

Université MENTOURI Constantine

Institut de Recherche pour le Développement



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie et Ecologie,
ED : **Biotechnologie, Biologie et Environnement**,
Option : Biotechnologie et Génomique Végétales

ED : **SIBAGHE (Systèmes Intégrés en Biologie, Agronomie, Géosciences, Hydrosociences, Environnement)**,
Option : Biologie Intégrative des Plantes

Thèse en Cotutelle

En vue de l'obtention du Grade de Doctorat

présentée et soutenue publiquement le 02 décembre 2012 par

Faïza Meriem BENABDOUN

Sur le sujet :

Étude moléculaire des étapes précoces de la symbiose actinorhizienne *Casuarina-Frankia* : analyse fonctionnelle des gènes de la plante hôte contrôlant l'infection

Membres du Jury :

Abdelhamid DJEKOUN
Christophe ROBAGLIA
Aïssa ABDELGUERFI
Bruno TOURAINE
Claudine FRANCHE
Nadia YKHLEF
Hassen GHERBI

Professeur Univ. Mentouri-Constantine
Professeur Univ. Aix-Marseille
Professeur ENSA (ex. INA)-Alger
Professeur Univ. Montpellier II
DR1/IRD
Professeur Univ. Mentouri-Constantine
CR1/IRD

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Directrice de Thèse
Directrice de Thèse
Co-directeur de Thèse

Année universitaire

2012 -2013

Remerciements

Ce travail a été réalisé en cotutelle au sein de l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD) de Montpellier, relevant de l'Université Sciences et Techniques Montpellier II, et des Laboratoires de Biochimie, Génétique et Biotechnologies Végétales (BGBV) de l'Université Mentouri de Constantine, avec le soutien financier du programme AVERROËS (Erasmus Mundus).

En préambule à ce mémoire, je tiens à remercier au même titre mes deux directrices de thèse : Dr. Claudine FRANCHE d'avoir apporté à mon travail un soutien professionnel et magistral, qui s'est tout le temps montrée disponible et objective tout le long de la réalisation de mon projet, ainsi que Pr. Nadia YKHLEF et ce, pour la qualité de ses conseils imposants, pour tous ses encouragements mais surtout pour son soutien moral qui m'a poussé à persévérer pour enfin arriver à mes fins tant attendues. Bien évidemment, je n'oublie pas de m'incliner majestueusement devant le génie, l'aide et le temps que m'a consacré mon co-directeur de thèse Dr. Hassen GHERBI, sans qui, ce mémoire n'aurait jamais vu le jour. Merci à vous tous ; d'ailleurs c'est tout à mon honneur que revient ces échanges professionnels et fructueux.

Je tiens à remercier Pr. Abdelhamid DJEKOUN d'avoir accepté d'être président du jury. Je remercie également tous les autres membres du jury Pr. Aissa ABDELGUERFI, Pr. Christophe ROBAGLIA et Pr. Bruno TOURAINE d'avoir accepté d'assister et de juger mon travail, et merci encore pour le déplacement jusqu'à Constantine.

Je remercie également Dr. Fabienne CARTIEAUX, Dr. Guilhem DESBROSSES et Dr. Charles ROSENBERG pour leur participation aux comités de thèse.

J'adresse un grand Merci au directeur de l'équipe Rhizogénèse (IRD) de Montpellier, Dr. Didier BOGUSZ de m'avoir accueilli au sein de son équipe (Rhizogénèse), pour son amabilité, sa serviabilité et son aide inégale durant mon séjour Montpelliérain. Mes reconnaissances s'adressent aussi à tous les chercheurs de l'équipe Rhizogénèse pour leurs aides et conseils : Dr. Sergio SVISTOONOFF, Dr. Laurent LAPLAZE, Dr. Soazig GUYOMAR'CH, Dr. Valérie HOCHER, Dr. Antony CHAMPION, et aux post-doctorants : Dr. Mikael LUCAS et Dr. Francine PERRINE-WALKER sans oublier Dr. Aziz SMOUNI, merci beaucoup d'avoir répondu à mes interrogations, et merci aussi au Dr. Christine LE ROUX du LSTM (Laboratoire des Symbioses Tropicales Méditerranéennes) de m'avoir fourni autant de documents utiles.

Je tiens à manifester toute mon affection et estime à mon ange gardien Jocelyne BONNEAU dont la complicité m'a soutenue et m'a permise de confronter quelques difficultés et merci aussi de m'avoir initié à certaines manip. Du plus profond de mon être MERCI JOYCE.

Un autre grand Merci à la « fée » du laboratoire Virginie VAISSEYRE (équipe Rhizogénèse) pour sa disponibilité, sa grande gentillesse et son savoir-faire. Je n'oublie pas de remercier également Amandine CRABOS pour sa bonne humeur et son aide au laboratoire.

Merci à tout le personnel des laboratoires BGBV tant ingénieurs que chercheurs : à Mr. Nadir BELBEKRI notre pilier du laboratoire, à Ryma BOULDJEJ pour son dévouement, sans oublier bien sûr Radhia DJEGHAR pour sa sympathie et pour les « pauses TEY » sans fin ! Merci aussi aux enseignements Mr. Kamel KELLOU, Mme. Sandra KACEM, Adra MOUELEF et Mahmoud TAMAGOULT de m'avoir accepté comme assistante TP.

Une profonde et agréable pensée à Nadine HOUCINAT et Chouaib MEZIADI, c'est vraiment un bonheur de vous avoir comme stagiaires, quant à toi Maxime AUZON-CAPE, merci d'avoir achevé mes expériences. Dr. Khalid ABDEL-LATEIF et Myriam COLIN, merci à vous aussi de m'avoir ouvert les yeux sur quelques manip.

J'aimerais adresser un remerciement particulier aux stagiaires de l'équipe Rhizogénèse qui, avec leurs différences et leurs spécificités, ont apporté leur touche personnelle en créant une ambiance agréable et conviviale. D'ailleurs je vous promets à vous tous de ne jamais oublier nos agréables moments.

J'ai eu la possibilité de vivre une expérience extrêmement enrichissante à Montpellier, tant sur le plan professionnel que personnel, par ce fait, je remercie toute personne qui m'a entouré, encouragé et soutenu : à Maya qui a toujours été là pour moi, à Rassim qui me faisait voyager à travers le souvenir vers mon origine, ma terre natale et ma famille, à Cécile et son humeur, à Jennyfer et son côté chaleureux, à Amira et sa persévérance, à Chouaib « dont le rire est à l'homme ce que la bière est à la pression », à Faten qui m'a apporté de la joie de vivre durant son court séjour, à Maxime « le grand » et sa bonne culture, à

Remerciements

Léandro malgré la langue qui n'a jamais été un obstacle entre nous, à Kaouther et les « Feel Juice », et à Chaymae le tip-top des « wakha », je te souhaite un très bon début de thèse Chaymouma. J'ai gardé une petite place à part pour mes très chers amis Karima 'ma kikouuu adorée' et Mohammad avec qui j'ai partagé mes bons et mauvais moments durant la phase de rédaction et dont le soutien et l'aide étaient sans limites.

Une pensée spéciale à Amira, ma source de sérénité, et à Ikram, la bombe d'énergie. Merci également aux doctorantes de « Beyte Tey » : Chourouk, Karima, Zoheira, Narimène, Mouna, Soumia et Amina pour les fous-rires, et les bons moments passés à Annaba, et au duo fantastique des M&M's, merci bien à toi Meriem pour les instants de folie et de délire. Merci aussi à Adra pour sa bonté et générosité, et à Mahmoud « le génie du lab ». Je vous souhaite à tous une très bonne fin de thèse.

Du fait qu'une thèse ne peut être accomplie ni finalisée que par un 'simple' travail, celle-ci doit toute sa réussite au dévouement, aux sacrifices et encouragements des parents et famille ; MERCI encore et toujours !

Dédicace

Ma dédicace va à l'endroit de tous ceux qui ont contribué à la réussite de mon travail et qui ont exhorté mon ambition d'aller vers l'avant.

À mon très cher papa à qui je dois la plus étonnante et la plus affective des dédicaces, mon professeur de toujours ;

À ma très chère maman pour ses sacrifices, et pour m'avoir soutenue jusqu'au bout et surtout d'avoir nourri son petit oisillon à bras cassé ; maman je te revaudrai ça ! ;

À mon 'atmosphère et traktouur' petite sœur Zeineb, pour avoir évincé mes moments de doute, mais surtout d'avoir été grande lorsque je me sentais petite, sache que tu comptes plus que tout pour moi ;

À tonton Hichem 'The Five Stars' ;

À tous mes proches et amis et tous ceux qui sont présent dans mon cœur et dont je n'ai pas cité les noms ;

À mes grands parents maternels : Baba Youcef et Mamalika, et aussi à la mémoire de mes grands parents paternels défunts que j'adorais tant : Dada et Baba Hadj ;

Au bonheur de mes deux familles ALLAM et BENABDOUN, mais surtout et exceptionnellement de celui de mes deux tantes Ouarda et Cathy, je dédie mon travail.

Auteur : Faïza Meriem BENABDOUN

Titre : Étude moléculaire des étapes précoces de la symbiose actinorhizienne *Casuarina-Frankia* : analyse fonctionnelle des gènes de la plante hôte contrôlant l'infection

Directeurs de thèse : Claudine FRANCHE, Nadia YKHLEF & Hassen GHERBI

Résumé :

Plus de 80% des plantes peuvent établir une symbiose racinaire avec des champignons de l'ordre des Glomales et former des endomycorhizes à arbuscules (AM). En revanche, seules certaines espèces appartenant à dix familles d'angiospermes réunies dans le clade des Eurosidiées I peuvent établir une symbiose racinaire fixatrice d'azote. Il s'agit d'une part, des plantes de la famille des Légumineuses (Fabacées) et de *Parasponia* associées à *Rhizobium* et d'autre part, des plantes actinorhiziennes associées à l'actinomycète *Frankia*. Comme chez les Légumineuses, la symbiose actinorhizienne aboutit à la formation de nodosités (ou « nodules »), siège de la fixation d'azote par les bactéries. Cependant, contrairement aux nodules des Légumineuses, le nodule actinorhizien présente une structure et un développement s'apparentant aux racines latérales. L'étude des nodosités actinorhiziennes est donc particulièrement intéressante tant pour rechercher les spécificités de cette symbiose, que pour déterminer quelles sont les caractéristiques communes avec les Légumineuses.

