

Mise en évidence de nodulines chez *Sesbania rostrata*

P. de Lajudie¹ et T. Huguet²

Introduction

Le développement d'un nodule et la fixation symbiotique de l'azote chez une légumineuse sont le résultat d'une série d'événements et d'échanges continus d'informations entre la plante et l'endophyte fixateur d'azote. Un certain nombre de gènes bactériens et végétaux, impliqués dans la reconnaissance et la différenciation des deux partenaires pendant la symbiose, ont été identifiés (pour des revues, voir référence 2 et 5). Ainsi, par des expériences de génétique classique sur plusieurs systèmes symbiotiques, il a été montré que des gènes de la plante interviennent dans le contrôle de certaines propriétés comme le délai d'apparition des nodules, leur abondance et leur taille, la multiplication des bactéries, leur libération hors des cordons d'infection, la maturation et la morphologie des bactéroïdes, l'efficacité de la fixation d'azote.

Récemment, des techniques d'immunologie et de biologie moléculaire ont permis de mettre en évidence des nodulines qui sont des protéines codées par la plante, spécifiques des nodules et qui ne sont pas retrouvées dans les racines non infectées ou les autres parties de la plante-hôte (21). Des nodulines ont été décrites chez plusieurs légumineuses à nodules racinaires comme *Glycine max* (16), *Pisum sativum* (4), *Medicago sativa* (15), et *Phaseolus vulgaris* (7).

Les fonctions de ces nodulines sont encore mal connues mais elles doivent intervenir à toutes les étapes du développement et du fonctionnement du nodule, lors de la reconnaissance entre la plante et la bactérie, au cours du processus d'infection, pour le

transport des substrats vers les bactéroïdes, ainsi qu'au cours de toutes les modifications morphologiques, cytologiques et physiologiques qui interviennent dans les cellules infectées.

Quelques nodulines particulières ont été identifiées comme la leghémoglobine, cette protéine affine d'oxygène qui facilite sa diffusion vers les bactéroïdes à une tension partielle compatible avec la fixation d'azote. D'autres nodulines comme une uricase (3) ou une glutamine synthétase (7), impliquées dans l'assimilation et le transport de l'azote fixé, ou plus récemment une sucrose synthétase (20) spécifique du nodule ont également été identifiées.

Dans le cas de *Sesbania rostrata*, si la bactérie a déjà fait l'objet de nombreuses études génétiques (voir ce volume), peu d'informations sont disponibles sur la plante elle-même.

C'est ainsi que nous nous sommes intéressés à la recherche des gènes de la plante activés au cours de la symbiose dans le cas de *Sesbania rostrata*, avec les buts suivants:

- ▲ faire l'inventaire des nodulines et des gènes végétaux impliqués dans la symbiose,
- ▲ rechercher si ces gènes sont exprimés de façon identique dans les nodules de tige et de racine,
- ▲ étudier la cinétique de l'expression de ces gènes au cours du développement du nodule,
- ▲ étant donné que *Sesbania rostrata* vit en symbiose avec deux genres bacté-

riens différents *Azorhizobium* et *Rhizobium* (9), comparer l'expression des gènes de la plante dans les deux cas,

- ▲ identifier les leghémoglobines grâce à un antisérum anti-leghémoglobine de *Sesbania rostrata*,
- ▲ rechercher si l'expression de certains gènes de la plante est en relation avec la fixation d'azote, en étudiant des nodules inefficients,
- ▲ les nodules de tige étant chlorophylliens, nous avons voulu voir l'incidence de la photosynthèse au niveau des nodules de tige sur l'expression des gènes végétaux en étudiant l'expression des gènes de la plante dans des nodules de tige induits par la souche sauvage ORS571 protégés ou non de la lumière. Les nodules de tige développés à l'obscurité sont de forme normale, blancs au lieu de verts à l'extérieur, roses à l'intérieur. De plus, sur certains, une petite racine émerge du nodule (14). Aucune différence dans l'activité réductrice d'acétylène n'est détectée par comparaison avec les nodules éclairés du même âge prélevés en parallèle sur les mêmes plantes.

