

Un modèle pour l'étude des symbioses fixatrices d'azote actinorhiziennes

Casuarina-Frankia

C. Santl¹ E. Guldner¹ D. Bogusz¹
C. Geney¹ F. Auguy¹ C. Franche¹
S. Swistonoff¹ I. Bourrie¹
L. Constans¹ E. Duhoux¹

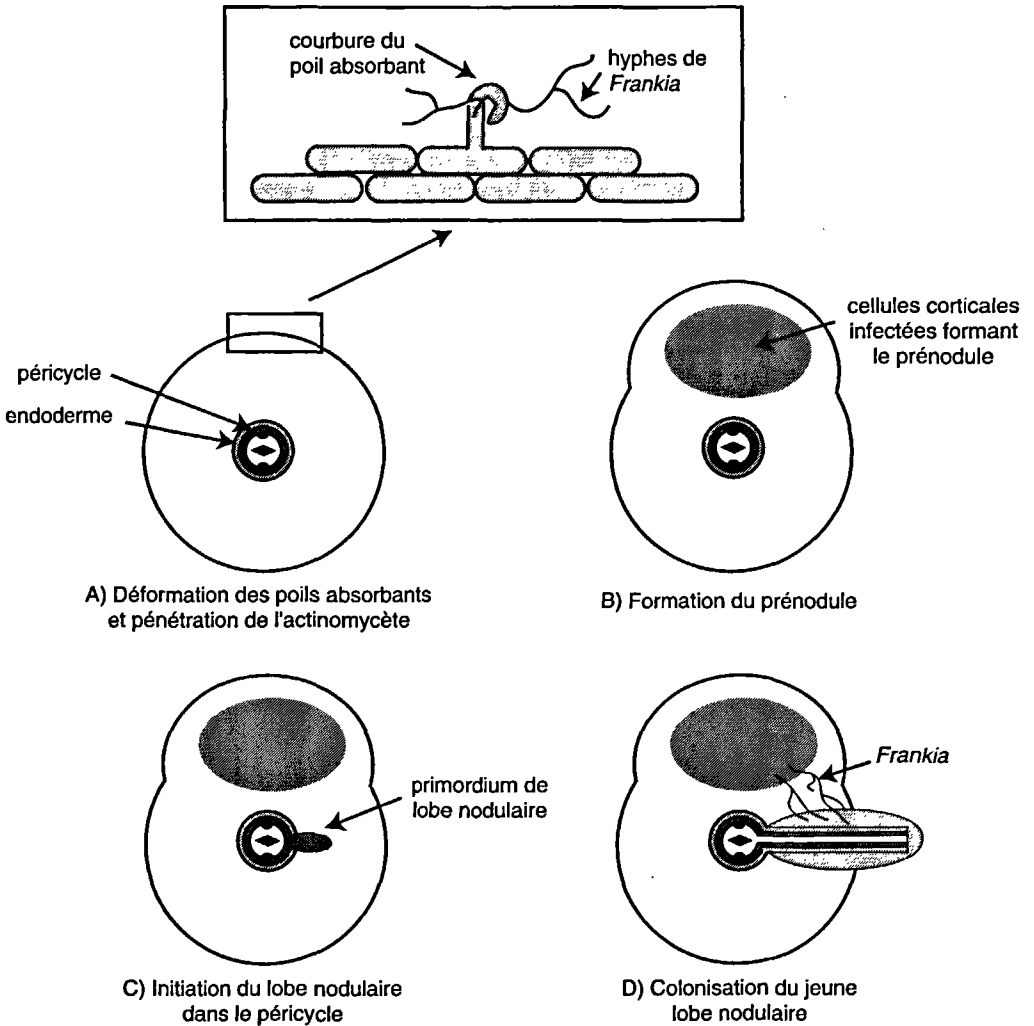
I Introduction

Les plantes susceptibles d'établir une symbiose fixatrice d'azote avec l'actinomycète du sol *Frankia* sont appelées plantes actinorhiziennes (Baker et Mullin, 1992). L'établissement de la symbiose implique le développement d'un nouvel organe, le nodule, qui est le site de la fixation d'azote atmosphérique par le microorganisme symbiote. Les plantes actinorhiziennes constituent, après les légumineuses, le deuxième groupe de plantes capables de fixer biologiquement l'azote atmosphérique (pour revue voir Berry, 1994). Contrairement aux légumineuses qui constituent une seule famille, les plantes actinorhiziennes ont une large répartition taxonomique ;

¹ Laboratoire de Physiologie cellulaire et moléculaire des arbres, IRD GeneTrop, UR Biodev, UMR 1098, 911 avenue Agropolis, BP 5045, 34032 Montpellier cedex 1, France.

elles appartiennent à environ 260 espèces, dont 24 genres répartis en 8 familles d'angiospermes. Une seconde originalité réside dans la structure du nodule actinorhizien (ou actinorhize) qui s'apparente à celle d'une racine adventive induite en réponse aux signaux émis par le microorganisme *Frankia* ; le nodule actinorhizien a en effet pour origine les cellules du péricycle de la racine et possède une vascularisation centrale. Ces nodules fixateurs d'azote constituent donc un modèle alternatif original, considéré comme moins complexe que les nodules des légumineuses (Pawlowski et Bisseling, 1996 ; Duhoux *et al.*, 1996).

