**Tableau 5** : Milieu de Broughton et Dillworth (BD) modifié

<b>Macroéléments</b>	
CaCl <sub>2</sub>	1m M
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 mM
MgSO <sub>4</sub>	0,25 mM
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,25 mM
MnSO <sub>4</sub>	1 $\mu$ M
<b>Chélate de fer</b> : Fe, EDTA	
Na <sub>2</sub> EDTA	9,3 mg.L <sup>-1</sup>
FeSO <sub>4</sub>	6,9 mg.L <sup>-1</sup>
<b>Oligoéléments</b>	
H <sub>3</sub> B <sub>3</sub>	2 $\mu$ M
ZuSO <sub>4</sub>	0,5 $\mu$ M
CuSO <sub>4</sub>	0,2 $\mu$ M
CoSO <sub>4</sub>	0,1 $\mu$ M
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0,1 $\mu$ M

Pour le milieu azoté 0,5 g.L<sup>-1</sup> de KNO<sub>3</sub> sont ajoutés.

La propagation des plantes en culture *in vitro* est réalisée dans une chambre de culture à 27°C (pour les Casuarinacées) ou à 25°C (pour *Arabidopsis* ou *M. truncatula*) avec un éclairage de 50  $\mu$ Einstein. m<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup> fourni par des tubes fluorescents (Gro-Lux, Sylvania-Osram, Munich, Allemagne) avec une photopériode de 16 h. *Arabidopsis* et *M. truncatula* ont été cultivés dans une chambre de culture à 23-25°C, sous une lumière de 50  $\mu$ E/m<sup>2</sup>/s avec une photopériode de 16 h sur un mélange vermiculite-terreau 1:1.

#### Souches fongiques

La souche IR100 de *Pisolithus alba* fournie par R. Duponnois a été utilisée pour l'obtention d'ectomycorhizes sur *A. verticillata*.

Des spores stériles du champignon endomycorhiziens *Glomus intraradices* en provenance

du MUCL Culture collection (Louvain-la Neuve, Belgique) (numéro d'accession MUCL43194) ont été utilisées pour obtenir des endomycorhizes.

L'inoculum de *Gigaspora rosea*, *Glomus mosseae* et *Glomus deserticola* a été fourni par L. Wall (Université de Quilmes, Argentine). Les trois souches ont été multipliées dans des racines de trèfle cultivé en serre dans du terreau désinfecté. L'inoculum est préparé en tamisant le terreau après l'avoir laissé sécher. La pureté de l'inoculum est vérifiée en identifiant les spores à la loupe.

#### Souches bactériennes

##### *Escherichia coli*

La souche DH5 $\alpha$ (F') : *supE44*,  $\Delta$ *lacU169* (F80*lacZ* $\Delta$ M15), *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi1*, *relA1* (F'). d'*Escherichia coli* a été utilisée pour les clonages.

##### *Frankia*

La nodulation de *C. glauca* a été effectuée avec la souche de *Frankia* Thr (Girgis *et coll.*, 1990) isolée en Egypte à partir de nodules de *Casuarina cunninghamiana*.

*A. verticillata* a été nodulée avec la souche *Allo2* isolée en Uruguay à partir de nodules d'*A. verticillata* (Girgis & Schwencke, 1993).

Les tests d'induction d'expression de *Cg12* par des *Frankia* non infectieux ont été réalisés avec la souche Ac50-1 isolée à partir de nodules d'*Alnus cuminata* et fournie par A. Moiroud.

##### *Sinorhizobium meliloti*

La souche 1021 (type sauvage, Meade *et coll.*, 1982) a été utilisée pour inoculer *M. truncatula*.

##### *Agrobacterium tumefaciens*

La transformation génétique de *A. verticillata*, *C. glauca* et *Arabidopsis* a été réalisée avec la souche d'*A. tumefaciens* C58C1 (pGV2260; Bin19) (Vancannet *et coll.*, 1990). La souche C58C1 pGV3101 a été utilisée lors de la transformation d'*Arabidopsis* avec les constructions *Cg12-Gfp* et *Ara12-Gfp*. *M. truncatula* a été transformée avec la souche EHA105 (Hood *et coll.*, 1993).

#### Plasmides

Les plasmides utilisés pour les constructions géniques figurent dans le tableau 6.

**Tableau 6 :** Plasmides utilisés pour les constructions géniques

Nom	Résistance	Référence ou fournisseur
pGEM-T	Ampicilline	Promega
pGEM-T <sub>E</sub>	Ampicilline	Promega
PKS+	Ampicilline	Stratagene
pBI101. 3	Kanamycine	Clontech
pBIN35S-mGFP5ER	Kanamycine	Hasseloff et coll., 1997
pEYFP	Ampicilline	Clontech
pAra12-gus	Kanamycine	Svistoonoff et coll., sous presse

## Oligonucléotides synthétiques

### clonage du promoteur de *Cg12*

Isolement du promoteur de *Cg12*

*Cg12*-Gsp1

CTGATGCTGAACTACCAGGGAGAGTCAGCA

*Cg12* -Gsp2 : GGGAAGGAAGACG  
AAGCCAACTGTAGC

Adaptateurs

AP1 GTAATACGACTCACTATAGGG

AP2 ACTATAGGGCACGCGGGT

Criblage des bactéries ayant intégré pGEM-T avec  
P *Cg12*

M13-Forward GTAAAACGACGGCCAGT

M13-Reverse GGAAACAGCTATGACCATG

### Sous clonage dans *pBi101. 3*

*Cg12*Bam

CGGGATCCCGTTTTCTCTCTAAATAAGAA  
TTGC

*Cg12*Hind

CCCAAGCTTGGGAGAGATGTAGACGAGGA  
GG

### RT-PCR sur *M. truncatula*

Amorces pour amplifier le gène d'actine (contrôle interne, Cohn et coll., 2001):

AF: CCATTCTGCTCCCTCAG

AR: GACGTAATAAAAACCCAG

Amorces correspondant aux ESTs identifiées avec TBLASTN (le chiffre correspond au rang de cette EST sur la sortie de TBLASTN) :

1F : GTGAAAATACAATAATTGCAAAC

1R : CCCCTCACTTTTGAAGGATCAAGTG

2F : GAATTGGCACAATGTGTCTTATC

2R : CCATCACAACATTTGTAACAATCCTC

3R : GGCATCAAAGCCTCAAGCACCTCCTTC

3F : GATTTTGAAACCAGATGTTATTGGGCCTGG

4F : GTAACAGACAATCGTCGAGGTTTTCCATC

4 R

GACCATTGCAGTTCTCCAAATTCGTATTTTCCC

6F : GAGACGACGACGGCCACGGCACTCACACC

6R : CCCGTCATACACAAATTCCTT

8F : GGCTTGTGAGTTGACACAAGGCATGTGAGC

8R : CCAGAAGGCATTGAATGAGATGTGAACG

13F : CGAGAGATAACACCAACAAGCCTATAAGCG

13R : CGCAGTTCCCAAAATGGTATTTCTCC

1 7 F :  
GCCTCTCGGTTTTGCTTCTGGGACAGCAAAAGGC  
1 7 R :  
GTAAAGAGACACGCCGTTATATTCTGTGCC  
24F : CAACAAAGCTTACGAGGCCTTTCACG  
24R : CAGGATTTGTATTAGGTTGCCTCCAGC  
5 7 F :  
CCAACCTTCATACGACGTTGTTATTGGTGTACT  
5 7 R :  
CGGCGGAGCCAGCGGCGGTTGTGGCAGTATGGG

## Méthodes

### Méthodes de biologie moléculaire

#### Extraction d'acides nucléiques

##### Extraction d'ADN génomique végétal

L'ADN génomique de *C. glauca* a été extrait sur des rameaux de jeunes pousses de *C. glauca* âgées de 3 semaines en utilisant le kit "Dneasy" (Qiagen, Courtaboeuf, France), selon les instructions du fournisseur. L'ADN génomique d'*Arabidopsis* et de *M. truncatula* a été extrait avec la même méthode sur des tissus jeunes.

##### Extraction d'ADN génomique bactérien

L'ADN total d'*A. tumefaciens* est extrait de la manière suivante: 5 mL d'une culture de 36 h d'*A. tumefaciens* contenant les quantités appropriées d'antibiotiques sont centrifugés 10 min à 3200 g et 4°C. Le culot correspondant est repris dans 1,2 mL de tampon d'extraction (8% Saccharose, 50 mM Tris HCl pH 8,0, 50 mM EDTA, 1,4% SDS, et 1,65 mg de Protéinase K) et incubé pendant 30 min à 37 °C. 165 µL de NaCl à 5M sont rajoutés et la préparation est incubée 30 min à 68°C. L'ADN est ensuite cassé avec une seringue (aiguille Terumo 0,8 x 40 mm) en effectuant plusieurs va et viens. Une purification au phénol-chloroforme est ensuite effectuée (voir ci-dessous) et le culot correspondant est repris dans 500 µL d'eau stérile. 3 µL de Rnase sont rajoutés et la préparation est incubée 30 min à 37°C. Afin d'éliminer l'enzyme, une nouvelle purification au phénol chloroforme est réalisée. Le culot correspondant est repris dans 200 µL d'eau stérile et gardé à -20°C.

##### Extraction d'ADN plasmidique

Les extractions d'ADN plasmidique sur *E. coli* sont réalisées à partir de cultures liquides (5 à 15 mL) de bactéries cultivées pendant 14 à 16 h dans le milieu LB (Tableau 7) contenant les quantités appropriées d'antibiotiques en utilisant le Miniprep Kit (Qiagen) selon les instructions du fournisseur.

**Tableau 7 :** Milieu Luria et Bertani pour *E. coli* (LB)

Bacto tryptone.....		10 g. L <sup>-1</sup>
Extrait de levure.....	5 g. L <sup>-1</sup>	
NaCl .....		10 g.l-1
Bacto-agar (pour le milieu solide)		14 g. L-1

#### Extraction d'ARN

L'ARN de *M. truncatula* est extrait à partir de plantes âgées d'un mois en utilisant le kit "RN Easy"

(Qiagen) selon les instructions du fournisseur.

### **Purification des acides nucléiques**

La purification des fragments d'ADN après digestion enzymatique ou après une réaction de PCR est réalisée en utilisant le kit "High Pure PCR product Purification" (Roche, Meylan, France) selon les indications du fournisseur.

Lorsque la quantité d'ADN obtenue avec la méthode précédente est insuffisante, la technique de purification au phénol chloroforme est utilisée:

#### **Purification de l'ADN au phénol chloroforme**

L'échantillon à purifier est mélangé à 1 volume de Phénol/CAIA (1/1). Après une centrifugation de 5 min à 8000 g, l'ADN hydrosoluble est séparé des composés liposolubles en récupérant la partie supérieure. Un volume de CAIA (24/1) est rajouté et de même, une deuxième centrifugation pendant 5 min à 8000 g à 4°C permet de récupérer une partie supérieure aqueuse contenant l'ADN. Afin de précipiter l'ADN, un volume d'une solution d'Acétate de sodium (3M pH 5,2) et 2 volumes d'éthanol sont rajoutés. La préparation est ensuite incubée pendant 30 minutes à -20°C et centrifugée pendant 15 min à 8000 g et à 4°C. Le culot correspondant est lavé avec 1 mL d'éthanol à 70 % et centrifugé 15 min à 8000 g à 4°C. Le culot d'ADN correspondant est séché au sous vide pendant 10 min et repris dans 500 µl d'eau stérile.

### **Digestion et ligation de l'ADN**

#### **Digestion par des enzymes de restriction**

Les réactions de digestion sont effectuées dans 100 µL de solution contenant de 2 à 5 unités enzymatiques par µg d'ADN à digérer et un tampon défini par le fournisseur de l'enzyme. Les réactions sont réalisées pendant au moins 2 h à 37°C ou à la température indiquée par le fournisseur de l'enzyme.

#### **Ligation de fragments d'ADN**

Les ligations sont réalisées avec la T4 DNA ligase (Promega), le mélange ADN-tampon-T4 DNA-ligase est incubé 16 h à 15°C selon les indications du fournisseur.

### **PCR**

Les PCR sont réalisées sur 50 µl d'une solution contenant 10 mM de Tris-HCl pH 8,3 ; 50 mM de KCl ; 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub> ; 200 µM de dNTP, 125 µM de chaque amorce et une unité de Taq polymérase (Promega). Les paramètres utilisés pour programmer le thermocycleur sont les suivants :

- pour cribler les bactéries transformées : généralement 94°C pendant 5 min ; 35-40 cycles de 30s à 94°C 30 s, 1 min à 50° C et 3 min à 72°C et une dernière incubation de 15 min à 72°C.

- pour les autres PCR : généralement 94°C pendant 3 min ; 30 cycles de 30 s à 94°C, 1 min à 58° C et 3 min à 72° C et un dernier cycle de 7 min à 72°C.

Le temps d'incubation à 72°C est ajusté selon la longueur des fragments que l'on désire amplifier. La température d'hybridation est ajustée selon la

température de fusion des amorces utilisées.

### **Analyse des acides nucléiques**

#### **Électrophorèse**

Les résultats d'extractions d'ADN, de PCR, de digestions enzymatiques et de purifications sont analysés avec des mini-gels d'agarose à 0,8 ou 1%, préparés dans du tampon TBE 0,5X (Tris-Borate 0,045 M, EDTA 1mM). Les échantillons sont déposés avec un sixième de volume de tampon de charge (Glycérol 50%, bleu de bromophénol 0,07%, TBE 50%). Après migration à 50-100V dans le tampon TBE 0,5X en présence de BET (0,1 µg. mL<sup>-1</sup>), les gels sont photographiés sous lumière UV (312 nm).

