

## Les symbioses actinorhiziennes fixatrices d'azote : un exemple d'adaptation aux contraintes abiotiques du sol

Valérie Hocher  
Florence Auguy  
Didier Bogusz  
Patrick Doumas  
Claudine Franche  
Hassen Gherbi  
Laurent Laplaze  
Mariana Obertello  
Sergio Svistoonoff

IRD  
911 avenue Agropolis  
BP64501  
34394 MONTPELLIER  
France  
<valerie.hocher@ird.fr>  
<florence.auguy@ird.fr>  
<didier.bogusz@ird.fr>  
<patrick.doumas@ird.fr>  
<claudine.franche@ird.fr>  
<hassen.gherbi@ird.fr>  
<laurent.laplaze@ird.fr>  
<mari\_obertello@yahoo.com>  
<sergio.svistoonoff@ird.fr>

### Résumé

Après l'eau et la lumière, ce sont les éléments minéraux – phosphore, azote – qui limitent la croissance des végétaux. L'utilisation des engrais chimiques pour compenser ces carences est controversée ; leur prix augmente et leur impact est néfaste sur le réchauffement climatique, l'environnement et la santé des populations. Une alternative consiste à exploiter les facultés développées par certaines espèces végétales pour s'adapter à des environnements carencés. Un exemple est donné par les symbioses fixatrices d'azote. En carence azotée, une association entre la plante et une bactérie diazotrophe permet, au sein de nodules racinaires, l'utilisation de l'azote atmosphérique et, ainsi, l'enrichissement des sols en azote assimilable par les plantes. Si la symbiose légumineuses-*Rhizobium* est la plus étudiée, du fait de son importance agronomique, l'association entre les espèces actinorhiziennes et l'actinomycète du sol *Frankia* est d'un intérêt capital pour l'environnement. Parmi elles, les casuarinacées (arbres tropicaux d'origine australienne) représentent un atout écologique considérable pour les pays du Sud grâce à leur facilité à coloniser des sols pauvres. Nos travaux portent sur l'étude cellulaire et moléculaire de l'association entre l'arbre tropical *Casuarina glauca* et la bactérie *Frankia*. Des gènes symbiotiques ont été caractérisés à différents stades du développement des nodules actinorhiziens : *Cg12*, un gène de subtilase impliqué dans l'étape d'infection ; *CgMT1*, un gène de métallothionéine impliqué dans les réponses aux stress ; *CgSymRK* un gène de la voie de signalisation activée lors de la mise en place de la symbiose. Une approche génomique consistant à comparer à différents stades d'infection par *Frankia* les Étiquettes de séquence exprimées (EST) de racines et de nodules de *Casuarina* conduira à une analyse comparative entre nodules actinorhiziens et nodules de légumineuses, ce qui contribuera, à long terme, à une meilleure compréhension de l'évolution des endosymbioses au sein du règne végétal.

**Mots clés :** *Casuarina* ; *Frankia* ; gène ; nodosité racinaire ; stress abiotique ; symbiose.

**Thèmes :** métabolisme ; productions végétales ; sols.

### Abstract

#### Actinorhizal nitrogen fixing symbiosis: An example of adaptation against soil abiotic stresses

After water and light, nitrogen and phosphorus are the major elements limiting plant production worldwide. The use of fertilizers to offset these deficiencies is now actively disapproved because of their high price, their effect on climate change and their negative environmental impact. One solution could be to exploit plants that have acquired the ability to adapt to deficient environments. One example is given by plants that develop symbiotic associations with nitrogen-fixing bacteria in order to benefit from the large reservoir of atmospheric nitrogen. Two groups of plants are known to form nitrogen-fixing root nodules: legumes that associate with rhizobia and plants belonging to eight angiosperm families, called actinorhizal plants, that associate with the actinomycete *Frankia*. These plants can thrive on nitrogen-poor soil and have long been used to increase soil fertility. Among them, *Casuarina* a tropical tree originating from Australia, presents a very important ecological asset for Southern countries due to its high ability to colonize deficient soils. Our team has focused on the cellular and molecular studies of the plant genes involved at different steps of the interaction between *Frankia* and

*Casuarina glauca*. Several candidate genes from *Casuarina* have been characterized, including *cg12*, a subtilase gene expressed during early infection events, *CgMT1* a metallothionein gene involved in stress responses and *CgSymRK*, a gene from the signaling pathway involved at the beginning of the symbiosis. More recently, a genomic approach has been initiated in order to sequence the ESTs from roots and nodules of *Casuarina*. Comparison between our data and legumes EST databases should reveal molecular mechanisms that are common and unique to the two endophytic root nodule symbioses and bring new information to further our understanding of the evolution of plant endosymbiosis across the plant kingdom.

**Key words:** abiotic stress; *Casuarina*; *Frankia*; genes; root nodules; symbiosis.

**Subjects:** metabolism; soil; vegetal productions.

Le monde est aujourd'hui confronté à un défi : augmenter la production agricole pour couvrir les besoins croissants d'une population mondiale en augmentation (6 à 8,3 milliards d'individus d'ici 2030 selon la *Food And Agriculture Organisation* (FAO)<sup>1</sup>), tout en s'adaptant aux changements climatiques dont les effets, désormais sans ambiguïté, demeurent mal connus sur le long terme. Les pays du Sud sont particulièrement concernés, puisqu'une baisse des rendements agricoles potentiels sera visible dans la plupart des zones tropicales et subtropicales (Lobell *et al.*, 2008). Jusqu'à présent, la compensation des déficits minéraux des sols était réalisée par l'apport d'engrais, en particulier d'engrais azotés et/ou phosphatés. Cette stratégie est remise en question, en grande partie à cause des effets néfastes de ces engrais chimiques sur l'environnement et la santé des populations (Vance, 2001), mais aussi à cause du prix croissant des énergies fossiles nécessaires à leur synthèse.