Nous avons étudié le rôle du gène *CCaMK* dans le processus symbiotique et l'organogenèse nodulaire chez l'arbre actinorhizien *Casuarina glauca*. *CCaMK* code pour une protéine kinase dépendante du calcium et de la calmoduline (« calcium and calmodulin dependent protein kinase »). Dans la cascade de signalisation conduisant à la nodulation et à la mycorhization chez les Légumineuses, ce gène est positionné en aval des oscillations calciques (« calcium spiking ») qui ont lieu durant les premières étapes de l'interaction symbiotique. *CCaMK* jouerait un rôle dans la perception et le décodage des oscillations calciques, ainsi que leur transduction aux différents composants contrôlant les endosymbioses racinaires.

Nous avons suivi l'expression spatio-temporelle de la fusion transcriptionnelle *PromCgCCaMK::GUS* au cours de la nodulation et montré que celle-ci était corrélée à la présence de *Frankia* tout au long du processus symbiotique, soulignant ainsi le rôle clé de *CCaMK* dans l'infection. Par ailleurs, nous avons cherché à déterminer l'importance du domaine autoinhibiteur de la protéine *CCaMK* dans l'activation du processus d'organogenèse du nodule. Pour cela, nous avons réalisé et introduit chez *C. glauca* des constructions géniques de *CgCCaMK* permettant l'expression de formes tronquées constitutivement actives, car dépourvues du domaine autoinhibiteur/CAM. Nous avons aussi utilisé des formes tronquées du gène *MtCCaMK* de *Medicago truncatula*. L'expression de ces formes tronquées de *CCaMK* a révélé que la levée de l'autoinhibition induit la formation de nodules spontanés indépendamment de l'actinobactérie *Frankia*. Les résultats obtenus suggèrent que la protéine dérégulée est capable de réactiver la voie de signalisation, ainsi que les gènes situés en aval de *CCaMK*, qui sont nécessaires à l'organogenèse nodulaire.

Mots clés : *Casuarina glauca*, *Frankia*, *CCaMK*, infection, autoinhibition, nodules spontanés

Laboratoires : Équipe Rhizogenèse, UMR-DIADE, Institut de Recherche pour le Développement (IRD), 911, Avenue Agropolis, 34394 Montpellier Cedex 5, France
Laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologies Végétales, Université Mentouri-Constantine. Route Ain El-Bey, Constantine, Algérie

Author: Faïza Meriem BENABDOUN

Title: Molecular study of the early stages of actinorhizal symbiosis *Casuarina-Frankia*: functional analysis of the host plant genes controlling the infection

Ph.D Supervisors: Claudine FRANCHE, Nadia YKHLEF & Hassen GHERBI

Summary:

More than 80% of plant species are able to develop arbuscular mycorrhizal (AM) symbiosis in association with glomeromycete fungi. In contrast, only some species of the Eurosid I clade, confined to four orders and ten Angiosperm families, are able to form nitrogen-fixing root nodule symbioses with soil bacteria. This concerns plants of the Legume family (*Fabaceae*) and *Parasponia* associated with Rhizobium bacteria and actinorhizal plants associated with the actinomycete *Frankia*. Similarly to Legumes, the actinorhizal symbiosis results in the formation of nitrogen-fixing root nodules. However, unlike Legume nodule, the actinorhizal nodule has a same origin and structure than a lateral root. Thus, the study of actinorhizal nodules is of particular interest not only for investigating its specific properties but also, for determining common characteristics shared with Legume nodules.

We have studied the role of *CgCCaMK* gene during the symbiotic process and nodule organogenesis in the actinorhizal tree *Casuarina glauca*. *CCaMK* encodes a calcium and calmodulin dependent protein kinase. In the signalisation cascade leading to both nodulation and mycorrhization in Legumes, this gene is acting downstream the calcium oscillations (« calcium spiking ») that occur during the early steps of the symbiotic interaction. It has been suggested that these calcium oscillations are decoded and transduced by the *CCaMK* protein.

We have monitored the spatio-temporal expression of a *PromCgCCaMK::GUS* fusion during actinorhizal nodulation and have shown that reporter gene expression was correlated with the presence of *Frankia* along the symbiotic process. This data highlights the role of *CgCCaMK* during *Frankia* infection. In addition, we have investigated the role of the *CCaMK* autoinhibitory/CAM domain in actinorhizal nodule organogenesis. To achieve this goal, we have obtained truncated versions of *CgCCaMK* lacking the autoinhibitory/CAM domain, and then expressed them into *C. glauca*. We have also used truncated forms of *MtCCaMK* from *Medicago truncatula*. The expression of these *CCaMK* constructs from *C. glauca* and *M. truncatula* was found to induce spontaneous nodulation in the absence of *Frankia* bacteria. These results suggest that deregulation of the calcium and calmodulin dependent protein kinase is able to reactivate the symbiotic signalling pathway and genes acting downstream *CCaMK* that are needed for nodule organogenesis.

Key words: *Casuarina glauca*, *Frankia*, *CCaMK*, infection, autoinhibition, spontaneous nodules

Laboratories: Équipe Rhizogénèse, UMR-DIADE, Institut de Recherche pour le Développement (IRD), 911, Avenue Agropolis, 34394 Montpellier Cedex 5, France

Laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologies Végétales, Université Mentouri-Constantine. Route Ain-El Bey, Constantine, Algérie

إعداد: فائزة مريم بن عبدون

العنوان: دراسة المراحل المبكرة من التعايش التكافلي بين الكازورينا والفرانكيا: تحليل وظيفي لجينات النبات المضيف المتحكمة بالإصابة

بإشراف: كلودين، فرانش ناديا ويخلف، و حسن غربي

ملخص:

تستطيع حوالي 80% من النباتات التعايش مع فطور من رتبة Glomales تشكل ما يسمى بـ Arbuscular Mycorrhizae (AM) في حين تتميز عدة أنواع تابعة لعشر عائلات من مغطاة البذور تتجمع ضمن كلاد (Clade) يسمى Eurosid I بقدرتها على القيام بعلاقة تعايشية تؤدي لتثبيت الأزوت الجوي. تتعايش هذ الأنواع إما مع الريزوبيوم كما هو الحال للنباتات التابعة للجنس *Parasponia* و تلك المنتمية للعائلة البقولية *Fabaceae*. أو تتعايش مع الفرانكيا (*Frankia*) كما هو الحال عند نباتات الأكتينوريزالية (Actinorhizal Plants) والتي هي موضوع الدراسة. تتشابه النباتات البقولية مع نباتات الأكتينوريزالية بتشكيل العقد الجذرية بنتيجة التعايش مع البكتريا والتي تعتبر مقرات تثبيت الأزوت الجوي ولكن عقد الأخيرة تتشابه مع الجذور النانوية من حيث الأصل والتركيب وبالتالي فإن دراسة العقد المتشكلة على هذه النباتات ذات أهمية خاصة سواء بهدف معرفة خصوصية هذا التعايش أو بهدف تحديد الصفات المشتركة مع عقد النباتات البقولية.

في هذه الرسالة تم دراسة دور الجين *CCaMK* في العملية التعايشية وتشكيل العقد الجذرية عند الأشجار الأكتينوريزالية وتحديداً عند الكازورينا (*Casuarina glauca*). يشفر الجين المذكور بروتين كيناز مرتبط بالكالسيوم والكالمودولين (« calcium and calmodulin dependent protein kinase ») ويانظر إلى تعاقب الاشارات (Signaling cascade) المؤدية لتشكيل العقد الجذرية وحدث التعايش نلاحظ أن هذا الجين يتوضع بعد تذبذبات الكالسيوم (« calcium spiking ») والتي تحدث بنورها خلال المراحل الأولى من التعايش وبالتالي من الممكن أن يكون للجين *CCaMK* دوراً في التعرف وفك تشفير تذبذبات الكالسيوم بالإضافة لترجمتها إلى مكوناتها المختلفة.

في إطار هذه الدراسة تتبعنا التعبير المكاني والزمني لـ *PromCgCCaMK::GUS* خلال تشكل العقد الجذرية وبيننا أنها كانت متوافقة مع وجود الفرانكيا خلال عملية التعايش مظهرين الدور الأساسي لـ *CCaMK* في إحداث الإصابة بالفرانكيا. بالإضافة لذلك حاولنا تحديد أهمية مجال *autoinhibitor/CAM* لبروتين *CCaMK* في تنشيط عملية تشكيل العقد الجذرية. في سبيل ذلك قمنا بتشكيل وإدخال تشكيلات جينية من *CgCCaMK* نقترح أمجال *CAM*. كما قمنا بالمثل مع الجين *MitCCaMK* لنبات الفصاة *Medicago truncatula*. أظهر التعبير عن هذه الجينات المعدلة أن إزالة الكيسج الذاتي لبروتين *CCaMK* أدى إلى التشكيل الفوري للعقد الجذرية خالية من البكتيريا. هذه النتيجة تقترح أن البروتين المحرر قادر على إعادة تفعيل تعاقب الاشارات بالإضافة للجينات المتوضعة بعد *CCaMK* والتي تعتبر ضرورية لتشكيل العقد.

كلمات مفتاحية: *Casuarina glauca*, *Frankia*, *CCaMK*, الإصابة بالفرانكيا، الكيسج الذاتي لبروتين *CCaMK*, العقد الجذرية: بإخالية من البكتيريا

مخبر:

Équipe Rhizogenèse, UMR-DIADÉ, Institut de Recherche pour le Développement (IRD), 911, Avenue Agropolis, 34394 Montpellier Cedex 5, France

Laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologies Végétales, Université Mentouri-Constantine. Route Ain-El Bey, Constantine, Algérie

Liste des abréviations	1
Liste des illustrations	2
Introduction générale	6
Étude bibliographique	7
I. La fixation symbiotique d'azote	7
1. Les symbioses fixatrices d'azote	7
2. Fixation symbiotique d'azote et développement durable	8
II. Les symbioses actinorhiziennes	9
1. Les partenaires végétaux : les plantes actinorhiziennes	9
1.1. Généralités	9
1.2. Répartition géo-écologique	10
1.3. Importance et utilisation	10
1.4. La famille des Casuarinacées	11
2. Le partenaire bactérien : <i>Frankia</i>	13
2.1. Isolement	13
2.2. Taxonomie et spécificité d'hôte	13
2.3. Physiologie et morphologie	14
2.4. Connaissances des génomes de <i>Frankia</i>	15
3. Établissement de la symbiose actinorhizienne	16
3.1. Processus d'infection	16
3.1.1. Infection intracellulaire	16
3.1.2. Infection intercellulaire	18
3.2. Structure, morphologie et originalité de l'actinorhize	18
3.2.1. Structure de l'actinorhize	18
3.2.2. Morphologie et originalité de l'actinorhize	19
III. Aspects évolutifs et moléculaires des symbioses fixatrices d'azote	20
1. Aspects phylogénétiques et évolutifs	20
2. Aspects moléculaires de la symbiose rhizobienne	20
2.1. Dialogue moléculaire entre les partenaires symbiotiques	20
2.2. Modèle de la voie de signalisation des facteurs Nod chez les Légumineuses	22
2.2.1. Le perception des signaux bactériens par les récepteurs de la plante	22
2.2.2. Dissection de la cascade signalétique chez les Légumineuses	23
a. Des gènes communs aux endosymbioses racinaires	23
b. D'autres composants moléculaires de la cascade signalétique	25
c. Des gènes requis pour l'infection	26
d. Récepteurs cytokininine et organogénèse du nodule	27
3. Aspects moléculaires de la symbiose actinorhizienne	27