Résultats

Analyse des protéines cytoplasmiques solubles totales

Nous avons purifié les protéines cytoplasmiques solubles totales (PCST) des racines et des tiges non infectées ainsi que des nodules de tige et de racine effectifs induits par la souche sauvage d'*A. caulidans* ORS571 et récoltés 30 jours après l'inoculation. Après séparation par PAGE-

(1) Laboratoire de Biologie des sols, ORSTOM, BP 1386, Dakar, Sénégal.

(2) Laboratoire de Biologie Moléculaire des Relations Plantes-Microorganismes, INRA-CNRS, Auzeville, BP 27, 31326, Castanet-Tolosan, France

SDS, et coloration au bleu de coomassie, environ 50 bandes correspondant à des polypeptides de masses moléculaires comprises entre 15 et 200 kDa sont révélées dans chacun des tissus (figure 1A). La plupart d'entre elles sont présentes dans tous les tissus. Cependant, certaines différences qualitatives et quantitatives apparaissent à la comparaison des différents profils.

Ainsi, nous avons pu observer une dizaine de bandes moins intenses et une dizaine d'autres plus intenses dans les nodules par rapport aux tissus non infectés. Au moins 4 bandes apparaissent spécifiques des nodules. Les profils des nodules de tige et des nodules de racine sont très voisins et seules quelques différences ont pu être décelées comme par exemple une bande de 26 kDa plus intense dans le cas des nodules de tige. Nous avons vérifié que ces différences ne sont pas dues aux protéines de bactéroïdes car les profils des protéines extraites de bactéroïdes isolés soit de nodules de tige soit de nodules de racine sont identiques (figure 1C).

Une bande majoritaire de masse moléculaire apparente inférieure à 18 kDa est spécifique des nodules de tige et de racine. Son abondance et sa taille suggèrent qu'il s'agit de la leghémoglobine, ce que nous avons vérifié par la suite par des expériences de "Western blotting" en utilisant un antisérum préparé contre les leghémoglobines purifiées de nodules de tige de *Sesbania rostrata* (fourni par D. Bogusz; figure 1B).

Analyse des produits de traduction *in vitro*

Ayant observé des différences dans les profils électrophorétiques des PCST des différents tissus, nous avons suivi une autre approche qui consiste à analyser l'expression des gènes végétaux au niveau transcriptionnel.

A partir des différents tissus, nous avons extrait les ARN poly A+ pour les traduire *in vitro* dans un lysat de réticulocytes de lapin en présence de Méthionine marquée au ³⁵Souffre, et nous avons ensuite analysé les produits de traduction par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en une

(PAGE-SDS) ou deux dimensions (2D-PAGE) (18), suivie d'une autoradio-fluorographie.

La figure 2 présente les profils électrophorétiques en PAGE-SDS des produits de traduction obtenus à partir des ARN-poly A+ extraits des divers tissus: 50 à 60 bandes de masses moléculaires comprises entre 10 et plus de 100 kDa sont distinguables sur chaque profil. En 2D-PAGE, environ 200 à 300 polypeptides de masses moléculaires comprises entre 10 et plus de 100 kDa sont visibles sur chacun des profils obtenus (14). Dans les deux cas, la majorité des polypeptides sont communs à tous les tissus étudiés; cependant, certains apparaissent soit spécifiques d'un type de tissu (nodule ou tissu non infecté) soit plus ou moins abondants dans l'un ou l'autre tissu.

Nodules de tige et de racine induits par *A. caulidans*

En PAGE-SDS, par rapport aux tissus non infectés, les nodules efficients induits par la souche d'*Azorhizobium* ORS571 présentent environ une dizaine de bandes augmentées et une dizaine d'autres qui sont diminuées. En 2D-PAGE, nous avons dénombré au moins 16 polypeptides spécifiques des nodules, 10 qui sont fortement augmentés et une dizaine d'autres qui sont diminués dans les nodules par rapport aux tissus non infectés.

