

La symbiose *Casuarinaceae-Frankia* : approche moléculaire du rôle de la plante-hôte

par Didier Bogusz⁽¹⁾, Claudine Franche⁽¹⁾, Hassen Gherbi⁽¹⁾, Diaga Diouf⁽¹⁾,
Ateff Nassar, Clothilde Gobé⁽¹⁾, Florence Auguy⁽¹⁾, Jeanne Ahée⁽¹⁾ et Emile Duhoux^(1,2)

⁽¹⁾ Laboratoire de Biotechnologie des Symbioses Forestières Tropicales (BSFT),
(ORSTOM-CIRAD-Forêt), 45bis avenue de La-Belle-Gabrielle, F-94736 Nogent-sur-Marne

⁽²⁾ Université Paris 7-D. Diderot

Résumé. - Les *Casuarinaceae* sont des plantes actinorhiziennes susceptibles d'établir une symbiose fixatrice d'azote avec le microorganisme actinomycète *Frankia*. Dans le but d'identifier des gènes de *Casuarina* participant au processus symbiotique, une banque d'ADNc, issus d'ARNm de nodules, a été construite. L'hybridation différentielle, par utilisation de sondes d'ADNc de nodules et de racines non nodulées a permis d'isoler plusieurs clones dont certains n'hybrident qu'avec la sonde nodule. Quelques clones ont été séquencés et leurs séquences analysées. Afin d'étudier la régulation de l'expression des gènes symbiotiques, deux systèmes de transformation génétique des *Casuarinaceae* ont été mis au point. Le premier système utilise *Agrobacterium rhizogenes* et le second *Agrobacterium tumefaciens* désarmé. L'analyse de l'expression des gènes symbiotiques est effectuée dans les nodules transformés.

Summary. - Casuarinas are actinorhizal tropical trees belonging to the family *Casuarinaceae* and are capable of forming nitrogen fixing root nodules with an actinomycetal microorganism known as *Frankia*. In order to identify genes involved in *Casuarina-Frankia* symbiosis, a *Casuarina glauca* root nodule cDNAs library was constructed and screened differentially with root and nodule cDNA probes. Here, we present the characterization of several *C. glauca* transcripts identified by sequence analysis of cDNA clones. In order to study the symbiotic genes in *Casuarina glauca* root nodules, two genetic transformation systems were developed in *Casuarinaceae* using *Agrobacterium rhizogenes* and *Agrobacterium tumefaciens*. Expression of symbiotic genes was studied in transgenic root nodules.

Key word : actinorhizal symbiosis - *Casuarina glauca* - *Allocasuarina verticillata* - cDNA library - genetic transformation.

I. INTRODUCTION

Les *Casuarinaceae* sont des plantes actinorhiziennes capables de former des nodules fixateurs d'azote en association avec l'actinomycète du sol *Frankia*. Comme les autres nodules actinorhiziens, les nodules des *Casuarinaceae* sont constitués de lobes nodulaires dont chacun correspond à une structure de racine adventive modifiée (Duhoux *et al.*, ce fascicule). Une des questions fondamentales est de savoir quels sont les mécanismes moléculaires qui président à la modification d'une racine adventive orientée vers la fixation de l'azote atmosphérique.

Chez les Légumineuses, on a pu montrer ces dernières années que l'installation de la symbiose et le développement du nodule impliquent une induction coordonnée et séquentielle d'une part de gènes de la bactérie et d'autre part, de gènes spécifiques de l'hôte. Ainsi, de nombreux gènes de la plante hôte, qui sont préférentiellement ou exclusivement exprimés dans les nodules (gènes de nodulines), ont été isolés et caractérisés grâce à l'analyse de banques d'ADNc réalisées à partir d'ARNm de nodules (Legocki et Verma, 1980 ; Scheres *et al.*, 1990b). L'étude des cinétiques d'apparition des nodulines au cours de la symbiose a permis de les classer en deux catégories : les nodulines précoces qui interviennent dans le processus d'infection et les nodulines tardives impliquées dans le fonctionnement du nodule (van Kammen, 1984 ; Franssen *et al.*, 1992). Comme exemple de nodulines précoces, on peut citer l'isolement, chez le pois (*Pisum sativum*), d'ADNc correspondant à des nodulines qui participent au processus d'infection (PsENOD12 et PsENOD5) (Scheres *et al.*, 1990a et b). Des expériences d'hybridation *in situ* ont permis de localiser les transcrits correspondant à PsENOD12 dans les cellules du cordon d'infection, les poils absorbants, les cortex racinaire et nodulaire et dans plusieurs couches cellulaires situées

en amont du cordon d'infection (Franssen *et al.*, 1992). Parmi toutes les nodulines tardives, la plus abondante et la mieux étudiée est la leghémoglobine (Appleby, 1984), en effet, elle représente 20 à 25 % des protéines cytoplasmiques solubles du nodule. Elle est localisée dans le cytoplasme des cellules infectées (Robertson *et al.*, 1984 ; De Billy *et al.*, 1991). La leghémoglobine est la protéine clé de la symbiose fixatrice d'azote, sa fonction est de faciliter la diffusion de l'oxygène (pour revue, voir Appleby, 1984 ; Appleby *et al.*, 1988).

Chez les plantes actinorhiziennes, les protéines qui sont spécifiquement exprimées au cours de l'établissement de la symbiose ont reçu le nom d'actinorhizines (Tremblay *et al.*, 1986). Bien que les symbioses actinorhiziennes aient été l'objet de nombreux travaux ces dix dernières années (Berry, 1994), on a encore très peu d'informations sur l'interaction plante-*Frankia*. La purification de l'hémoglobine de *Casuarina glauca* a été obtenue par Fleming *et al.*, en 1987 et Jacobsen-Lyon *et al.* (1995) ont cloné un gène symbiotique et non symbiotique de l'hémoglobine de cette même plante. La localisation de l'expression des ARNm correspondants au gène de l'hémoglobine symbiotique a été précisée par une étude histologique en hybridation *in situ* sur des coupes longitudinales de nodules de *C. glauca* (Gherbi *et al.*, sous presse). Des travaux récents ont permis également d'isoler un ADNc correspondant à une cystéine protéinase (Goetting-Minesky et Mullin, 1994), ainsi qu'un ADNc correspondant à une protéase sérine de la famille des subtilisines (Ribeiro *et al.*, 1995). Ces deux dernières actinorhizines sont présentes préférentiellement dans les nodules de l'aulne (plante actinorhizienne de la famille des *Betulaceae*).