3.1. Le rôle des flavonoïdes dans les phases précoces de l'interaction	28
3.2. Gènes symbiotiques exprimés lors des étapes précoces de l'interaction symbiotique	29
3.3. SymRK, un acteur de la voie de signalisation symbiotique chez les plantes actinorhiziennes	30
3.4. Autres acteurs de la voie de signalisation symbiotique chez les plantes actinorhiziennes	31
3.5. Phytohormones et signalisation symbiotique	32
IV. Présentation et objectifs du travail de thèse	33
1. Contexte général	33
2. Le projet de thèse	33
V. Revue	35
Matériels et Méthodes	41
I. Matériels	41
1. Matériel végétal	41
2. Matériel bactérien	41
2.1. <i>Escherichia coli</i>	41
2.2. Agrobactéries	41
2.3. <i>Frankia</i>	41
3. Plasmides et oligonucléotides utilisés	41
II. Méthodes	42
1. Culture du matériel	42
1.1. Culture du matériel végétal	42
1.1.1. Culture <i>in vitro</i> de <i>C. glauca</i>	42
1.1.2. Transfert en hydroponie de <i>C. glauca</i>	43
1.2. Culture des bactéries	43
1.2.1. <i>Escherichia coli</i>	43
1.2.2. Agrobactéries	43
1.2.3. <i>Frankia</i>	43
2. Méthodes de transformation génétique	44
2.1. Transformation génétique des bactéries	44
2.1.1. Préparation des agrobactéries électrocompétentes	44
2.1.2. Électroporation d'Agrobacterium	44
2.1.3. Transformation d'E. Coli	45
2.2. Transformation génétique des plantes	45
2.2.1. Transformation <i>in vitro</i> de <i>C. glauca</i> via <i>A. rhizogenes</i>	45
2.2.2. Transformation <i>in vitro</i> de <i>C. glauca</i> via <i>A. tumefaciens</i>	46
3. Inoculation des plantes par <i>Frankia</i>	47
3.1. Préparation de l'inoculum	47

3.2. Inoculation	47
4. Méthodes de biologie moléculaire	47
4.1. Extraction de l'ADN plasmidique	47
4.2. Méthodes de clonage	48
4.2.1. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	48
a. Amplification avec une Taq polymérase	48
b. Amplification des fragments pour le clonage	48
4.2.2. Digestion de l'ADN	49
4.2.3. Purification des acides nucléiques	49
4.2.4. Ligation des fragments d'ADN dans le vecteur	49
4.2.5. Criblage des bactéries transformées	49
4.3. Analyse des acides nucléiques	50
4.3.1. Électrophorèse	50
4.3.2. Dosage et évaluation de la qualité d'ADN	50
4.3.3. Séquençage de l'ADN	50
4.3.4. Analyse bioinformatique des séquences	51
5. Histologie	51
5.1. Détection histochimique de l'activité β -glucuronidase	51
5.2. Fixation, déshydratation et inclusion dans la résine	51
5.3. Réalisation des coupes	52
5.4. Coloration au bleu de toluidine	52
5.5. Coloration au rouge de ruthénium	53
5.6. Observations microscopiques	53
Chapitre I : Caractérisation du gène <i>CgCCaMK</i>	54
I. Introduction	54
1. <i>CCaMK/DMI3</i> , une kinase requise dans la symbiose rhizobienne et mycorhizienne à arbuscules	54
1.1. <i>CCaMK</i> et oscillations calciques (ou « calcium spiking »)	54
1.2. Localisation subcellulaire de <i>CCaMK</i>	55
1.3. Protéines orthologues et fonctions de <i>CCaMK</i>	55
1.4. Interaction <i>CCaMK</i> /protéines	56
2. Structure et mode de fonctionnement de la protéine <i>CCaMK</i>	57
3. Objectifs	58
II. L'homologue de <i>DMI3/CCaMK</i> chez <i>Casuarina glauca</i>	58
1. Isolement	58
2. Structure du gène, alignements de séquences et analyses phylogénétiques	59
3. Implication de <i>CgCCaMK</i> dans le processus symbiotique	59
III. Caractérisation du promoteur <i>CgCCaMK</i>	60
1. Séquence du promoteur et analyse informatique	60

2. Expression spatio-temporelle conférée par le promoteur <i>CgCCaMK</i> chez <i>Casuarina glauca</i>	61
2.1. Approche méthodologique	61
2.1.1. Description de la construction <i>PromCgCCaMK ::GUS ::TermNos</i>	61
2.1.2. Transformation de <i>C. glauca</i> par la souche <i>C58C1</i> d' <i>A. tumefaciens</i> contenant la construction <i>PromCgCCaMK ::GUS ::TermNos</i>	62
2.1.3. Sélection des plantes de <i>C. glauca</i> <i>PromCgCCaMK ::GUS ::TermNos</i> obtenues par transformation génétique avec <i>A. tumefaciens</i>	62
2.1.4. Mise en place de la cinétique d'inoculation	63
2.2. Expression spatio-temporelle du <i>PromCgCCaMK ::GUS ::TermNos</i> dans les tissus non-symbiotiques	64
2.3. Expression spatio-temporelle du <i>PromCgCCaMK ::GUS ::TermNos</i> dans les tissus symbiotiques	64
2.3.1. Profil d'expression de <i>PromCgCCaMK ::GUS ::TermNos</i> lors des phases précoces de la symbiose	64
2.3.2. Profil d'expression de <i>PromCgCCaMK ::GUS ::TermNos</i> dans le prénodule et nodule	65
IV. Discussion	65
V. Article	70
<u>Chapitre II</u> : Étude de la régulation du gène <i>CCaMK</i> chez <i>Casuarina glauca</i>	108
I. Introduction	108
1. Rôle du domaine autoinhibiteur (CAM) du gène <i>CCaMK</i>	108
2. Objectifs	109
II. Étude de la régulation de l'activité <i>MtDMI3</i> dans les racines de <i>Casuarina glauca</i>	109
1. Présentation de la construction dérégulée du gène <i>MtDMI3</i>	109
2. Introduction des constructions tronquées <i>MtDMI3 1-311</i> chez <i>Casuarina glauca</i> par la technique « hairy root » et obtention des plantes composites	110
3. Sélection des racines co-transformées et transfert en hydroponie	111
4. Développement des nodules spontanés suite à l'introduction des constructions tronquées <i>MtDMI3 1-311</i> chez <i>Casuarina glauca</i>	112
5. Analyses phénotypiques et histologiques des nodules spontanés	112
III. Étude de la régulation de l'activité <i>CgCCaMK</i> dans les racines de <i>Casuarina glauca</i>	113
1. Présentation des constructions tronquées de <i>CgCCaMK</i> obtenues par clonage moléculaire	113

2. Introduction des constructions tronquées de <i>CgCCaMK</i> chez <i>Casuarina glauca</i> par la technique « hairy root » et obtention des plantes composites	114
3. Sélection des racines co-transformées et transfert en hydroponie	115
4. Développement des nodules spontanés suite à l'introduction des constructions tronquées <i>CgCCaMK</i> chez <i>Casuarina glauca</i>	115
5. Analyses phénotypiques et histologiques des nodules spontanés	116
IV. Discussion	116
Discussion générale et Conclusion	120
I. Contribution de la transgénèse à la connaissance de la symbiose actinorhizienne	121
II. <i>CCaMK</i>, le gène clé de la symbiose nodulaire fixatrice d'azote	123
1. Un rôle majeur de <i>CgCCaMK</i> dans le processus d'infection	123
2. <i>CgCCaMK</i> , un marqueur moléculaire précoce permettant la purification des facteurs de <i>Frankia</i>	125
3. Un rôle majeur de <i>CCaMK</i> dans le processus d'organogenèse nodulaire	125
4. <i>CCaMK</i> , un gène à l'interface des voies de signalisation conduisant à l'infection et à l'organogenèse	127
III. Un objectif à long terme : des céréales fixatrices d'azote	129
1. L'introduction de bactéries fixatrices d'azote dans la rhizosphère	129
2. L'introduction du complexe nitrogénase chez les céréales	130
3. Des champignons endomycorhziens abritant des bactéries fixatrices d'azote	131
4. Le transfert de l'aptitude à former des nodosités fixatrices d'azote	131
IV. Revue	133
Références bibliographiques	142
Annexes	160