L'étude cinétique de l'expression de ces gènes spécifiques au cours du développement du nodule a montré que ces derniers sont activés de façon séquentielle. Ainsi, la majorité de ceux-ci s'expriment vers le 12ème jour après inoculation. Cependant, certains sont exprimés beaucoup plus tôt, vers les 6/7ème jour, et d'autres plus tard. Plusieurs enfin sont activés de façon transitoire: l'un d'eux est très intense au cours des premiers stades puis décroît au cours du développement; d'autres atteignent leur intensité maximale entre 12 et 16 jour, puis diminuent.

Leghémoglobine

Afin d'identifier les composants de la leghémoglobine, nous avons utilisé un antisérum dirigé contre la leghémoglobine de nodules de tige de *Sesbania rostrata* (préparé par D. Bogusz) pour immunoprécipi-

ter les produits de traduction *in vitro* et les identifier par 2D-PAGE.

Aucun produit de traduction d'ARN-Poly A+ de tiges ou de racines non infectées ne réagit avec l'antisérum; par contre, six polypeptides abondants sont immunoprécipités dans le cas des nodules de tige et de racine. Leur masse moléculaire (inférieure à 17 kDa) est en accord avec celles des leghémoglobines décrites dans d'autres systèmes (1).

Au cours du développement du nodule, dans nos conditions d'expérience, les leghémoglobines apparaissent vers le 12ème jour et leur intensité augmente ensuite au cours de notre période d'observation. De plus, leur intensité relative varie dans la même période: à 12 jours, Lb2, Lb3, Lb6 ont environ la même intensité alors que Lb5 et Lb4 sont majoritaires et que Lb1 est à peine visible; après le 16ème jour, Lb2 et Lb6 deviennent majoritaires, Lb1 reste minoritaire et les autres sont moyennement abondants.

Nodules de racine induits par *Rhizobium* sp.

Les nodules de racine induits soit par *Azorhizobium* (souche ORS571) soit par *Rhizobium* sp. (souche ORS51) présentent des profils identiques mis à part l'intensité de quelques bandes (figure 2). Cependant, en 2D-PAGE (14), deux polypeptides "racine" (rsst21 et rsst26) semblent plus abondants dans les nodules induits par ORS51 et un spot remarquable, correspondant à un polypeptide de masse moléculaire 37,5 kDa, semble spécifique.

Nodules de tige développés à l'obscurité

Le profil des produits de traduction des ARN extraits de nodules de tige développés à l'obscurité est très semblable à celui des nodules chlorophylliens et les polypeptides stimulés le sont dans les mêmes proportions (figure 2, piste 6 et 8). Cependant il est intéressant de remarquer que dans le cas de nodules à l'obscurité, l'intensité de certaines bandes est très augmentée, et ceci de façon semblable aux racines; en particulier deux bandes majeures de masses moléculaires approximatives 21 et 28,5 kDa. Ceci pourrait être en relation avec la présence de radicules sur