Le mode d'infection intracellulaire par *Frankia* a été décrit dans les genres *Myrica*, *Comptonia*, *Alnus* et *Casuarina* et peut être divisé en plusieurs étapes (fig. 1) (Duhoux *et al.*, 1996). Tout d'abord, en réponse à des signaux dont la nature est encore inconnue, les poils absorbants des racines latérales vont se déformer, puis l'actinomycète va digérer la paroi primaire de certains poils absorbants et pénétrer dans la zone de courbure de ces poils (fig. 1 A). La pénétration de *Frankia* s'accompagne d'une encapsulation des hyphes par une matrice polysaccharidique d'origine végétale et par le plasmalemme de l'hôte ; cette capsule constitue l'interface entre le partenaire végétal et le microsymbiote fixateur d'azote. Suite à la pénétration du microsymbiote, une intense activité mitotique se produit dans le cortex de la racine, près de la zone d'infection, et conduit à la formation d'une protubérance sur la racine appelée pré-nodule (fig. 1 B). Les filaments de *Frankia* vont envahir les cellules corticales nouvellement formées et provoquer leur hypertrophie. Ce pré-nodule, dont la fonction est encore inconnue, n'évolue jamais en nodule, mais constitue une étape obligatoire dans la formation du lobe nodulaire. La troisième étape est l'initiation du lobe nodulaire dans le péricycle de la racine, en général à l'opposé des pôles de protoxylème (fig. 1 C). Le primordium a une structure de racine latérale et se développe en bordure ou de manière diamétralement opposée à l'emplacement du pré-nodule. La dernière phase est l'infection du lobe nodulaire ; les filaments de *Frankia* progressent à partir du pré-nodule, prolifèrent dans les cellules corticales de la racine et vont envahir le jeune lobe nodulaire (fig. 1 D). Les cellules corticales infectées vont s'hypertrophier et leur paroi s'épaissir en lignine.



■ Figure 1
Représentation schématique de l'infection par les poils absorbants (voie intracellulaire).

Dans les années 90, plusieurs laboratoires ont entrepris l'isolement et la caractérisation des gènes végétaux impliqués dans la relation symbiotique avec *Frankia* (Pawlowski et Bisseling, 1996 ; Franche *et al.*, 1998 b). Ces programmes ont été réalisés sur différentes

plantes actinorhiziennes, *Alnus glutinosa*, *Casuarina glauca*, *Datisca glomerata* et *Elaeagnus* ; ils ont conduit à l'isolement de gènes exprimés dans les différentes zones des lobes nodulaires : le méristème (zone 1), la zone d'infection (zone 2), la zone de fixation d'azote (zone 3) et la zone de sénescence des nodules (zone 4). Beaucoup de ces gènes sont exprimés à la fois dans les nodules et les racines, ce qui suggère que le programme génétique de morphogénèse racinaire est fortement impliqué lors du développement des nodules actinorhiziens (Bogusz *et al.*, 1996). La situation est différente chez les légumineuses où le criblage des banques d'ADNc de nodules a montré que la majorité des transcrits n'étaient pas exprimés dans les racines.

Notre laboratoire a pour objectif d'étudier les interactions moléculaires qui président à l'établissement et au fonctionnement de la symbiose *Casuarina-Frankia*.

Casuarina est un arbre tropical actinorhizien de la famille des *Casuarinaceae* qui comprend environ 90 espèces d'arbres et d'arbustes répartis en quatre genres : *Casuarina*, *Allocasuarina*, *Ceuthostoma* et *Gymnostoma*. En association avec *Frankia* et des champignons mycorhiziens, les *Casuarinaceae* peuvent croître sur des sols marginaux carencés en azote et en phosphore. La famille des *Casuarinaceae* comprend des essences tropicales, subtropicales ou méditerranéennes, adaptées à différents climats (arides à humides), à différentes altitudes (0 à 3 000 m) et à différents types de sols (acides à alcalins). Elles sont utilisées pour enrichir les sols, fixer les terrains érodés et les dunes mobiles, produire du bois d'œuvre et de feu, ainsi que de la fibre (National Research Council, 1984).

Dans cet article, nous décrivons la contribution de notre laboratoire à la mise au point d'un système de transformation génétique chez les *Casuarinaceae* et à la connaissance de l'expression conférée par des promoteurs hétérologues dans ces arbres tropicaux.

Puis nous illustrerons comment les Casuarinacées transgéniques peuvent être utilisées pour obtenir des informations sur la conservation ou la divergence des programmes génétiques qui conduisent au développement des différentes symbioses nodulaires fixatrices d'azote.

Matériel et méthodes

Matériel végétal et milieux de culture

Les graines d'*Allocasuarina verticillata* collectées en Australie sont désinfectées et mises à germer selon la technique de Le *et al.* (1996).

Le milieu MSC de régénération contient les micro- et macro-éléments de Murashige et Skoog (1962), les vitamines de Nitsch et Nitsch (1965), 20 g.L⁻¹ de saccharose, pH 5,6 et 0,7 % de bacto-agar Difco ; 0,5 μM d'ANA (acide naphthalène acétique) et 2,5 μM de BA (benzylaminopurine) sont ajoutés comme régulateurs de croissance. Le matériel végétal est repiqué toutes les trois semaines et incubé dans une chambre de culture à 28 °C, avec une photopériode de 16 h et une intensité lumineuse de 50 μE.m².s⁻¹.

Souches bactériennes et milieux de culture

La souche d'*Agrobacterium tumefaciens* C58C1 (pGV2260 ; pBIN19) (Vancanneyt *et al.*, 1990) est cultivée à 28 °C dans le milieu Ag (Franche *et al.*, 1997).

Les souches de *Frankia* Allo2 et THR utilisées respectivement pour l'inoculation des plantes transgéniques d'*A. verticillata* et de *Casuarina glauca* sont cultivées à 26 °C dans le milieu BAP modifié selon Benoist *et al.* (1992).

Transformation génétique par A. tumefaciens

La transformation génétique est effectuée sur des épicotyles des Casuarinacées selon la technique de Franche *et al.* (1997). Les plantes transgéniques sont sélectionnées en présence de 100 mg.L⁻¹ de kanamycine et la présence des transgènes *nptII* et *gus* est vérifiée par une analyse de type PCR (Le *et al.*, 1996). La liste des constructions géniques étudiées est décrite dans la figure 2.