Par ailleurs, la transformation génétique a beaucoup contribué à comprendre comment sont régulés les gènes symbiotiques chez les Légumineuses. En effet, des Légumineuses transgéniques ont été obtenues

après transformation par des souches désarmées d'*Agrobacterium tumefaciens* ou de souches sauvages d'*Agrobacterium rhizogenes* et ont été utilisées pour l'étude de promoteur de gènes symbiotiques (Hansen *et al.*, 1989 ; Petit *et al.*, 1987). L'analyse des nodules des Légumineuses transformées avec des gènes chimères a permis ainsi l'étude de la régulation des gènes symbiotiques tels que l'hémoglobine (Stougaard *et al.*, 1987), ou la glutamine synthétase (Forde *et al.*, 1989).

Afin de mieux comprendre la contribution de la plante-hôte dans le processus symbiotique *Casuarina-Frankia*, nous avons développé une stratégie intégrée qui comprend des approches complémentaires de physiologie moléculaire. Une banque d'ADNc a été construite et son analyse nous a permis d'identifier et de caractériser certains gènes symbiotiques (Gherbi *et al.*, sous presse). Parallèlement, l'obtention de *Casuarinaceae* transgéniques (Diouf *et al.*, 1995) nous permettra d'étudier la régulation de gènes symbiotiques grâce à l'utilisation de gènes chimères.

II. CONSTRUCTION ET CRIBLAGE D'UNE BANQUE D'ADNC DE NODULES DE *C. GLAUCA*

La banque d'ADNc a été réalisée dans le phage λ gt10 à partir d'ARN messagers extraits de nodules de *C. glauca* âgés d'environ 4 semaines. A ce stade, les nodules sont totalement différenciés, fonctionnels et sont formés de 1 à 4 lobes nodulaires. La banque d'ADNc a été criblée par hybridation différentielle avec des sondes d'ADNc issues de nodules et de racines non nodulées. Ce criblage permet d'analyser la nature des clones d'ADNc en fonction de leur spécificité racinaire et nodulaire. Les différentes étapes de réalisation de la banque et la méthode de criblage différentiel assisté par PCR sont décrites dans la figure 1.

En résumé, un millier de phages recombinants ont été prélevés aléatoirement et les

fragments d'insertion amplifiés par PCR. Environ 60 % de phages possédaient un fragment d'insertion d'au moins 150 pb. Quelques 240 clones dont la taille était supérieure à 400 pb ont été testés par la technique du criblage différentiel assisté par PCR. La révélation des membranes par chimioluminescence nous a permis d'obtenir des clones d'ADNc spécifiques aux nodules ou fortement exprimés dans ceux-ci (Fig. 2). 20 % des clones hybrident fortement avec la sonde nodule seule et près de 60 % présentent une hybridation à la fois avec la sonde nodule et la sonde racine. Le tableau 1 présente l'ensemble des résultats de l'hybridation différentielle.

Certains de ces clones qui hybrident uniquement ou fortement avec la sonde nodule ont été séquencés en partie ou en totalité. L'analyse de leurs séquences, par interrogation de banques de données, indique que pour certains d'entre eux, il s'agit d'ADNc ayant une très forte homologie de séquences avec les gènes codant pour les protéines suivantes : l'hémoglobine symbiotique (Hb), une chalcone synthase (CHS), une métallothionéine (MT), une α -tubuline, une protéine transporteuse de groupement acyl (ACP) et une sous-unité d'une protéase multicatalytique ainsi que d'autres protéines (Tableau 2). Par contre, certains clones séquencés ne présentent aucune homologie avec des séquences d'ADN enregistrées dans les banques de données (Tableau 2).

L'analyse globale des clones isolés et séquencés a montré que nous avons une banque d'ADNc représentative. En effet, le nombre important de clones *hb* obtenus au hasard est un élément en faveur de la qualité de la banque utilisée, puisque l'hémoglobine est une protéine très abondante dans les nodules (Fleming *et al.*, 1987) ; il est donc normal que le nombre de transcrits *hb* clonés soit important. Toutefois, un fort pourcentage de clones analysés par PCR ne semblent pas posséder de fragments d'insertion (environ 40 %). Cette faible effica-

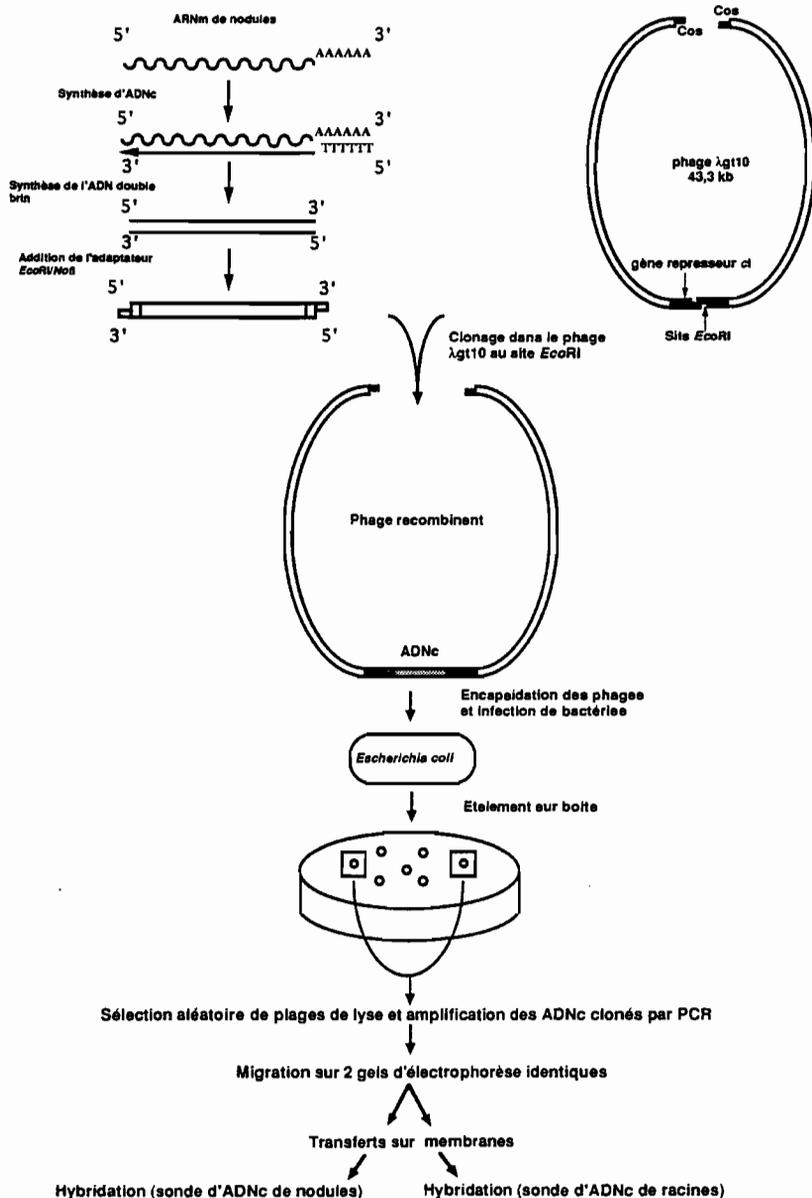


Fig. 1.- Construction et criblage différentiel d'une banque d'ADNc de nodules de *Casuarina glauca*
 Fig. 1.- Construction and differential screening of *Casuarina glauca* nodule cDNA library