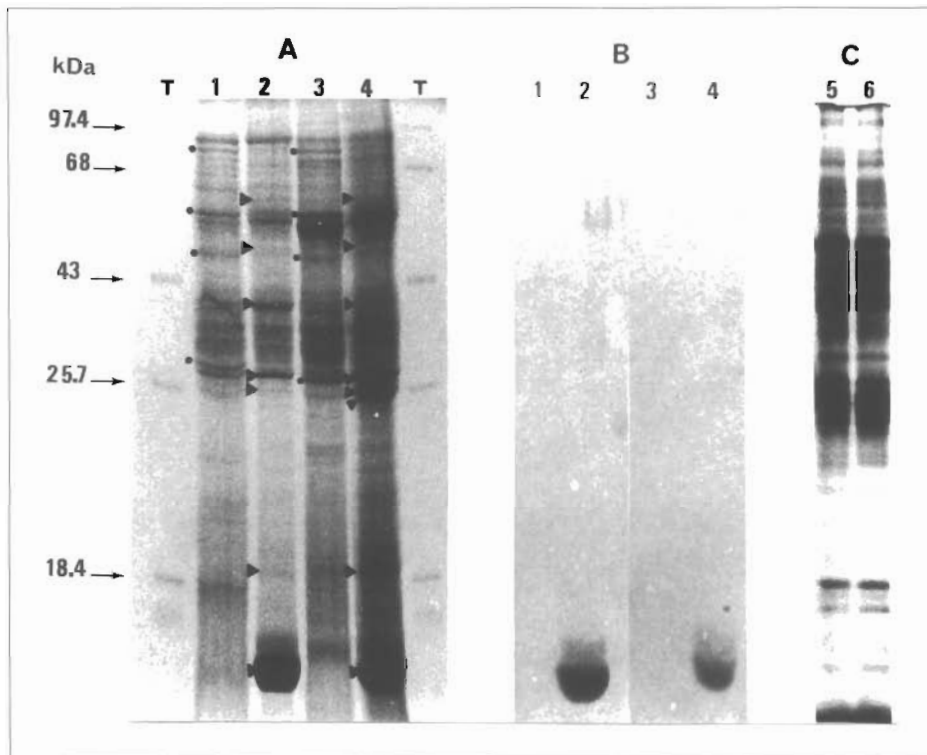


Figure 1 : Analyse en PAGE-SDS (A et C) et "Western blotting" (B) des protéines cytoplasmiques solubles totales de *Sesbania rostrata*, de nodules et de bactéroïdes.

Protéines solubles totales extraites de:

1. Racines non infectées
 2. Nodules de racine Fix+ induits par la souche ORS571
 3. Tiges non infectées
 4. Nodules de tige Fix+ induits par la souche ORS571
 5. Bactéroïdes isolés de nodules de racine
 6. Bactéroïdes isolés de nodules de tige
- T = Témoins de masses moléculaires

- (A) PAGE-SDS/Coloration au bleu de Coomassie
(B) Expérience de "Western blotting" avec l'antisérum anti-leghémoglobines de *Sesbania rostrata*
(C) PAGE-SDS/Coloration au nitrate d'argent

● indique les principales bandes qui sont plus abondantes ou spécifiques des nodules

◀ indique les principales bandes qui sont plus abondantes ou spécifiques des tissus non infectés