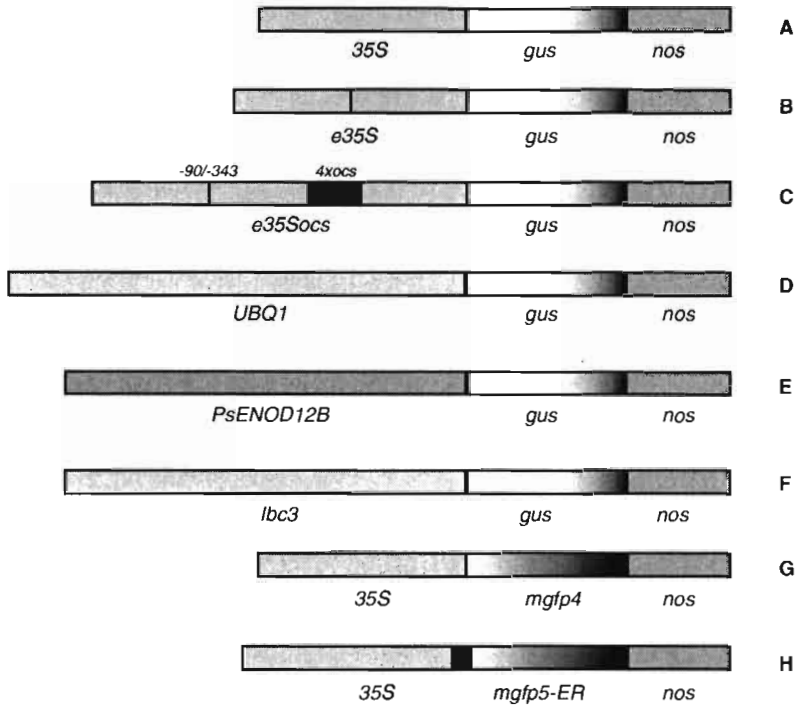


Figure 2
Constructions géniques introduites par transformation génétique chez les Casuarinacées.

Nodulation des plantes transgéniques de Casuarinacées

L'inoculation des plantes transgéniques est réalisée en chambre de culture selon les indications de Diem *et al.* (1983). Les premiers prénodules sont visibles environ trois semaines après inoculation par *Frankia* des plantes carencées en azote.

Détection de l'activité β -glucuronidase

L'activité β -glucuronidase est révélée après incubation des explants en présence de 1 mM de X-gluc (acide 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-

β -D-glucuronique) selon la méthode décrite par Jefferson *et al.* (1987). Pour les nodules transgéniques, la révélation histochimique est effectuée sur des coupes de 50 μ m réalisées avec un vibratome.

Détection de la fluorescence

La fluorescence liée à la GFP est détectée après observation du matériel végétal sous une loupe binoculaire Leica MZ FLII équipée d'un filtre d'excitation 470-440 nm et d'un filtre d'arrêt 525-550 nm.

Résultats

La transformation génétique des Casuarinacées par *A. tumefaciens*

Les techniques de transformation génétique peuvent être divisées en deux catégories : celles qui utilisent le vecteur biologique que sont les agrobactéries et les méthodes de transfert dites directes qui ont pour but de forcer la pénétration du matériel génétique par des moyens physiques, chimiques ou électriques. Lors d'expériences préliminaires, notre laboratoire a établi que les *Casuarinaceae* présentent une bonne sensibilité aux agrobactéries (Phelep *et al.*, 1991) ; cette approche a donc été privilégiée pour obtenir des arbres transgéniques actinorhiziens.

Les expériences de transformation génétique ont porté sur des *Casuarinaceae* appartenant à deux genres différents : *Allocauarina verticillata*, espèce pour laquelle les systèmes de culture *in vitro* sont bien maîtrisés, et *Casuarina glauca*, choisi en raison de sa bonne aptitude à la nodulation par *Frankia*. Après évaluation de plusieurs souches désarmées d'*A. tumefaciens*, la souche C58C1 (pGV2260 ; pBIN19) a été choisie pour cocultiver pendant trois jours des fragments d'épicotyles prélevés sur des plantes âgées de 30 à 45 jours. Après lavage, les explants sont placés sur un milieu sélectif contenant 50 mg.L⁻¹ de kanamycine et 250 mg.L⁻¹ de céfo-

taxime. Des cals résistants aux antibiotiques apparaissent au niveau des zones de blessure sur environ 30 % des épicotyles et la différenciation de bourgeons et de rameaux est obtenue sur 70 % de ces cals. Des plantes transgéniques d'*A. verticillata* sont régénérées quatre à six mois après l'inoculation par les agrobactéries (Franche *et al.*, 1997) ; pour *C. glauca*, l'obtention des plantes transformées enracinées est un peu plus longue, six à neuf mois (Franche *et al.*, 1999). L'inoculation de ces plantes par l'actinomycète *Frankia* a établi que la présence des transgènes n'a pas d'effet négatif sur l'appétitude à la nodulation ; l'activité réductrice d'acétylène mesurée dans les nodules témoins non transformés et les plantes transgéniques est identique.

Plusieurs approches ont permis d'apporter la preuve d'un transfert génétique dans les plantes régénérées en présence de kanamycine. Tout d'abord, l'activité du gène rapporteur de la β -glucuronidase a été étudiée après révélation histochimique et dosage fluorométrique. Environ 85 à 90 % des plantes régénérées expriment bien l'activité β -glucuronidase. Une analyse par réaction de polymérase en chaîne portant sur un échantillonnage de 200 plantes transgéniques a mis en évidence que 89 % des plantes contiennent le gène de sélection *nptII* et le gène rapporteur *gus* ; le transfert du gène *gus* semble avoir été affecté dans 8 % des plantes et 3 % des échantillons ne présentent pas d'amplification à la fois pour les gènes *nptII* et *gus*. Une analyse Southern a révélé l'intégration de une à trois copies des transgènes dans le génome d'*A. verticillata* et de *C. glauca* (Franche *et al.*, 1997 ; 1999).

Maîtriser l'expression des transgènes chez les Casuarinacées

L'introduction de gènes chez les plantes implique le contrôle de la régulation de leur expression dans l'organisme transgénique. Cette régulation a lieu à différents niveaux, mais le rôle de la région promotrice est en général prépondérant (Guilfoyle, 1997). Si beaucoup de publications traitent de l'étude de promoteurs dans les plantes annuelles, on a beaucoup moins de recul sur les séquences les plus appropriées pour exprimer un transgène de façon constitutive, spéci-

fique, ou inductible, chez les arbres forestiers. Il nous a donc semblé important, avant d'entreprendre des stratégies sens ou antisens dans les *Casuarinaceae*, de préciser l'expression spatiotemporelle conférée par des promoteurs hétérologues constitutifs ou spécifiques.