Fig. 1.- Construction et criblage différentiel d'une banque d'ADNc de nodules de *Casuarina glauca*
 Fig. 1.- Construction and differential screening of *Casuarina glauca* nodule cDNA library

ité d'insertion suggère l'existence de difficultés au niveau du clonage lors de la construction de la banque. Cela peut être lié à la présence dans la solution de ligation d'inhibiteurs de la ligase. En effet, les végétaux ligneux sont riches en polyphénols, en tannins et en oxydases variées pouvant interférer avec les différentes réactions enzymatiques. En outre, comme le montre le tableau 1, certains clones n'ont hybridé avec aucune des deux sondes, il s'agirait en fait d'ADNc correspondant à des ARNm peu représentés dans les cellules.

Plusieurs clones s'avèrent être de l'hémoglobine, ce qui montre bien que c'est la protéine la plus importante de la symbiose fixatrice d'azote. Chez les Légumineuses

notamment, son rôle est bien connu; il s'agit de permettre le transport et la diffusion de l'oxygène jusqu'au microorganisme symbiote dans un environnement où une faible pression d'oxygène est maintenue afin de préserver l'activité de la nitrogénase (pour revue voir Appleby, 1984 ; Appleby *et al.*, 1988). Chez *Casuarina*, la protéine a été isolée et étudiée (Fleming *et al.*, 1987 ; Kortt *et al.*, 1988) ; elle présente les mêmes propriétés biochimiques que la leghémoglobine de légumineuses comme le poids moléculaire ou l'affinité à l'oxygène; elle remplirait dans ce cas, une fonction similaire (Fleming *et al.*, 1987). Des alignements entre la séquence en acides aminés déduite à partir d'un clone hémoglobine (Cg-1F) et d'autres hémoglobines végétales connues ont révélé 42,5 % d'homologie avec la séquence de la leghémoglobine de soja (*Lba*) et 50 % d'homologie avec l'hémoglobine de *Parasponia* (non Légumineuse symbiotique) (Fig. 3).

Le clone Cg-a51 correspond à la chalcone synthase (CHS) qui est une enzyme dont le rôle chez les plantes est multiple (pour revue voir Martin, 1993). En effet, la chalcone synthase joue un rôle majeur dans la biosynthèse des flavonoïdes (composés phénoliques). Les flavonoïdes interviennent dans les mécanismes de défense de la plante, ce sont aussi des composés qui peuvent activer la division cellulaire (par inhibition du transport des auxines). Dans la symbiose *Rhizobium*-Légumineuses, des études ont montré que lors des premiers stades d'infection entre *Rhizobium* et la plante-hôte, des composés dérivés des flavonoïdes interagissent avec la protéine NodD pour induire l'expression des autres gènes *nod* et permettre ainsi la nodulation (Firmin *et al.*, 1986 ; Peters *et al.*, 1986). D'autre part, il a été montré, chez beaucoup de plantes, que la CHS appartient à une famille multigénique dont la régulation et l'induction sont différentes en fonction des tissus de la plante (Estabrook et Sengupta-Goaplan, 1991 ; Hirsch *et al.*, 1989 ; Recourt *et al.*, 1989 ;

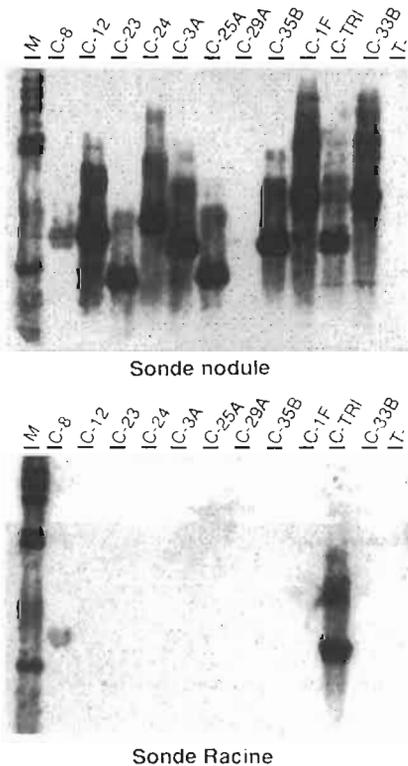


Fig. 2.- Analyse par Southern blot de clones d'ADNc amplifiés par PCR

Fig. 2.- Southern blot analysis of PCR amplified cDNA clones

Tableau 1.- Analyse de clones d'ADNc par criblage différentiel avec des sondes d'ADNc de nodules et de racines
 Table 1.- Analysis of cDNAs clones by differential screening with nodule and root cDNA probes

Nombre de clones analysés	Nombre de clones hybridant avec la sonde racines	Nombre de clones hybridant avec la sonde nodules	Nombre de clones nodule spécifique	Nombre de clones n'hybridant pas avec les 2 sondes
240	89	118	49	102

Tableau 2.- Analyse de séquences de clones d'ADNc
 Table 2.- Sequence analysis of cDNA clones

Clones	Homologie	
	Nature du gène	Source d'homologie
Hybridation avec sonde d'ADNc de nodules seule		
Cg-1F; Cg-24; Cg-12; Cg-55H; Cg-3A; Cg-23; Cg-25A; Cg-35b	Hémoglobine	Soja. <i>Parasponia</i>
Hybridation avec sonde d'ADNc de racines et de nodules		
Cg-a51	Chalcone synthase	Haricot, Petunia, Vigne
Cg-TR1	Métallothionéine	<i>Mimulus</i> , Ricin
Cg-8	Acyl Carrier Protein (ACP)	Epinard, orge.
Cg-55AB	Sous-unité d'une protéase multicatalytique (MCP)	Rat
Cg-M72C	α -Tubuline	Maïs, <i>Arabidopsis</i>
Cg-L96	Protéine ribosomale	<i>Arabidopsis</i>
Cg-b78	Non identifié	
Cg-2A	Non identifié	
Cg- α 1	Non identifié	
Cg-32A	Non identifié	
Cg-82A	Non identifié	
Cg-84A	Non identifié	
Cg-P38	Non identifié	
Cg-P18	Non identifié	
Cg-P42	Non identifié	