De nouvelles stratégies sont nécessaires pour avoir une production agricole suffisante et assurer la sécurité alimentaire des populations tout en permettant une gestion durable des écosystèmes. Beaucoup d'études sont d'ores et déjà en cours et des solutions émergent, comme, par exemple, la sélection génétique de variétés pouvant se développer dans des milieux défavorisés (Yan *et al.*, 2006), ou encore l'utilisation de la transformation génétique pour introduire des gènes conférant une résistance à certains stress environnementaux comme la salinité et la sécheresse (Bhatnagar-Mathur *et al.*, 2008). Certaines espèces végétales ont,

quant à elles, développé naturellement des stratégies d'adaptation aux conditions abiotiques défavorables (Vance, 2001). Un grand nombre d'espèces peuvent améliorer leurs capacités d'absorption minérale en s'associant à des micro-organismes du sol, tels que des champignons mycorhiziens, qui améliorent l'acquisition de phosphore. Un autre exemple d'adaptation aux contraintes du sol est donné par les symbioses fixatrices d'azote. En condition de carence azotée, une association entre la plante et une bactérie diazotrophe capable de fixer l'azote de l'air permet l'utilisation au niveau de nodules racinaires de l'azote atmosphérique et, ainsi, l'enrichissement des sols en forme azotée assimilable par les plantes. Si la symbiose légumineuses-*Rhizobium* est la plus étudiée, du fait de son importance agronomique (Vessey *et al.*, 2004), l'association entre les espèces actinorhiziennes et l'actinomycète du sol *Frankia* est d'un intérêt capital pour l'environnement. En effet, outre leur capacité à utiliser l'azote atmosphérique et à enrichir en azote les sols où elles croissent, elles présentent aussi des facultés d'adaptation aux sols pauvres et défavorisés et sont considérées comme des espèces pionnières (Duhoux et Franche, 2003).

## Symbiose actinorhizienne

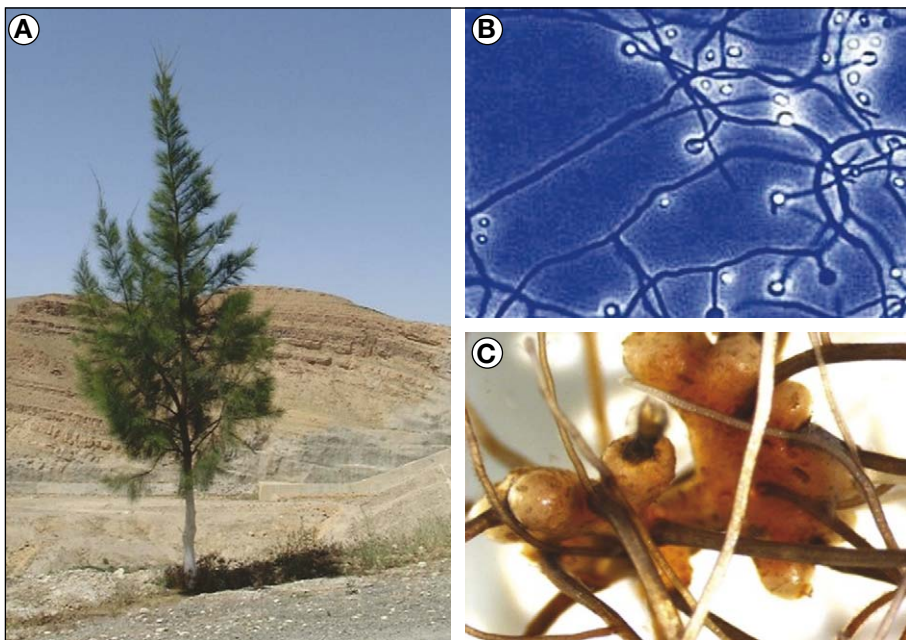
### Plantes actinorhiziennes et casuarinacées

Les plantes susceptibles d'établir une symbiose fixatrice d'azote avec l'actinomycète

du sol *Frankia* sont appelées plantes actinorhiziennes. L'établissement de la symbiose implique le développement d'un nouvel organe, l'actinorhize ou nodule actinorhizien, qui est le site de la fixation d'azote atmosphérique par le microsymbiote (Duhoux *et al.*, 1996). Les plantes actinorhiziennes sont des plantes pérennes ligneuses, à l'exception du genre *Datisca*, et représentent environ 260 espèces, réparties en 24 genres et huit familles d'angiospermes. Réparties sur tous les continents (Duhoux et Franche, 2003), elles constituent, après les légumineuses, le deuxième groupe de plantes capables de fixer biologiquement l'azote atmosphérique (Wall, 2000) et présentent un taux de fixation de l'azote équivalent à celui des légumineuses. Du fait de leur association avec *Frankia* et des champignons mycorhiziens, les plantes actinorhiziennes sont des plantes pionnières qui colonisent des sols pauvres. Elles peuvent faire face à une grande variété de stress tels qu'une forte salinité, des pH extrêmes ou encore une forte teneur en métaux lourds (Dawson, 1990 ; Spent et Parsons, 2000).

Parmi les plantes actinorhiziennes, la famille des *Casuarinaceae* appartient à l'ordre des casuarinales. Elle compte quatre genres, *Allocasuarina*, *Casuarina*, *Ceuthostoma* et *Gymnostoma*, et constitue un groupe d'environ 90 espèces d'arbres et d'arbustes, dont l'aire d'origine s'étend de l'Australie aux îles du Pacifique et au Sud-Est de l'Asie (National Research Council, 1984). Les *Casuarinaceae* possèdent des rameaux chlorophylliens photosynthétiques et des feuilles réduites à des écailles verticillées cornées, limitant la déperdition en eau et leur permettant de survivre dans des climats chauds et secs (*figure 1A*). En association avec *Frankia* et des champignons mycorhiziens, les

<sup>1</sup> <http://www.fao.org/french/newsroom/news/2002/7833-fr.html>



**Figure 1.** Clichés présentant l'arbre tropical *Casuarina glauca* et la bactérie *Frankia*.  
A : l'arbre *Casuarina glauca*; B : aspect morphologique de la bactérie *Frankia* en culture pure;  
C : Nodules actinorhiziens de *C. glauca*.