Le promoteur constitutif 35S

Nous avons dans un premier temps recherché si le promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (Odell *et al.*, 1985) conférait une expression constitutive dans les plantes transgéniques d'*A. verticillata* et de *C. glauca*. La construction utilisée contient le gène *gus* (Jefferson *et al.*, 1987) sous contrôle d'un fragment de 800 pb du promoteur 35S et de l'extrémité 3' du gène *nos* de la nopaline synthase (fig. 2 A).

Chez *A. verticillata*, l'analyse histochimique des plantes transgéniques révèle une expression GUS constitutive dans les parties aériennes, à l'exception de l'apex des rameaux (Franche *et al.*, 1997). Dans la racine principale, le gène rapporteur est surtout exprimé dans le cylindre central et la région méristématique. Dans les jeunes racines latérales, on observe une expression GUS restreinte au méristème ; lorsque la racine latérale se développe, le gène rapporteur est également exprimé dans les tissus vasculaires dans une zone proche de l'attachement à la racine principale.

Dans les nodules d'*A. verticillata*, le promoteur 35S apparaît très peu exprimé (fig. 3 A). Il n'y a pas d'activité GUS dans les cellules corticales du nodule, que celles-ci soient ou non infectées par *Frankia* ; en revanche, le gène rapporteur est exprimé dans le système vasculaire du nodule et dans l'assise subérophellodermique (Laplaze *et al.*, 2000).

Dans les rameaux transgéniques de *C. glauca*, le promoteur 35S dirige l'expression du gène *gus* de façon moins constitutive que chez *A. verticillata* (résultats non illustrés). Au niveau de la partie apicale, le gène *gus* est surtout exprimé dans les tissus vasculaires des écailles et des tiges ; des prélèvements effectués à différents niveaux des tiges mettent en évidence que l'activité enzymatique GUS augmente avec l'âge des tissus. Ces résultats sont en accord avec ce qui est observé dans la majorité des plantes annuelles, le promoteur 35S étant mieux exprimé dans les tissus âgés que dans les tissus jeunes.



Figure 3 A
Analyse des plantes transgéniques d'*Allocauarina verticillata*.
Expression du gène rapporteur de la β -glucuronidase sous
contrôle du promoteur 35S (A) dans des nodules transformés.

Dans les racines transformées, on trouve des spécificités d'expression absolument identiques chez *C. glauca* et *A. verticillata*, tant au niveau de la racine principale que des racines latérales.

L'analyse histochimique du gène rapporteur dans les nodules de *C. glauca* met en évidence une expression dans le système vasculaire et dans l'assise subérophellodermique ; contrairement à *A. verticillata*, une activité GUS est également notée dans certaines cellules corticales non infectées du nodule qui contiennent de grandes quantités de composés phénoliques (Laplaze *et al.*, 1999). Ces cellules corticales forment des couches concentriques qui délimitent différents compartiments au sein du nodule de *C. glauca*. La fonction de ces cellules corticales est encore inconnue. Aucune coloration bleue n'est en revanche détectée dans les cellules corticales du nodule dépourvues de polyphénols. Ce résultat suggère l'existence de programmes génétiques différents selon la nature des cellules corticales non infectées.

Les nodules de *C. glauca* sont caractérisés par la présence de racines nodulaires à géotropisme négatif qui seraient impliquées

dans les échanges gazeux. La coloration bleue GUS est faible et limitée au système vasculaire ; la partie apicale de la racine nodulaire ne présente pas de cristaux bleus. Les facteurs de transcription sont donc différents dans le méristème des racines nodulaires et des racines latérales.

L'ensemble des résultats obtenus lors de l'analyse des plantes transgéniques d'*A. verticillata* et de *C. glauca* exprimant la construction *35S-gus* révèle que le promoteur *35S* peut être utilisé pour exprimer des gènes d'intérêt dans les tiges et les racines. En revanche, cette séquence possède une spécificité très marquée dans les nodules actinorhiziens ; aucune activité n'est mesurée dans les cellules corticales infectées par *Frankia*, aussi bien dans la zone d'infection que dans la zone de fixation d'azote.

Bilan des autres promoteurs constitutifs étudiés

Trois constructions contenant le gène *gus* sous contrôle de promoteurs constitutifs ont été introduites chez *A. verticillata* : *e35Sgus* (promoteur *35S* dupliqué) (Kay *et al.*, 1987), *e35Socsgus* (promoteur *e35S* contenant quatre copies de l'activateur de transcription *ocs*) (Ellis *et al.*, 1987), *UBQ1gus* (promoteur du gène de l'ubiquitine 1 d'*Arabidopsis thaliana*) (Callis *et al.*, 1990) (fig. 2 B-D). Ces trois constructions confèrent à des gènes hétérologues une forte expression constitutive chez les plantes annuelles.

L'analyse histochimique révèle une activité β -glucuronidase constitutive dans les tiges et les racines des plantes contenant le gène *gus* sous contrôle des promoteurs *e35S* et *e35Socs* (résultats non illustrés). La coloration bleue dans les racines transformées est extrêmement intense, y compris dans les poils racinaires et la zone d'élongation de la racine principale, et les cellules corticales des racines latérales. Dans les nodules transgéniques, on observe avec ces deux séquences régulatrices une très forte activité GUS dans l'assise suberophellodermique (fig. 3 B). En revanche, l'activité dans le système vasculaire du nodule n'est pas toujours observée avec la construction *e35Sgusocs* ; la présence des quatre copies de l'activateur de transcription *ocs* conduit parfois à une absence totale d'activité GUS dans ce tissu. Dans des racines transgéniques de tabac contenant une fusion *ocs-lacZ*, Teeri *et al.* (1989) ont établi