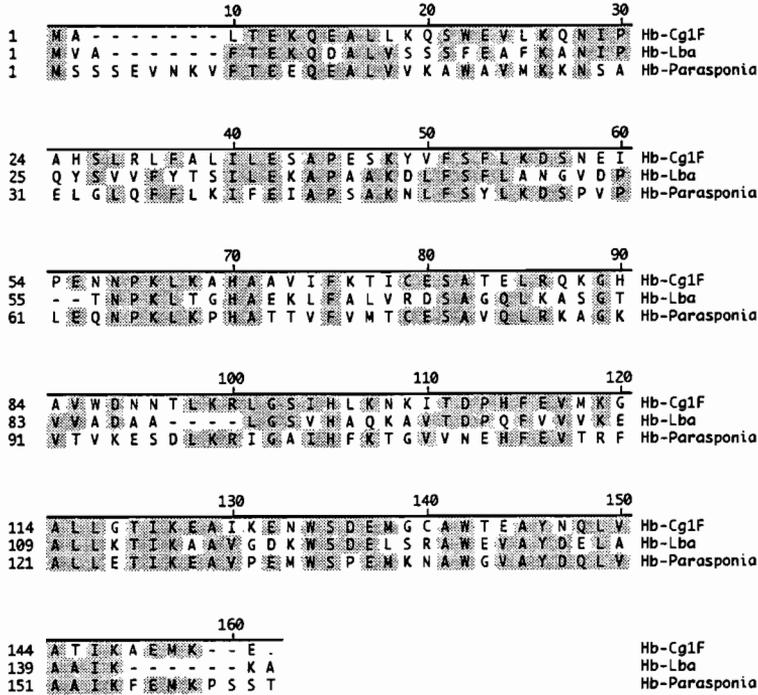


Fig. 3.- Alignement de la séquence en acides aminés du clone HbCg-1F avec celles de la légghémoglobine de soja (Lba) et de l'hémoglobine de *Parasponia*.

Fig. 3.- Amino acid sequence alignment of HbCg-1F clone with soybean leghemoglobin (hbLba) and *Parasponia* hemoglobin.

Yang *et al.*, 1992 ; McKhann et Hirsch, 1994). Chez *Casuarina glauca* l'existence de tels d'isomères de la CHS dont certains limités aux nodules n'est pas à exclure.

L'analyse de la séquence du clone Cg-TRI a montré qu'il s'agissait d'une métallothionéine qui est une petite protéine riche en cystéine dont l'arrangement lui permet de complexer des métaux lourds. Chez les animaux, les métallothionéines sont des chélateurs de métaux et jouent un rôle important dans le métabolisme et la détoxification des certains métaux lourds comme le cuivre, le zinc ou le cadmium (Kägi et Schäffer, 1988 ; Robinson *et al.*, 1993). Elles ont été peu étudiées chez les végétaux même si de telles protéines ont été identifiées, comme chez le pois (Evans *et al.*,

1992), *Mimulus* (de Miranda *et al.*, 1990), le soja (Kawashima *et al.*, 1991) ou l'orge (Okumura *et al.*, 1991). Les *Casuarinaceae* ont la propriété d'être naturellement tolérantes à des quantités élevées de métaux lourds (reboisement de sites miniers de nickel en Nouvelle Calédonie). Par ailleurs, le fonctionnement de la symbiose fixatrice d'azote nécessite l'utilisation de métaux tels que le fer, le molybdène ou le manganèse qui sont présents dans les sites actifs des enzymes et dans la structure des cofacteurs impliqués dans la symbiose (Yates, 1992). Dans la symbiose *Rhizobium-Légumineuses*, les protéines correspondant aux gènes de nodulines précoces ENOD3 et ENOD14 possèdent un domaine cystéine qui suggère un rôle de liaison à métaux (Scheres *et al.*, 1990b).

D'autres clones analysés correspondent à des protéines comme la protéine transporteuse de groupement acyl (ACP) (clone Cg-8) qui intervient dans le métabolisme des lipides (Hansen et Kauppinen, 1991 ; Cahoon et Ohlroge, 1994 ; Voets *et al.*, 1994) ; l' α -tubuline qui joue un rôle important dans les processus cellulaires de base et dans la morphogenèse chez les plantes (Kopczak *et al.*, 1992) ou l'adénylate cyclase (clone Cg-89A) liée à la synthèse de l'AMP cyclique et est associée à la membrane plasmique (Ohkubo *et al.*, 1992) ou encore la protéinase à activité multicatalytique (clone Cg-55AB) qui a non seulement un rôle protéolytique, mais aussi de régulateur cellulaire et de stimulateur de l'ATP dans le catabolisme protéique (Kremp *et al.*, 1986 ; Orłowski, 1990 ; Sorimachi *et al.*, 1990 ; Schliephacke *et al.*, 1991). Toutes ces protéines peuvent intervenir dans l'organogenèse du nodule pour la formation de nouvelles parois de nature lipidique ou polysaccharidique par exemple.

En revanche, certains clones séquencés n'ont pas donné de correspondance à des protéines ou gènes connus par interrogation des banques de données, il pourrait en fait s'agir de nouvelles protéines non identifiées et dont le rôle est inconnu pour l'instant.

III. TRANSFORMATION GÉNÉTIQUE DES CASUARINACEAE

A. Le système *A. rhizogenes*

Agrobacterium rhizogenes est une bactérie phytopathogène du sol capable d'induire des racines au point d'infection chez plusieurs dicotylédones. Nous avons donc

montré que *Casuarina glauca* est sensible à la souche A4RS (Jouanin *et al.*, 1986) d'*Agrobacterium rhizogenes*. La technique utilisée consiste à enduire une aiguille d'une culture fraîche d'*Agrobacterium rhizogenes* contenant un vecteur binaire dans lequel a été cloné le gène GUS sous le contrôle du promoteur 35S (Odell *et al.*, 1985), et à blesser une plante de *C. glauca* au niveau de l'hypocotyle. Au bout d'une semaine, les plantes blessées développent une tumeur à partir de laquelle émergent des racines. L'élimination de la racine principale et le développement des racines induites par *A. rhizogenes* permet d'obtenir une plante chimère avec une partie aérienne non transformée et une partie racinaire transformée (Pl. I, A).