°C : degré Celsius	kb : kilo-base
16S et 18S : gènes de l'ARN ribosomique	kDa : kilo-dalton
2,4-D : acide 2,4 dichlorophénoxy acétique	Km : kanamycine
35S : promoteur (ou terminateur) 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur	kV : kilo-volt
aa : acide aminé	LacZ : gène de l'opéron lactose
ABA : acide abscissique	LB (milieu) : milieu liquide de Luria et Bertani
ADN : acide désoxyribonucléique	LHK1 : lotus histidine kinase 1
ADNr : ADN ribosomal	LRR : leucine rich repeat
ADNc : ADN complémentaire	LYK3 : lysine motif receptor-like kinase 3
ADN-T : ADN de transfert d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	M : molaire
AIA : acide indole acétique	MA : million d'années
AIB : acide 3-indole butyrique	Mb : méga-base
AM : symbiose mycorhizienne à arbuscule	min : minute
AmpR : gène de résistance à l'ampiciline	MSC (milieu) : milieu de Murashige et Skoog pour <i>Casuarina</i>
ANA : acide naphthalène acétique	Myc : mycorhization
ARN : acide ribonucléique	Nbre : nombre
ARNi : ARN interférence	NFP : nod factor perception
ATP : adénosine triphosphate	NFR : nod factor receptor
Aux : auxine	NFs : facteurs nod
BA : benzylaminopurine	nif : nitrogen fixation
BAP (milieu) : buffered mineral medium added of phosphatidylcholine	nifH : gène codant pour la nitrogénase
BD (milieu) : milieu de Broughton et Dilworth	NIN : nod inception
BET : bromure d'éthidium	nod : nodulation
BIT : branching infection threads	NORK : nodulation receptor kinase
CAM : calmoduline	nptII : gène issu d' <i>E. coli</i> , qui confère la résistance aux aminoglycosides (kanamycine et néomycine)
CCaMK : calcium and calmodulin dependent kinase	NSP : nodulation signaling pathway
CDS : coding sequence	ohms : unité de résistance électrique
Cg12 : gène de la subtilase chez <i>Casuarina glauca</i>	ORF : open reading frame
AUX1 : transporteur d'auxine 1	PAA : acide phénylacétique
CgMT1 : gène de la métallothionéine chez <i>C. glauca</i>	pb : paire de bases
CIP73 : CCaMK-interacting protein	PCM : phosphatidylcholine MES-Tris
CRE1 : cytokinin receptor 1	PCR : polymerase chain reaction
CSP : common symbiotic pathway	PGPR : plant growth promoting rhizobacteria
DMF : diméthylformamide	Plasmide Ri : plasmide root-inducing d' <i>A. rhizogenes</i>
DMI : does not make infections	Prom : promoteur
DMSO : diméthyl sulfoxyde	RLK : receptor-like kinase
dNTP : désoxyribonucléotide triphosphate	rpm : rotation par minutes
DO : densité optique	rbcL et atpB : gènes chloroplastiques
EDTA : acide éthylène diamino tétraacétique	sec : seconde
EGTA : acide éthylène glycol tétraacétique	snf : spontaneous nodule formation
ENOD : early nodulin genes	SYM : symbiose
ERF : ethylene response factor	SymRK : symbiosis receptor kinase
ERN : ERF required for nodulation	TBE : tris-borate-EDTA
EST : expressed sequence tag	Term : terminateur
JA : jasmonate	Terminateur Nos : terminateur de la nopaline synthase
ex. : exemple	Thr : thréonine
GFP : green fluorescent protein	Tris : tris (hydroxyméthyl) aminométhane
glnII : gène de la glutamine synthétase II	U : unité enzymatique
GUS : β-glucuronidase d' <i>Escherichia coli</i> codée par le gène uidA	UTR : untranslated region
h : heure	UV : ultraviolet
ha : hectare	V : volt
HIT1 : hyperinfected 1	WT : wild type
HR : hairy root	X-Gal : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside
IAA : acide 3-indole acétique	X-Gluc : acide 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronique
iPA : isopentényl adénosine	μE.m ² .sec ⁻¹ : microeinstein par mètre carré par seconde
IPD3 : interacting protein of DMI3	μF : microfarad
J : jour	

		Figures	
			page
Figure 1 :	Arbre représentant la relation phylogénétique entre les différents genres des Rhizobiums.		8
Figure 2 :	Aspect morphologique de quelques plantes actinorhiziennes.		10
Figure 3 :	Plantation et utilisation des Casuarinacées.		12
Figure 4 :	Étude phylogénique des plantes actinorhiziennes et des souches de <i>Frankia</i> .		14
Figure 5 :	Observation de <i>Frankia</i> à l'état libre et à l'état symbiotique.		14
Figure 6 :	Modes d'infection et organogenèse d'un lobe nodulaire chez les plantes actinorhiziennes.		16
Figure 7 :	Coupe longitudinale d'un lobe nodulaire actinorhizien.		18
Figure 8 :	Plasticité racinaire chez les plantes actinorhiziennes en cas de carence en éléments nutritifs.		19
Figure 9 :	Évolution des endosymbioses racinaires.		20
Figure 10 :	Dialogue moléculaire Nod-dépendant du couple symbiotique Légumineuse-Rhizobium.		20
Figure 11 :	Réponses physiologiques de la plante aux facteurs Nod.		21
Figure 12 :	Localisation histochimique de l'activité GUS (β -glucuronidase) dans les racines transgéniques de <i>Medicago truncatula</i> au cours de l'infection par <i>Sinorhizobium meliloti</i> , à l'aide d'une construction <i>PromENOD11::GUS</i> .		22
Figure 13 :	Représentation schématique des domaines LysM-RLKs et organisation en domaines du récepteur kinase NFP de type LysM-RLKs chez <i>Medicago truncatula</i> .		22
Figure 14 :	Localisation subcellulaire des protéines NUP85 et NENA chez <i>Lotus japonicus</i> et IPD3 chez <i>Medicago truncatula</i> .		23
Figure 15 :	Structure et localisation subcellulaire des protéines DMI1 et DMI2 chez <i>Medicago truncatula</i> .		24
Figure 16 :	Intervention du complexe protéique HMGR1-NORK dans le développement du nodule.		25
Figure 17 :	Organisation en domaines des facteurs de transcription NSP1, NSP2 et localisation subcellulaire de la protéine de fusion <i>NSP2::GFP</i> .		25
Figure 18 :	Présentation schématique en domaines de NIN et LIN de <i>Medicago truncatula</i> .		26
Figure 19 :	Étude de l'expression spatio-temporelle du gène <i>LIN</i> chez <i>Medicago truncatula</i> au cours de l'infection par <i>Sinorhizobium meliloti</i> , à l'aide d'une construction <i>PromLIN::GUS</i> .		27
Figure 20 :	Implication de la protéine LHK1 dans le processus de nodulation chez le lotier.		27

Figures

Figure 21 : Rôle des cytokinines (CK) dans le processus d'infection et de nodulation.	27
Figure 22 : Localisation de <i>Cg12</i> dans les racines et nodules des Casuarinacées.	29
Figure 23 : Localisation histochimique de l'activité GUS dans les racines de <i>Casuarina glauca</i> exprimant la construction <i>PromMtEnod11::GUS</i> .	29
Figure 24 : Expression des gènes symbiotiques dans les différentes zones du nodule actinorhizien.	29
Figure 25 : Schéma représentatif de la voie de signalisation impliquée dans l'activation de l'organogenèse nodulaire et de l'infection par les bactéries.	30
Figure 26 : Complémentation fonctionnelle du mutant <i>Ljsymrk-</i> avec la construction <i>PromLjSymRK::CgSymRK</i> et inoculation avec <i>Mesorhizobium loti</i> et <i>Glomus intraradices</i> .	31
Figure 27 : Immunolocalisation de l'auxine dans les nodules de <i>Casuarina glauca</i> .	32
Figure 28 : Expression de <i>CgAUX1</i> au cours de l'infection de <i>Casuarina glauca</i> par <i>Frankia</i> .	32
Figure 29 : Perception et signalisation de l'auxine durant l'infection de <i>Casuarina glauca</i> par <i>Frankia</i> .	33
Figure 30 : Localisation du « calcium spiking » dans le poil absorbant de <i>Pisum sativum</i> et de <i>Medicago truncatula</i> .	54
Figure 31 : Localisation subcellulaire de la protéine DMI3 chez <i>Medicago truncatula</i> .	55
Figure 32 : Modèle d'interaction des deux protéines CCaMK et CYCLOPS.	56
Figure 33 : Structure de la séquence du gène <i>CCaMK</i> de <i>Casuarina glauca</i> et de la protéine prédite.	57
Figure 34 : Représentation du mode de fonctionnement de la protéine CCaMK/DMI3.	58
Figure 35 : Alignement de séquence de CCaMK chez <i>Lotus japonicus</i> (LjCCaMK), <i>Medicago truncatula</i> (MtCCaMK) et <i>Casuarina glauca</i> (CgCCaMK).	59
Figure 36 : Arbre phylogénétique contenant la protéine CCaMK de <i>Casuarina glauca</i> ainsi que des CCaMK des autres espèces, basé sur l'alignement par la méthode ClustalW.	59
Figure 37 : Identification de différents motifs dans la séquence nucléotidique du promoteur du gène <i>CgCCaMK</i> .	61
Figure 38 : Présentation de la construction <i>PromCgCCaMK::GUS::TermNos</i> .	61
Figure 39 : Transformation génétique de <i>Casuarina glauca</i> avec la construction <i>PromCgCCaMK::GUS::TermNos</i> et obtention de nouvelles plantules par micropropagation.	62
Figure 40 : Mise en évidence de l'activité GUS dans des racines <i>PromCgCCaMK::GUS::TermNos</i> lors de la phase précoce de la symbiose <i>Casuarina</i>	

	Figures	
<i>glauca-Frankia.</i>		64
Figure 41 : Mise en évidence de l'activité GUS dans la zone d'émergence des prénodules, et coupes fines de prénodules et nodules de <i>Casuarina glauca</i> transformés avec la construction <i>PromCgCCaMK::GUS::TermNos</i> .		65
Figure 42 : Constructions géniques dérégulées de <i>MtDMI3</i> .		109
Figure 43 : Obtention de plantes composites de <i>Casuarina glauca</i> et observation de l'activité GFP dans le système racinaire.		111
Figure 44 : Morphologie des nodules spontanés issus de la dérégulation du gène <i>CgCCaMK</i> par introduction des constructions dérégulées <i>MtDMI3</i> chez <i>Casuarina glauca</i> .		112
Figure 45 : Analyse des coupes histologiques (épaisseur 4 µm), des nodules spontanés issus de la dérégulation du gène <i>CgCCaMK</i> par introduction des constructions dérégulées <i>MtDMI3</i> chez <i>Casuarina glauca</i> .		112
Figure 46 : Constructions géniques dérégulées de <i>CgCCaMK</i> obtenues par clonage moléculaire.		113
Figure 47 : Plantes composites de <i>Casuarina glauca</i> en système hydroponique après transformation <i>via Agrobacterium rhizogenes</i> .		116
Figure 48 : Morphologie des nodules spontanés issus de la dérégulation du gène <i>CgCCaMK</i> par introduction des constructions dérégulées <i>CgCCaMK</i> chez <i>Casuarina glauca</i> .		116
Figure 49 : Analyse des coupes histologiques (épaisseur 6 µm) des nodules spontanés issus de la dérégulation du gène <i>CgCCaMK</i> par introduction des constructions dérégulées <i>CgCCaMK</i> chez <i>Casuarina glauca</i> .		116
Figure 50 : Nodules spontanés chez <i>Parasponia andersonii</i> obtenus par des mutants « gain de fonction » du gène <i>MtDMI3</i> .		118
Figure 51 : Induction de nodules spontanés dans une plante de <i>Discaria trinervis</i> transformée génétiquement avec une forme autoactive de <i>CgCCaMK</i> .		119
Figure 52 : Structure chimique des facteurs Nod de <i>Rhizobium</i> et des facteurs Myc de <i>Glomus intraradices</i> .		120
Figure 53 : Suivi de l'expression spatio-temporelle de <i>DMI3</i> par fusion transcriptionnelle <i>PromDMI3::GUS</i> chez <i>Medicago truncatula</i> .		124
Figure 54 : Profil d'expression de <i>CCaMK</i> chez <i>Sesbania rostrata</i> .		124
Figure 55 : Induction de <i>PromCgCCaMK::GUS::TermNos</i> chez <i>Casuarina glauca</i> par les surnageants de <i>Frankia</i> .		125
Figure 56 : Modèle de la voie de signalisation symbiotique chez les Légumineuses.		128
Figure 57 : Induction de nodules spontanés en présence d'auxine (2,4-D).		128
Figure 58 : Colonisation des racines des céréales par des champignons endomycorhiziens.		131