**Figure 1.** Photos of the tropical tree *Casuarina glauca* and of the *Frankia* bacteria.

A : The tropical tree *Casuarina glauca*; B : Morphological aspect of the bacteria *Frankia* in pure culture;  
C : Actinorhizal nodules of *C. glauca*.

*Casuarinaceae* peuvent croître sur des sols marginaux carencés. Cette famille comprend également des essences tropicales, subtropicales ou méditerranéennes, adaptées à différents climats (arides à humides), à différentes altitudes (0 à 3 000 mètres) et à différents sols (acides à alcalins). L'ensemble de ces propriétés facilite l'introduction de ces arbres en zone tropicale. Ainsi *Casuarina* joue un rôle essentiel dans les zones tropicales : en fixant l'azote, il contribue à la restauration de la fertilité des sols.

## La bactérie *Frankia*

Si le rôle écologique des plantes actinorhiziennes est connu depuis longtemps, ce n'est qu'en 1978 qu'une culture pure de *Frankia* a été isolée à partir de nodules d'une plante actinorhizienne, *Comptonia* (figure 1B). Le premier isolement du symbiote de *Casuarina* date quant à lui de 1982. Toutefois, il faut souligner qu'il reste encore impossible d'isoler les *Frankia* à partir de certaines familles de plantes actinorhiziennes. L'ADN des souches de *Frankia* est caractérisé par un pourcentage en GC<sup>2</sup> élevé, com-

pris entre 66 et 75 % et la taille du génome varie de 8,7 à 12 x 10<sup>6</sup> paires de bases (pb). Des plasmides, dont la taille est comprise entre 7 à 190 kilobases (kb) ont été mis en évidence (Lavire et Cournoyer, 2003).

Ce micro-organisme Gram + qui appartient à l'ordre des actinomycétales et à la famille des frankiacées, se présente aussi bien dans les nodules qu'à l'état libre, sous forme de filaments septés dénommés hyphes (Simonet *et al.*, 1990). La connaissance de *Frankia* est limitée par l'absence de moyens d'analyse génétique (Lavire et Cournoyer, 2003). Tous les essais de transformation génétique basés sur l'électroporation, la conjugaison ou la transduction ont échoué, de même que les systèmes de mutagenèse par transposon (Cournoyer et Normand, 1992 ; Benson et Sylvestre, 1993 ; Myers et Tisa, 2003 ; Matsuo *et al.*, 2006). Des projets récents ont permis le séquençage de trois souches de *Frankia* dont celle nodulant les *Casuarinaceae* (Cc13) (Normand *et al.*, 2007). L'analyse globale de ces données devrait apporter des réponses sur la nature des gènes impliqués dans le processus de nodulation avec la plante-hôte. Ainsi, on sait d'ores et déjà que les *Frankia* ne possèdent pas d'homologues des gènes Nod des bactéries *Rhizobium*.

## Morphologie et développement du nodule actinorhizien

Le nodule actinorhizien, appelé également actinorhize est formé sur le système racinaire de la plante après un processus complexe d'interactions cellulaires et moléculaires entre la plante-hôte et *Frankia* (Duhoux *et al.*, 1996, Franche *et al.*, 1998). Contrairement au nodule des légumineuses qui est un organe nouveau, l'actinorhize s'apparente, par son origine et sa structure, à une racine adventive modifiée (Pawlowski et Bisseling, 1996) (figure 1C). Une analyse comparative des nodules actinorhiziens et de légumineuses est présentée dans le tableau 1. Dans la famille des *Casuarinaceae*, le premier signe de l'interaction entre la plante et le micro-organisme est une déformation des poils racinaires (figure 2A) (Duhoux *et al.*, 1996). Les hyphes de *Frankia* pénètrent ensuite dans la zone de courbure en digérant localement la paroi des poils racinaires (figure 2B). Le microsymbiote est alors encapsulé dans une gaine constituée de polysaccharides d'origine végétale qui s'apparente au cordon d'infection observé chez les légumineuses. Suite à l'infection, des divisions cellulaires s'initient dans le cortex de la racine, à proximité du poil racinaire infecté. Ces divisions, ainsi que le grossissement des cellules infectées, conduisent à la formation d'une protubérance appelée pré-nodule (figure 2C). Peu après la formation du pré-nodule, un ou deux *primordia* sont initiés à partir de cellules du péricycle de la racine, en face de l'un des pôles de protoxylème. Ces *primordia* s'apparentent à celles de racines latérales et se développent, dans un premier temps, en étant dépourvus d'endophytes, puis le microsymbiote envahit les tissus corticaux (figure 2D). Le développement du *primordium* infecté donne naissance au lobe nodulaire qui se présente comme une structure oblongue avec un cylindre central vascularisé non infecté, un tissu cortical contenant des cellules infectées hypertrophiées et des cellules non infectées, et un périderme (figure 2E).

## Les phases précoces de la symbiose actinorhizienne

À l'heure actuelle, on dispose de très peu d'informations sur les phases précoces du dialogue moléculaire qui s'établit entre

<sup>2</sup> Guanine et cytosine

**Tableau 1. Analyse comparative des principales caractéristiques des symbioses actinorhiziennes et des symbioses *Rhizobium*-légumineuses (d'après Duhoux *et al.*, 1996).**

Table 1. Comparison between actinorhizal symbiosis and *Rhizobium*-Legumes symbiosis (from Duhoux *et al.*, 1996).