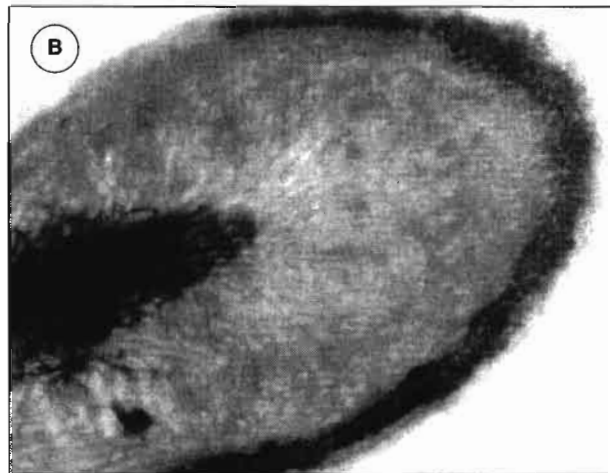


Figure 3 B
Analyse des plantes transgéniques d'*Allocasuarina verticillata*.
Expression du gène rapporteur de la β -glucuronidase sous
contrôle du promoteur *e35S* (B) dans des nodules transformés.

qu'il y avait une activité β -galactosidase dans l'épiderme, mais pas dans le tissu vasculaire ; des résultats contradictoires ont été rapportés par le groupe de Gelvin (Konowicz *et al.*, 1992) qui a localisé l'expression du gène rapporteur uniquement dans le système vasculaire des plantes transformées. Il est donc difficile de déterminer si nos résultats sont liés à la spécificité d'expression de l'*ocs*, ou à un phénomène d'extinction dû aux multiples copies de cette séquence dans notre construction.

Par contre, avec le promoteur *UBQ1* d'*A. thaliana*, l'activité β -glucuronidase est restreinte aux régions méristématiques : méristèmes axillaires dans les rameaux et l'apex de la racine principale. Cette construction est également exprimée lors de l'émergence des racines latérales, puis s'éteint peu à peu lors de leur croissance. La spécificité d'expression très marquée du promoteur *UBQ1* chez *A. verticillata* se distingue de celle observée dans du tabac transgénique où l'activité est constitutive (Callis *et al.*, 1990). Dans le cas des nodules transgéniques *UBQ1gus*, quelques rares cellules du cortex du nodule expriment le gène rapporteur. Aucune activité du gène *gus* n'a été observée dans la zone méristématique du nodule, ce qui

suggère l'existence de programmes génétiques différents dans les méristèmes racinaires et nodulaires.

Étude de l'expression de promoteurs de noduline

Chez les légumineuses, au cours de l'interaction avec *Rhizobium*, l'expression spécifique de certains gènes chez la plante et chez la bactérie entraîne l'établissement de la symbiose et la formation du nodule (pour revue voir Schultze et Kondorosi, 1998). On parle pour les gènes de plante de gènes de noduline (Legocki et Verma, 1980). En fonction de leur cinétique d'apparition, on distingue des nodulines précoces, exprimées avant la mise en place de la fixation d'azote et impliquées dans le processus d'infection et l'ontogénèse du nodule ; et les nodulines tardives, synthétisées durant la mise en place de la fixation d'azote et jouant un rôle dans le métabolisme du nodule (Scheres *et al.*, 1990).

L'un des objectifs de notre laboratoire est, grâce aux plantes transgéniques, de déterminer si les séquences régulatrices de légumineuses sont reconnues dans les nodules actinorhiziens, et si elles conservent leur spécificité d'expression. Dans ce cadre, nous avons transformé génétiquement *A. verticillata* avec deux constructions chimères contenant le gène rapporteur de la β -glucuronidase sous contrôle d'un promoteur de gène de noduline précoce de pois, ENOD12, et d'un promoteur de gène de noduline tardive de soja, l'hémoglobine (fig. 2 E-F).

L'exemple d'une noduline précoce : *PsENOD12B*

PsENOD12B est un gène de noduline précoce de pois, inductible par les facteurs Nod de *Rhizobium* (Scheres *et al.*, 1990 a, b). Chez les légumineuses, cette séquence est transcrite dans les poils absorbants, les cellules corticales contenant les cordons d'infection et dans les cellules du cortex interne des nodules qui entrent en division dès les premières étapes de l'infection. La protéine ENOD12 est riche en hydroxyproline et pourrait être une protéine de paroi. Chez les plantes actinorhiziennes, aucun gène homologue à ENOD12 n'a pu être mis en évidence malgré les recherches entreprises par différents laboratoires.

La construction *PsENOD12B-gus* a été introduite par transformation génétique chez *A. verticillata* et l'activité du gène rapporteur a été étudiée dans les tissus non symbiotiques et symbiotiques. Au niveau des racines, aucune coloration n'est observée. Dans les tiges, une activité bleu pâle est notée dans le système vasculaire. Dans les nodules actinorhiziens, l'activité GUS est localisée dans les grandes cellules corticales infectées par *Frankia* qui correspondent aux cellules fixatrices d'azote (fig. 3 C). La séquence promotrice *ENOD12* est donc reconnue dans les plantes actinorhiziennes, mais elle ne semble pas conserver sa spécificité d'expression dans les nodules puisque l'expression est observée dans la zone de fixation d'azote, et non dans la zone d'infection comme chez les légumineuses. Des études sont en cours afin de déterminer si on détecte une expression de cette construction dans les phases précoces de l'infection par *Frankia*.

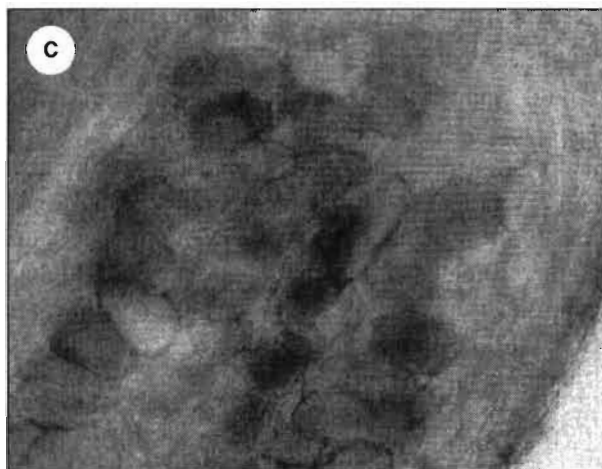


Figure 3 C
Analyse des plantes transgéniques d'*Allocauarina verticillata*.
Expression du gène rapporteur de la β -glucuronidase sous contrôle
du promoteur *PSENOD12* (C) dans des nodules transformés.