#### **Transfert sur membrane" Southern Blot"**

##### **Transfert d'ADN**

Après électrophorèse, le gel est incubé 1 h dans une solution de dénaturation (NaCl 1,5M, NaOH 0,5M) avec agitation. Il est ensuite incubé 1 h dans une solution de neutralisation (NaCl 1,5M, Tris-HCl 1M pH 7,5) sous agitation douce. Le gel est alors placé sur un pont de papier filtre (Wathman 3MM) plongeant dans une solution SSC x 10. Une membrane en nylon, puis une pile de papier absorbant et enfin un léger poids sont placés au dessus. Le transfert se fait toute la nuit. La membrane est finalement séchée et l'ADN est fixé par traitement aux U. V. (Crosslinker, Spectrolinker, Spectronics).

##### **Marquage d'ADN par extension d'amorce**

Le fragment d'ADN à marquer est dénaturé, des amorces aléatoires d'héxanucléotides viennent s'hybrider sur cette matrice, les fragments de brins complémentaires sont alors synthétisés par la Klenow polymérase. L'"Oligolabelling Kit" (Amersham) est utilisé selon les recommandations du fournisseur. Le volume réactionnel de 50 µL contient 100 à 200 ng d'ADN dénaturé 5 min à 95 °C, un mélange (tampon+dNTP+héxanucléotides) et une Klenow polymérase fournis par Amersham et 50 µCi d'<sup>32</sup>P dCTP.

La réaction est incubée 1 h à 37°C. L'excédent d'<sup>32</sup>P dCTP non incorporé est éliminé en utilisant le "Qiaquick Nucleotide Removal Kit" (Qiagen).

##### **Hybridation**

La membrane est préhybridée pendant au moins 2 h dans une solution d'hybridation (SSC, 6x ; Denhardt's, 5x ; 1% de SDS et 0,1 g.L<sup>-1</sup> d'ADN de sperme de poisson) dans un four à hybridation à 65°C. La sonde est dénaturée pendant 5 min à 95 °C directement dans la solution de préhybridation. L'hybridation a lieu toute la nuit à 65°C. La membrane est lavée 2 fois 20 min dans une solution (2xSSC, 0,1% SDS) à 65°C puis 2 fois 20 min dans une solution (1xSSC, 0,1% SDS) à 65°C et 2 fois 20 min dans une solution (0,5xSSC, 0,1 SDS). La membrane est séchée, enrobée dans un film plastique et placée en face d'un film (Hyperfilm, Amersham) dans une cassette d'autoradiographie à -80°C.

##### **Transcription inverse-PCR (RT-PCR)**

Pour éviter les problèmes de contamination liés à

l'ADN et qui ne sont pas toujours résolus par traitement à la DNase, nous avons utilisé le "mRNA capture kit" (Boehringer). Les ARNm sont la cible d'une hybridation spécifique avec un oligonucléotide (dT)<sub>20</sub> marqué à la biotine. Cela permet (i) de capturer les ARNm dans des tubes dont la paroi est recouverte de streptavidine, (ii) d'amorcer la réaction de transcription inverse après élimination de la solution et lavage.

Après capture des ARNm à partir de 3,5 µg d'ARN total selon le protocole défini par le fournisseur, la réaction de transcription inverse est réalisée dans un volume de 50 µL (Tableau 8) pendant 1h à 42°C. La solution est ensuite incubée pendant 5 min à 95°C pour détacher l'ADNc.

**Tableau 8** : Composition de la solution de RT-PCR

KCl	50 mM
Tris-HCl (pH9)	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
Triton X-100	0,1%
dNTP	0,2 mM
Amorces	0,2 mM de chaque
Taq polymérase (Promega)	1 U

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est réalisée dans un volume de 50 µL à partir de 2-5 µL d'ADNc. Un même ARNm peut donc servir pour tester différents couples d'amorces. Le mélange réactionnel est soumis à une amplification en chaîne selon le protocole suivant: 3 min à 94°C ; 35 cycles comprenant : 1 min à 94°C, 1 min à 55°C, 1 min à 72°C ; 3 min à 72°C et 4°C (à l'infini).

### Analyse bioinformatique

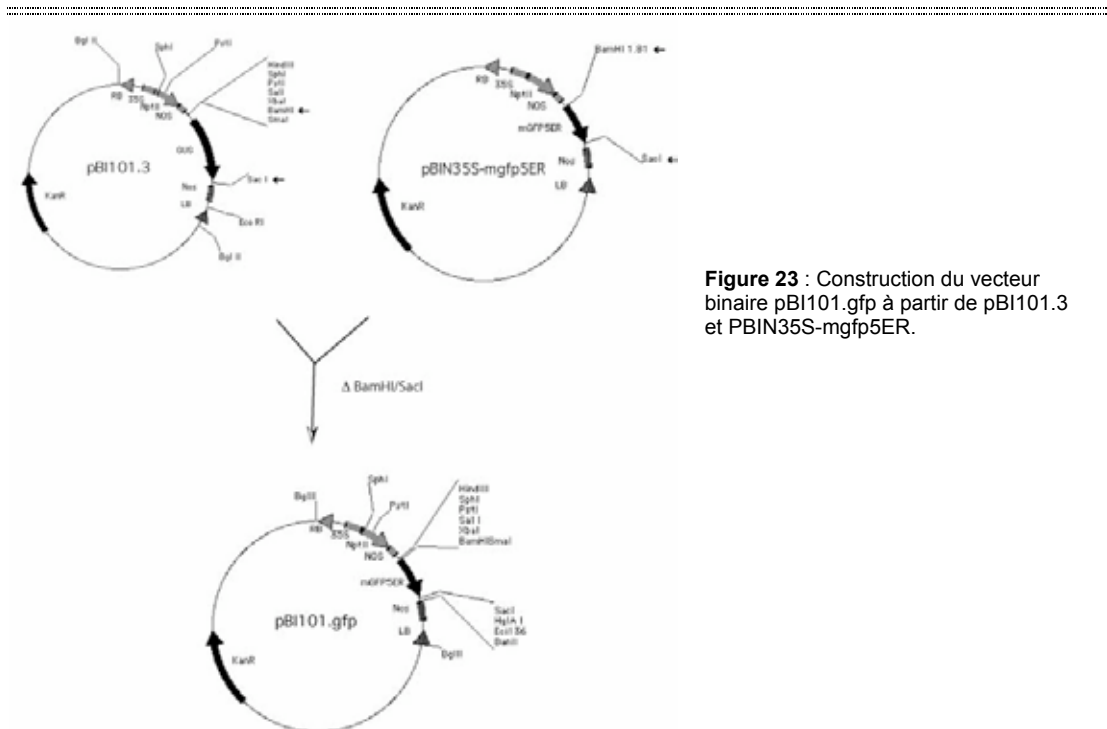
Les recherches de séquences homologues dans les banques de données ont été réalisées par le logiciel BLAST2 du serveur du National Center for

Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/NCBI>). La recherche de la séquence promotrice minimale et des séquences consensus caractéristiques a été réalisée à l'aide du logiciel "Promoter Prediction by Neural Network" (Martin Reese, Lawrence Berkeley Laboratory, CA, U. S. A. : [http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/promoter.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html)). L'analyse des sites de reconnaissance de facteurs de transcription a été effectuée par les programmes Tfsitescan (Institute for Transcriptional Informatics, Pittsburgh, U. S. A : <http://www.ifti.org/cgi-bin/ifti/Tfsitescan.pl>.) TRANSFAC (GenomeNet, Institute for Chemical Research, Kyoto University, Japan <http://motif.genome.ad.jp>) et MatInspector (Genomatix, Allemagne : <http://genomatix.gsf.de/cgi-bin/matinspector/matinspector.pl>).

La recherche d'ESTs similaires à *Cg12* a été effectuée en utilisant le logiciel BLASTN du serveur du "Medicago Genome Initiative database" (<https://xqi.ncgr.org/mgi/>).

### Clonage du promoteur de *Cg12*

L'isolement du promoteur de *Cg12* est réalisé en utilisant le kit "universal genome walker" (Clontech). Le promoteur est cloné dans pGEM-T en suivant les instructions des fournisseurs. La procédure utilisée pour le clonage est présentée à la Figure 9. Il s'agit d'une amplification par PCR sur l'ADN génomique à partir de la séquence connue du clone d'ADNc de *Cg12* préalablement caractérisée. Les produits de cette PCR ont été purifiés et clonés dans pGEM-T, ce plasmide a été utilisé pour transformer *E. coli* par choc thermique. Le criblage des bactéries transformées a été réalisé sur les colonies résistantes à l'ampicilline, en utilisant les amorces F et R.



**Figure 23** : Construction du vecteur binaire pBI101.gfp à partir de pBI101.3 et pBIN35S-mgfp5ER.

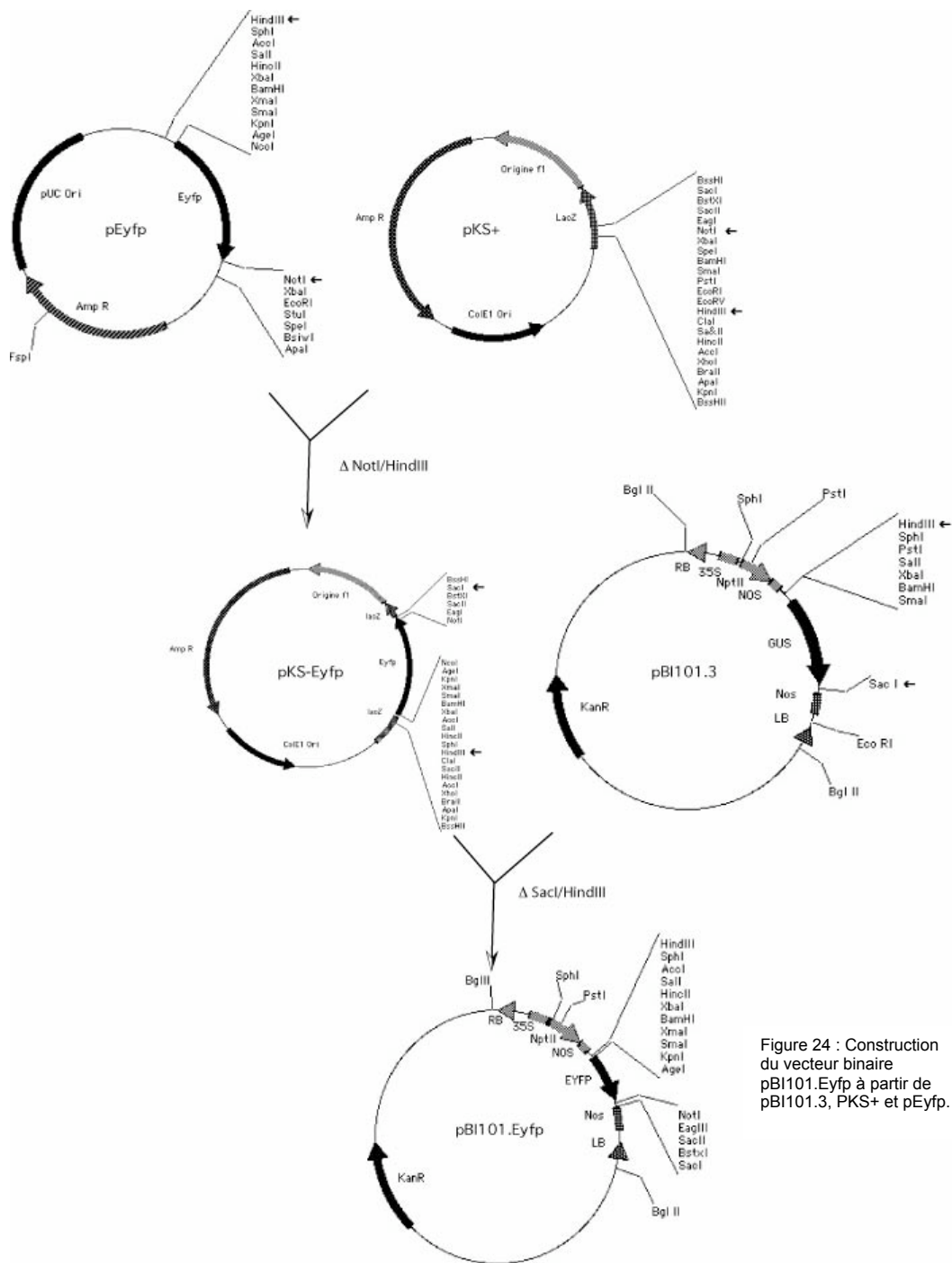


Figure 24 : Construction du vecteur binaire pBI101.Eyfp à partir de pBI101.3, PKS+ et pEyfp.

## Construction des fusions transcriptionnelles

### Construction des vecteurs binaires

Afin de réaliser les fusions *Cg12-Gfp* et *Cg12-Eyfp*, des vecteurs binaires comportant les gènes *mgfp5ER* (pBI101.Gfp) ou *Eyfp* (PBI101.Eyfp) en aval d'un site multiple de clonage ont été construits à partir du plasmide commercialisé par clontech pBi101.3. pBI101.Gfp a été obtenu en digérant pBIN35S-

*mgfp5ER* par *BamHI/SacI* et en clonant le fragment de 0,6 kb correspondant à *mgfp5ER* dans PBI101.3 digéré par ces mêmes enzymes (Figure 23).

Pour obtenir pBI101.Eyfp le fragment de digestion de 0,6kb pEyfp par *HindIII/NotI* a été cloné dans pBLUESCRIPT SK+ pour donner pKS-Eyfp. La digestion de pKS-Eyfp par *HindIII/SacI* a ensuite été cloné dans le fragment de digestion de 10 kb de pBI101.3 par *BamHI/HindIII* (Figure 24).