Caractéristiques	Plantes actinorhiziennes	Légumineuses
Plante-hôte	Huit familles principalement ligneuses	Une superfamille
Microsymbiote	<i>Frankia</i> , Gram +	<i>Rhizobium</i> , Gram –
Infection		
* Nature	Poil racinaire ou intercellulaire	Poil racinaire ou intercellulaire
* Signaux émis par le microsymbiote	Inconnus	lipochito-oligosaccharides (LCO)
Nodules		
* Types	Avec racine nodulaire Sans racine nodulaire	Nodule indéterminé allongé (NI) Nodule déterminé sphérique (ND)
* Morphologie	Multilobé	Unilobé en général
* Anatomie	Groupe de racines adventives système vasculaire central	Excroissance du cortex de la racine Vascularisation périphérique dans le cortex
* Origine	Cellules corticales infectées	Zone centrale infectée
	Péricycle	Cortex interne (NI) Cortex externe (ND)
* Structure du microsymbiote	Hyphes ramifiées encapsulées dans un cordon d'infection	Cordon d'infection, Multiplication des bactéries et endocytose
* Fonctionnement	Pérenne	Pérenne ou annuel

*Frankia* et les plantes actinorhiziennes (Laplaze *et al.*, 2000a). Si l'on observe une déformation des poils racinaires en présence de *Frankia* ou d'un surnageant de culture de l'actinomycète, on ignore toutefois la nature des facteurs déformants impliqués. Des études effectuées chez l'aulne ont cependant montré que ces facteurs sont thermostables, hydrophiles et résistants à un traitement par la chitinase (Cérémonie *et al.*, 1999). Ces résultats suggèrent que les facteurs déformants produits par l'actinomycète sont différents des facteurs Nod de *Rhizobium*.

## Gènes impliqués dans la mise en place de la symbiose actinorhizienne chez *Casuarina*

Au cours de la différenciation du nodule actinorhizien, un nombre important de gènes – appelés nodulines actinorhiziennes – est activé dans le nodule et

différents travaux ont permis d'en caractériser un certain nombre (Obertello *et al.*, 2003 ; Autran *et al.*, 2006). Les nodulines précoces s'expriment très tôt avant la fixation de l'azote et sont généralement impliquées dans l'étape d'infection ou d'organogenèse du nodule. Les nodulines tardives sont généralement impliquées dans les activités métaboliques nécessaires au fonctionnement nodulaire. La caractérisation fonctionnelle de certaines de ces nodulines a pu être menée chez *C. glauca*, car c'est la seule espèce actinorhizienne avec *Allocauarina* qui peut être transformée génétiquement (Franche *et al.*, 1997). Depuis peu, une autre espèce actinorhizienne, *Datisca glomerata*, a été transformée en utilisant le système « hairy root » (Markmann *et al.* ; 2008) ; cela devrait permettre de nouvelles caractérisations fonctionnelles.

### Une noduline précoce : étude du gène de subtilase *Cg12* isolé de *Casuarina glauca*

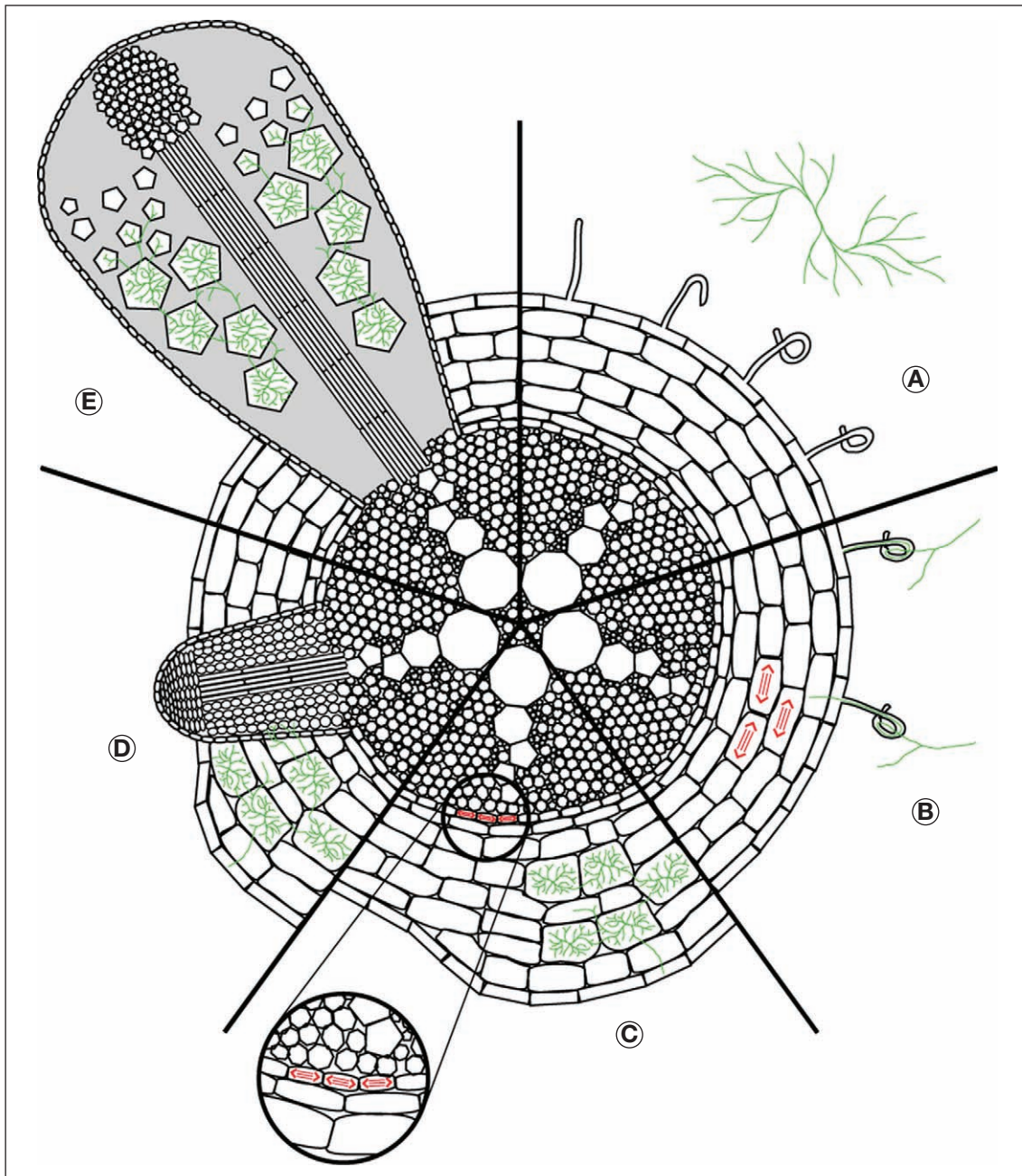
Les protéinases à sérine de la famille des subtilisines sont également appelées subtilases. Ces enzymes présentes chez tous les organismes ont des rôles variés (Siezen et Leunissen, 1997). Les subtilases de plantes interviendraient notamment dans la matu-