Tableaux

Tableau 1 : Taxonomie, et répartition géographique des plantes actinorhiziennes.	10
Tableau 2 : Origines de quelques souches de <i>Frankia</i> .	13
Tableau 3 : Résultats d'alignements des différents domaines protéiques CCaMK de <i>Medicago truncatula</i> (MtCCaMK), <i>Lotus japonicus</i> (MtCCaMK), <i>Sesbania rostrata</i> (SrCCaMK), et <i>Casuarina glauca</i> (CgCCaMK).	59
Tableau 4 : Nombre de plantes étudiées lors de l'étude spatio-temporelle conférée par le promoteur <i>CgCCaMK</i> .	63
Tableau 5 : Lignées transgéniques <i>PromCgCCaMK::GUS::TermNos</i> utilisées pour suivre la cinétique d'inoculation.	63
Tableau 6 : Nombre et pourcentage de plantes <i>Casuarina glauca</i> transformées avec les constructions dérégulées <i>MtDMI3</i> ainsi qu'avec la construction témoin.	111
Tableau 7 : Nodulation en absence de <i>Frankia</i> des plantes composites de <i>Casuarina glauca</i> issues de la transformation avec les constructions dérégulées <i>MtDMI3</i> .	112
Tableau 8 : Nombre et pourcentage de plantes <i>Casuraina glauca</i> transformées avec les constructions dérégulées <i>CgCCaMK</i> ainsi qu'avec les constructions témoins.	114
Tableau 9 : Nodulation en absence de <i>Frankia</i> des plantes composites de <i>Casuarina glauca</i> issues de la transformation avec les constructions dérégulées <i>CgCCaMK</i> .	115
Tableau 10 : Analyse comparative des différentes stratégies envisagées pour le transfert de la fixation d'azote aux céréales.	129



Introduction générale

L'azote (N), quatrième constituant des plantes (après le carbone, l'hydrogène et l'oxygène) utilisé dans l'élaboration de molécules importantes comme les protéines, les acides nucléiques et la chlorophylle, est indispensable au développement des organismes vivants. Par ailleurs, ce composé est l'un des premiers éléments limitant la croissance végétale après l'eau, la lumière et le phosphore (Vitousek *et al.*, 2010), ce qui est en apparence contradiction avec les quantités d'azote existant dans l'atmosphère terrestre (78% de l'air) sous forme de diazote (N₂). La plupart de ces molécules sont difficilement accessible aux plantes car elles ne peuvent absorber cet élément que sous forme de nitrate (NO₃⁻), d'ammonium (NH₄⁺) ou d'ammoniaque (NH₃).

Certains procaryotes sont dotés d'une capacité à transformer l'azote atmosphérique sous une forme assimilable par la plante et pallier de ce fait la carence azotée dans le sol. Ces organismes sont dits « fixateurs » d'azote ou « diazotrophes ». La fixation de l'azote est réalisée par un complexe enzymatique appelé nitrogénase qui est particulièrement sensible à l'oxygène (Downie, 2005). Cette réaction enzymatique est très coûteuse en énergie, puisqu'il faut 16 molécules d'ATP pour réduire une molécule d'azote. Seule la respiration aérobie possède un rendement de production énergétique suffisant pour assurer la fixation biologique de l'azote.

Les microorganismes fixateurs d'azote appartiennent à des genres phylogénétiquement très éloignés (bactéries et archéobactéries) (Franche *et al.*, 2009). Ils fixent l'azote soit à l'état libre, soit de manière symbiotique. On peut citer comme procaryotes diazotrophes libres des cyanobactéries telles *Anabaena* et *Nostoc* qui fixent l'azote au sein de cellules spécialisées appelées hétérocystes (Kumaza et Mitsui, 1992 ; Berman-Frank *et al.*, 2007), des archaeobactéries des genres *Methanosarcina* et *Methanococcus* (Leigh, 2000), et d'autres membres appartenant aux genres *Clostridium*, *Klebsiella*, *Azospirillum*, *Azotobacter* et *Erwinia*. Cependant, les systèmes fixateurs d'azote les plus efficaces sont des symbioses associant des bactéries diazotrophes à des organismes photosynthétiques capables de transformer l'énergie lumineuse en énergie chimique.

L'introduction bibliographique de ce mémoire sera consacrée à la fixation symbiotique de l'azote et développera les connaissances actuelles sur les symbioses actinorhiziennes, en les remplaçant dans un contexte comparatif avec les symbioses Légumineuses-Rhizobium. Une revue dont je suis premier auteur est jointe à la fin de cette introduction.



Étude bibliographique

I. La fixation symbiotique d'azote

1. Les symbioses fixatrices d'azote

Au cours de l'évolution, certaines plantes ont mis en place des associations symbiotiques avec des bactéries diazotrophes, ce qui leur permetent d'absorber l'azote atmosphérique reconverti en ammoniacque (NH_3) pour former des molécules complexes nécessaires au développement du partenaire végétal.

Certaines cyanobactéries peuvent par ex. établir des associations symbiotiques avec des plantes de différents embranchements tels que des ptéridophytes (symbiose entre *Azolla*, fougère aquatique, et *Anabaena*), des gymnospermes tropicaux de la famille des cycadales (symbiose *Cycas-Nostoc*) ou des Angiospermes (*Gunnera-Nostoc*) (Rai *et al.*, 2002 ; Duhoux et Nicole, 2004). Les symbioses avec les cyanobactéries ne conduisent pas obligatoirement à la formation de structures spécialisées visibles, mais plutôt au détournement d'organes existants. C'est le cas pour l'interaction *Azolla-Anabaena* où le microorganisme fixateur d'azote est abrité dans une cavité foliaire (Lechno-Yossef et Nierzwicki-Bauer, 2002). D'autres symbioses se manifestent par la formation d'organes spécialisés ; l'interaction cyanobactéries-*Cycas* entraîne par ex. la formation de racines coralloïdes chez le partenaire végétal (Costa *et al.*, 1999 ; Costa et Lindblad, 2002).

Cependant, les principales symbioses fixatrices d'azote impliquant un microorganisme et un hôte végétal sont les endosymbioses dotées d'une capacité à former un nouvel organe appelé « nodosité » ou plus communément « nodule », généralement racinaire. Chez certaines Légumineuses telles que *Aeschynomene*, *Cassia*, *Parkinsonia* (Prin *et al.*, 1991) et *Sesbania rostrata* (Dreyfus *et al.*, 1988), des nodules caulinaires peuvent également être observés.

Dans le nodule, la plante hôte offre un micro-habitat exceptionnellement favorable au symbiote tout en lui procurant des substrats carbonés provenant de la photosynthèse, tandis que celui-ci fixe l'azote atmosphérique, le rendant assimilable par la plante. La mise en place de cet organe, développé *de novo* et facultatif pour la survie de la plante, requiert un programme d'organogenèse induit par la présence du symbiote (Kouchi *et al.* 2010 ; Mortier *et al.*, 2012).

La plus récente (60 millions d'années) et la plus étudiée des endosymbioses est celle impliquant les plantes de la superfamille des Légumineuses, ainsi que le genre

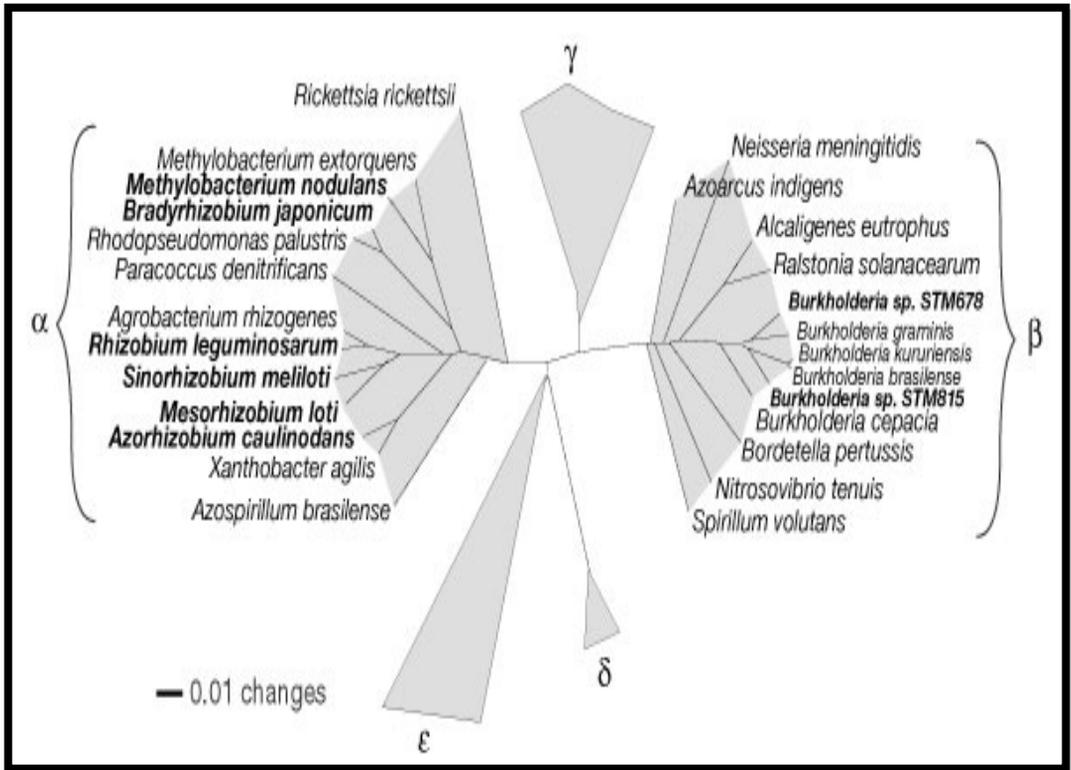


Figure 1 : Arbre représentant la relation phylogénétique entre les différents genres des Rhizobiums (D'après Moulin *et al.*, 2001).

α , β , γ , δ , et ϵ : Représentent les subdivisions des Protéobactéries.

Parasponia (non-Légumineuse) de la famille des Celtidaceae, à certaines bactéries de la famille des Rhizobiums (Kistner et Parniske, 2002 ; Lafay *et al.*, 2006). Cette dernière appartient à l'embranchement des Proteobacteria et la sous-classe des α -protéobactéries qui compte huit genres : *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Azorhizobium*, *Methylobacterium*, *Blastrobacter* et *Allorhizobium*. Il a été découvert que certaines β -protéobactéries appartenant aux genres *Burkholderia* et *Ralstonia* sont également capables de mettre en place des symbioses fixatrices d'azote avec les Légumineuses (**Figure 1**) (Moulin *et al.*, 2001 ; Gyaneshwar *et al.*, 2011).