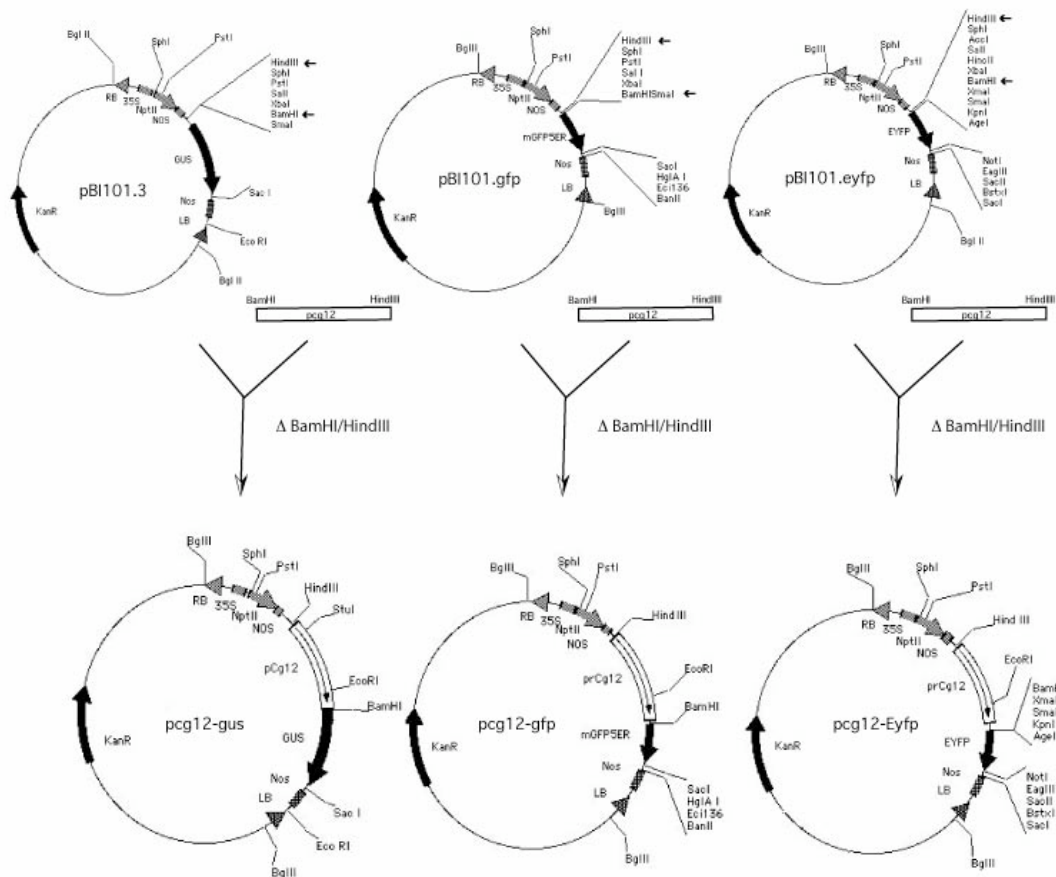
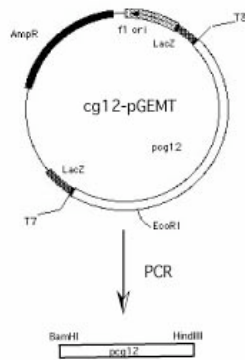


Figure 25 : Clonage du promoteur de Cg12 dans les vecteurs binaires pBI101.3, pBI101.Gfp et pBI101.Eyfp.

**Construction des fusions pCg12-gus, pCg12-mgfp5ER et pCg12-Eyfp**

Les amorces pBam3' et pHind5' ont été utilisées pour incorporer les sites de restriction synthétiques BamHI et HindIII aux extrémités du promoteur de Cg12. Après une amplification par PCR, le fragment BamHI/HindIII de 1583 bp correspondant a été cloné dans les vecteurs pBI101.3, pBI101. Gfp et pBI1013 digérés par BamHI/HindIII pour donner pCg12-Gus,

pCg12-Gfp et pCg12-Eyfp respectivement. Le clonage a été vérifié en séquençant les régions adjacentes aux sites BamHI/HindIII (Figure 25).

**Ara12-gfp**

La fusion Ara12-Gfp a été réalisée clonant le fragment de digestion de 1837 pb de pAra12-gus par XbaI/HindIII dans pBI101.gfp digéré par XbaI/HindIII. Le clonage a été vérifié par séquençage des régions adjacentes aux extrémités du promoteur.



## Transformation génétique

### **Transformation d'*E. coli* par choc thermique**

#### *Préparation de bactéries compétentes*

##### **Méthode du chlorure de calcium**

Cette méthode a été utilisée au début pour le clonage dans le vecteur pGEM-T du promoteur de *Cg12*. Les bactéries compétentes ont été préparées selon la méthode du chlorure de calcium (Sambrook et coll., 1989).

##### **Méthode du chlorure de rubidium**

La méthode décrite par Hanahan et coll. (1983). A été utilisée par la suite car elle a donné de meilleurs résultats. 200 mL de milieu LB ont étéensemencés avec une préculture de 5mL d'*E. coli*. Lorsque l'absorbance à 600 nm de la culture atteint 0,3 à 0,4 elle est mise dans la glace pendant 10 min. La culture est ensuite centrifugée à 4°C pendant 10 minutes à 4000 g. Le culot correspondant est repris dans 30 mL de solution RF1 (RbCl 100 mM, MnCl<sub>2</sub> 50mM, AcK 30mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, Glycérol 15% pH ajusté à 5,8 avec de l'acide acétique 0,2 M) stérilisée sur un filtre de 0,2 µm. La préparation est ensuite laissée pendant 2h dans la glace puis centrifugée à 4°C pendant 10 minutes à 4000 g. Le culot correspondant est repris dans 7 mL de solution RF2 (MOPS 10 mM, RbCl 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 75 mM, glycérol 15 %, pH ajusté à 6,8 avec NaOH) froide stérilisée sur un filtre de 0,2µm. Après 15 min de repos dans la glace la solution de bactéries est aliquotée par 50 µL dans des tubes plongés dans l'azote liquide et conservée à -80°C.

### **Choc thermique**

Pour le choc thermique, 150 µl de bactéries compétentes sont mélangées à 5 µl de ligation. Ce mélange est laissé 30 min dans la glace, puis transféré 2 min. à 42°C. 300 µl de milieu SOC (Tableau 9) sont ensuite rajoutés, et incubés 1 h à 37°C. Finalement le mélange est étalé sur du milieu LB solide contenant l'antibiotique de sélection approprié pour sélectionner les bactéries transformées.

**Tableau 9** : milieu SOC (D'après Sambrook et coll., 1989)

Bacto-trytone	20 g. L <sup>-1</sup>
Extrait de levure	5 g. L <sup>-1</sup>
NaCl	0,5 g. L <sup>-1</sup>
KCl	2,5 mM
MgCl <sub>2</sub>	2,5 mM
Glucose	20 mM

Le pH est ajusté à 7 avec NaOH 1M

### **Criblage des bactéries transformées**

Afin de vérifier la présence de l'ADN inséré dans les bactéries résistantes à l'antibiotique, une PCR sur colonie est réalisée sur 10-20 colonies résistantes. Un cure-dent stérile est placé au contact d'une colonie puis plongé dans 5 µl d'eau stérile. Ce même cure-dent est utilisé pour repiquer la colonie sur une boîte contenant du milieu LB additionné de l'antibiotique adéquat Cette solution bactérienne est utilisée pour réaliser une PCR avec 40 µl de solution PCR. Trois séries de

criblages sont réalisés jusqu'à l'obtention de résultats positifs sur l'ensemble des colonies testées.

### **Transformation d'*A. tumefaciens* par électroporation**

#### *Préparation de bactéries compétentes*

Un litre de milieu Ag (Tableau 10) sans NaCl est inoculé avec 10 mL d'une préculture d'*A. tumefaciens* et incubé à 28°C jusqu'à obtenir une absorbance à 600 nm comprise entre 0,6 et 0,9 ce qui correspond à la phase de croissance exponentielle de la culture. La culture est laissée dans de la glace pendant 15 minutes et centrifugée à 4°C pendant 10 min à 3200 g. Le culot, correspondant est repris dans de l'eau pure froide jusqu'à un volume final d'un litre puis centrifugé à 4°C pendant 15 min à 3000 g. Le culot est repris dans 0,5 L d'eau pure froide puis, après centrifugation, dans 20 mL de glycérol 10% froid puis, après une dernière centrifugation, dans 20 mL de glycérol 10% froid. La suspension bactérienne est aliquotée par 50 µL dans des tubes plongés dans l'azote liquide et conservée à -80°C.

### **Electroporation**

Pour l'électrotransformation d'*A. tumefaciens*, 50 µL de cellules compétentes sont mélangées avec 2 µL de solution de plasmide dans un tube eppendorf froid. Le mélange est laissé pendant 2 min dans la glace puis transféré dans une cuvette à électroporation de 0,2 cm. La solution est soumise à une décharge électrique de 2500 V, 192 W et 40 µF. Après la décharge, 500 µL de milieu SOC sont immédiatement ajoutés. Le mélange est incubé pendant 2h à 28°C.

La culture bactérienne est étalée sur boîte de Pétri contenant un milieu AG solide (1,5% agar) additionné de kanamycine (50 µg.mL<sup>-1</sup>), et de rifampicine (25 µg/mL) pour sélectionner les transformants.

**Tableau 10** : Milieu AG pour *A. tumefaciens* (AG)

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> :	0,5 g.l <sup>-1</sup>
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O :	0,2 g.l <sup>-1</sup>
NaCl:	0,1 g.l <sup>-1</sup>
Mannitol:	5 g.l <sup>-1</sup>
Extrait de levure:	1 g.l <sup>-1</sup>
Casamino acid:	1 g.l <sup>-1</sup>
Bacto-agar (pour le milieu solide)	14 g.l <sup>-1</sup>

### **Criblage des bactéries transformées**

Le criblage a été réalisé comme pour *E. coli* par PCR sur colonie, en remplaçant le milieu LB par le milieu Ag.

### **Transformation d'*Arabidopsis***

Des plantes d'*Arabidopsis* sont cultivées jusqu'à l'apparition de nombreux bourgeons floraux. Ces plantes sont ensuite transformées à l'aide d'*A. tumefaciens* selon la méthode du "Floral Dip" (trempage floral, Clough et coll., 1998). La solution d'*A. tumefaciens* est préparée à partir de 1L de culture en phase exponentielle qui est centrifugée et reprise dans 100 mL d'une solution de saccharose 5% additionnée de 500 µl.L<sup>-1</sup> de Silwet-L77. (OSI Specialities, Danbury, CO, USA ) Les hampes florales sont trempées dans la solution pendant 2-5s. Ensuite

les plantes sont laissées dans une mini-serre pendant 24 h, avec un fort taux d'humidité, puis transférées dans les conditions normales de culture jusqu'à la production de graines.

Ces graines sont désinfectées à l'alcool 75° pendant 10 s. puis à l'hypochlorite de calcium à 5% pendant 10 min ou avec un bain de 10 min dans une solution de "Domestos" (Lever Fabergé, Paris, France) dilué au

1/5<sup>e</sup> suivi de trois lavages à l'eau stérile. Elles sont mises à germer sur des boîtes de Pétri contenant du milieu MS (Tableau 11) additionné de 100 mg. L<sup>-1</sup> de céfotaxime et de 50 mg. L<sup>-1</sup> de kanamycine. Les plantules transformées sont transférées au bout de 2-3 semaines dans les conditions standard jusqu'à l'obtention de graines.

**Tableau 11 : Milieu MS (Murashige et Skoog, 1962)**

Macroéléments	Quantité pour 1 L
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0,825 g
KNO <sub>3</sub>	0,95 g
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	8,45 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,185 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,125 g
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,0125 g
Microéléments	
KI	0,425 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3,1 mg
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,22 mg
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	4,3 mg
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,085 mg
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,0125 mg
Chélate de fer	
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27,85 mg
EDTA	37,25 mg
Saccharose	30 g
Vitamines (pour les Casuarinacées)	
Mésoinositol	100 mg
Glycine	2 mg
Acide nicotinique	5 mg
Pyridoxine	0,5 mg
Thiamine	0,5 mg
Acide folique	0,5 mg
Vitamines (pour Arabidopsis)	
Mésoinositol	50 mg
Acide nicotinique	0,5 mg
Pyridoxine	0,5 mg
Thiamine	5 mg
Bacto-Agar (milieu solide)	7 g

Pour l'enracinement des Casuarinacées 40 g. L<sup>-1</sup> de sucrose sont nécessaires. Pour la culture de Casuarinacées on utilise 8 g.L<sup>-1</sup> d'agar.

### **Transformation de *A. verticillata* et de *C. glauca***

La transformation d'*A. verticillata* et de *C. glauca* a été réalisée en modifiant le protocole décrit par Franche et coll. (1997).

Pour la transformation de *A. verticillata*, les graines sont scarifiées pendant 2 min dans de l'acide sulfurique à 95 % puis rincées à l'eau pendant 30 min. Elles sont ensuite stérilisées avec de l'hypochlorite de calcium 5% pendant 30 min, puis lavées dans de l'eau distillée stérile pendant 5 min. Les graines sont mises à germer dans des boîtes de Pétri stérile contenant du milieu H (Tableau 12) dilué au quart additionné de 17 mg. L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solide (agar 8 g. L<sup>-1</sup>). Les boîtes sont placées en chambre de culture. Après un mois, les plantules sont transférées en boîte magenta contenant le même milieu. Quand les plantes présentent un épicotyle de 3 à 4 cm, elles sont prélevées stérilement et des fragments d'épicotyle d'environ 2 cm sont coupés. Ces explants sont mis au contact d'*A.*

*tumefaciens* contenant la construction d'intérêt pendant 1 heure dans du milieu MS liquide sous agitation. L'excès d'agrobactéries est éliminé sur du papier filtre (Whatman, 3MM) stérile puis les explants sont déposés sur un milieu MS solide dilué au demi contenant 3 g. L<sup>-1</sup> de bacto agar, 0,1 mg. L<sup>-1</sup> d'acide naphthalène acétique (ANA) et 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de Benzylamino purine (BA). La coculture est réalisée pendant 3 jours en chambre de culture. Afin d'éliminer les agrobactéries, les explants sont lavés 3 fois pendant 1 heure sous agitation dans de l'eau avec 0,5 g. L<sup>-1</sup> de céfotaxime. Ils sont ensuite cultivés pendant 7 jours sur un milieu MS solide dilué au demi contenant 0,1 mg.L<sup>-1</sup> d'ANA, 0,5 mg. L<sup>-1</sup> de BA, 100 mg.L<sup>-1</sup> de kanamycine (Km) et 250 mg. L<sup>-1</sup> de céfotaxime. Les explants sont repiqués dans des boîtes de pétri contenant ce même milieu toutes les trois semaines. Quand les cals atteignent un centimètre de diamètre environ ils sont transférés dans des tubes en verre avec le même milieu.