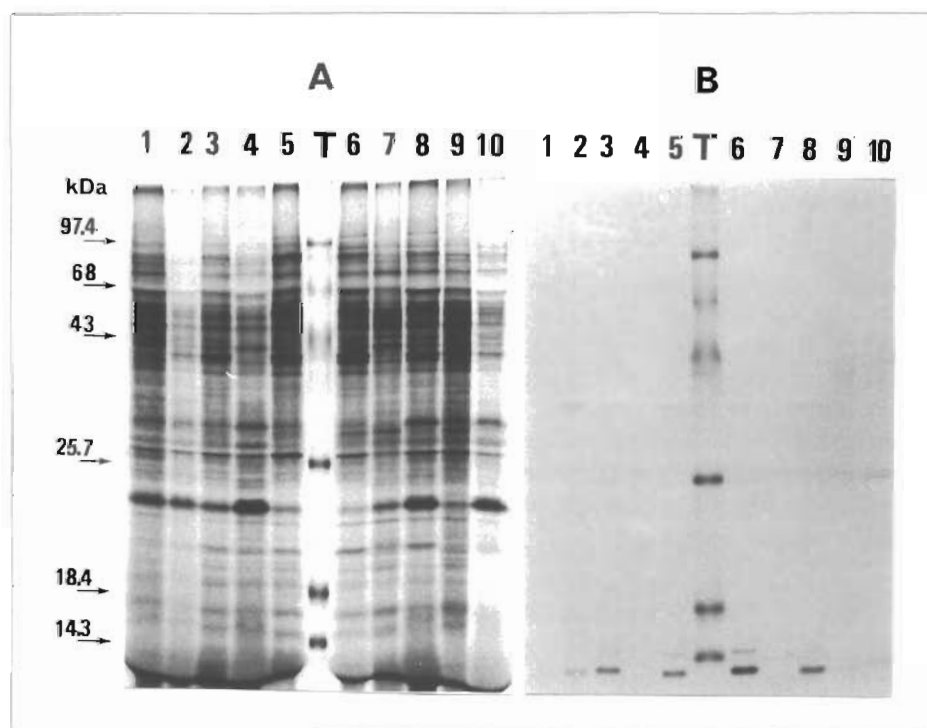


Figure 2 : Analyse en PAGE-SDS et autoradiofluorographie des produits de traduction des ARNm-poly A+ purifiés de :

Protéines solubles totales extraites de:

1. Nodules de racine Fix- induits par la souche ORS51
 2. Nodules de racine Fix- induits par la souche 5740
 3. Nodules de racine Fix+ induits par la souche ORS51
 4. Racines non infectées
 5. Nodules de racine Fix+ induits par la souche ORS571
 6. Nodules de tige Fix+ induits par la souche ORS571 maintenus à la lumière
 7. Tiges non infectées
 8. Nodules de tige Fix+ induits par la souche ORS571 maintenus à l'obscurité
 9. Nodules de tige Fix- induits par la souche 5740
 10. Nodules de tiges Fix- induits par la souche 5795
- T = Témoins de masses moléculaires (BRL)

- (A) Produits de traduction totaux
(B) Produits de traduction après immunoprécipitation avec l'antisérum anti-leghémoglobine de *Sesbania rostrata*.

certaines nodules développés à l'obscurité. L'analyse en 2D-PAGE a confirmé ces similitudes avec les tissus souterrains (14).

Nodules inefficients

Afin de déterminer si certains polypeptides remarquables dans le cas des nodules sont directement liés à l'activité fixatrice d'azote, nous avons analysé plusieurs types de nodules inefficients (Fix-):

- ▲ nodules de tige et nodules de racine induits par la souche Fix-5740, mutant ponctuel de ORS571 affecté dans le gène *nif K* (10).
- ▲ nodules de tige induits par la souche Fix-5795, mutant de régulation qui ne produit aucun des polypeptides *nif* normalement synthétisés par la souche sauvage (ORS571) en conditions de dérépression de la nitrogénase (8).
- ▲ nodules de racine induits par la souche ORS51 en conditions (température, photopériode) non permissives pour la fixation d'azote (19).

Dans tous les cas, la leghémoglobine est présente mais en quantité réduite par rapport aux nodules Fix+ du même âge. L'analyse en 2D-PAGE a confirmé ces observations et a montré que les 6 composants sont présents (14).

Ceci montre que, comme chez d'autres espèces (11, 13, 15) les gènes leghémoglobine sont activés dans des nodules inefficients mais que leur expression reste faible comparée aux nodules Fix+.

En plus des composants leghémoglobine, de nombreux polypeptides "noduline" ou dont l'intensité augmente dans les nodules fixateurs voient, dans les nodules non fixateurs, leur intensité diminuer, alors que simultanément certaines taches de type "tissus non infectés" se trouvent renforcées. Le niveau d'expression des polypeptides spécifiques du nodule est fonction du type de nodule inefficace considéré: ainsi, par rapport au nodule efficace, l'expression des gènes dans un nodule induit par la souche 5795 semble plus perturbée que dans celui induit par la souche 5740 (figure 2 et référence 14).

Conclusions

L'analyse des protéines cytoplasmiques solubles totales a fait apparaître la présence de protéines spécifiques dans les nodules.

L'analyse, par électrophorèse en une et deux dimensions, des produits de traduction des mARN-Poly A+ des nodules racinaires et caulinaires, des tiges et des racines non infectées nous a permis de suivre l'expression des gènes de la plante actifs au cours de la symbiose.

Nous avons pu ainsi mettre en évidence une activité transcriptionnelle différentielle des gènes de la plante au cours de la nodulation racinaire et caulinaire de *Sesbania rostrata*.