Afin de déterminer la présence du gène GUS et son niveau d'expression dans les racines, trois approches ont été utilisées. Tout d'abord, grâce à l'amplification en chaîne par polymérase nous avons démontré que ces racines ont intégré dans leur génome les fragments gauche (T_L) et droite (T_R) du plasmide Ri de A4RS de même que le gène GUS. Ensuite, l'analyse histo-chimique de l'activité de la β -glucuronidase nous a permis de localiser l'expression du gène GUS. Enfin, les résultats de l'analyse de l'activité enzymatique par fluorimétrie ont permis une évaluation du niveau d'expression du gène GUS (Diouf *et al.*, 1995). L'analyse de l'expression génique effectuée dans les racines montre que le gène GUS ne s'exprime pas dans la coiffe. Dans la zone méristématique une forte expression du gène GUS a été identifiée. Dans les autres tissus de la racine, cette expres-

Planche I.- Transformation génétique de *Casuarina glauca* et d'*Allocasuarina verticillata*. A : Jeune plante de *C. glauca* inoculée par *Agrobacterium rhizogenes* A4RS. Le site d'inoculation est indiqué par la flèche blanche pleine ; l'autre flèche montre le système racinaire transgénique. B : Nodules induits par *Frankia* sur des racines de *C. glauca* transformées par *A. rhizogenes*. C : Régénération de rameaux transgéniques d'*A. verticillata* sur des cals transformés par *Agrobacterium tumefaciens*.

Plate I.- Genetic transformation of *Casuarina glauca* and *Allocasuarina verticillata*. A : *C. glauca* plantlet inoculated with *Agrobacterium rhizogenes* A4RS. The inoculated site is indicated by the plain white arrow; the second arrow shows the transgenic root system. B : Nodules induced by *Frankia* on *C. glauca* roots transformed by *A. rhizogenes*. C : Regeneration of transgenic *A. verticillata* shoots from calli transformed by *Agrobacterium tumefaciens*.

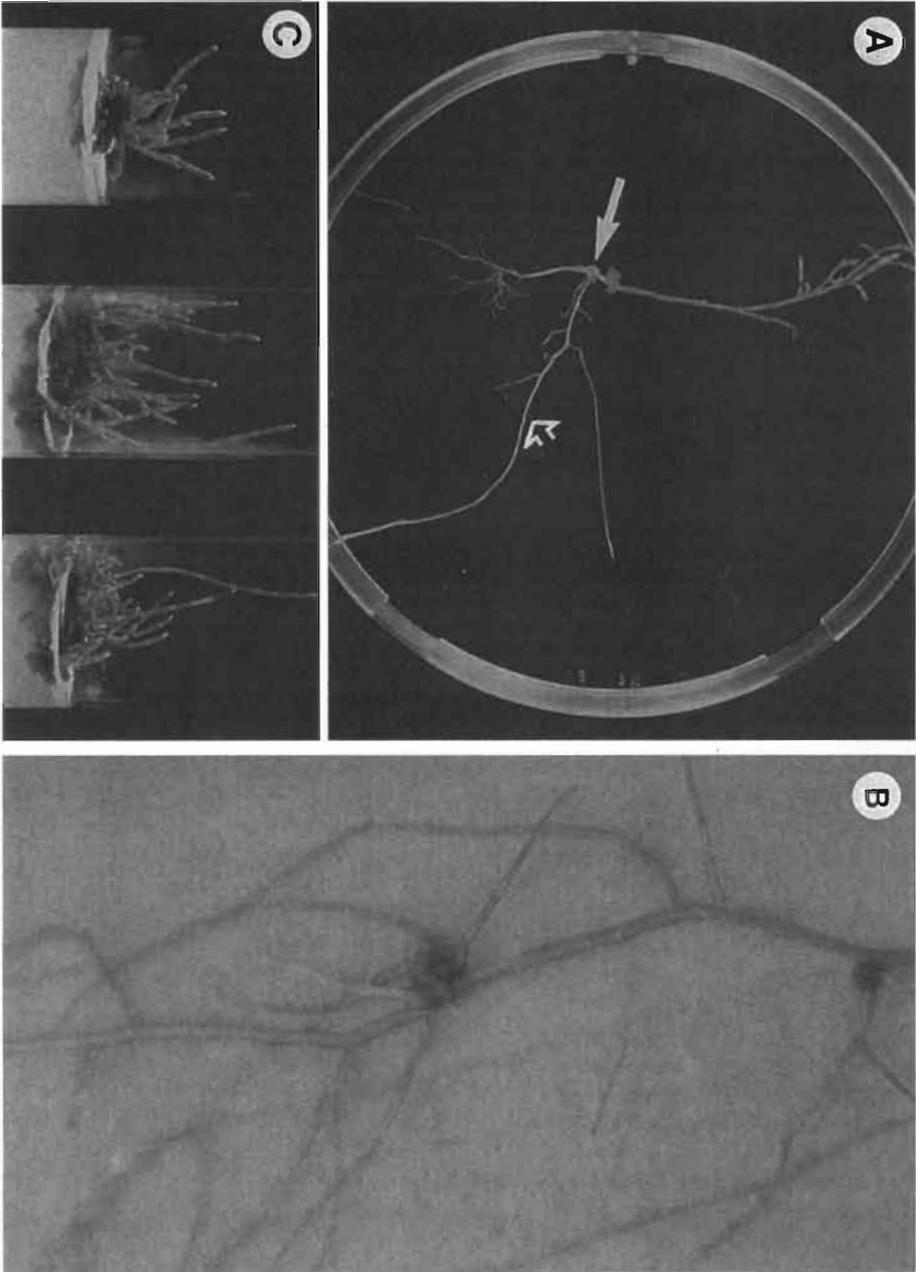


Planche I

sion présente une variabilité assez nette : elle peut être uniquement localisée dans le cylindre central ou s'étendre dans tous les autres tissus. Les résultats obtenus chez *C. glauca* sont comparables à ceux déjà décrits chez le lotier (Forde *et al.*, 1989).