**Tableau 12** : Milieu H (Hoagland & Arnon).

Macroéléments	pour 1 litre
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	109 mg
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	123 mg
Ca(H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	29 mg
CaSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	86 mg
FeNaEDTA (0,2%)	2 ml
Microéléments	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	7,15 mg
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	4,52 mg
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,55 mg
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,2 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,0625 mg
Bacto-agar (pour le milieu solide)	8 g

Le pH est ajusté à 6,8 avec une solution de KOH 0,1 N. Pour le milieu nutritif azoté, 17 mg. L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sont ajoutés et le pH est ajusté à 5,6. Pour l'inoculation de *Frankia*, 2% de charbon actif est rajouté.

L'enracinement des rameaux émergeant sdes cals est obtenu avec un choc auxinique. Des rameaux de 2 cm de long sont prélevés et cultivés sur du milieu MS solide dilué au demi contenant 5 mg. L<sup>-1</sup> d'ANA pendant 24 h. Les rameaux sont ensuite transférés dans des tubes en verre contenant du milieu MS liquide dilué au demi avec 40 g. L<sup>-1</sup> de saccharose.

Pour la transformation de *C. glauca*, le même protocole a été utilisé pour obtenir des cals transgéniques en modifiant les quantités d'antibiotiques ( 50 mg. L<sup>-1</sup> de kanamycine au lieu de 100 mg. L<sup>-1</sup> et 250 mg. L<sup>-1</sup> de céfotaxime au lieu de 500 mg. L<sup>-1</sup>). L'enracinement des rameaux est obtenu comme pour *A. verticillata* avec un choc auxinique. Les rameaux sont cultivés pendant 3 jours dans un milieu du MS solide dilué au demi contenant 50 mg. L<sup>-1</sup> d'AIA (Acide Indole Acétique). Les rameaux sont ensuite transférés dans des tubes en verre contenant du milieu MS solide dilué au demi avec 40 g. L<sup>-1</sup> de saccharose et 2% de charbon actif.

## Transformation de *M. truncatula*

La transformation de *M. truncatula* grâce à *A. tumefaciens* a été réalisée en collaboration avec le laboratoire de A. Ribeiro (Oeiras, Portugal), en utilisant le protocole établi par L. Neves (2000). Les lignées de plantes transformées sont multipliées et enracinées *in vitro*, dans des flacons contenant 20 mL de milieu MS solide.

## Inoculation d'agents symbiotiques

### Inoculation de *Frankia*

#### Culture de *Frankia*

Les souches de *Frankia* sont cultivées dans du milieu BAP (Tableau 13) à 30°C à l'obscurité sous agitation douce. Le repiquage est effectué toutes les semaines ; pour cela la solution décantée de *Frankia* a été prélevée (1/5 è de volume) et centrifugée à 3200 g pendant 10 min à 20°C. Le surnageant est éliminé et le culot repris dans un même volume d'eau distillée stérile et centrifugé à nouveau. Le surnageant est éliminé et le culot repris dans un tube de 15 mL. A l'aide d'une seringue de 10 mL munie d'une aiguille (0,7 x 30 mm) stérile, les hyphes de *Frankia* sont cassés par aspiration et rejet (~10 fois). Cette préparation de *Frankia* est utilisée pour semer des nouvelles cultures.

#### Préparation de l'inoculum

L'inoculum est préparé en cultivant *Frankia* dans ces conditions pendant 4 jours afin d'obtenir des bactéries en phase exponentielle de croissance. La culture est ensuite traitée de manière analogue et les hyphes sont cassées comme précédemment avec une seringue ou au potter. La préparation bactérienne est reprise dans 1/5è de volume de milieu H sans azote.

**Tableau 13** : Composition du milieu BAP-PCMP pour la culture de *Frankia*.

Macroéléments	pour 1 litre
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,05 g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,01 g
NH <sub>4</sub> Cl	0,267 g
Propionate Na	0,48 g
FeNaEDTA	0,01 g
Microéléments	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,86 mg
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1,81 mg
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,22 mg
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,08 mg
Na <sub>2</sub> O <sub>4</sub> Mo. 2H <sub>2</sub> O	0,025 mg
CoSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,001 mg
Vitamines	
Thiamine	10 mg
Acide nicotinique	50 µg
Pyridoxine monochloride	50 µg
Acide folique	10 µg
Panthothénate de calcium	10 µg
Riboflavine	10 µg
D(+)-biotine	22,5 µg
MES/Tris 0,5M pH 6.8	20 ml
L-a-Phosphatidylcholine d'oeuf (Sigma)	0,86 mg

## ***Inoculation***

### ***Inoculation des plantes transgéniques***

Les plantes transgéniques enracinées sont transférées dans des tubes en verre de 20 cm contenant du milieu H liquide azoté et du milieu H gélosé (Tableau 12) qui sert de support pour le système racinaire des plantes. Quand le système racinaire est suffisamment développé, le milieu liquide est enlevé et les plantes sont inoculées.

Pour l'inoculation, 10 mL de culture de *Frankia* sont nécessaires pour inoculer chaque plante. 2 mL d'inoculum de *Frankia* sont mis en contact des racines pendant 2 h en maintenant les tubes à l'horizontale. Ensuite les tubes sont remplis au 1/3 avec du milieu H sans azote, recouverts d'un papier opaque et remis dans la chambre de culture.

### ***Inoculation de C. glauca en hydroponie***

Des plantes de *C. glauca* sont cultivées dans un système hydroponique dans du milieu BD azoté (Tableau 5) . Quand les racines ont atteint une taille suffisante (10 cm de long) le milieu BD est enlevé et les plantes sont inoculées. 500 mL de culture sont utilisés pour inoculer 40 plantes. L'inoculum de *Frankia* (5 mL) est repris dans 100 mL de milieu BD sans azote et les racines sont mises au contact avec cette préparation pendant 2 h. Les plantes sont ensuite remises dans le système de culture hydroponique avec du milieu BD sans azote et l'inoculum est réparti entre les plantes.

### ***Inoculation de S. meliloti***

Pour l'inoculation de *S. meliloti*, des plantes de *M. truncatula* cultivées *in vitro* sont transférées dans des boîtes de Pétri maintenues verticalement contenant du milieu de Fahræus solide (Tableau 14) pendant au moins une semaine. L'inoculation a également été réalisée sur des plantes transférées dans des sacs en papier-cellophane contenant du milieu de Fahræus liquide.

Tableau 14 : Milieu de Fahræus

Macroéléments	
MgSO <sub>4</sub>	0,5 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,7 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,8 mM
Fe-EDTA <sub>2</sub>	50 µM
Microéléments	
MnSO <sub>4</sub>	0,1 µg.L <sup>-1</sup>
CuSO <sub>4</sub>	0,1 µg.L <sup>-1</sup>
ZnSO <sub>4</sub>	0,1 µg.L <sup>-1</sup>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,1 µg.L <sup>-1</sup>
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0,1 µg.L <sup>-1</sup>

Le pH est ajusté à 6,5. Pour le milieu solide, 15 g.L<sup>-1</sup> de plant agar (Difco) sont ajoutés. Avant l'utilisation une solution de CaCl<sub>2</sub> (1 M) est ajoutée pour obtenir une concentration finale de 1 mM.

*S. meliloti* est cultivé dans le milieu TY (Tableau 15) contenant 50 mg.L<sup>-1</sup> de streptomycine jusqu'à atteindre une absorbance de 0,6 à 0,9 à 600 nm. La culture est centrifugée pendant 10 min à 3200 g, resuspendue dans de l'eau stérile et diluée dans l'eau de façon à obtenir une absorbance comprise entre 0,001 et 0,005.

Tableau 15 : milieu TY pour culture de *S. meliloti*

Composants	pour 1 L
Extrait de levure	3 g
Tryptone	6 g
CaCl <sub>2</sub>	0,39 g
Bacto-Agar (pour milieu solide)	14 g

L'inoculation de *M. truncatula* cultivé en boîte de petri verticales se fait en déposant quelques gouttes de dilution sur les racines, dans la zone où les poils absorbants commencent à apparaître. L'inoculation des sacs en papier se fait en déposant 1 mL de dilution à l'intérieur du sac.

### ***Inoculation du champignon ectomycorizien***

#### ***Culture du champignon ectomycorizien et obtention de l'inoculum***

Le champignon ectomycorizien *Pisolithus alba* a été cultivé dans des boîtes de Pétri contenant du milieu MNM solide (Tableau 16 ; Marx, 1969) à 28°C et à l'abri de la lumière. Le repiquage du champignon a été réalisé en déposant sur des nouvelles boîtes des morceaux d'agar recouverts de filaments découpés au scalpel sur une culture précédente.

Tableau 16 : Milieu MNM (Milieu de Melin et Norkrans modifié par Marx, 1969)

Composants	Quantité pour 1 L (g)
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,25
Extrait de malt	3
Glucose	10
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,05
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,15
NaCl	0,025
Thiamine-HCl (1mg.ml <sup>-1</sup> )	1 mL
Citrate ferrique(1 %)	1,2 mL
Agar	20
Le pH est ajusté à 5,5.	

Afin d'inoculer *A. verticillata*, des morceaux de papier filtre stériles (2x4) cm ont été déposés sur des boîtes de Pétri contenant ce même milieu et le champignon a été repiqué sur ces boîtes. Une fois recouverts par les filaments mycéliens, ces morceaux de papier ont été utilisés pour inoculer *A. verticillata*.

### ***Inoculation d'A. verticillata***

Les plantes transformées ont été cultivées dans des tubes en verre dans les mêmes conditions que pour l'inoculation de *Frankia*. Quand le système racinaire a atteint un développement suffisant, le milieu H azoté a été remplacé par du milieu H sans azote et un morceau de papier recouvert de filaments a été déposé sur les racines, sur la partie non immergée de celles-ci. La formation d'ectomycorhizes a été suivie à la loupe binoculaire.

### ***Inoculation du champignon endomycorhizien***

Quelques spores enrobées dans de la gélose sont déposées sur des jeunes racines latérales de plantes d'*A. verticillata* ou *C. glauca* cultivées dans les mêmes conditions que pour l'inoculation de *Frankia*.

Pour *M. truncatula*, des pots de 20 cm de diamètre sont remplis aux 2/3 avec un mélange terreau-

vermiculite désinfecté au préalable (3 fois 30 min à 100°C). Les plantes sorties de la culture *in vitro* sont transférées dans ces pots. Quelques grammes d'inoculum de *G. mosseae*, *G. deserticola* ou *G. rosea* sont déposés sur l'appareil racinaire, qui est ensuite recouvert du mélange terreau-vermiculite. Les plantes sont ensuite transférées en serre. Les racines mycorhizées sont prélevées au moins 1 mois après.

### Traitements avec des phytohormones et facteurs Nod

#### **Sur *A. verticillata***

Des plantules âgées de 3 mois ont été placées dans des boîtes de Pétri contenant 20 mL de milieu H solide. Les racines reposent horizontalement sur le milieu solide et les rameaux passent à l'extérieur de la boîte à travers un trou percé sur le couvercle. Les boîtes sont recouvertes de papier aluminium pour maintenir l'obscurité. Les racines baignent dans 10 mL de milieu H liquide contenant les quantités appropriées de phytohormones ou de facteurs Nod (Tableau 3).

Les traitements à l'AS ont été réalisés également sur des rameaux, qui ont été aspergés avec une solution contenant 0.01% (V/V) de Silwett L77 solution (OSI Specialities, Danbury, CO) et 1 mM d'AS. Des traitements au MeJa ont aussi été faits en mettant des plantes cultivées en boîte de pétri comme précédemment dans une boîte étanche dans laquelle un papier filtre a été placé avec 10 µL de MeJa.

#### **Sur *Arabidopsis***

Différentes conditions de culture ont été testées : (1) Les plantes ont été placées dans des flacons stériles contenant 20 mL de milieu MS liquide en agitation constante et contenant les quantités appropriées de phytohormones (Tableau 4). (2) les plantes ont été cultivées en boîte de Pétri pendant deux semaines. Les traitements hormonaux ont été faits en déposant un carré de gélose à côté des plantules contenant les quantités appropriées de phytohormones. (3) pour l'acide salicylique, des plantes cultivées en chambre de culture, sur terreau dans les conditions habituelles ont été aspergées avec une solution contenant 0.01% (V/V) de Silwett L77 et 1 mM d'acide salicylique.

#### **Sur *M. truncatula***

Les plantes sont cultivées en boîte de pétri dans les mêmes conditions que pour l'inoculation de *S. meliloti*. Quelques gouttes d'une solution contenant les facteurs Nod de *S. meliloti* ( $10^{-7}$  M) sont déposées sur les racines, dans la zone où les poils absorbants commencent à apparaître.

### Traitements au MAS-7

Pour les traitements au MAS-7, les plantes d'*A. verticillata* sont cultivées dans des tubes en verre de 25 cm, les plantes de *M. truncatula* en boîtes de pétri verticales dans les mêmes conditions que pour l'inoculation de *Frankia* ou *S. meliloti* respectivement. Les plantes sont transférées dans des boîtes de Pétri contenant du tampon d'incubation (20mM de MES-NaOH ; 0,5 mM de MgSO<sub>4</sub> ; 1mM de KCl et 1mM de

CaCl<sub>2</sub> ; pH 5,9). Après une incubation d'une heure, la solution est remplacée par du tampon frais contenant 0,2 à 2 mM de MAS-7 comme décrit dans Pingret et coll. (1998). L'incubation est faite pendant au moins 6 h et l'expression des gènes rapporteurs analysée pendant 3 jours.