ration des fruits (Yamagata *et al.*, 1994), la formation des racines latérales (Neuteboom *et al.*, 1999) ou encore la réponse aux pathogènes (Jorda et Vera, 2000).

*Cg12*, un ADNc de 2645 pb codant pour une subtilase de 765 acides aminés, a été isolé à partir d'une banque d'ADNc de nodules de *C. glauca* (Laplaze *et al.*, 2000b). Une analyse par Northern blot et par hybridation *in situ* a mis en évidence une forte quantité de transcrits dans les nodules de *Casuarina* associés à la zone d'infection (Laplaze *et al.*, 2000b).

Une approche « Promoteur *Cg12*-gène rapporteur » a permis de confirmer que l'expression de *Cg12* était spécifiquement liée à l'infection des cellules par *Frankia* et qu'elle débutait dès les premières étapes de la symbiose lorsque l'actinomycète pénètre dans les poils racinaires déformés (Svistoonoff *et al.*, 2003). L'activité du gène rapporteur sous contrôle du promoteur de *Casuarina* est également associée à l'infection par *Rhizobium*, ce qui indique l'existence d'une voie de transduction indépendante de celle activée par les facteurs Nod (Svistoonoff *et al.*, 2004).

Des expériences d'immunolocalisation utilisant des anticorps antiCG12 ont montré que la subtilase de *Casuarina* était localisée dans les compartiments extracellulaires, au niveau des parois et du matériel polysaccharidique qui entourent *Frankia* (S. Svistoonoff et M. Nicole, com-



**Figure 2.** Différentes étapes du développement du nodule symbiotique chez *Casuarina glauca* (d'après Péret *et al.*, 2007).

A) échange de signaux entre la plante actinorhizale et la bactérie *Frankia* qui mène à l'infection du poil racinaire ; B) *Frankia* pénètre un poil déformé et induit des divisions dans les cellules corticales ; C) les cellules corticales en division sont infectées par les hyphes de *Frankia* et s'hypertrophient entraînant la formation du pré-nodule. En même temps, des divisions cellulaires s'initient au niveau du péricycle en face d'un pôle de xylème formant ainsi un *primordium* nodulaire ; D) les hyphes de *Frankia* provenant du pré-nodule envahissent le cortex du *primordium* nodulaire ; E) le nodule mature montre une structure de racine latérale modifiée.

**Figure 2.** Different steps of nodule development in *Casuarina glauca* (from Péret *et al.*, 2007).

A : Signal exchanges between the actinorhizal plant and *Frankia* lead to root hair infection; B : *Frankia* penetrates a deformed root hair and triggers cortical cell divisions; C : Dividing cortical cells are infected by *Frankia* hyphae and hypertrophy, thus leading to the formation of a nodule primordium. At the same time, pericycle cell divisions occur in front of a xylem pole to form a nodule primordium; D : *Frankia* hyphae from the nodule primordium invade the cortex of the nodule primordium; E : Mature nodules showing a structure of a modified lateral root.

munication personnelle). Ainsi, la subtilase CG12 pourrait participer à la dégradation de protéines associées à la paroi végétale pendant l'infection bactérienne,

permettant le remodelage des parois lors du passage des cordons d'infection contenant *Frankia* ; elle pourrait aussi participer à la maturation de protéines ou de

peptides, donnant naissance à des molécules bioactives faisant partie d'une cascade de signalisation activée en réponse à l'infection bactérienne.

## Une noduline tardive : *cgMT1* un gène de métallothionéine isolé de *Casuarina glauca* et impliqué dans les réponses aux stress

Les métallothionéines sont des protéines de petit poids moléculaire riches en cystéine et pouvant se lier aux métaux lourds. Elles sont présentes dans une majorité d'organismes vivants, mais leur rôle exact n'est pas encore établi. Elles auraient un rôle dans la détoxification des métaux lourds au niveau des cellules mais aussi comme antioxydant et seraient impliquées dans les réponses aux stress (Cobbett et Goldsbrough, 2002 ; Hall, 2002).

*CgMT1*, codant pour une métallothionéine de type I, a été isolé chez *C. glauca*. L'étude de ce gène a montré une expression importante dans les nodules au niveau des cellules infectées par *Frankia* (Laplaze *et al.*, 2002). Une approche « promoteur *CgMT1*-gène rapporteur » a confirmé cette spécificité d'expression. Une construction promoteur « *CgMT1*-gène rapporteur *gus* » introduite chez *Arabidopsis* a montré que l'expression de *CgMT1* n'était pas induite par les métaux lourds mais par des traitements oxydants ( $H_2O_2$ ), des blessures mécaniques et des attaques pathogènes (Obertello *et al.*, 2007). Il semble donc que, chez *C. glauca*, les métallothionéines soient impliquées dans les réponses aux stress avec un rôle antioxydant en protégeant les cellules des formes réactives de l'oxygène (ROS). Ce rôle serait important au niveau des cellules nodulaires fixatrices d'azote, où des accumulations de ROS ont été montrées (Obertello *et al.*, 2007).