L'exemple d'une noduline tardive : l'hémoglobine symbiotique de soja

L'hémoglobine est une molécule transporteuse d'oxygène présente dans le sang et les muscles des vertébrés, mais aussi dans les plantes

supérieures. Dans les nodules fixateurs d'azote, l'hémoglobine symbiotique peut représenter jusqu'à 20 à 25 % des protéines cytoplasmiques. Elle y a pour fonction d'assurer l'approvisionnement en oxygène des bactéries symbiotiques et de préserver le complexe nitrogénase d'une inactivation irréversible par l'oxygène (Appleby, 1992).

Nous avons utilisé le promoteur hétérologue du gène *lbc3* d'hémoglobine symbiotique de soja ; dans les nodules de soja, ce gène est exprimé dans les cellules végétales de la zone de fixation d'azote contenant les bactéroïdes (Stougaard *et al.*, 1986). La construction contenant le gène de la β -glucuronidase sous contrôle du promoteur *lbc3* a été placée dans le vecteur BIN19, puis introduite dans la souche désarmée d'*Agrobacterium tumefaciens* C58C1 (pGV2260). Une cinquantaine de plantes transgéniques d'*A. verticillata* ont été régénérées et inoculées avec la souche de *Frankia Allo2*.

L'incubation des parties aériennes et des racines non nodulées dans le substrat X-gluc confirme l'absence d'activité β -glucuronidase pour toutes les plantes transgéniques (Franche *et al.*, 1998 a). Dans les nodules transgéniques *lbc3-gus*, seules les cellules infectées par *Frankia* de la zone de fixation d'azote sont colorées en bleu (fig. 3 D).



Figure 3 D
Analyse des plantes transgéniques d'*Allocauarina verticillata*. Expression du gène rapporteur de la β -glucuronidase sous contrôle du promoteur *lbc3* (D) dans des nodules transformés.

La régulation de l'expression du promoteur d'hémoglobine apparaît donc conservée dans les plantes actinorhiziennes. Cette séquence devrait contribuer au succès des stratégies antisens visant à éteindre l'expression des gènes symbiotiques dans les cellules infectées de la zone de fixation d'azote des nodules actinorhiziens.

Évaluation du gène rapporteur de la protéine fluorescente verte (GFP)

Le principal inconvénient lié à l'utilisation du gène rapporteur *gus* réside dans la destruction des tissus végétaux lors de la mise en évidence de l'activité enzymatique (Jefferson *et al.*, 1987). Une étude de cinétique d'expression d'une construction chimère peut donc s'avérer très lourde car elle implique au cours du temps le sacrifice de nombreuses plantes. Nous avons donc recherché si le gène rapporteur de la GFP pouvait être substitué à l'utilisation du gène *gus*.

Deux constructions ont été introduites chez *A. verticillata* (fig. 2 G-H) : 35S-*mgfp4* qui contient une séquence *gfp* sur laquelle 84 nucléotides ont été modifiés afin de se rapprocher des caractéristiques des séquences de plantes (Haseloff *et al.*, 1997) ; et 35S-*mgfp5-ER* qui contient une séquence adressant la protéine dans le réticulum endoplasmique (Haseloff et Siemerling, 1998). La fluorescence des plantes transgéniques d'*A. verticillata* a été comparée à celle de plantes transgéniques de *N. tabacum* exprimant ces mêmes constructions.

Les résultats obtenus chez *A. verticillata* mettent en évidence que les gènes *mgfp4* et *mgfp5-ER*, placés sous contrôle du promoteur 35S, sont exprimés chez *A. verticillata*. L'efficacité de transformation avec ces constructions est comparable à celle observée avec les constructions *gus*, ce qui suggère qu'il n'y a pas de phytotoxicité avec ce gène rapporteur dans les *Casuarinaceae*. *mgfp4* confère une faible fluorescence aux cals et aux racines transformées ; en revanche, il est beaucoup plus difficile de déceler la fluorescence dans la partie aérienne, sans doute en raison de la présence de chlorophylle.

La construction *mgfp5-ER* est beaucoup mieux exprimée que la précédente, à la fois dans les cals et les plantes transgéniques d'*A. verticillata* (fig. 3 E). Au niveau des racines, comme dans le cas des plantes 35S-*gus*, on observe une forte expression de la GFP dans le



Figure 3 E
Racines transformées exprimant le gène rapporteur de la protéine fluorescente verte (GFP) sous contrôle du promoteur 35S (E).

système vasculaire. Dans les parties aériennes, la spécificité d'expression est à nouveau beaucoup plus difficile à analyser ; seule la partie apicale des rameaux présente une fluorescence verte. Dans tous les cas, le niveau de fluorescence est très significatif par rapport aux plantes témoins non transformées. La comparaison visuelle avec les plantes transgéniques de tabac met en évidence une fluorescence un peu plus faible chez *A. verticillata*. L'étude des nodules transgéniques d'*A. verticillata* est en cours.

Discussion

Contrairement aux symbioses *Rhizobium*-légumineuses, les connaissances du dialogue moléculaire qui s'établit entre le microorganisme *Frankia* et les plantes actinorhiziennes restent limitées

(Pawlowski et Bisseling, 1996 ; Franche *et al.*, 1998 b). Parmi les problèmes rencontrés, il y a d'une part l'absence de systèmes d'analyse génétique chez le microorganisme *Frankia* et, d'autre part, le fait que toutes les plantes actinorhiziennes, à l'exception de *Datisca*, sont des arbres ou des arbustes. On a cependant assisté ces dix dernières années à des avancées importantes dans l'étude du partenaire végétal, à la fois par la mise au point des techniques d'extraction d'ADN et d'ARNm permettant des approches moléculaires, et par l'utilisation des techniques d'hybridation *in situ* sur les nodules actinorhiziens.