### Analyse des protéines

#### **Extraction et dosage des protéines**

##### **Extraction de protéines de *C. glauca***

1g d'échantillons (jeunes rameaux, racines non inoculées ou jeunes nodules) est broyé dans de l'azote liquide et suspendu dans 5 mL de tampon d'extraction (tampon phosphate de Na 0,1 M à pH 7,8, 2mM de DTT ; 0,1 mM de EDTA ; 1,25 mM de PEG 4000) avec 0,2 g de polyvinylpyrrolidone (PVPP). Après une centrifugation pendant 15 min à 8000 g, le surnageant est collecté et purifié sur une colonne PD10 (BioRad) préalablement équilibrée avec 4 mL de tampon phosphate (0,1M, pH 7,8), en suivant les instructions du fournisseur. Les fractions contenant les protéines purifiées sont identifiées en dosant les protéines (Cf. plus loin) sur un aliquote de 10 µL.

##### **Extraction de protéines de *Frankia***

100 mL de culture fraîche de *Frankia* sont centrifugés à 4°C pendant 15 minutes à 3200 g. Le culot est repris dans l'eau et centrifugé à nouveau, puis repris dans 3 mL de tampon de lyse (Tris-HCl à 20 mM pH 7,5 ; KCl à 100 mM ; Glycérol à 5% ) par g de culture. Les hyphes sont soniqués dans la glace pendant 5' à 20-40W dans un sonicateur Sonifer 250 (Branson, Danbury, CT, USA). La solution est centrifugée à 100 000 g dans un rotor SW41 pendant 1h à 4°C.

#### **Dosage des protéines**

Le dosage des protéines est effectué directement en lisant l'absorbance de la solution à 260 nm ou par la méthode de Bradford : 10 µL d'échantillon sont dilués dans 790 µL d'eau ; sont mélangés à 200 µL de solution de Bradford (BioRad) ; après une incubation de 10 minutes l'absorbance est lue à 595 nm.

#### **Obtention et purification des Anticorps anti-Cg12**

Les anticorps anti-Cg12 ont été obtenus par la société Eurogentec. Deux peptides de synthèse (NPLDNTQKPIRDNGL et NGKNDTVVKKFRR) correspondant à des parties potentiellement antigéniques de la protéine Cg12 et comportant une asparagine permettant de coupler les peptides à une protéine porteuse ont été synthétisés. Ils ont été couplés à la protéine KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) puis injectés à un lapin en 4 injections. Le sérum a été prélevé au bout de 3 mois.

Les immunoglobulines G ont été purifiées sur une colonne d'affinité HI-Trap Protein A (Amersham Pharmacia) en suivant les instructions du fournisseur.

Les anticorps qui reconnaissent spécifiquement les peptides synthétiques ont été purifiés sur des colonnes d'affinité HI-Trap NHS activated (Amersham

pharmacia). La colonne d'affinité a été préparée en couplant 5 mg de peptide sur une colonne de 1 mL. Cette colonne a ensuite été utilisée pour purifier le sérum en suivant les instructions du fournisseur.

**Tableau 17 :** Tampon PBS (Phosphate-Buffered Saline)

Composants	Quantité pour 1L d'eau
NaCl	8g
KCl	0,2g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,44 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,24 g

Le pH est ajusté à 7,4 avec HCl.

### Dot-Blot

5 à 10  $\mu$ L d'extrait protéique ou de solution peptidique sont déposés sur une membrane Immobilon-P (Millipore) préalablement imbibée de méthanol et équilibrée dans du tampon PBS (Tableau 17). Après séchage, la membrane est réhumidifiée au méthanol et rincée à l'eau. Le blocage se fait pendant 1h dans un tampon BSA avec 2% de BSA, sous faible agitation. L'incubation avec l'anticorps primaire directement ajouté à cette solution (dilution de 1/2000) a lieu pendant 1 h. Après 3 rinçages dans du tampon PBS, la membrane est incubée avec l'anticorps secondaire anti IgG de chèvre couplé à la peroxysae (BioRad) dilué au 1/500 dans PBS-BSA) pendant 1h sous agitation faible. Après 4 rinçages dans PBS la chémoluminescence résultant de l'activité peroxydase est détectée sur une pellicule après une incubation de 5 minutes dans 3 mL de solution West Pico (Pierce, Rockford, USA) par membrane.

**Tableau 18 :** gels de polyacrylamide

Composants	Quantité v/v
"Running gel"	
Acrylamide-bis acrylamide 29:1	24,5%.
Tris-HCl 1,5M pH8,8	25 %
SDS 10 %	1%
Persulfate d'ammonium	1%
Temed	0,1 %
H <sub>2</sub> O	48 %
"Stacking gel"	
Acrylamide-bis acrylamide 29:1	12%.
Tris-HCl 1,5M pH8,8	12%
SDS 10 %	1%
Persulfate d'ammonium	1%
Temed	0,1 %
H <sub>2</sub> O	73%

### SDS-PAGE

Le protocole utilisé est une modification de celui décrit par Sambrook et coll. (1989). Des gels de polyacrylamide sont préparés comme indiqué au tableau 18. Avant leur dépôt, les protéines sont mélangées avec 1/4 de volume de tampon de charge 4x ( 100 mM Tris-HCL pH 6,8 ; 200 mM DTT ; 4% DSD ; 1,2 % Bleu de bromophénol et 20 % glycérol) et dénaturées pendant 4 minutes à 100 °C. La migration se fait à 80V jusqu'à la sortie des protéines du "stacking gel", puis à 100V jusqu'à la sortie de la bande bleue du gel, dans un tampon de migration (Tris 25 mM ; Glycine 250mM). Les gels peuvent ensuite être colorés par incubation pendant 1h dans une solution de bleu de coomassie (0,25 g de bleu de

Coomassie R250 dans 90 ml de méthanol et 10 mL d'acide acétique) suivie d'un lavage d'au moins 1h dans une solution d'acide acétique-éthanol (acide acétique 10% ; éthanol 20% ; eau ).

### Transfert sur membrane ou Western-blot

Après avoir séparé les protéines par SDS-PAGE, celles-ci sont transférées sur une membrane de nitrocellulose de 0,45  $\mu$ m (BioRad) avec un champ électrique de 100V pendant 1H dans un tampon de transfert (2,42 g Tris ; 11,26 g glycine 100 mL méthanol complété à 1L avec H<sub>2</sub>O). La membrane est ensuite bloquée pendant une heure dans une solution de blocage (lait écrémé 3 % dans le tampon de lavage) et lavée 6 fois pendant 5 minutes dans du tampon de lavage( Tris 4,8 g, NaCl 6,2 g ; MgCl<sub>2</sub> 1,016 g ; Tween 20 1 mL, pH ajusté à 7,5). L'incubation avec l'anticorps secondaire dilué au 40 000 se fait pendant 1h dans le même tampon. Après une nouvelle série de lavages, la chémoluminescence résultant de l'activité peroxydase est détectée sur une pellicule après une incubation de 5 minutes dans 3 mL de solution West Pico (Pierce) par membrane.

### Histologie, histochimie et immunolocalisation

#### Coupes

#### Coupes épaisses au vibratome

Les échantillons sont inclus dans l'agarose 3% et sectionnés à 40-60  $\mu$ m à l'aide d'un vibratome VT1000E (Leica Wetzlar, Allemagne). Les coupes sont réalisées dans du tampon phosphate froid (Tableau 19) afin de préserver l'activité GUS ou la fluorescence de la GFP.

**Tableau 19 :** Tampon phosphate

Solution 1 : NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,2M  
Solution 2 : Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2M

Le tampon phosphate 50 mM pH 7 est obtenu en mélangeant 39 vol de (1) 61 vol. de (2) et 400 vol. d'eau.

#### Coupes semi fines pour localisation de l'activité GUS

Afin de faciliter l'orientation des échantillons pendant la polymérisation de la résine, les échantillons colorés au X-gluc (cf. ci-dessous) sont réhydratés dans des solutions d'éthanol à 50 et 10 % et inclus dans l'agarose 1%. Des blocs contenant les échantillons sont découpés et fixés pendant 24 h au paraformaldéhyde-glutaraldéhyde (Tableau 20) et déshydratés par des rinçages de 30 minutes dans des solutions d'éthanol à 10,30,50,70 et 95 et 100%, le dernier bain étant répété deux fois. L'imprégnation dans la résine ( 50 mL de Technovit 7100 et 0,5 g de durcisseur I) se fait par des bains de 2h dans des solutions résine-éthanol (1:3, 1:1 et 3:1) et un bain de 12h dans la résine pure. L'inclusion se fait pendant 12h dans un moule contenant un mélange de résine et de durcisseur II (15:1). Des adaptateurs sont collés aux blocs polymérisés à l'aide d'un ciment de montage (Technovit 3040).

Des coupes de 2-5  $\mu$ m d'épaisseur sont réalisées avec un microtome LKB 2218 (HISTORANGE) ou Jun GRM 2055 (Leica).

**Tableau 20** : Tampon de fixation.

EGTA pH 7,2	62,5 mM
DMSO	10%
Paraformaldéhyde	4%
Tampon phosphate pH 7,2	0,1 M
Glutaraldéhyde	0,25%

### Coupes semi fines et ultrafines pour Immunolocalisation

Les échantillons sont fixés pendant 2h dans une solution de cacodylate (0,1M, pH 7,1) contenant du glutaraldéhyde à 1% et du paraformaldéhyde à 4%. Trois rinçages de 20' sont effectués dans du tampon cacodylate. Les échantillons sont déshydratés par des bains de 1h dans des solutions d'éthanol à 10,30,50,70,80 et 90 %. L'imprégnation se fait avec 2 bains de 12h dans des solutions de résine (LR White-éthanol à 1:2 ; 2:1) et deux bains de 12h dans la résine pure. La polymérisation se fait pendant 24h en mettant les échantillons dans des capsules en gélatine à 26°C.

Des coupes de 0,5  $\mu$ m ou de 70-90 nm d'épaisseur sont réalisées avec un ultra microtome Reichert Ultracut S (Leica). Les coupes semi fines sont étalées sur des lames en verre enduites Silane Prep (Sigma). Les coupes ultrafines sont étalées sur des grilles en nickel de 200 ou 300 mesh.

### Localisation de l'activité GUS

Les échantillons ont été incubés à l'obscurité à 37 °C pendant 16 h dans une solution de X-gluc 1 mM (Tableau 21) additionnée de 0,5 à 5 mM de  $K_3Fe(CN)_6$  et  $K_4Fe(CN)_6$ . Ces composés agissent comme catalyseurs de la réaction et ont été rajoutés afin de limiter la diffusion de la couleur bleue. Les échantillons sont ensuite fixés pendant au moins 12 h dans une solution contenant 5% de formaldéhyde, 5% d'acide acétique et 50% d'éthanol à température ambiante et immergés plusieurs fois pendant 24h dans l'éthanol à 70° jusqu'à obtenir une décoloration complète de la chlorophylle.

**Tableau 21** : substrat X-Gluc utilisé pour révéler la présence de  $\beta$ -glucuronidase

X-Gluc	1 mM
NaPO4 pH 7	50 mM
EDTA	1mM
Triton	0.5 %

L'observation des échantillons est faite à la loupe binoculaire pour les faibles grossissements sur les échantillons non coupés ou les coupes épaisses, avec un microscope DMRB (Leica) pour les plus forts grossissements sur les coupes épaisses et fines. Les objectifs utilisés sont PL FLUOTTAR 5/0. 1, PL FLUOTTAR 10/0. 3 PH1, PL FLUOTTAR 20/0. 5 PH3, PL FLUOTTAR 40/0. 7 PH2 et PL FLUOTTAR 100/1. 3 PH3-oil (Leica). Les observations ont été faites en contraste de phase, en contraste différentiel et en fond noir.

### Localisation de l'activité gfp

#### Plantes entières et faibles grossissements

L'observation est faite directement sur les plantes cultivées en tube de verre ou sur des coupes épaisses conservées dans du tampon phosphate froid avec une loupe binoculaire MZFLIII (Leica). Les filtres utilisés sont le GFP1 (excitation 425/60 nm ; arrêt 480 nm)(Leica), le GFP2 (excitation 480/40 nm ; arrêt 510 nm)(Leica) et le GFP3 (excitation 470/40 nm ; arrêt 525/50 nm)(Leica).

#### Microscopie à fluorescence et confocale

L'observation est faite sur des sections d'échantillons incluses dans l'agar et conservées dans du tampon phosphate froid.

Pour la microscopie à épifluorescence un microscope DMRB (Leica) est utilisé avec un filtre A (excitation 340-380 nm, arrêt 425 nm, Leica) ou un filtre I3 (excitation 450-490 nm, arrêt 515 nm, Leica).

La microscopie confocale est faite en utilisant un microscope confocal Leica DMRXA et le logiciel Leica TCS SP avec des objectifs 63x PlanApo NA 1,3, 20x PlanApoNA 0,7 et 10x PlanApo NA 0,4 (Leica). Le pic d'émission pour la GFP est de 510 nm. Des bandes passantes de 20-40 nm ont été utilisées.

**Tableau 22** : Protocole suivi pour l'immunomarquage

Solutions	Mode opératoire	
PBS-G : PBS avec 0,1 M de Glycine	<b>Solution</b>	<b>temps d'incubation</b>
PBS-TB : PBS avec 0,05% de tween20 et 1% de BSA	PBS-G	35 min
PBS-T PBS avec 0,05% de tween20	H <sub>2</sub> O	rinçages 3 x 5"
AC1 : Anticorps primaire dans PBS-TB	PBS-TB	rinçage de 5"
Tris-HCl : Tris 0,02 M ajusté à pH 8,2 avec HCl	AC1	1h
Tris-HCl-TB : Tris-HCl avec 0,05% de tween20 et 1% de BSA	PBS-TB	6 rinçages de 5 min
AC2 : Anticorps secondaire dilué dans Tris-HCl	H <sub>2</sub> O	rinçage 5"
	Tris-HCl-TB	10 min
	AC2	1h
	PBS-T	rinçage 5"
	H <sub>2</sub> O	rinçage de 5 min

### Immunolocalisation

#### Marquage

Pour l'immunomarquage les coupes sont incubées dans les solutions qui Figurent au Tableau 22. Afin de visualiser les structures cellulaires, des coupes semi fines adjacentes aux coupes marquées sont colorées

avec une goutte de Bleu de Toluidine à 0,5 %. Pour l'immunomarquage des coupes semi fines, l'anticorps secondaire utilisé est un anticorps de chèvre dirigé contre les anti-IgG de lapin et couplé au FITC (Caltag labs, San Francisco, CA, USA). Pour les coupes ultrafines, on utilise un anticorps secondaire analogue, couplé à des billes d'or de 15 nm de diamètre (British

Bio Cell International, Angleterre).