## Analyse comparative des symbioses actinorhiziennes et des symbioses *Rhizobium*-légumineuses

### Un ancêtre commun prédisposé à la fixation symbiotique de l'azote

La capacité de former des nodules racinaires fixateurs d'azote en symbiose avec des

bactéries du sol est limitée, dans l'état actuel de nos connaissances, à certaines familles de plantes (légumineuses, *Parasponia* et plantes actinorhiziennes). Il existe une certaine similarité des modes d'infection dans les différents groupes de plantes fixatrices d'azote. Cependant, l'ontogenèse et la structure des nodules de légumineuses et de non-légumineuses sont différentes (tableau 1) (Pawlowski et Bisseling, 1996). Une étude de phylogénie moléculaire fondée sur le gène chloroplastique *rbcl* indique que ces familles appartiennent à un même clade (Soltis *et al.*, 1995) et auraient donc un ancêtre commun. Du fait de la présence dans ce clade de nombreuses familles de plantes non fixatrices d'azote, il a été suggéré que cet ancêtre commun ne devait pas être lui-même capable de réaliser une fixation symbiotique de l'azote et que la capacité de former des nodules fixateurs d'azote racinaires serait apparue de façon indépendante plusieurs fois au cours de l'évolution (Soltis *et al.*, 1995 ; Swensen, 1996).

### *CgSymRK* : un gène commun aux endosymbioses

Dans les symbioses *Rhizobium*-légumineuses, les facteurs Nod produits par la bactérie lors de l'interaction avec son hôte sont perçus par la plante, déclenchant une cascade de réponses incluant des changements de flux ionique, des oscillations calciques, des modifications au niveau du cytosquelette, ce qui conduit à la courbure du poil racinaire (Oldroyd et Downie, 2006). De récents travaux ont permis d'identifier certains gènes de cette voie de signalisation, notamment le gène *SymRK*, qui est aussi impliqué dans la symbiose mycorhizienne (Stracke *et al.*, 2002).

Chez les plantes actinorhiziennes, peu de données existent sur la voie de signalisation impliquée dans la perception des facteurs déformants de la bactérie *Frankia*. De récentes recherches développées chez *C. glauca* ont permis d'isoler *CgSymRK*, un gène homologue de celui des légumineuses. La structure protéique de ce récepteur kinase s'est révélée comparable aux *SymRK* décrits chez les légumineuses, avec trois domaines riches en leucine, une région transmembranaire et un domaine kinase à sérine/thréonine. Une approche fonctionnelle par acide ribonucléique (ARN) interférent (ARNi) développée chez *Casuarina* (Gherbi *et al.*, 2008a) a permis d'appréhender le rôle

de *CgSymRK* au cours de la nodulation. Les résultats ont montré que l'extinction de l'expression de *CgSymRK* inhibait la nodulation, mais aussi la mycorhization chez *Casuarina glauca*. Par ailleurs, des expériences de complémentation utilisant des mutants *symrk* de lotier et le gène de *Casuarina* ont abouti à la restauration de la nodulation et de la mycorhization chez cette légumineuse. Ces résultats montrent donc l'implication du gène *SymRK* dans la voie de signalisation menant à la symbiose actinorhizienne et, plus encore, ils ont montré l'existence d'un gène commun aux voies de signalisation des endosymbioses (Gherbi *et al.*, 2008b). Des travaux de recherche sont maintenant entrepris sur d'autres gènes de la voie de signalisation.

### Approche génomique de la symbiose actinorhizienne

Plus de 40 000 Étiquettes de séquences exprimées (EST) (séquençage Génoscope) ont été séquencées à partir de différentes banques d'ADNc de *Casuarina* construites à partir des conditions suivantes :

- i) racines témoins non infectées (gènes exprimés de manière basale dans les racines) ;
- ii) racines prélevées 2, 4 et 7 jours après l'infection par la bactérie ;
- iii) nodules fixateurs d'azote induits par *Frankia* ;
- iv) racines mycorhizées.

L'analyse globale de ces EST a permis d'observer les caractéristiques générales de la base de données (Hoher *et al.*, 2006). Ainsi, pour chacune des banques, environ 90 % des séquences analysées ont pu être validées. L'assemblage de ces EST a permis la création d'une base de données d'environ 15 000 unigènes. Leur annotation a été réalisée avec le logiciel Blast2GO (Conesa *et al.*, 2005) et a permis une classification selon le système *Gene Ontology*<sup>3</sup>. Une fonction a pu être assignée pour environ 55 % des unigènes de *C. glauca*, alors que 45 % des séquences ne présentent pas d'homologie avec des séquences connues. Ce dernier résultat est particulièrement intéressant, car ces 45 % de gènes inconnus sont une source de gènes potentiellement impliqués dans la symbiose actinorhizienne et non encore identifiés.

<sup>3</sup> <http://www.geneontology.org/>

Nous avons aussi mis en évidence différentes séquences correspondant à des nodulines actinorhiziennes : hémoglobine, métallothionéine, subtilisine, rubisco activase, saccharose synthase et protéine riche en glycine et en histidine. D'autres séquences en liaison avec la voie de signalisation impliquée dans la réception des signaux bactériens décrite chez les légumineuses ont été trouvées (entre autres, les protéines kinase) et leur caractérisation est entreprise.