L'obtention de plantes transgéniques chez les Casuarinacées constitue une avancée majeure pour l'étude des symbioses actinorhiziennes (Franche *et al.*, 1998 b). Le système développé dans notre laboratoire est jusqu'à présent le seul système de transfert de gènes permettant l'obtention de plantes actinorhiziennes transformées. Les résultats obtenus avec l'analyse de différents promoteurs constitutifs mettent en évidence que les promoteurs e35S et e35Socs sont de bons candidats pour diriger l'expression de gènes d'intérêt chez *Casuarina*. En revanche, aucun de ces promoteurs ne dirige une expression dans les cellules des nodules actinorhiziens infectés par *Frankia*.

Comme chez les légumineuses, la transformation génétique de *Casuarina* peut désormais être utilisée pour caractériser les gènes symbiotiques impliqués dans le développement ou le fonctionnement des nodules actinorhiziens. Les études des séquences promotrices vont permettre de préciser la spécificité d'expression conférée par ces séquences ; les modifications physiologiques liées à l'extinction ou à la surexpression des gènes symbiotiques seront étudiées, et conduiront à préciser la fonction symbiotique et non symbiotique des gènes végétaux étudiés (Laplaze *et al.*, 2000).

Une autre utilisation des *Casuarinaceae* transgéniques que nous avons illustrée dans cet article est l'étude de la spécificité d'expression conférée par un promoteur de légumineuse dans une plante actinorhizienne. Dans le cas du promoteur de noduline précoce ENOD12B de pois, les études préliminaires ont révélé que cette séquence conserve la même spécificité d'expression non symbiotique dans la tige d'*A. verticillata*. En revanche, dans les nodules actinorhiziens transgéniques, c'est dans les cellules végétales infectées de

la zone de fixation d'azote que l'on trouve les facteurs de transcription permettant l'expression de la construction *PsENOD12B-gus* ; dans les nodules des légumineuses, cette séquence est exprimée dans la zone d'infection, mais pas dans la zone de fixation d'azote. Avec le promoteur du gène de noduline tardive de soja, on a au contraire une reconnaissance parfaite lorsque l'on compare les résultats obtenus dans les nodules de légumineuses et les nodules actinorhiziens (Franche *et al.*, 1998 a). Cette plus grande conservation s'explique probablement par l'existence de gènes d'hémoglobine aussi bien dans les légumineuses que dans les plantes actinorhiziennes, alors que pour la noduline précoce ENOD12, aucun équivalent n'a été mis en évidence dans les plantes actinorhiziennes malgré les efforts de différents laboratoires.

Le travail effectué avec le gène rapporteur de la GFP montre que l'on obtient une fluorescence très marquée chez *A. verticillata* avec la séquence *mgfp5-ER* sous contrôle du promoteur constitutif 35S. L'étude des nodules transgéniques permettra de déterminer l'intérêt de ce gène pour la symbiose actinorhizienne. La mise au point de systèmes de transformation génétique sur des espèces actinorhiziennes récalcitrantes en culture *in vitro* ou récalcitrantes aux agrobactéries devrait être facilitée par l'utilisation de ce gène rapporteur non léthal.

La symbiose *Casuarina-Frankia* présente plusieurs caractéristiques intéressantes qui pourraient contribuer à faire de cette association un modèle pour l'étude des symbioses actinorhiziennes :

- on sait cultiver à l'état pur la souche de *Frankia* qui nodule *Casuarina* ;
- les techniques de biologie moléculaire permettant l'extraction d'ADN, d'ARN, le clonage de gènes, et l'hybridation *in situ* sur nodules sont au point pour *Casuarina* ;
- c'est la seule plante actinorhizienne, avec *Allocasuarina*, que l'on sait transformer génétiquement ; la méthode basée sur *A. tumefaciens* permet la régénération rapide (6 mois) de nombreuses plantes transgéniques ;
- le génome de *Casuarina* est petit ($2C = 0,7$ pg et $2n = 18$ chromosomes).

La compréhension globale du programme génétique qui se met en place lors de l'interaction avec l'actinomycète nécessite la réalisa-

tion d'un programme de séquençage des EST (Expressed Sequence Tags) exprimées dans les racines non infectées et les nodules actinorhiziens. Les résultats obtenus devront être comparés aux programmes de séquençage développés chez les légumineuses, et contribueront à déterminer quel est le programme génétique qui prédispose une plante à développer des nodules fixateurs d'azote.

Bibliographie

- Appleby CA 1992 —
The origin and functions
of haemoglobin in plants.
Sci Progress (Oxford) 76 : 365-398.
- Baker DD, Mullin BC 1992 —
Actinorhizal symbioses. In Biological
nitrogen fixation. G Stacey ed.,
Chapman et Hall, New York, 259-291.
- Benoist P, Müller A,
Diem HG, Schwencke J 1992 —
High-molecular-mass multicatalytic
proteinases complexes produced
by the nitrogen-fixing actinomycete
Frankia strain BR.
J Bacteriol 174 : 1495-1504.
- Berry AM 1994 —
Recent development in actinorhizal
symbiosis. Plant Soil 161 : 135-145.
- Bogusz D, Franche C, Gherbi H,
Diouf D, Nassar A, Gobe C,
Auguy F, Ahee J, Duhoux E 1996 —
La symbiose *Casuarinaceae-Frankia* :
approche moléculaire
du rôle de la plante hôte.
Acta bot Gallica 143 : 621-633.
- Callis J, Raasch JA, Viestra RD 1990 —
Ubiquitin extension proteins
of *Arabidopsis thaliana*.
J Biol Chem 265 : 12486-12493.
- Diem HG, Gauthier D,
Dommergues Y 1983 —
Isolation of *Frankia* from nodules
of *Casuarina equisetifolia*.
Can J Bot 28 : 526-530.
- Duhoux E, Diouf D, Gherbi H,
Franche C, Ahee J, Bogusz D 1996 —
Le nodule actinorhizien.
Acta bot Gall 143 : 593-608.
- Ellis J, Llewellyn DJ, Walker JC,
Dennis ES, Peacock WJ 1987 —
The *ocs* element: a 16 base pair
palindrome essential for activity
of the octopine synthase enhancer.
EMBO J 6 : 3203-3208.
- Franche C, Bogusz D, Smouni A,
Diouf D, Gherbi H, Duhoux E 1999 —
Genetic transformation of
Casuarina glauca. In Biotechnology
in agriculture and forestry. Vol 44,
Transgenic trees. YPS Bajaj ed.,
Springer-Verlag, Berlin, 15-28.
- Franche C, Diouf D, Le QV,
N'diaye A, Gherbi H, Bogusz D,
Gobe C, Duhoux E 1997 —
Genetic transformation of the
actinorhizal tree *Allocasuarina*
verticillata by *Agrobacterium*
tumefaciens. Plant J 11 : 897-904.
- Franche C, Diouf D, Laplaze L,
Auguy F, Frutz T, Rio M,
Duhoux E, Bogusz D 1998 a —
Soybean (*lbc3*), *Parasponia*,
and *Trema* hemoglobin gene
promoters retain their symbiotic and
nonsymbiotic specificity in transgenic