Pour l'observation au MET, les coupes incubées pendant 20' dans une solution d'acétate d'uranyle à 3%, lavées 15" à l'eau, incubées 1 min dans une solution de citrate de plomb ( 3 mM de citrate de plomb ; 50 mM de NaOH) et lavées 15" à l'eau.

### Observation

L'observation des coupes semi fines se fait à l'aide d'un microscope Diaplan (Leica) avec un filtre I3 et avec un objectif PL FLUOTAR 50/1.00-oil (Leica).

L'observation des coupes ultrafines se fait à l'aide d'un microscope électronique à transmission (Jeol 100EX) à un voltage de 80 kv.

### Coloration de l'amidon

Pour détecter les amyloplastes dans les nodules de *M. truncatula*, les coupes épaissies sont incubées dans du liquide de lugol pendant 1 min puis elles sont lavées à l'eau.

## Références bibliographiques

- Albrecht, C., R. Geurts, F. Lapeyrie et T. Bisseling. 1998. Endomycorrhizae and rhizobial Nod factors both require *SYM8* to induce the expression of the early nodulin genes *PsENOD5* and *PsENOD12A*. *Plant J.* **15**:605-614.
- Andersson, C. R., D. J. Llewellyn, W. J. Peacock et E. S. Dennis. 1997. Cell-specific expression of the promoters of two non-legume hemoglobin genes in transgenic legume, *Lotus corniculatus*. *Plant Physiol.* **113**: 45-57.
- Appleby, C. A., D. Bogusz, E. S. Dennis, E. S. et W. J. Peacock. 1988. A role for haemoglobin in all plant roots? *Plant Cell Environ.* **11**: 359-367.
- Arima, K., H. Yonezawa, T. Uchikoba, M. Shimada et M. Kaneda. 2000a. Cleavage specificity of cucumisin, a serine protease, with synthetic substrates. *Phytochemistry* **54**:451-454.
- Arima, K., T. Uchikoba, H. Yonezawa, M. Shimada et M. Kaneda. 2000b. Cucumisin-like protease from the latex of *Euphorbia supina*. *Phytochemistry* **53**:639-644.
- Arp, D. J. 2000. The nitrogen cycle. In: Prokaryotic nitrogen fixation, a model system for the analysis of a biological process. Triplett, E. W. (Eds.) Horizon Scientific, Wymondham, Norfolk, England.
- Artigiani, S., D. Barberis, P. Fazzari, P. Longati, P. Angelini, J. W. Van De Loo, P. M. Comoglio et L. Tamagnone. 2003. Functional regulation of semaphorin receptors by proprotein convertases. *J. Biol. Chem.* **278**:10094-10101.
- Asad, S., Y. Fang, K. L. Wycoff and A. M. Hirsch. 1994 Isolation and characterization of cDNA and genomic clones of *MsEnod40* : transcripts are detected in meristematic cells of alfalfa. *Protoplasma* **183** : 10-23.
- Batchelor, A. K., K. Boutilier, S. S. Miller, H. Labbe, L. Bowman, M. Hu, D. A. Johnson, M. Gijzen et B. L. Miki. 2000. The seed coat-specific expression of a subtilisin-like gene, *SCSI*, from soybean. *Planta* **211**:484-92.
- Bauer, P., P. Ratet, M. D. Crespi M Schultze et A. Kondoros. 1996. Nod factors and cytokinins induce similar cortical cell division, amyloplast deposition and *MsEnod12A* expression patterns in alfalfa roots. *Plant J.* **10**:91-105.
- Beilinson, V., O. V. Moskalenko, D. S. Livingstone, S. V. Reverdatto, R. Jung et N. C. Nielsen. 2002. Two subtilisin-like proteases from soybean. *Physiol. Plant.* **115**:585-597.
- Benson D. R. et Clawson M. L. 2000. Evolution of the actinorhizal plant symbiosis. In: Prokaryotic nitrogen fixation, a model system for the analysis of a biological process. Triplett, E. W. (Eds.) Horizon Scientific, Wymondham Norfolk, England..
- Berg, R. H. 1990. Cellulose and xylans in the interface capsule in symbiotic cells of actinorhizae. *Protoplasma.* **159**: 35-43.
- Berg, R. H. 1999. *Frankia* forms infection threads. *Can. J. Bot.* **77**:1327-1333.
- Berg, R. H. et L. McDowell. 1987. Cytochemistry of the wall of infected cells in *Casuarina* actinorrhizae. *Can. J. Bot.* **66**: 2038-2047.
- Berg, R. H., B. Langenstein et W. B. Silvester. 1999. Development in the *Datisca-Coritaria* nodule type. *Can. J. Bot.* **77**:1334-1350.
- Berger, D. et T. Altmann. 2000. A subtilisin-like serine protease involved in the regulation of stomatal density and distribution in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev.* **14**:1119-31.
- Berry, A. L. et L. A. Sunell. 1990. The infection process and nodule development. Dans : The biology of Frankia and actinorhizal plants. Schwintzer, C. R. et J. D. Tjepkema (eds). Academic Press. New York. pp 61-81.
- Berry, A. M., O. T. Harriott, R. A. Moreau, S. F. Osman, D. R. Benson et A. D. Jones. 1993. Hopanoid lipids compose the *Frankia* vesicle envelope, presumptive barrier of oxygen diffusion to nitrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **90**:6091-4.
- Bogacheva, A. M., G. N. Rudenskaya, A. Preusser, I. O. Tchikileva, Y. E. Dunaevsky, B. N. Golovkin et V. M. Stepanov. 1999. A new subtilisin-like proteinase from roots of the dandelion *Taraxacum officinale* Webb S. L. *Biochemistry (Mosc)* **64**:1030-7.
- Bogacheva, A. M., G. N. Rudenskaya, Y. E. Dunaevsky, G. G. Chestuhina et B. N. Golovkin. 2001. New subtilisin-like collagenase from leaves of common plantain. *Biochimie* **83**:481-6.
- Brake, A. J., J. P. Merryweather, D. G. Coit, U. A. Heberlein, F. R. Masiarz, G. T. Mullenbach, M. S. Urdea, P. Valenzuela et P. J. Barr. 1984. Alpha-factor-directed synthesis and secretion of mature foreign proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **81**:4642-4646.
- Callahan, D. et J. G. Torrey. 1977. Prenodule formation and primary nodule development in roots of *Comptonia (Myricaceae)*. *Can J. Bot.* **51**: 2306-2318.
- Callahan, D., P. Del Tredici et J. G. Torrey. 1978. Isolation and cultivation in vitro of the actinomycete causing root nodulation in *Comptonia*. *Science* **199**: 899-902.
- Casimiro, I., T. Beeckman, N. Graham, R. Bhalerao, H. Zhang, P. Casero, G. Sandberg et M. J. Bennett. 2003. Dissecting *Arabidopsis* lateral root development. *Trends Plant Sci.* **8**:165-171.
- Chen, W. M., S. Laevens, T. M. Lee, T. Coenye, P. De Vos, M. Mergeay, P. Vandamme. 2001. *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. *P. Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**:1729-35.
- Cérémonie H., F. Debellé et M. P. Fernandez. 1999. Structural and functional comparison of *Frankia* root hair deforming factor and rhizobia Nod factor *Can. J. Bot.* **77** (9): 1293-1301.
- Ceremonie, H., B. Cournoyer, F. Maillet, P. Normand et M. P. Fernandez. 1998. Genetic complementation of rhizobial nod mutants with *Frankia* DNA: artifact or reality? *Mol. Gen. Genet.* **260**:115-9.
- Clough, S. J. and A. F. Bent. 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**:735-43.
- Cohn, J. R., T. Uhm, S. Ramu, Y. W. Nam, D. J. Kim, R. V. Penmetsa, T. C. Wood, R. L. Denny, N. D. Young, D. R. Cook et G. Stacey. 2001. Differential regulation of a family of apyrase genes from *Medicago truncatula*. *Plant Physiol* **125**:2104-2119.
- Compaan, B., W. C. Yang, T. Bisseling et H. Franssen. 2001. *ENOD40* expression in the pericycle precedes cortical cell division in Rhizobium-legume interaction and the highly conserved internal region of the gene does not encode a peptide. *Plant Soil* **230**:1-8.
- Cullimore, J. V., R. Ranjeva et J. J. Bono. 2001. Perception of lipochitooligosaccharidic Nod factors in legumes. *Trends Plant Sci* **6**:24-30.
- Dawson, J. O. 1990. Interaction among actinorhizal and associated plant species. In The biology of *Frankia* and actinorhizal plants C. R. Schintzer et J. D. Tjepkema (Eds) p. 299-316 San Diego Academic press.