L'analyse de ces banques est actuellement poursuivie et ces unigènes sont utilisés pour la réalisation de puces à ADN. Des analyses globales d'expression seront ainsi réalisées à l'aide de sondes correspondant aux ARNm des racines et de l'ensemble des organes dérivés des racines de *Casuarina* (nodules fixateurs d'azote, ecto- et endomycorhizes). Cette étude devrait permettre de dévoiler les programmes génétiques de la rhizogénèse symbiotique et de la mycorrhization. L'analyse comparative des gènes exprimés lors des symbioses développées avec *Rhizobium* (légumineuses et *Parasponia*) et *Frankia* (plantes actinorhiziennes) devrait contribuer à comprendre ce qui a prédisposé leur ancêtre commun à développer des nodules racinaires fixateurs d'azote.

## Conclusion et perspectives

Les techniques de biologie moléculaire ont permis d'accomplir, depuis une décennie, des progrès considérables dans la connaissance des gènes végétaux exprimés lors de l'interaction symbiotique avec l'actinomycète *Frankia* (Pawlowski et Bisseling., 1996 ; Franche *et al.*, 1998 ; Laplace *et al.*, 2000a). La mise au point de systèmes de transformation génétique chez les casuarinacées a ouvert la voie vers une analyse fonctionnelle des gènes symbiotiques végétaux dans les plantes actinorhiziennes (Franche *et al.*, 1997 ; Franche *et al.*, 1998, Gherbi *et al.*, 2008a). Malgré ces résultats, les phases précoces de l'interaction entre la plante-hôte et *Frankia* restent méconnues : on ignore quelle est la nature des signaux émis par le micro-organisme conduisant à la déformation des poils racinaires et aucun gène symbiotique exprimé lors des premières

heures de l'infection n'a pour l'instant été mis en évidence. L'approche génomique en cours de développement devrait autoriser la caractérisation de nouveaux gènes symbiotiques et la comparaison des données génomiques obtenues pour *Casuarina*, avec celles d'autres plantes actinorhiziennes (l'aulne, par exemple) et de légumineuses modèles, ainsi que de symbioses mycorrhiziennes, devrait aider à la caractérisation de processus spécifiques à chaque symbiose, mais surtout des processus génétiques communs mis en œuvre lors des endosymbioses. Plus généralement, ces données permettront de mieux comprendre l'évolution des endosymbioses au sein du règne végétal. ■

## Références

Autran D, Laplace L, Hoher V, *et al.* Make your way to nodules. Early events in actinorhizal and legumes nitrogen fixing symbioses. In : Hemantaranjan A, ed. *Advances in Plant Physiology, Vol 9*. Jodhpur (India) : Scientific Publishers, 2006.

Benson DR, Sylvester WB. Biology of *Frankia* strains, actinomycete symbionts of actinorhizal plants. *Microbiol Rev* 1993 ; 57 : 293-319.

Bhatnagar-Mathur P, Vadez V, Shama KK. Transgenic approaches for abiotic stress tolerance in plants: retrospect and prospects. *Plant Cell Rep* 2008 ; 27 : 411-24.

Cérémonie H, Debellé F, Fernandez MP. Structural and functional comparison of *Frankia* root hair deforming factor and *Rhizobia* Nod factor. *Can J Bot* 1999 ; 77 : 1293-301.

Cobbett C, Goldsbrough P. Phytochelatin and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Ann Rev Plant Biol* 2002 ; 53 : 159-82.

Conesa A, Götz S, García-Gómez JM, Terol J, Talón M, Robles M. Blast2GO: A universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* 2005 ; 21 : 3674-6.

Cournoyer B, Normand P. Electroporation of *Frankia* intact cells to plasmid DNA. *Acta Oecologica* 1992 ; 13 : 369-78.

Dawson JO. Interactions among actinorhizal and associated plant species. In : Schwintzer CR, Tjepkema JD, eds. *The Biology of Frankia and Actinorhizal Plants*. New York (USA) : Academic Press, 1990.

Duhoux E, Diouf D, Gherbi H, Franche C, Ahée J, Bogusz D. Le nodule actinorhizien. *Acta Bot Gallica* 1996 ; 143 : 593-608.

Duhoux E, Franche C. Les nodules actinorhiziens de *Casuarina*. *Biofutur* 2003 ; 235 : 45-9.

Franche C, Diouf D, Le QV, *et al.* Genetic transformation of the actinorhizal tree *Allocastrum verticillata* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant J* 1997 ; 11 : 897-904.

Franche C, Laplace L, Duhoux E, Bogusz D. Actinorhizal symbioses: recent advances in plant molecular and genetic transformation studies. *Crit Rev Plant Sci* 1998 ; 17 : 1-28.

Gherbi H, Markmann K, Svistoonoff S, *et al.* *SymRK* defines a common genetic basis for plant root endosymbioses with arbuscular mycorrhizal fungi, rhizobia, and *Frankia* bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008b ; 105 : 4928-32.

Gherbi H, Nambiar-Veetil M, Zhong C, *et al.* Post-transcriptional gene silencing in the root system of the actinorhizal tree *Allocastrum verticillata*. *Mol Plant-Microbe Interact* 2008a ; 21 : 518-24.

Hall JL. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J Exp Bot* 2002 ; 53 : 1-11.

Hoher V, Auguy F, Argout X, Laplace L, Franche C, Bogusz D. Expressed sequence-tag analysis in *Casuarina glauca* actinorhizal nodule and root. *New Phytol* 2006 ; 169 : 681-8.

Jorda L, Vera P. Local and systemic induction of two defense-related subtilisin-like protease promoters in transgenic *Arabidopsis* plants. Luciferin induction of PR gene expression. *Plant Physiol* 2000 ; 124 : 1049-58.

Laplace L, Bon M-C, Sy MO, *et al.* Molecular biology of tropical nitrogen-fixing trees in the *Casuarinaceae* family. In : Jain MS, Minocha SC, eds. *Molecular biology in woody plants, vol. 1*. Amsterdam (Pays-Bas) : Kluwer Academic Publishers, 2000a.