A l'état symbiotique, l'activité d'une dizaine de gènes est diminuée, alors qu'une trentaine d'autres gènes sont stimulés, la majorité de façon identique dans les nodules de tige et de racine. Parmi eux, 16 apparaissent comme des gènes de nodulines.

Ces résultats sont comparables à ceux obtenus avec le soja et le pois, chez lesquels 20 à 30 nodulines ont été signalées (4, 16).

En ce qui concerne les nodules de racine, souche "de tige" du genre *Azorhizobium* (ORS571) et souche "de racine" du genre *Rhizobium* (ORS51) semblent induire l'activation des mêmes gènes chez la plante, mis à part un gène activé supplémentaire dans le cas de ORS51. Il serait intéressant de déterminer quel rôle pourrait jouer une telle noduline.

Une étude cinétique a montré que les gènes de la plante sont séquentiellement activés au cours du développement du nodule: certains le sont dans les premiers jours suivant l'infection, la majorité vers le 12^e jour, et d'autres plus tard (vers le 18^e jour). De plus, certains gènes sont activés de façon transitoire à un moment ou l'autre du développement. Une telle séquence d'événements est également connue chez le pois (13) et le soja (12).

Au moins six différents produits de traduction *in vitro* ont été identifiés par immunoprécipitation comme étant des composants de la leghémoglobine. Leur abondance relative varie en accord avec ceux de Bogusz et coll. (6), confirmant chez *Sesbania rostrata* la présence de la plus grande famille de gènes de leghémoglobine caractérisée jusqu'à présent. Dans les deux types de nodules, ces auteurs ont séparé six composants par isoélectrofocalisation et sept par chromatographie échangeuse d'anions. Les composés apparaissent en proportions relatives différentes dans les nodules de tige et de racine. L'analyse de séquence des acides aminés amino-terminaux, ont permis à ces auteurs de conclure qu'au moins six d'entre eux sont des produits de gènes différents.

L'expression des gènes dans les nodules de tige développés à l'obscurité est comparable à celle des nodules de tige développés à la lumière; cependant, un fait remarquable est l'expression dans les nodules de tige à l'obscurité de gènes typiquement stimulés dans le cas des nodules de racine ou des racines non infectées. Ainsi, tout se passe comme si les nodules de tige à l'obscurité acquièrent certaines caractéristiques des organes souterrains.

Dans les nodules inefficients, les gènes de nodulines sont exprimés à un niveau d'expression variable en fonction du type de nodule inefficace, mais généralement réduit par rapport aux nodules fixateurs. Par ailleurs certains gènes dont l'expression est généralement renforcée dans les tissus non infectés, sont également stimulés dans le cas des nodules inefficients. Ainsi ces derniers acquièrent-ils certains caractères de type "tissu non infecté" et, comme il a été montré chez le soja (16), le pois (13) et la luzerne (17), les gènes de nodulines y sont activés indépendamment de la fixation d'azote, mais restent à faible niveau d'expression.

References

1. Appleby, C. 1984. Leghemoglobin and *Rhizobium* respiration. In Briggs W.R. (ed) Ann. Rev. Plant Physiol., 35:443-478.
2. Ausubel, F. 1983. Developmental Genetics of the *Rhizobium*-legume Symbiosis. Dans Lo-