En plus des Rhizobiums, le sol recèle des actinobactéries filamenteuses du genre *Frankia* qui peuvent infecter les racines des plantes dites actinorhiziennes (*Casuarina*, *Alnus*,...) entraînant la formation de nodules actinorhiziens (Huss-Danel, 1997 ; Wall, 2000). Ce n'est qu'à partir des années 1980 que Fessenden proposa l'appellation « actinorhizes » pour les « nodules actinorhiziens », par analogie avec le terme de mycorhizes (Prin et Duhoux, 1996). Apparues il y a environ 80 MA, les symbioses actinorhiziennes sont moins étudiées que les symbioses Légumineuses-Rhizobium, mais ont néanmoins une grande importance écologique. Par ailleurs, cette relation symbiotique avec *Frankia* présente des différences notables avec la symbiose rhizobienne, ce qui en justifie pleinement l'étude (Pawloski et Bisseling, 1996 ; Pawlowski et Sprent, 2008 ; Franche *et al.*, 2009).

2. Fixation symbiotique d'azote et développement durable

Au niveau mondial, on estime que la masse d'azote fixé par voie biologique est de 100 millions de tonnes par an (Graham et Vance, 2003), soit le même ordre de grandeur que la production d'azote fixé par l'industrie chimique à l'aide du procédé d'Haber-Bosch (1909). Il est anticipé que la production d'engrais azotés par voie chimique continue à progresser au cours du temps pour atteindre les 120 millions de tonnes en 2040 (Vance, 2001). Le processus de fabrication chimique est très coûteux, car le marché du pétrole influence le cours des engrais azotés. Il faut en effet deux tonnes de pétrole pour fabriquer une tonne d'engrais azotés.

D'après Pujic et Normand (2009), 300 kg de fertilisant coûteraient 250 euros, une somme excessivement importante pour des engrais qui, utilisés en trop grande quantité, participent à la pollution de l'environnement. Ainsi, les quantités d'azote nitrique (NO_3^-) présentes dans les différents horizons du sol déterminent des risques de pollution de la

nappe phréatique, causant ensuite de graves problèmes pour la santé humaine ou encore l'eutrophisation des milieux aquatiques (He *et al.*, 2011). L'utilisation en rotation de cultures céréalières et de Légumineuses, pour fertiliser les sols d'une année sur l'autre, permettrait d'économiser 200 à 300 millions de dollars US d'engrais azotés (Graham et Vance, 2003).

- En Algérie

Selon les données collectées pour la période 1983-1991, aussi bien pour la zone nord que pour la zone sud des hautes plaines sétifiennes, les engrais les plus utilisés sont l'ammonitrate et l'engrais phosphaté TSP (Super46) (Abdelguerfi *et al.*, 2005). Lors du forum interprofessionnel de la protection des plantes et de la fertilisation, qui s'est tenu le 15 novembre 2009 à Alger, des études ont mis en évidence que le niveau d'utilisation des engrais en Algérie est le plus faible tant au niveau du bassin méditerranéen qu'au Maghreb (Le Jeune Indépendant, 2009). D'après Cohan *et al.* (2010), le renforcement de la présence de Légumineuses dans les rotations est une piste prometteuse pour limiter la dépendance des systèmes de grandes cultures vis-à-vis des engrais. En plus de leur contribution à la fertilisation des sols, les Légumineuses sont plantées en Algérie afin de lutter contre la désertification, et contribuer à la régénération et la fixation du sol (Abdelguerfi et Ramdane, 2003).

II. Les symbioses actinorhiziennes

1. Les partenaires végétaux : les plantes actinorhiziennes

1.1. Généralités

Le nom de plantes « actinorhiziennes » a été introduit en 1978, lors d'un symposium à l'Université de Harvard dans le Massachusetts. Il a été attribué à toutes les plantes susceptibles d'établir une symbiose fixatrice d'azote avec des actinomycètes du genre *Frankia* (Benson et Silvester, 1993 ; Wheeler *et al.*, 2008 ; Chaia *et al.*, 2010). L'association symbiotique avec *Frankia* aboutit le plus souvent à l'apparition de nodules racinaires. Dans des conditions climatiques particulières caractérisées par une forte

Tableau 1 : Taxonomie, et répartition géographique des plantes actinorhiziennes (D'après Dawson, 2008).

Famille	Genre	Nombre total d'espèces	Nombre d'espèces nodulantes	Origine géographique
<i>Betulaceae</i>	<i>Alnus</i>	47	47	Europe, Asie, Amérique du Nord, Les Andes
<i>Casuarinaceae</i>	<i>Allocasuarina</i>	59	54	Australie
	<i>Casuarina</i>	18	18	Australie, Asie Tropicale, Pacifique Sud-Ouest
	<i>Ceuthostoma</i>	2	2	Océanie
	<i>Gymnostoma</i>	18	18	Australie, Nouvelle-Calédonie, Sumatra
<i>Coriariaceae</i>	<i>Coriaria</i>	16	16	Méditerranée, Asie, Nouvelle-Zélande, Amérique du Nord
<i>Datisceae</i>	<i>Datisca</i>	2	2	Asie, Amérique du Nord, Europe
<i>Elaeagnaceae</i>	<i>Elaeagnus</i>	45	35	Asie, Amérique du Nord,
	<i>Hippophae</i>	3	2	Europe Europe, Asie
	<i>Shepherdia</i>	3	2	Amérique du Nord
<i>Myricaceae</i>	<i>Comptonia</i>	1	1	Amérique du Nord
	<i>Myrica</i>	60	28	Tous les continents sauf l'Australie
<i>Rhamnaceae</i>	<i>Adolphia</i>	1	1	Amérique du Nord
	<i>Ceanothus</i>	55	31	Amérique du Nord
	<i>Colletia</i>	17	4	Amérique du Sud
	<i>Discaria</i>	10	5	Amérique du Sud, Australie, Nouvelle-Zélande
	<i>Kentrothammus</i>	2	2	Amérique du Sud
	<i>Talguenea</i>	1	1	Amérique du Sud
	<i>Trevoa</i>	6	2	Amérique du Sud
<i>Rosaceae</i>	<i>Cercocarpus</i>	20	4	Mexique, Sud-Ouest des Etats-Unis
	<i>Chamaebatia</i>	2	1	Sierra Nevada
	<i>Cowania</i>	25	1	Mexique, Sud-Ouest des Etats-Unis
	<i>Dryas</i>	3	1	Antarctique
	<i>Purshia</i>	4	2	Amérique du Nord-Ouest

humidité, des nodules caulinaires peuvent être observés à 130-150 cm au dessus du sol chez *Casuarina cunninghamiana* (Prin *et al.*, 1991).

À l'exception du genre *Datisca* qui est une herbacée, les plantes actinorhiziennes sont des arbres et des arbustes appartenant au clade des Angiospermes. On distingue environ 260 espèces de plantes actinorhiziennes réparties en 8 familles et comprenant 24 genres (**Tableau 1**), parmi lesquelles on trouve le Filao (*Casuarina equisetifolia*), l'olivier de Bohême (*Elaeagnus angustifolia*), le myrte des marais (*Myrica gale*) et l'aulne (*Alnus* sp.) (Benson et Silvester, 1993).

1.2. Répartition géo-écologique

Les espèces actinorhiziennes sont réparties sur tous les continents à l'exception de l'Antarctique. En 1977, Silvester a fourni une carte montrant la répartition géographique des différents genres de plantes actinorhiziennes, dont certaines espèces ont été introduites par l'homme, celui-ci l'ayant fait entrer depuis des siècles dans ses pratiques culturelles et culturelles (horticoles et reforestation comme *Casuarina* sp. et *Elaeagnus* sp.). De ce fait, leur répartition géo-écologique est assez disparate ; certaines espèces colonisent les forêts tempérées et tropicales, d'autres les zones alpines, les milieux semi-arides (*Cercocarpus* et *Allocasuarina*) et les zones lacustres (*Alnus* sp. et *M. gale*) (Moiroud, 1996 ; Dawson, 2008 ; Bargali, 2011). D'après les recherches effectuées par Gtari et Dawson (2011), le continent africain regroupe 6 familles, 9 genres et 38 espèces de plantes actinorhiziennes parmi lesquelles 21 espèces sont natives (comme *A. glutinosa*) et 17 espèces sont exotiques (comme les Casuarinacées).

Espèces pionnières par excellence et espèces édificatrices en raison de leur rôle dans l'évolution de la roche mère vers un sol véritable, les plantes actinorhiziennes poussent dans des sols perturbés ou pauvres en azote : sols miniers, dunes de sables, toundra arctique, moraines glaciaires, et dépôts volcaniques (Moiroud, 1996 ; Bargali, 2011). L'aspect morphologique de quelques plantes actinorhiziennes est représenté sur la **Figure 2**.

1.3. Importance et utilisation

La symbiose actinorhizienne constitue, après la symbiose Légumineuses-Rhizobium, le deuxième grand groupe de symbioses racinaires fixatrices d'azote chez les plantes. Elle