- Dixon, R. A. et N. L. Paiva. 1995. Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *Plant Cell* **7**:1085-1097.
- Dommergues Y., E. Duhoux et H. G. Diem. 1998. Les arbres fixateurs d'azote caractéristiques fondamentales et rôle dans l'aménagement des écosystèmes méditerranéens et tropicaux, avec référence particulière aux zones subhumides et arides. Editions espaces 34, Montpellier, France.
- Doyle, J. J. et M. A. Luckow. 2003. The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiol.* **131**:900-910.
- Dyer, J. M., D. C. Chapital, A. R. Lax et A. B. Pepperman. 1999. Identification of a subtilisin-like protease in seeds of developing tung fruits. *Journal of Plant Physiol.* **155**:802-805.
- Endre, G., A. Kereszt, Z. Kevei, S. Mihacea, P. Kalo et G. B. Kiss. 2002. A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature* **417**:962-6.
- Fontanini, D. et B. L. Jones. 2002. SEP-1 - a subtilisin-like serine endopeptidase from germinated seeds of *Hordeum vulgare* L. cv. Morex. *Planta* **215**:885-893.
- Franché, C., D. Diouf, Q. V. Le, D. Bogusz, A. N'Diaye, H. Gherbi, C. Gobé et E. Duhoux. 1997. Genetic transformation of the actinorhizal tree *Allocauarina verticillata* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant J.* **11**:897-904.
- Franché, C., L. Laplaze, E. Duhoux et D. Bogusz. 1998a. Actinorhizal symbioses: Recent advances in plant molecular and genetic transformation studies. *Crit. Rev. Plant Sci.* **17**:1-28.
- Franché, C., D. Diouf, L. Laplaze, F. Auguy, T. Frutz, M. Rio, E. Duhoux et D. Bogusz. 1998b. Soybean (*lbc3*), *Parasponia* et *Trema* hemoglobin gene promoters retain symbiotic and nonsymbiotic specificity in transgenic *Casuarinaceae*: Implications for hemoglobin gene evolution and root nodule symbioses. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **11**:887-894.
- Fruhling, M., N. Hohnjec, G. Schroder, H. Kuster, A. Puhler et A. M. Perlick. 2000. Genomic organization and expression properties of the *VJENOD5* gene from broad bean (*Vicia faba* L.). *Plant Science* **155**:169-178.
- Gage, D. J. 2002. Analysis of infection thread development using *Gfp*- and *DsRed*-expressing *Sinorhizobium meliloti*. *J.Bacteriol.* **184**:7042-7046.
- Gage, D. J. et W. Margolin. 2000. Hanging by a thread: invasion of legume plants by rhizobia. *Curr. Opin. Microbiol.* **3**:613-617.
- Gamas, P., F. de Billy et G. Truchet. 1998. Symbiosis-specific expression of two *Medicago truncatula* nodulin genes, *MtN1* and *MtN13*, encoding products homologous to plant defence proteins. *Mol. Plant Microbe Interact.* **11**: 393-403.
- Gianinazzi-Pearson, V. 1996. Plant cell responses to arbuscular mycorrhizal fungi: Getting to the roots of the symbiosis. *Plant Cell* **8**: 1871-1883.
- Girgis, M. G., Y. Z. Izhac, M. El-Haddad, E. A. Saleh., H. G. Diem et Y. R. Dommergues. 1990. First report on isolation and culture of effective *Casuarina*-compatible strains of *Frankia* from Egypt. Pages 156-164 in: *Int. Casuarina* Worksh., 2nd. M. H. El-Lakany, J. W. Turnbull et J. L. Brewbaker, eds.
- Girgis, Z. M. et J. Schwencke. 1993. Differentiation of *Frankia* strains by their electrophoretic patterns of intracellular esterases and aminopeptidases. *J. Gen. Microbiol.* **139**:2225-2232.
- Goetting-Minesky, M. P. et B. C. Mullin. 1994. Differential gene expression in an actinorhizal symbiosis: evidence for a nodule-specific cysteine proteinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:9891-5.
- Gonzalez, J. E., G. M. York et G. C. Walker. 1996. *Rhizobium meliloti* exopolysaccharides: synthesis and symbiotic function. *Gene* **179**:141-146.
- Grotewold, E., B. J. Drummond, B. Bowen et T. Peterson. 1994. The myb-homologous P gene controls phlobaphene pigmentation in maize floral organs by directly activating a flavonoid biosynthetic gene subset. *Cell* **76**:543-553.
- Guan, C., A. Ribeiro, A. D. Akkermans, Y. Jing, A. van Kammen, T. Bisseling et K. Pawlowski. 1996. Nitrogen metabolism in actinorhizal nodules of *Alnus glutinosa*: expression of glutamine synthetase and acetylornithine transaminase. *Plant Mol. Biol.* **32**:1177-84.
- Halbleib, C. M. et P. W. Ludden. 2000. Regulation of biological nitrogen fixation. *J. Nutr.* **130**:1081-4.
- Hamilton, J. M., D. J. Simpson, S. C. Hyman, B. K. Ndimba et A. R. Slabas. 2003. *Ara12* subtilisin-like protease from *Arabidopsis thaliana*: purification, substrate specificity and tissue localization. *Biochem. J.* **370**:57-67.
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J.Mol.Biol.* **166**:557-580.
- Haseloff, J., K. R. Siemering, D. C. Prasher et S. Hodge. 1997. Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA* **94**:2122-2127.
- Heidstra, R., W. C. Yang, Y. Yalcin, S. Peck, A. M. Emons, A. van Kammen et T. Bisseling. 1997. Ethylene provides positional information on cortical cell division but is not involved in Nod factor-induced root hair tip growth in *Rhizobium*-legume interaction. *Development* **124**:1781-1787.
- Hirsch, A. M. 1992. Developmental biology of legume nodulation. *New Phytol.* **122** (2): 211-237.
- Hirsch, A. M. 1999. Role of lectins (and rhizobial exopolysaccharides) in legume nodulation. *Curr. Opin. Plant. Biol.* **2**: 320-326.
- Hirsch, A. M., Y. Fang., S. Asad et Y. Kapulnik. 1997. The role of phytohormones in plant-microbe symbioses. *Plant Soil* **194**: 171-184.
- Hirsch, A. M., M. R. Lum et J. A. Downie. 2001. What makes the *rhizobia*-legume symbiosis so special? *Plant Physiol.* **127**:1484-92.
- Hood, E. E., S. B. Gelvin, L. S. Melchers et A. Hoekema. 1993. New *agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Transg. Res.* **2**, 202-218.
- Horvath, B., R. Heidstra, M. Lados, M. Moerman, H. P. Spaink, J. C. Prome, A. van Kammen et T. Bisseling. 1993. Lipo-oligosaccharides of *Rhizobium* induce infection-related early nodulin gene expression in pea root hairs. *Plant J.* **4**:727-733.
- Hunt P. W., R. A. Watts, B. Trevaskis, D. J. Llewellyn, J. Burnell, E. S. Dennis et W. J. Peacock. 2001. Expression and evolution of functionally distinct haemoglobin genes in plants. *Plant Mol. Biol.* **47**: 677-92.
- Huss-Danell, K. (1997). Actinorhizal symbioses and their N<sub>2</sub> fixation. *New Phytol.* **136** : 375-405.
- Jacobsen-Lyon, K., E. O. Jensen, J. E. Jorgensen, K. A. Marcker, W. J. Peacock et E. S. Dennis. 1995. Symbiotic and nonsymbiotic hemoglobin genes of *Casuarina glauca*. *Plant Cell* **7**:213-23.
- Janzik, I., P. Macheroux, N. Amrhein et A. Schaller. 2000. *LeSBT1*, a subtilase from tomato plants - Overexpression in insect cells, purification et characterization. *J. Biol. Chem.* **275**:5193-5199.
- Jiang, L. et J. C. Rogers. 1999. Functional analysis of a Golgi-localized Kex2p-like protease in tobacco suspension culture cells. *Plant J.* **18**:23-32.
- Jorda, L., A. Coego, V. Conejero et P. Vera. 1999. A genomic cluster containing four differentially regulated subtilisin-like processing protease genes is in tomato plants. *J. Biol. Chem.* **274**: 2360-5.
- Jorda, L. et P. Vera. 2000. Local and systemic induction of two defense-related subtilisin-like protease promoters in transgenic *Arabidopsis* plants. Luciferin induction of PR gene expression. *Plant Physiol.* **124**:1049-1058.
- Jorda, L., V. Conejero et P. Vera. 2000. Characterization of *P69E* and *P69F*, two differentially regulated genes encoding new members of the subtilisin-like proteinase family from tomato plants. *Plant Physiol.* **122**:67-74.
- Journet, E. P., D. van Tuinen, J. Gouzy, H. Crespeau, V. Carreau, M. J. Farmer, A. Niebel, T. Schiex, O. Jaillon, O. Chatagnier, L. Godiard, F. Micheli, D. Kahn, V. Gianinazzi-Pearson et P. Gamas. 2003. Exploring root symbiotic programs in the model legume *Medicago truncatula* using EST analysis. *Nucl. Ac. Res.* **31**:1803.
- Kahn, M. L., T. R. McDermott et M. K. Udvardi. 1998. Carbon and nitrogen metabolism in rhizobia. In *Rhizobiaceae*: Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria ; Spaink, H. P., P. J. Hooykaas et A. Kondorosi. (Eds) Kluwer Academic Publishers, London, England.
- Kaneda, M., H. Yonezawa et T. Uchikoba. 1995. Improved isolation, stability and substrate specificity of cucumisin, a plant serine endopeptidase. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **22**: 215-222.
- Kim, H. B. et C. S. An. 2002. Differential expression patterns of an acidic chitinase and a basic chitinase in the root nodule of *Eleagnus umbellata*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **15**: 209-215.
- Kim, H.B., S. H. Lee et C. S. An. 1999. Isolation and characterization of a cDNA clone encoding asparagin synthetase from root nodules of *Eleagnus umbellata*. *Plant Sci.* **149**: 85-94.
- Kinal, H., C. M. Park, J. O. Berry, Y. Koltin et J. A. Bruenn. 1995. Processing and secretion of a virally encoded antifungal toxin in transgenic tobacco plants: evidence for a *Kex2p* pathway in plants. *Plant Cell* **7**:677-88.
- Kistner, C. et M. Parniske. 2002. Evolution of signal transduction in intracellular symbiosis. *Trends Plant Sci.* **7**:511-518.

- Laplaze, L., H. Gherbi, C. Franche, E. Duhoux et D. Bogusz. 1998. cDNA sequence for an Acyl Carrier Protein from actinorhizal nodules of *Casuarina glauca* (PGR98-066). *Plant Physiol.* **116**:1605.
- Laplaze, L., H. Gherbi, T. Frutz, K. Pawlowski, C. Franche, J. J. Macheix, F. Auguy, D. Bogusz et E. Duhoux. 1999. Flavan-containing cells delimit *Frankia*-infected compartments in *Casuarina glauca* nodules. *Plant Physiol.* **121**:113-122.
- Laplaze, L., A. Ribeiro, C. Franche, E. Duhoux, F. Auguy, D. Bogusz et K. Pawlowski. 2000a. Characterization of a *Casuarina glauca* nodule-specific subtilisin-like protease gene, a homolog of *Alnus glutinosa ag12*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **13**:113-7.
- Laplaze, L., E. Duhoux, C. Franche, T. Frutz, S. Svistoonoff, T. Bisseling, D. Bogusz et K. Pawlowski. 2000b. *Casuarina glauca* prenodule cells display the same differentiation as the corresponding nodule cells. *Mol. Plant Microbe Interact.* **13**:107-12.
- Laplaze, L., H. Gherbi, E. Duhoux, K. Pawlowski, F. Auguy, F. Guermache, C. Franche et D. Bogusz. 2002. Symbiotic and non-symbiotic expression of *cgMT1*, a metallothionein-like gene from the actinorhizal tree *Casuarina glauca*. *Plant Mol. Biol.* **49**:81-92.
- Laplaze L., S. Svistoonoff, C. Santi, F. Auguy, C. Franche et D. Bogusz. Molecular biology of actinorhizal symbioses. In "Nitrogen fixation research: origins and progress" Vol. VI: Actinorhizal symbioses. W.E. Newton (eds). Kluwer (Sous presse).
- Lawton, M. A., S. M. Dean, M. Dron, J. M. Kooter, K. M. Kragh, M. J. Harrison, L. Yu, L. Tanguay, R. A. Dixon et C. J. Lamb. 1991. Silencer region of a chalcone synthase promoter contains multiple binding sites for a factor, *SBF-1*, closely related to *GT-1*. *Plant Mol.Biol.* **16**:235-249.
- Liu, Q. et A. M. Berry. 1991 Localization and characterization of pectic polysaccharides in roots and root nodules of *Ceanothus* sp. during intercellular infection by *Frankia*. *Protoplasma* **164**: 93-101.
- Lodwig E. M. , A. H. Hosie, A. Bourdes, K. Findlay, D. Allaway, R. Karunakaran, J. A. Downie, P. S. Poole. 2003. Amino-acid cycling drives nitrogen fixation in the legume-*Rhizobium* symbiosis. *Nature*. **17** (6933):722-6.
- Lumini, E. et M. Bosco. 1996. PCR-restriction fragment length polymorphism identification and host range of single-spore isolates of the flexible *Frankia* sp. strain UFI 132715. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:3026-9.
- Malamy, J. E. et P. N. Benfey. 1997. Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* **124**:33-44.
- Marx, D. H. 1969. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. In: Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology* **59**: 153-163
- Mathesius, U., C. Charon, B. G. Rolfe, A. Kondorosi et M. Crespi. 2000. Temporal and spatial order of events during the induction of cortical cell divisions in white clover by *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii inoculation or localized cytokinin addition. *Mol.Plant Microbe Interact.* **13**:617-628.
- Meade, H. M., S. R. Long, G. B. Ruvkun, S. E. Brown et F. M. Ausubel. 1982. Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* induced by transposon Tn5 mutagenesis. *J. Bacteriol.* **149**: 114-122.
- Meichtry, J., N. Amrhein et A. Schaller. 1999. Characterization of the subtilase gene family in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Plant Mol. Biol.* **39**: 749-60.
- Miklashevichs, E., H. Rohrig, J. Schell et J. Schmidt. 2001. Perception and signal transduction of rhizobial NOD factors. *Crit. Rev. Plant Sci.* **20**:373-394.
- Miller, I. M. et D. D. et Baker. 1985 Initiation, development and structure of root nodules in *Eleagnus angustifolia* L. (*Eleagnaceae*). *Protoplasma* **128**: 107-119.
- Mithofer, A. 2002. Suppression of plant defence in *rhizobia*-legume symbiosis. *Trends Plant Sci.* **7**:440-444.
- Moiroud, A. 1996. Diversité et écologie des plantes actinorhiziennes. *Acta Bot. Gall.* **143**: 651-661.
- Moulin, L., A. Munive, B. Dreyfus et C. Boivin-Masson. 2001. Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteobacteria. *Nature* **411**:948-50.
- Mullin, B. C. et S. V. Dobritsa. 1996 Molecular analysis of actinorhizal symbiotic systems: progress to date. *Plant Soil* **186**: 9-20.
- Murashige, T. et F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**: 473-497.
- NC-IUBMB (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology). 1992 Enzyme Nomenclature Recommendations.
- Neuteboom, L. W., L. M. Veth-Tello, O. R. Clijdesdale, P. J. Hooykaas et B. J. van der Zaal. 1999a. A novel subtilisin-like protease gene from *Arabidopsis thaliana* is expressed at sites of lateral root emergence. *DNA Res.* **6**:13-9.
- Neuteboom, L. W., J. M. Ng, M. Kuyper, O. R. Clijdesdale, P. J. Hooykaas et B. J. van der Zaal. 1999b. Isolation and characterization of cDNA clones corresponding with mRNAs that accumulate during auxin-induced lateral root formation. *Plant Mol. Biol.* **39**:273-87.
- Neves L. Regeneration and transformation of barrel medic (*Medicago truncatula* Gaertner. Cv. Jemalong). PhD thesis. Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, 208 pp.
- Okubara, P. A., N. A. Fujishige, A. M. Hirsch et A. M. Berry. 2000. *Dg93*, a nodule-abundant mRNA of *Datisca glomerata* with homology to a soybean early nodulin gene. *Plant Physiol.* **122**:1073-9.
- Pawlowski, K. 1997. Nodule-specific gene expression. *Physiol. Plant.* **99**: 617-631.
- Pawlowski, K. et T. Bisseling. 1996. rhizobial and Actinorhizal Symbioses: What Are the Shared Features? *Plant Cell* **8**:1899-1913.
- Pawlowski, K., P. Twigg, S. Dobritsa, C. Guan et B. C. Mullin. 1997. A nodule-specific gene family from *Alnus glutinosa* encodes glycine- and histidine-rich proteins expressed in the early stages of actinorhizal nodule development. *Mol. Plant Microbe Interact.* **10**:656-64.
- Perradin, Y., M. J. Mottet et M. Lalonde, M. 1982. Influence of phenolics on in vitro growth of *Frankia* strains. *Can. J. Bot.* **61**: 2807-2814.
- Pingret, J. L., E. P. Journet et D. G. Barker. 1998. Rhizobium nod factor signaling. Evidence for a g protein-mediated transduction mechanism. *Plant Cell* **10**:659-672.
- Popovic, T., V. Puizdar et J. Brzin. 2002. A novel subtilase from common bean leaves. *FEBS Lett.* **530**:163-168.
- Posthaus, H., C. M. Dubois et E. Muller. 2003. Novel insights into cadherin processing by subtilisin-like convertases. *FEBS Lett.* **536**:203-208.
- Reddy, P. M., J. K. Ladha, M. C. Ramos, F. Maillet, R. J. Hernandez, L. B. Torrizo, N. P. Oliva, S. K. Datta et K. Datta. 1998. rhizobial lipochitooligosaccharide nodulation factors activate expression of the legume early nodulin gene *ENOD12* in rice. *Plant J.* **14**:693-702.
- Rees, D. C. et J. B. Howard. 2000. Nitrogenase: standing at the crossroads. *Curr.Opin.Chem.Biol.* **4**:559-566.
- Ribeiro, A., A. D. Akkermans, A. van Kammen, T. Bisseling et K. Pawlowski. 1995. A nodule-specific gene encoding a subtilisin-like protease is expressed in early stages of actinorhizal nodule development. *Plant Cell* **7**:785-94.
- Riggs, C. D. et A. P. Horsch. 1995. Molecular cloning of an anther specific gene from tomato. *Plant Physiol. (suppl.)* **108**: 117.
- Rodriguez-Barrueco C. et F. Bermudez de Castro. 1973. Cytokinin-induced pseudonodules on *Alnus glutinosa*. *Physiol. Plant.* **29**: 277-280.
- Rudenskaya, G. N., A. M. Bogacheva, A. Preusser, A. V. Kuznetsova, Y. Dunaevsky, B. N. Golovkin et V. M. Stepanov. 1998. Taraxalysin -- a serine proteinase from dandelion *Taraxacum officinale* Webb s.l. *FEBS Lett.* **437**:237-240.
- Rudenskaya, G. N., E. A. Bogdanova, L. P. Revina, B. N. Golovkin et V. M. Stepanov. 1995. Macluralisin--a serine proteinase from fruits of *Maclura pomifera* (Raf.) Schneid. *Planta* **196**:174-179.
- Sandal, N. N., Bojsen, K. et Marker, K. A. 1987. A small family of nodule specific genes from soybean. *Nucl. Acid Res.* **15**: 1507-1519.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis (1989) Dans : Molecular cloning, a Laboratory manual, 2d edition. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, USA
- Schaller, A. et C. A. Ryan. 1994. Identification of a 50-kDa systemin-binding protein in tomato plasma membranes having *Kex2p*-like properties. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA* **91**:11802-11806.
- Scheres, B, H. I. McKhann, A. Zalensky, A. Löber, T. Bisseling et A. M. Hirsch. 1992 The *PsEnod12* gene is expressed at two different sites in Afghanistan pea pseudonodules induced by auxin transport inhibitors. *Plant Physiol.* **100**: 1649-1655.
- Scheres, B., F. van Engelen, K. E. van der, W. C. van de, A. van Kammen et T. Bisseling. 1990. Sequential induction of nodulin gene expression in the developing pea nodule. *Plant Cell* **2**:687-700.
- Seidah, N. G. et M. Chretien. 1999. Proprotein and prohormone convertases: a family of subtilases generating diverse bioactive