- sick, R., Shapiro, L., (eds), Microbial Development, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., pp 275-298.
3. **Bergmann, H., Preddie, E., Verma, D.P.S.** 1983. Nodulin 35: a subunit of specific uricase (uricase II) induced and localized in the uninfected cells of soybean nodules. *EMBO J.* **2** (12):2333-2339.
 4. **Bisseling, T., Been, C., Klugkist, J., Van Kammen, A., Nadler, K.** 1983. Nodule-specific host proteins in effective and ineffective root nodules of *Pisum sativum*. *EMBO J.* **2**:961-966.
 5. **Bisseling, T., Govers, F., Stiekema, W.** 1984a. Identification of proteins and their mRNAs involved in the establishment of an effective symbiosis. *Dans Oxford Surveys of Plant Molec. Cell Biol.* **1**:53-84.
 6. **Bogusz, D., Kortt, A.A., Appleby, C.A.** 1987. *Sesbania rostrata* root and stem nodule leghemoglobin: purification and relationships amongst the seven major components. *Arch. Biochem.* **254** (1):263-271.
 7. **Cullimore, J.V., Lara, M., Lea, P.J., Milfin, B.J.** 1983. Purification and properties of two forms of glutamine synthetase from the plant fraction of *Phaseolus* root nodules. *Planta* **157**:245-253.
 8. **Denèfle, P., Kush, A., Norel, F., Paquelin, A., Elmerich, C.** 1987. Biochemical and genetic analysis of the nif HDKE of *Rhizobium* ORS571. *Mol. Gen. Genet.* **207**:280-287.
 9. **Dreyfus, B.L., Garcia, J.L., Gillys, M.** 1988. Characterization of *Azorhizobium caudans* gen. nov., sp. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, In press.
 10. **Elmerich, C., Dreyfus, J.L., Reyssset, G., Aubert, J.P.** 1982. Genetic analysis of nitrogen fixation in a tropical fast-growing *Rhizobium*. *EMBO J.* **1**(4):499-503.
 11. **Fuller, F., Verma, D.P.S.** 1984. Appearance and accumulation of nodulin mRNAs and their relationship to the effectiveness of root nodules. *Plant Mol. Biol.* **3**:21-28.
 12. **Gloudemans, T., de Vries, S., Bussink, H.J., Malik, N.S.A., Franssen, H.J., Louwerse, J., Bisseling, T.** 1987. Nodulin gene expression during soybean (*Glycine max*) nodule development. *Plant Molec. Biol.* **8**:395-403.
 13. **Govers, F., Gloudemans, T., Moerman, M., Van Kammen, A., Bisseling, T.** 1985. Expression of plant genes during the development of pea root nodules. *EMBO J.* **4**(4):861-867.
 14. **Lajudie (de) P. et T. Huguet.** 1988. Plant gene expression during effective and ineffective nodule development of the tropical stem-nodulated legume *Sesbania rostrata*. En préparation.
 15. **Lang-Unnasch, N., Ausubel, F.M.** 1985. Nodule-specific polypeptides from effective alfalfa root nodules and from ineffective nodules lacking nitrogenase. *Plant Physiol.* **77**:833-839.
 16. **Legocki, R.P., Verma, D.P.S.** 1980. Identification of "Nodule-specific" host proteins (nodulins) involved in the development of *Rhizobium*-legume symbiosis. *Cell*, **20**:153-163.
 17. **Lullien, V., Barker, D.G., de Lajudie, P., Huguet, T.** 1987. Plant gene expression in effective and ineffective root nodules of alfalfa *Medicago sativa*. *Plant Mol. Biol.* **9**:469-478.
 18. **O'Farrell, P.H.** 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**(10):4007-4021.
 19. **Rinaudo, G., Moudiongui, A.** 1985. Fixation d'azote par *Sesbania rostrata*: son utilisation comme engrais vert. *Bull. Rech. agron. Gembloux*, **20**(3/4):833-849.
 20. **Thummler, F., Verma, D.P.S.** 1987. Nodulin 100 of soybean is the subunit of sucrose synthase regulated by the availability of free heme in nodules. *J. Biol. Chem.* **262**(30):14730-14736.
 21. **Van Kammen, A.** 1984. Suggested nomenclature for plant genes involved in nodulation and symbiosis. *Plant Molecular Biology reporter*, **2**(2):43-45.

Lajudie Philippe de, Huguet T.

Mise en évidence de nodulines chez *Sesbania rostrata*.

In : *Sesbania rostrata*.

Wageningen (NLD), Dakar : CTA, ORSTOM, 1989, p. 77-81.

Sesbania rostrata : Congrès International, 1989, Dakar