Afin d'analyser l'expression du gène GUS dans les nodules, nous avons procédé à une nodulation des racines transformées. La souche de *Frankia* utilisée est la souche Thr (Girgis *et al.*, 1990). Elle a été cultivée selon la méthode décrite par Schwencke (1991). Un mois après l'inoculation par *Frankia*, 40 % des plantes présentent des nodules multilobés (Pl. I, B). L'analyse histo-chimique réalisée dans les nodules révèle que l'expression du gène GUS est localisée dans le cylindre central, le cortex, à l'exception des cellules infectées par *Frankia*, et, dans le périderme. Il est intéressant de noter que chez le lotier, une Légumineuse transformée avec le gène GUS sous le contrôle du promoteur 35S, il a été observé une expression du gène GUS dans tous les tissus du nodule (Forde *et al.*, 1989). Plusieurs hypothèses ont été émises afin d'expliquer la variabilité d'expression du gène GUS dans les racines et dans les nodules de *C. glauca*. Parmi celles-ci nous pouvons citer d'abord l'état physiologique de la racine car le promoteur 35S s'exprime plus fortement dans les tissus en croissance, ensuite, l'intégration du gène GUS dans une zone plus ou moins accessible à l'ARN polymérase et, enfin, la méthylation possible du gène GUS introduit qui pourrait entraîner son inactivation plus ou moins importante.

Si le système *A. rhizogenes* présente un avantage considérable dans la rapidité d'obtention de nodules transformés (au bout de 4 mois), il présente cependant un inconvénient, car l'expression des constructions géniques ne peut pas être étudiée dans les différents organes de la plante. La mise au point d'un deuxième système permettant d'obtenir une plante entièrement transformée s'est avérée nécessaire.

B. Le système *A. tumefaciens*

Afin de remédier à l'inconvénient du système de transformation via *A. rhizogenes*, nous avons développé une stratégie avec *A. tumefaciens* permettant d'obtenir des plantes transgéniques entièrement transformées.

Des embryons zygotiques matures d'*Allocasuarina verticillata* sont cocultivés avec une culture fraîche d'*A. tumefaciens* désarmée C58C1 (GV2260) porteuse du gène GUS sous le contrôle du promoteur 35S (Odell *et al.*, 1985). Des cals résistants à la kanamycine et exprimant l'activité β -glucuronidase apparaissent sur 20 % des embryons zygotiques matures d'*A. verticillata* ; la différenciation de bourgeons, puis de rameaux est observée sur 70 % de ces cals. La présence du gène *uidA* dans les cals transgéniques a été mise en évidence par une analyse PCR et par Southern blot. De ces cals bourgeonnants ont été détachés des rameaux d'environ 2 cm de long qui ont été ensuite enracinés avec un excellent taux d'enracinement (96 %) (Pl. I, C). Les plantes transformées sont semblables phénotypiquement aux plantes sauvages.

L'analyse de l'activité β -glucuronidase dans les plantes transgéniques montre que le promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (Odell *et al.*, 1985) peut être utilisé pour exprimer des gènes d'intérêt chez cet arbre fixateur d'azote. Les résultats préliminaires obtenus par analyse histo-chimique semblent indiquer que le promoteur n'est pas exprimé de façon totalement constitutive. On note en particulier une forte expression dans la racine à l'exception des racines latérales où elle est localisée dans la coiffe, la zone méristématique et dans le tissu vasculaire. Dans la tige, l'expression du gène GUS a été détectée dans tous les tissus tandis qu'elle est absente à l'extrémité des feuilles (résultats non illustrés). La réalisation d'une analyse histologique fine sur différentes plantes transgéniques d'*A. verticillata* sera particulièrement intéressante car actuellement on

dispose de très peu de données bibliographiques sur la spécificité d'expression du promoteur 35S chez les arbres. Environ 65 % des plantes présentent des nodules après inoculation avec la souche Allo2 de *Frankia* (Girgis et Schwencke, 1993). Notons que l'expression du gène GUS dans les nodules transformés d'*A. verticillata* est localisée dans tous les tissus à l'exception du périoderme. Ce résultat pourrait s'expliquer par une forte subérisation des cellules du périoderme. Ces résultats semblent donc être très similaires avec ceux décrits chez le lotier (Forde *et al.*, 1989).

Ce système présente un avantage non négligeable, il permet en effet de suivre l'expression du gène introduit dans tous les organes de la plante. De ce fait, il peut être utilisé également dans un but appliqué pour l'introduction de gènes d'intérêt agronomique.

IV. CONCLUSION

Notre approche pluridisciplinaire de l'étude du rôle de la plante-hôte dans les symbioses *Casuarinaceae-Frankia* nous a permis d'identifier des gènes potentiellement importants pour le fonctionnement de ces symbioses et de mettre au point des outils d'analyse moléculaire.

Le séquençage des ADNc clonés après criblage différentiel, a permis d'identifier un certain nombre de clones correspondant à des gènes qui codent pour des protéines dont le rôle dans la symbiose fixatrice d'azote est primordial (cas de l'hémoglobine symbiotique), ou des protéines qui sont susceptibles d'intervenir dans le processus de nodulation (cas de la chalcone synthase). D'autres clones sont actuellement en cours de séquençage.

En fonction de l'importance des clones identifiés, et de leur rôle possible dans la symbiose, nous avons choisi de nous intéresser plus particulièrement aux clones d'hémoglobine (Cg-1F), chalcone synthase (a51) et métallothionéine (Cg-TRI) afin

de les étudier plus en détail. Des expériences d'hybridation de ces trois clones avec l'ADN génomique (Southern blot) de *C. glauca* indiquent que les transcrits correspondants sont issus de familles multigéniques. La spécificité et le niveau d'expression des gènes correspondant à ces trois ADNc est en cours de réalisation grâce à des expériences d'hybridation ADN/ARN (Northern) et d'hybridation *in situ*. Les premiers résultats indiquent que l'hémoglobine n'est exprimée que dans les nodules et plus spécifiquement dans les cellules infectées matures (Gherbi *et al.*, sous presse).

En outre, l'étude des clones dont la séquence ne présente aucune homologie avec des séquences connues va être poursuivie. Pour cela, la séquence complète de ces clones va être déterminée. A partir de cette séquence, les phases ouvertes de lectures possibles seront localisées par traitement informatique. Les séquences des protéines ainsi obtenues seront étudiées pour localiser des domaines connus et en déduire les éventuelles fonctions.

Grâce à la transformation génétique, nous disposons d'un outil indispensable pour étudier la régulation de l'expression des gènes symbiotiques homologues ou hétérologues chez les plantes actinorhiziennes comme les gènes symbiotiques qui interviennent dans le processus d'infection ou dans le fonctionnement des nodules des légumineuses. Cette approche s'avère indispensable pour mieux comprendre les symbioses actinorhiziennes. De même, la transgénie nous permettra d'utiliser des constructions antisens avec les clones isolés et de les introduire dans les *Casuarinaceae* afin d'observer les effets physiologiques de la sous-expression de ces gènes sur l'établissement et le fonctionnement de la symbiose. En plus de cette approche fondamentale, il est envisageable d'utiliser la transformation génétique pour introduire des gènes d'intérêt agronomique comme des gènes de résistance aux insectes.