- polypeptides. *Brain Res.* **848**:45-62.
- Siezen, R. J. et J. A. Leunissen. 1997. Subtilases: the superfamily of subtilisin-like serine proteases. *Protein Sci.* **6**:501-23.
- Smouni, A., L. Laplaze, D. Bogusz, F. Guermache, F. Auguy, E. Duhoux et C. Franche. 2002. The 35S promoter is not constitutively expressed in the transgenic tropical actinorhizal tree *Casuarina glauca*. *Functional Plant Biology* **29**:649-656.
- Solano, R., C. Nieto, J. Avila, L. Canas, I. Diaz et J. Paz-Ares. 1995. Dual DNA binding specificity of a petal epidermis-specific MYB transcription factor (MYB.Ph3) from *Petunia hybrida*. *EMBO J.* **14**:1773-1784.
- Soltis, D. E., P. S. Soltis, D. R. Morgan, S. M. Swensen, B. C. Mullin, J. M. Dowd et P. G. Martin. 1995. Chloroplast gene sequence data suggest a single origin of the predisposition for symbiotic nitrogen fixation in angiosperms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**:2647-2651.
- Spaink, H. P. 2000. Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**:257-288.
- Stougaard, J. 2001. Genetics and genomics of root symbiosis. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**:328-335.
- Stracke, S., C. Kistner, S. Yoshida, L. Mulder, S. Sato, T. Kaneko, S. Tabata, N. Sandal, J. Stougaard, K. Szczygowski et M. Parniske. 2002. A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. *Nature* **417**:959-62.
- Svistonoff S., L. Laplaze, F. Auguy, C. Santi, E. Fontanillas, E. Duhoux, C. Franche et D. Bogusz. Use of *Arabidopsis* to study a nodule-specific actinorhizal subtilase. *Plant Soil* (Sous presse).
- Sy, A., E. Giraud, P. Jourand, N. Garcia, A. Willems, P. de Lajudie, Y. Prin, M. Neyra, M. Gillis, C. Boivin-Masson et B. Dreyfus. 2001. Methylobacterium bacteria nodulate and fix nitrogen in symbioses with legumes. *J. Bacteriol.* **183**, 214-220.
- Swensen, S. M. 1996. The evolution of actinorhizal symbioses: evidence for multiple origins of the symbiotic association. *Am. J. Bot.* **83**: 1503-1512.
- Tanaka, H., H. Onouchi, M. Kondo, I. Hara-Nishimura, M. Nishimura, C. Machida et Y. Machida. 2001. A subtilisin-like serine protease is required for epidermal surface formation in *Arabidopsis* embryos and juvenile plants. *Development* **128**:4681-9.
- Taylor, A. A., A. Horsch, A. Rzepczyk, C. A. Hasenkampf et C. D. Riggs. 1997. Maturation and secretion of a serine proteinase is associated with events of late microsporogenesis. *Plant J.* **12**:1261-1271.
- Terefework Z., G. Lortet, L. Suominen et K. Lindstrom. 2000. Molecular evolution of interactions between rhizobia and their legume hosts. Dans: Prokaryotic nitrogen fixation, a model system for the analysis of a biological process. Triplett, E. W. (Eds.) Horizon Scientific, Wymondham Norfolk, England.
- Torner, P., E. Mayda, M. D. Gomez, L. Canas, V. Conejero et P. Vera. 1996b. Characterization of LRP, a leucine-rich repeat (LRR) protein from tomato plants that is processed during pathogenesis. *Plant J.* **10**:315-330.
- Torner, P., V. Conejero et P. Vera. 1996a. Primary structure and expression of a pathogen-induced protease (PR-P69) in tomato plants: Similarity of functional domains to subtilisin-like endoproteases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:6332-7.
- Torner, P., V. Conejero et P. Vera. 1997. Identification of a new pathogen-induced member of the subtilisin-like processing protease family from plants. *J. Biol. Chem.* **272**:14412-9.
- Torrey, J.G. 1976. Initiation and development of root nodules of *Casuarina* (*Casuarinaceae*). *Amer. J. Bot.* **63** (3): 335-344.
- Uchikoba, T., H. Yonezawa et M. Kaneda. 1995. Cleavage specificity of cucumisin, a plant serine protease. *J. Biochem. (Tokyo)* **117**:1126-1130.
- Uchikoba, T., H. Yonezawa et M. Kaneda. 1998. Cucumisin like protease from the sarcocarp of *Benincasa hispida* var. Ryukyu. *Phytochemistry* **49**:2215-2219.
- Valverde, C. et L. G. Wall. 1999. Time course of nodule development in *Discaria trinervis* (*Rhamnaceae*) - *Frankia* symbiosis. *New Phytol.* **141** : 345-354.
- van Brussel, A. A. N., R. Bakhuizen, P. C. Van Sprosen, H. P. Spaink, T. Tak et T., B. J. J. Lugtenberg., 1992. Induction of preinfection thread structures in the leguminous host plant by mitogenic lipopoligosaccharides of *Rhizobium*. *Science* **257**: 70-71.
- van Ghelue, M., A. Ribeiro, B. Solheim, A. D. Akkermans, T. Bisseling et K. Pawlowski. 1996. Sucrose synthase and enolase expression in actinorhizal nodules of *Alnus glutinosa*: comparison with legume nodules. *Mol. Gen. Genet.* **250**:437-446.
- van Ghelue, M., E. Lovaas, E. Ringo et B. Solheim. 1997. Early interaction between *Alnus glutinosa* and *Frankia* strain Ar13. Production and specificity of root hair deformation factor(s). *Physiol. Plant.* **99**: 579-587.
- van Rhijn, P., Y. Fang, S. Galili, O. Shaul, N. Atzmon, S. Winiger, Y. Eshead, M. Lum, Y. Li, V. To, N. Fujishige, Y. Kapulnik et A. M. Hirsch. 1997. Expression of early nodulin genes in alfalfa mycorrhizae indicates that signal transduction pathways used in forming arbuscular mycorrhizae and *Rhizobium*-induced nodules may be conserved. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 5467-5472.
- Vancanney, G., R. Schmit, A. O'Conner-Sanchez, L. Willmitzer et M. Rocha-Sosa, M. 1990. Construction of an intron containing marker gene. Splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium* mediated plant transformation. *Mol. Gen. Genet.* **220**: 245-250.
- Vasse, J., F. de Billy, S. Camut et G. Truchet. 1990. Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules. *J. Bacteriol.* **172**:4295-306.
- Von Groll, U., D. Berger et T. Altmann. 2002. The subtilisin-like serine protease *SDD1* mediates cell-to-cell signaling during *Arabidopsis* stomatal development. *Plant Cell* **14**:1527-39.
- Wais, R. J., C. Galera, G. Oldroyd, R. Catoira, R. V. Penmetsa, D. Cook, C. Gough, J. Denarie et S. R. Long. 2000. Genetic analysis of calcium spiking responses in nodulation mutants of *Medicago truncatula*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:13407-13412.
- Walker, S. A., V. Viprey et J. A. Downie. 2000. Dissection of nodulation signaling using pea mutants defective for calcium spiking induced by nod factors and chitin oligomers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **97**:13413-8.
- Wall, L. G. 2000. The Actinorhizal Symbiosis. *J. Plant Growth Regul.* **19**:167-182.
- Wang E. T. et E. Martinez-Romero E. 2000. Phylogeny of root and stem nodule bacteria associated with legumes. Dans: Prokaryotic nitrogen fixation, a model system for the analysis of a biological process. Triplett, E. W. (Eds.) Horizon Scientific, Wymondham Norfolk, England.
- Wienkoop, S. et G. Saalbach. 2003. Proteome Analysis. Novel Proteins Identified at the Peribacteroid Membrane from Lotus japonicus Root Nodules. *Plant Physiol.* **131**:1080-1090.
- Wulf, A., K. Manthey, J. Doll, A. M. Perlick, B. Linke, T. Bekel, F. Meyer, P. Franken, H. Kuster et F. Krajinski. 2003. Transcriptional changes in response to arbuscular mycorrhiza development in the model plant *Medicago truncatula*. *Mol. Plant-Microbe Interac.* **16**:306-314.
- Yamagata, H., T. Masuzawa, Y. Nagaoka, T. Ohnishi et T. Iwasaki. 1994. Cucumisin, a serine protease from melon fruits, shares structural homology with subtilisin and is generated from a large precursor. *J. Biol. Chem.* **269**:32725-32731.
- Yamagata, H., M. Uesugi, K. Saka, T. Iwasaki et Y. Aizono. 2000. Molecular cloning and characterization of a cDNA and a gene for subtilisin-like serine proteases from rice (*Oryza sativa* L.) and *Arabidopsis thaliana*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**:1947-57.
- Yamagata, H., K. Yonesu, A. Hirata et Y. Aizono. 2002. TGTCACA motif is a novel cis-regulatory enhancer element involved in fruit-specific expression of the cucumisin gene. *J. Biol. Chem.* **277**:11582-11590.
- Yanagisawa, S. et R. J. Schmidt. 1999. Diversity and similarity among recognition sequences of Dof transcription factors. *Plant J.* **17**:209-214.
- Yang, W. C., C. de Blank, I. Meskiene, H. Hirt, J. Bakker, A. van Kammen, H. Franssen et T. Bisseling. 1994. *Rhizobium* nod factors reactivate the cell cycle during infection and nodule primordium formation, but the cycle is only completed in primordium formation. *Plant Cell* **6**:1415-1426.
- Yonezawa, H., H. Kaizuka, T. Uchikoba, K. Arima et M. Kaneda. 2000. Substrate specificity of cucumisin on synthetic peptides. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**:2104-2108.
- Yonezawa, H., T. Uchikoba et M. Kaneda. 1995. Identification of the reactive histidine of cucumisin, a plant serine protease: modification with peptidyl chloromethyl ketone derivative of peptide substrate. *J. Biochem. (Tokyo)* **118**:917-20.
- Yonezawa, H., T. Uchikoba et M. Kaneda. 1995. Identification of the reactive histidine of cucumisin, a plant serine protease: modification with peptidyl chloromethyl ketone derivative of peptide substrate. *J. Biochem. (Tokyo)* **118**:917-920.
- Yoshida, K. T. et T. Kuboyama. 2001. A subtilisin-like serine protease specifically expressed in reproductive organs in rice. *Sex. Plant Reprod.* **13** : 193-199.
- Yoshioka, H., R. G. Gregerson, D. A. Samac, K. C. M. Hoevens, G.

Trepp, J. S. Gantt et C. P. Vance. 1999. Aspartate aminotransferase in alfalfa nodules : localisation of mRNA during effective and ineffective nodule development and promoter analysis. *Mol. Plant Microbe Interact.* **12**:263-274.

Zavitovski, J. et M. Newton. 1968. Ecological importance of snowbrush, *Ceanothus velutinus* in the oregon cascades. *Ecology* **49**,

1134-1145.

Zhao, C., B. J. Johnson, B. Kositsup et E. P. Beers. 2000. Exploiting secondary growth in *Arabidopsis*. Construction of xylem and bark cDNA libraries and cloning of three xylem endopeptidases. *Plant Physiol.* **123**:1185-96.

## Annexe : articles

---

Molecular biology of actinorhizal symbioses. Laplaze L., **Svistoonoff S.**, Santi C., Auguy F., Franche C. Bogusz D. Dans "Nitrogen fixation research: origins and progress" Vol. VI: Actinorhizal symbioses. W.E. Newton (ed). Kluwer (sous presse)

Molecular biology of actinorhizal nodules **Svistoonoff S.**, Santi C., Constans L., Geney C., Auguy F., Duhoux E., Bogusz D., Franche C. 2001 Dans Recent Research Developpments in Plant Biology SG Pandalai (Eds.), Kerala, India

cg12 Expression is Specifically Linked to Infection of Root Hairs and Cortical Cells during *Casuarina glauca* and *Allocauarina verticillata* Actinorhizal Nodule Development. **Svistoonoff S.**, Laplaze L., Auguy F., Runions J., Duponnois R., Haseloff J., Franche C. et Bogusz D. 2003 *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16 (7) : 600-607

Expression of *ara12*, an *Arabidopsis* homologue of the nodule-specific actinorhizal subtilases *cg12/ag12* **Svistoonoff S.**, Laplaze L., Auguy F., Santi C., Fontanillas E., Duhoux E., Franche C., Bogusz D. " *Plant and Soil*, sous presse