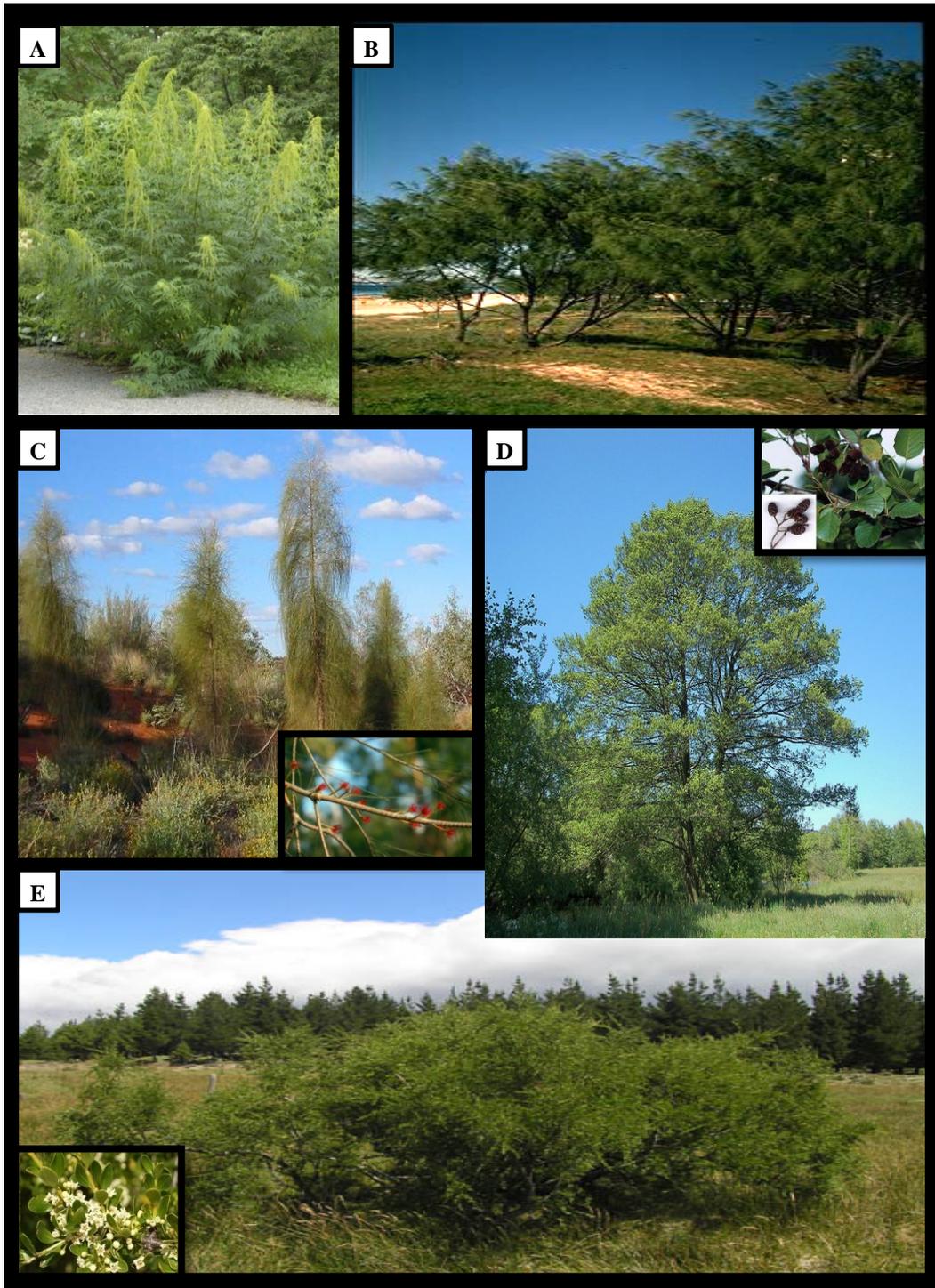


Figure 2 : Aspect morphologique de quelques plantes actinorhiziennes.

A : *Datisca cannabina* ; **B :** *Casuarina equisetifolia* ; **C :** *Allocasuarina decaisneana* ;
D : *Alnus glutinosa* ; **E :** *Discaria trinervis*.

présente en effet un taux de fixation d'azote équivalent à celui de la symbiose rhizobienne, allant jusqu'à 300 kg N₂/ha/an pour l'aulne rouge et 288 kg N₂/ha/an chez des plantations de *Casuarina* en Egypte (Zavitovski et Newton, 1968 ; Diem et Dommergues, 1990). Les plantes actinorhiziennes ont un rôle écologique important et sont largement utilisées en agroforesterie pour enrichir les sols et améliorer les rendements des cultures associées (Zhong *et al.*, 2010). Elles sont également impliquées dans des programmes de reboisement, de mise en valeur de zones désertiques, de réhabilitation de toutes sortes de sites dégradés par l'activité humaine, de production de bois de chauffage et de pâte à papier, ou encore utilisées comme plantes ornementales. D'autres espèces comme *Hippophae rhamnoides* sont cultivées pour des fins phytopharmaceutiques et nutritionnelles (contenu en vitamine C) (Ribeiro *et al.*, 2011).

1.4. La famille des Casuarinacées

La famille des Casuarinacées appartient à l'ordre des Fagales, regroupe 4 genres, *Allocasuarina*, *Casuarina*, *Ceuthostoma* et *Gymnostoma*, et 90 espèces dont l'aire d'origine s'étend de l'Australie aux Iles du Pacifique et au sud-est de l'Asie (National Research Council, 1984 ; Dommergues *et al.*, 1999). Ces plantes sont caractérisées par des feuilles réduites à des écailles verticillées cornées leur permettant de résister à des climats chauds et secs. Ces espèces arbustives comprennent des essences tropicales, subtropicales ou méditerranéennes, où elles peuvent croître sur les différents types de sols et à différentes altitudes (0 à 3000 m) (National Research Council, 1984 ; Diouf *et al.*, 2008). On les retrouve sur les sites marécageux, les bords des mares, les estuaires, les mangroves, les forêts ouvertes, parfois près des fronts de plage. On peut citer l'ex. de *C. collina*, espèce endémique de la Nouvelle-Calédonie qui se développe sur des sols dépourvus de matière organique, ainsi que sur les sols miniers qu'elle contribue à fixer en profondeur (Jaffré *et al.*, 1997). Des botanistes ont découvert des Casuarinas sur l'île Anak Krakatau en Indonésie, issue de l'éruption du Krakatoa en 1883, ce qui montre le caractère pionnier de ces arbres (Pujic et Normand, 2009 ; Kucho *et al.*, 2010).

D'autres propriétés intéressantes caractérisent ces arbres actinorhiziens (Diouf *et al.*, 2008). En effet, ces plantes aux usages multiples ont une croissance rapide, comprise entre 3 à 5 m par an, leur permettant d'atteindre 40 m de hauteur. Cette croissance rapide est liée à la fois à l'interaction symbiotique avec *Frankia* qui permet de pallier une éventuelle

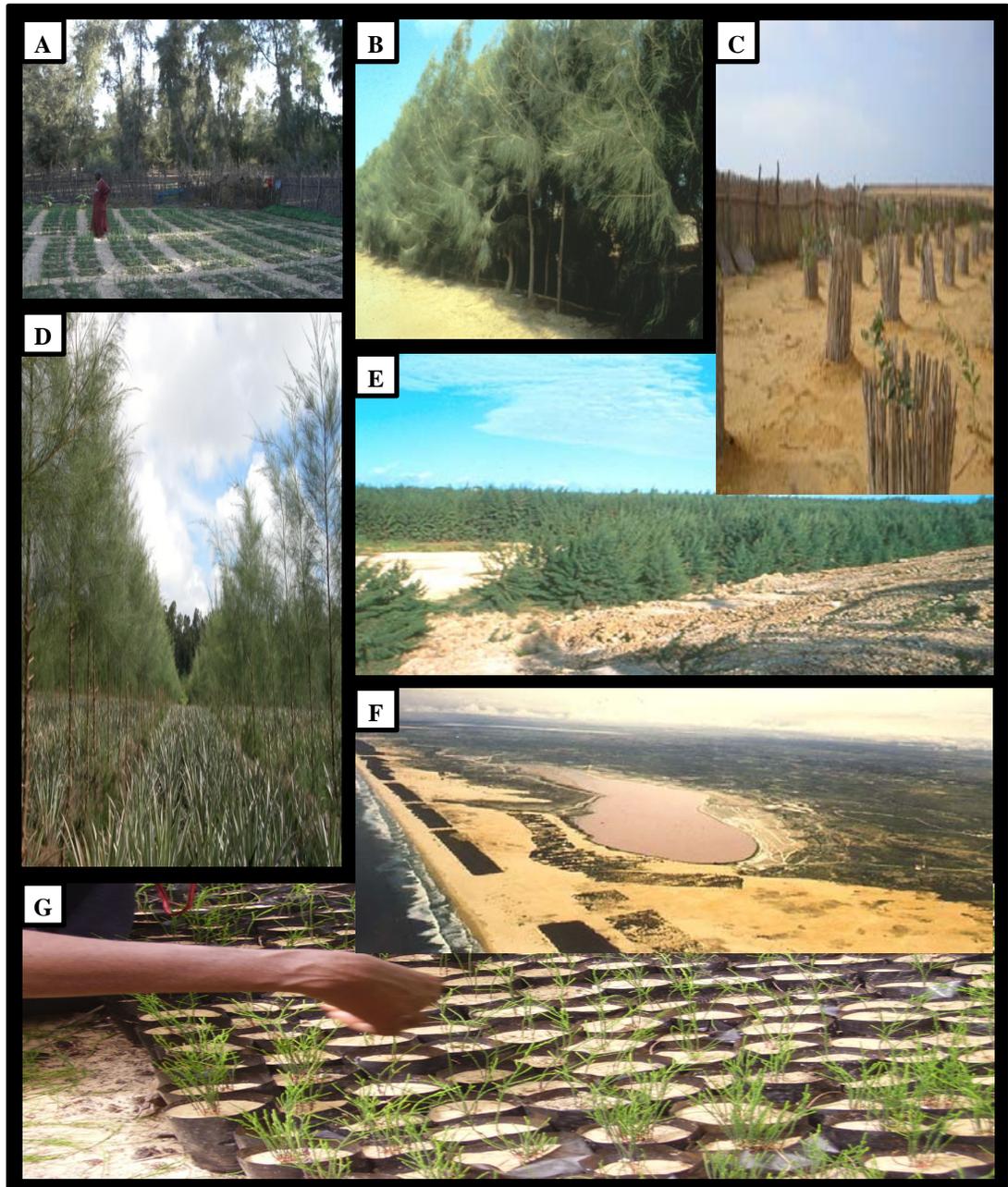


Figure 3 : Plantation et utilisation des Casuarinacées.

A : Protection des cultures maraîchères au Sénégal par les Filaos ; **B** : Utilisation de *C. glauca* comme brise-vent en Egypte ; **C** : Utilisation de *C. equisetifolia* en Algérie pour la restauration des sols dégradés ; **D** : Utilisation de *Casuarina* en agroforesterie en Chine ; **E** : Utilisation de *C. collina* en Nouvelle-Calédonie pour la restauration des sols dégradés ; **F** : Plantation de *Casuarina* au Sénégal pour la fixation des dunes de sable ; **G** : Filaos en pépinière au Sénégal.

carence en azote des sols, et à des interactions avec des champignons ecto- et endomycorhiziens qui favorisent l'acquisition du phosphate, protègent les racines de certains pathogènes et contribuent à une meilleure absorption de l'eau (Diem, 1996). Par ailleurs, en condition de carence en fer ou en phosphate, certaines espèces de Casuarinas comme *C. glauca* peuvent différencier des racines courtes et compactes appelées racines protéoïdes, qui favorisent l'assimilation de ces éléments (Duhoux *et al.*, 2000 ; Lambers *et al.*, 2006). Certaines espèces sont également résistantes à certains stress abiotiques comme les métaux lourds, la sécheresse (*Allocasuarina decaisneana*), ou la salinité (*C. glauca* et *C. obesa*) (Sayed, 2011).