- Casuarinaceae*: implications for hemoglobin gene evolution and root nodule symbioses. *Mol Plant Microbe Interact* 11 : 887-894.
- Franche C, Laplaze L, Duhoux E, Bogusz D 1998 b — Actinorhizal symbioses: recent advances in plant molecular and genetic transformation studies. *Crit Rev Plant Sci* 17: 1-28.
- Guilfoyle TJ 1997 — The structure of plant promoters. *In Genetic engineering* vol 19. JK Setlow ed., Plenum Press, New York, 15-47.
- Haseloff J, Siemerling KR 1998 — The uses of green fluorescent protein in plants. *In Green fluorescent protein: properties, applications, and protocols*. M Chalfie, S Kain eds., Wiley-Liss Inc, New York, 191-220.
- Haseloff J, Siemerling KR, Prasher DC, Hodge S 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.
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW 1987 — GUS fusion: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *Embo J* 6 : 3901-3907.
- Kay R, Chan A, Daly M, Mcpherson J 1987 — Duplication of CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. *Science* 236 : 1299-1302.
- Konowicz H, Wang YE, Habeck LL, Gelvin SB 1992 — Subdomains of the octopine synthase upstream activating element direct cell-specific expression in transgenic tobacco plants. *Plant Cell* 4 : 17-27.
- Laplaze L, Gherbi H, Frutz T, Pawlowski K, Franche C, Macheix J-J, Auguy F, Bogusz D, Duhoux E 1999 — Flavan-containing cells delimit *Frankia*-infected compartments in *Casuarina glauca* nodules. *Plant Physiol* 121 : 113-122.
- Laplaze L, Bon M-C, Sy MO, Smouni A, Allonneau C, Auguy F, Frutz T, Rio M, Guemache F, Duhoux E, Franche C, Bogusz D 2000 — Molecular biology of tropical nitrogen-fixing trees in the *Casuarinaceae* family. *In Molecular biology of woody plants* Vol 1. SM Jain, SC Minocha eds., Kluwer Academic Publishers, 269-285.
- Le QV, Bogusz D, Gherbi H, Lappartient A, Duhoux E, Franche C 1996 — *Agrobacterium tumefaciens* gene transfer to *Casuarina glauca*, a tropical nitrogen-fixing tree. *Plant Sci* 118 : 57-69.
- Legocki RP, Verma DPS 1980 — Identification of "nodule-specific" host proteins (nodulins) involved in the development of *Rhizobium*-legume symbiosis. *Cell* 20 : 153-163.
- Murashige T, Skoog F 1962 — A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15 : 473-497.
- National Research Council 1984 — Casuarinas: nitrogen-fixing trees for adverse sites. Washington DC, 117 p.
- Nitsch JP, Nitsch C 1965 — Néoformation de fleurs *in vitro* chez une espèce de jours courts : *Plumbago indica* L. *Ann Physiol* 7 : 251-256.
- Odell JT, Nagy F, Chua N-H 1985 — Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* 313 : 810-812.

- Pawlowski K, Bisseling T 1996 — Rhizobial and actinorhizal symbioses: what are the shared features? *Plant Cell*, 8 : 1899-1913.
- Phelep M, Petit A, Martin L, Duhoux E, Tempe J 1991 — Transformation and regeneration of a nitrogen-fixing tree, *Allocauarina verticillata* Lam. *Bio/Technology* 9 : 461-466.
- Scheres B, Van De Wiel C, Zalensky A, Horvath B, Spaink H, Van Eck H, Zwartkruls F, Wolters AM, Gloudemans T, Van Kammen A, Bisseling T 1990 a — The *ENOD12* gene product is involved in the infection process during the Pea-*Rhizobium* interaction. *Cell* 60 : 281-294.
- Scheres B, Van Engelen F, Van Der Knaap E, Van De Wiel C, Van Kammen A, Bisseling T 1990 b — Sequential induction of nodulin gene expression in the developing pea nodule. *Plant Cell*, 2 : 687-700.
- Schultze M, Kondorosi A 1998 — Regulation of symbiotic root nodule development. *Annu Rev Genet* 32 : 33-57.
- Stougaard J, Marcker KA, Otten L, Schell J 1986 — Nodule-specific expression of a chimaeric soybean leghaemoglobin gene in transgenic *Lotus corniculatus*. *Nature* 321 : 669-674.
- Teeri TH, Lehvaslaiho H, Franck M, Uotila J, Heino P, Palva ET, Van Montagu M, Herrera-Hestrella L 1989 — Gene fusions to *lacZ* reveal new expression patterns of chimeric genes in transgenic plants. *Embo J* 8 : 343-350.
- Vancanneyt G, Schmidt R, O'conner-Sanchez A, Willmitzer L, 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.