Laplace L, Gherbi H, Duhoux E, *et al.* Symbiotic and non-symbiotic expression of *cgMT1*, a metallothionein-like gene from the actinorhizal tree *Casuarina glauca*. *Plant Mol Biol* 2002 ; 49 : 81-92.

Laplace L, Ribeiro A, Franche C, *et al.* Characterization of a *Casuarina glauca* nodule-specific subtilisin-like protease gene, a homolog of *Alnus glutinosa ag12*. *Mol Plant-Microbe Interact* 2000b ; 13 : 113-7.

Lavire C, Cournoyer B. Progress on the genetics of the nitrogen-fixing actinorhizal symbiont *Frankia*. *Plant Soil* 2003 ; 254 : 125-37.

Lobell DB, Burke MB, Tebaldi C, Mastrandrea MD, Falcon WP, Naylor RL. Prioritizing climate change adaptation needs for food security in 2030. *Science* 2008 ; 319 : 607-10.

Markmann K, Giczey G, Parniske M. Functional adaptation of a plant receptor-kinase paved the way for the evolution of intracellular root symbioses with bacteria. *PLOS Biology* 2008 ; 6 : 497-506.

Matsuo TK, Okai K, Okamoto J, Minagawa J, Ishiura M. Real-time monitoring of chloroplast gene expression by a luciferase reporter : evidence for nuclear regulation of chloroplast circadian period. *Mol Cell Biol* 2006 ; 26 : 863-70.

Myers AK, Tisa LS. Effect of electroporation conditions on cell viability of *Frankia* Eu1c. *Plant Soil* 2003 ; 254 : 83-8.

National Research Council. *Casuarinas : nitrogen-fixing trees for adverse sites*. Washington DC (USA) : National Academic Press, 1984.

Neuteboom LW, Ng JM, Kuyper M, Clijdesdale OR, Hooykaas PJ, van des Zaal BJ. Isolation and characterization of cDNA clones corresponding with mRNAs that accumulate during auxin-induced lateral root formation. *Plant Mol Biol* 1999 ; 39 : 273-87.

Normand P, Lapierre P, Tisa LS, *et al.* Genome characteristics of facultatively symbiotic *Frankia* sp. strains reflect host range and host plant biogeography. *Genome Res* 2007 ; 17 : 7-15.

- Obertello M, Sy MO, Laplaze L, *et al.* Actinorhizal nitrogen fixing nodules: infection process, molecular biology and genomics. *African Journal Biotech* 2003 ; 2 : 528-38.
- Obertello M, Wall L, Laplaze L, *et al.* Functional analysis of the metallothionein gene *CgMT1* isolated from the actinorhizal tree *Casuarina glauca*. *Mol Plant-Microbe Interact* 2007 ; 20 : 1231-40.
- Oldroyd GE, Downie JA. Nuclear calcium changes at the core of symbiosis signalling. *Curr Opin Plant Biol* 2006 ; 9 : 351-7.
- Pawlowski K, Bisseling T. Rhizobial and actinorhizal symbioses : what are the shared features ? *Plant Cell* 1996 ; 8 : 1899-913.
- Péret B, Swarup R, Jansen L, *et al.* Auxin influx activity is associated with Frankia infection during actinorhizal nodule formation in *Casuarina glauca*. *Plant Physiol* 2007 ; 144 : 1852-62.
- Siezen RJ, Leunissen JAM. Subtilases: the superfamily of subtilisin-like serine proteases. *Prot Sci* 1997 ; 6 : 501-23.
- Simonet P, Normand P, Hirsch M, Akkermans ADL. The genetics of the *Frankia*-actinorhizal symbiosis. In : Gresshoff PM, ed. *Molecular Biology of Symbiotic Nitrogen Fixation*. Boca Raton (USA) : CRC Press, 1990.
- Soltis DE, Soltis PS, Morgan DR, *et al.* Chloroplast gene sequence data suggest a single origin of the predisposition for symbiotic nitrogen fixation in angiosperms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995 ; 92 : 2647-51.
- Spent JI, Parsons R. Nitrogen fixation in legume and non-legume trees. *Field Crops Res* 2000 ; 65 : 183-96.
- Stracke S, Kistner C, Yoshida S. A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. *Nature* 2002 ; 417 : 959-62.
- Svistoonoff S, Laplaze L, Auguy F, *et al.* *Cg12* expression is specifically linked to infection of root hairs and cortical cells during *Casuarina glauca* and *Allocauarina verticillata* actinorhizal nodule development. *Mol Plant-Microbe Interact* 2003 ; 7 : 600-7.
- Svistoonoff S, Laplaze L, Liang J, *et al.* Infection-related activation of the *Cg12* promoter is conserved between actinorhizal and legume-rhizobia root nodule symbiosis. *Plant Physiol* 2004 ; 136 : 3191-7.
- Swensen SM. The evolution of actinorhizal symbioses: evidence for multiple origins of the symbiotic association. *Am J Bot* 1996 ; 83 : 1503-12.
- Vance C. Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition. Plant nutrition in a world of declining renewable resources. *Plant Physiol* 2001 ; 127 : 390-7.
- Vessey JK, Pawlowski K, Bergman B. Root-based N<sub>2</sub>-fixing symbioses : legumes, actinorhizal plants, *Parasponia sp.* and cycads. *Plant and Soil* 2004 ; 266 : 205-30.
- Wall LG. The actinorhizal symbiosis. *J Plant Growth Regul* 2000 ; 19 : 167-82.
- Yamagata H, Mazuzawa T, Nagaoka Y, Ohnishi T, Iwasaki T. Cucumisin, a serine protease from melon fruits, shares structural homology with subtilisin and is generated from a large precursor. *J Biol Chem* 1994 ; 30 : 32725-31.
- Yan X, Wu P, Ling H, Xu F, Zhang Q. Plant nutriomics in China: an overview. *Ann Bot* 2006 ; 98 : 473-82.