BIBLIOGRAPHIE

- Appleby C. A., D. Bogusz, E. Dennis & W. J. Peacock, 1988.- A role of haemoglobin in all plant roots. *Plant Cell Environ.*, **11**, 359-367.
- Appleby C.A., 1984.- Leghemoglobin and *Rhizobium* respiration. *Rev. Plant Physiol.*, **35**, 443-478.
- Berry A.M., 1994.- Recent development in the actinorhizal symbiosis. *Plant Soil*, **161**, 135-145.
- Cahoon E.B. & J.B. Ohlrogge, 1994.- Metabolic evidence for involvement of Δ^1 -Palmitoyl-acyl carrier protein desaturase in petroselinic acid synthesis in coriander endosperm and transgenic tobacco cells. *Plant Physiol.*, **104**, 827-837.
- De Billy F., D.G. Barker, P. Gallusci & G. Truchet, 1991.- Leghemoglobin gene transcription is triggered in a single cell layer in the indeterminate nitrogen-fixing root nodule of alfalfa. *Plant J.*, **1**, 27-35.
- De Miranda J.R., M.A. Thomas, D.A. Thurman & A.B. Tommsetti, 1990.- Metallothionein genes from the flowering plant *Mimulus guttatus*. *Febs Lett.*, **260**, 277-280.
- Diouf D., H. Gherbi, C. Franche, E. Duhoux & D. Bogusz, 1995.- Hairy root nodulation of *Casuarina glauca*: a system for the study of symbiotic gene expression in an actinorhizal tree. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **8**, 532-537.
- Estabrook E.M. & C. Sengupta-Goaplan, 1991.- Differential expression of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase during soybean nodule development. *Plant Cell*, **3**, 299-308.
- Evans K.M., J.A. Gatehouse, W.P. Lindsay, J. Shi, A.M. Tommey & N.J. Robinson, 1992.- Expression of a pea metallothionein-like gene *PsMT_A* in *Escherichia coli* and *Arabidopsis thaliana* and analysis of trace metal ion accumulation: Implications for *PsMT_A* function. *Plant Mol. Biol.*, **20**, 1019-1028.
- Firmin J.L., K.E. Wilson, L. Rossen & A.W.B. Johnston, 1986.- Flavonoid activation of nodulation gene in *Rhizobium* reversed by other compounds present in plant. *Nature*, **324**, 90-92.
- Fleming A. I., J.B. Wittenberg, B.A. Wittenberg, W.F. Dudman & C.A. Appleby, 1987.- The purification, characterization and ligand-binding kinetics of hemoglobins from root nodules of the non-leguminous *Casuarina glauca*-*Frankia* symbiosis. *Biochim. Biophys. Acta*, **911**, 209-220.
- Forde B.G., H.M. Day, J.F. Turton, S. Wenjun, J.V. Cullimore & J.E. Oliver, 1989.- Two glutamine synthetase genes from *Phaseolus vulgaris* L. display contrasting developmental and spatial pattern of expression in transgenic *Lotus corniculatus* plants. *Plant Cell*, **1**, 391-401.
- Franssen H.J., I. Vijn, W.C. Yang & T. Bisseling, 1992.- Developmental aspects of the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Plant Mol. Biol.*, **19**, 89-107.
- Gherbi, H., E. Duhoux, C. Franche, K. Pawlowski, A. Berry & D. Bogusz.- Cloning of a full-length symbiotic hemoglobin cDNA and *in situ* localization of the corresponding mRNA in *Casuarina glauca* root nodule. *Physiol. Plant.* (sous presse).
- Girgis M.G.Z. & J. Schwencke, 1993.- Differentiation of *Frankia* by their electrophoretic patterns of intracellular estrases and aminopeptidases. *J. Gen. Microbiol.*, **139**, 2225-2232.
- Girgis M.G.Z., Y.Z. Ishac, M. El-Haddad, E.A. Saleh, H.G. Diem & Y.R. Dommergues, 1990.- First report on isolation and culture of effective *Casuarina*-compatible strains of *Frankia* form Egypt. In: *Advances in Casuarina* research and utilization. El-Lakany M.H. et al. (Eds), Desert Development Center, Cairo, Egypt. 156-164.
- Goetting-Minesky M.P. & B.C. Mullin, 1994.- Differential expression in an actinorhizal symbiosis: Evidence for a nodule-specific cysteine proteinase. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **91**, 9891-9895.
- Hansen J., J.E. Jorgensen, J. Stougaard & K.A. Marcker, 1989.- Hairy roots - a short cut to transgenic root nodules. *Plant Cell Rep.*, **8**, 12-15
- Hansen L. & S. Kauppinen, 1991.- Barley acyl carrier protein II: nucleotide sequence of cDNA clones and chromosomal location of the *Ac12* gene. *Plant Physiol.*, **97**, 472-474.
- Hirsch A.M., T.V. Bhuvaneshwaru, J.G. Torrey & T. Bisseling, 1989.- Early nodulin genes and induced in alfalfa root growth elicited by auxin transport inhibitors. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA.*, **86**, 1244-1248.
- Jacobsen-Lyon K., E.O. Jensen, J. Jorgensen, K.A. Marcker, W.J. Peacock, & E.S. Dennis, 1995.- Symbiotic and nonsymbiotic hemoglobin genes of *Casuarina glauca*. *Plant Cell*, **7**, 213-223.
- Jouanin L., J. Tourneur, C. Tourneur & F. Casse-Delbart, 1986.- Restriction maps and homologies of the three plasmids of *Agrobacterium rhizogenes* strains A4. *Plasmid*, **16**, 124-134.
- Kägi J.H.R. & A. Schäffer, 1988.- Biochemistry of metallothioneins. *Biochemistry*, **27**, 8509-8515.
- Kawashima I., Y. Inokuchu, M. Chino, M. Kimura & N. Shimizu, 1991.- Isolation of a gene for a metallothionein-like protein from soybean. *Plant Cell Physiol.*, **32**, 913-916.
- Kopczak S.D., N.A. Haas, P.J. Hussey, C.D., Siflow & D.P. Snustad, 1992.- The small genome of *Arabidopsis* contains at least six expressed α -tubulin genes. *Plant Cell*, **4**, 539-547.
- Kort A.A., A.S. Inglis, A.I. Flemming & C.A. Appleby, 1988.- Amino acid sequence of hemoglobin I from root nodules of the non-leguminous *Casuarina glauca*-*Frankia* symbiosis. *Febs Lett.*, **231**, 341-346.
- Kremp A., M. Schliephacke, U Kull & H.P. Schmid, 1986.- Prosomes exist in plant cells too. *Exp. Cell. Res.*, **166**, 553-557.
- Legocki R.P. & D.P.S. Verma, 1980.- Identification of « nodule-specific » host protein (nodulins) involved the development of *Rhizobium*-legume symbiosis. *Cell*, **20**, 153-163.
- Martin C.R., 1993.- Structure, function, and regulation of the chalcone synthase. *Int. Rev. Cytol.*, **147**, 233-284.

- McKahn H.I. & A.M. Hirsch, 1994.- Isolation of chalcone synthase and chalcone isomerase cDNAs from alfalfa (*Medicago sativa* L.) : Highest transcript level occur in young roots and root tips. *Plant Mol. Biol.*, **24**, 767-777.
- Odell T.J., F. Nagy & H.N. Chua, 1985.- Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature*, **313**, 810-812.
- Ohkubo S., C. Kimura, K. Ogi, K. Okazaki, M. Hosoya, H. Onda, A. Miyata, A. Arimura & M. Fujino, 1992.- Primary structure and characterization of the precursor to human pituitary adenylate cyclase activating polypeptide. *DNA Cell Biol.*, **11**, 21-30
- Okumura N., N.K. Nishizawa, Y. Umehara & S. Mori, 1991. - An iron deficiency-specific cDNA from barley roots having two homologous cysteine-rich MT domains. *Plant Mol. Biol.*, **17**, 531-533.
- Orlowski M., 1990.- The multicatalytic proteinase complex, a major extralysosomal proteolytic system. *Biochemistry*, **29**, 10289-10297.
- Peters N.K., J.W. Frost & S.R. Lonf, 1986.- A plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Science*, **233**, 977-980.
- Petit A., J. Stougaard, A. Kühle, K.A. Marcker & J. Tempé, 1987.- Transformation and regeneration of the legume *Lotus corniculatus* : A system for molecular studies of symbiotic nitrogen fixation. *Mol. Gen. Genet.*, **207**, 245-250
- Recourt K., A.A.N. Van Brussel, A.J.M. Driessen & B.J.J. Lugtenberg, 1989.- Accumulation of a *nod* gene inducer, the flavonoid naringenin, in the cytoplasmic membrane of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* is caused by the pH-dependent hydrophobicity of naringenin. *J. Bacteriol.*, **171**, 4370-4377.
- Ribeiro A., A.D.L. Akkermans, A. Van Kammen, T. Bisseling & K. Pawlowski, 1995.- A nodule-specific gene encoding a subtilisin-like protease is expressed in early stage of actinorhizal nodule development. *Plant Cell*, **7**, 785-794.
- Robertson J.G., B. Wells, T. Bisseling, K.J.F. Farnden & A.W.B. Johnson, 1984.- Immuno-gold localization of leghaemoglobin in cytoplasm in nitrogen-fixing root nodules of pea. *Nature*, **311**, 254-256
- Robinson N.J., A.M. Tommey, C. Kuske & P.J. Jackson, 1993.- Plant metallothioneins. *Biochem. J.*, **295**, 1-10
- Scheres B., C. Van de Wiel, A. Zalenski, B. Horvath, H. Spaink, H. Van Eck, F. Zwartkruls, A.M. Wolters, T. Gloude-mans, A Van Kammen & T. Bisseling, 1990a.- The ENOD12 gene product is involved in the infection process during the Pea-*Rhizobium* interaction. *Cell*, **60**, 281-294.
- Scheres B., F. Van Engelen, E. Van Der Knaap, C. Van De Wiel, A. Van Kammen & T. Bisseling, 1990b.- Sequential induction of nodulin gene expression in the developing pea nodule. *Plant Cell*, **2**, 687-700.
- Schliephacke M., A. Kremp, H.P. Schmid, K. Köhler & U. Kull, 1991.- Prosomes (proteasomes) of higher plants. *Eur. J. Cell Biol.*, **55**, 114-121.
- Schwencke J., 1991.- Rapid exponential growth and increased biomass yield for some *Frankia* strains in buffered and stirred mineral medium (BAP) with phosphatidyl choline. *Plant & Soil*, **137**, 37-41.
- Sorimachi H., T. Tsukahara, H. Kawasaki, S. Ishiura, Y. Emori, H. Sugita & K. Suzuki, 1990.- Molecular cloning of cDNAd for two subunits of rat multicatalytic proteinase. *Eur. J. Biochem.*, **193**, 775-781.
- Stougaard J., N.N. Sandal, A. Gron, A. Kühle & K.A. Marcker, 1987.- Regulatory elements required for promoter activity and organ specificity. *EMBO J.*, **6**, 3565-3569.
- Tremblay F.M., P. Périnet & M. Lalonde, 1986.- Tissue culture of *Alnus* spp. with regard to symbioses. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Y.P.S. Bajaj (Ed.), Springer-Verlag, Berlin. 87-100.
- Van Kammen A., 1984.- Suggested nomenclature for plant genes involved in nodulation and symbiosis. *Plant Mol. Biol. Rep.*, **2**, 43-45.
- Vancanney T G., R. Schmidt, A. O'Connor-Sanchez, L. Willmitzer & M. Rocha-Sosa, 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.
- Voets M., B. Klein, J. Schell & R. Töpfer, 1994.- Three different cDNAs encoding acyl carrier proteins from *Cuphea lanceolata*. *Plant Physiol.*, **106**, 785-786.
- Yang W.C., H.C.J. Canter-Cramers, P. Hogendijk, P. Katinakis, C.A., Wijffelmàn, H. Franssen, A. Van Kammen & T. Bisseling, 1992.- *In situ* localization of chalcone synthase mRNA in pea root nodule development. *Plant J.*, **2**, 143-151.
- Yates M.G., 1992.- The enzymology of molybdenum-dependent nitrogen fixation. In: *Biological nitrogen fixation*. Stacey G. et al. (Eds), Chapman & Hall, New York, 685-735.

Bogusz Didier, Franche Claudine, Gherbi H., Diouf D.,
Nassar A., Gobé C., Auguy Florence, Ahée Jeanne,
Duhoux Emile (1996)

La symbiose *Casuarinaceae-Frankia* : approche
moléculaire du rôle de la plante hôte

In : Duhoux Emile (ed.), Diem H.G. (ed.). Les plantes
actinorhiziennes *Acta Botanica Gallica*, 143 (7), p. 621-
633

Les Plantes Actinorhiziennes : Journée d'Etude

ISSN 1253-8078.