Grâce à leurs propriétés remarquables, les Casuarinacées jouent un rôle environnemental très important dans les régions arides et semi-arides, en particulier *C. equisetifolia*, *C. cunninghamiana* et *C. glauca* (**Figure 3**). Ces espèces sont largement utilisées sous forme de barrières arbustives pour préserver les cultures vivrières du vent et de l'ensablement, et pour protéger les zones côtières des typhons et des tsunamis. Des barrières vertes de 9700 ha et 800000 ha ont été respectivement plantées au Sénégal et au Sud de la Chine pour stabiliser les dunes du littoral et protéger les cultures (Mailly *et al.*, 1994 ; Zhong *et al.*, 2010 ; Ndoye *et al.*, 2011). En 2007, un projet financé par la Banque mondiale a été initié en Inde pour renouveler les plantations de *C. equisetifolia* dans les zones côtières des provinces de Tamil Nadu et du Kerala. Ces arbres avaient en effet démontré leur rôle protecteur lors du tsunami de décembre 2004 (Abraham, 2005 ; Braatz *et al.*, 2006 ; Vikram Reddy et Subramanean, 2010). Les Filaos interviennent aussi pour lutter contre l'érosion des sols et prévenir la désertification des terrains ou enrichir le sol par l'apport de litière riche en azote et matières organiques (Benson et Silvester, 1993).

Afin de lutter contre la désertification en Algérie, le programme du « barrage vert » a été lancé dans les années 70, consistant en une bande boisée de 1200 kilomètres de long sur 20 kilomètres de large. Parmi les espèces choisies, on trouve l'olivier de bohème et les Casuarinas (Bensaïd, 1995). En Algérie, les Casuarinas sont souvent utilisés comme brise-vent associés aux cultures maraîchères, pour la réhabilitation des anciennes carrières, pour prévenir les glissements de terrains grâce à leur système racinaire, et aussi comme plantes ornementales en zone urbaine.

Tableau 2 : Origines de quelques souches de *Frankia* (D'après Van Ghelue *et al.*, 1997).

Souches de <i>Frankia</i>	Plante hôte	Origine géographique
ArI3	<i>Alnus rubra</i>	Oregon, USA
AgP	<i>A. glutinosa</i>	Pays-Bas
AgKG'84/4	<i>A. glutinosa</i>	Allemagne
Avcll	<i>A. viridis crispa</i>	Ontario, Canada
Thr	<i>Casuarina cunninghamiana</i>	Egypte
CcI3	<i>C. cunninghamiana</i>	Floride, USA
CeI2	<i>C. equisetifolia</i>	Floride, USA
CeFl-82	<i>C. equisetifolia</i>	Florida, USA
Mgl8	<i>Myrica gale</i>	Ontario, Canada

2. Le partenaire bactérien : *Frankia*

2.1. Isolement

C'est en 1959 que Pommer décrit pour la première fois une culture pure de *Frankia* obtenue à partir des nodules d'*Alnus glutinosa*, mais son travail n'a pas été couronné de succès suite à la perte de la souche bactérienne (Normand *et al.*, 1996). À la différence des Rhizobiums qui ont été isolés depuis 1800, la première souche de *Frankia* CpI1 a été isolée en 1978 à partir de *Comptonia peregrina* (*Myricaceae*) (Callaham *et al.*, 1978). Il faudra attendre 1982 pour que Diem et ses collaborateurs réussissent à obtenir une culture pure de *Frankia* symbiotique de *Casuarina equisetifolia*. Le **Tableau 2** présente l'origine de quelques souches de *Frankia* (Van Ghelue *et al.*, 1997).

Cependant, certaines souches de *Frankia* ne peuvent être cultivées à l'état libre ; c'est le cas pour les symbiotes présents dans les nodules des *Coriariaceae*, *Datisceae*, *Rosaceae* et de *Ceanothus* (*Ramnaceae*) (Benson et Silvester, 1993 ; Normand *et al.*, 1996 ; Hahn, 2008). Récemment, l'isolement d'actinobactéries des genres *Nocardia*, *Streptomyces* et *Micromonospora* a été décrit à partir de nodules de plusieurs plantes hôtes : *C. equisetifolia* (Valdés *et al.*, 2005), *Coriaria myrtifolia* (Trujillo *et al.*, 2006), *Discaria trinervis* (Solans et Vobis, 2003), *A. glutinosa*, *C. glauca* et *E. angustifolia* (Ghodhbane-Gtari, 2010).

2.2. Taxonomie et spécificité d'hôte

Les bactéries responsables de la formation des actinorhizes ont été classées dans le phylum des actinobactéries qui représente l'une des plus grandes unités taxonomiques du domaine des Procaryotes (Garrity *et al.*, 2003). *Frankia* est un actinomycète de la famille des *Frankiaceae*, de l'ordre des actinomycétales, du sous-ordre des *Frankineae*, et de la sous-classe des *Actinobacterideae*. Ces bactéries telluriques ont été découvertes en 1886 par Brunchrost et classifiées plus tard comme actinomycètes filamenteux à croissance lente par Krebber en 1932 (Lechevalier, 1994).

Frankia a été caractérisé au niveau taxonomique grâce à une analyse comparative des séquences des gènes *nifH* codant la nitrogénase réductase, *glnII* qui code la glutamine synthétase II (Cournoyer et Lavire, 1999 ; Hahn, 2008 ; Nouioui *et al.*, 2011) et du gène

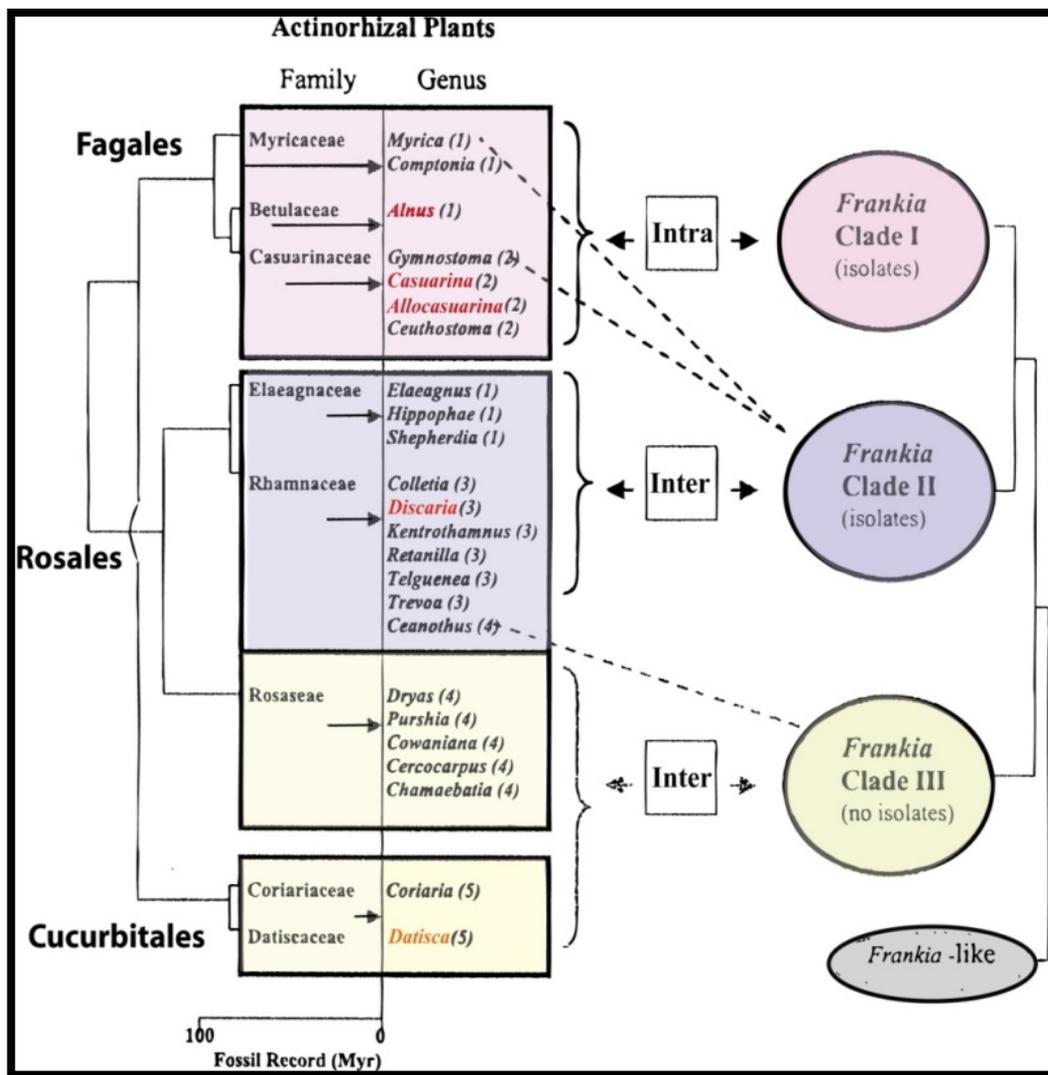


Figure 4 : Étude phylogénique des plantes actinorhiziennes et des souches de *Frankia* (D'après Wall, 2000).

Intra : Infection intracellulaire ; **Inter** : Infection intercellulaire.

Les Fagales, Cucurbitales, et Rosales sont 3 ordres du clade des Eurosids I, au sein desquels certaines espèces interagissent avec *Frankia*.

marqueur le plus utilisé en taxonomie bactérienne, qui est le gène de l'ARN ribosomal 16S (Normand *et al.*, 1996). Les résultats de ces études taxonomiques ont permis de répartir les différentes souches de *Frankia* dans 4 groupes différents ou « clusters ».

Les bactéries appartenant au cluster I infectent les plantes de la famille des *Betulaceae*, *Myricaceae* et *Casuarinaceae*, et sont caractérisées par un haut niveau de spécificité d'hôte. On cite comme ex. la souche CcI3 symbionte du Filao qui ne peut infecter que le genre *Casuarina* (Torrey et Racette, 1989). Les *Frankia* du cluster II ont un large spectre d'hôte, et sont capables d'infecter les membres des familles des *Myricaceae*, *Rhamnaceae*, *Elaeagnaceae*, les *Gymnostoma* et la famille des *Casuarinaceae*. Les plantes appartenant aux familles des *Coriariaceae*, *Datisceae*, *Rosaceae* et *Rhamnaceae* (*Ceanothus*) sont infectées par les *Frankia* du cluster III (non encore isolées). Le cluster IV regroupe des souches de *Frankia* atypiques (non-infectives et/ou non-fixatrices d'azote) isolées à partir des nodules de plusieurs plantes actinorhiziennes telles que *Coriaria*, *Datisca* et *Purshia*. Ramirez-Saad et son équipe (1998) ont démontré que les nodules racinaires de *Ceanothus caeruleus* contiennent, en plus de *Frankia* typiques, des actinobactéries phylogénétiquement liées mais non-fixatrices d'azote et incapables de nodulation. La **Figure 4** représente des arbres phylogénétiques incluant des *Frankia* de tous les groupes de plantes actinorhiziennes (Wall, 2000).

2.3. Physiologie et morphologie

Frankia est un microorganisme hétérotrophe, chimioorganotrophe, microaérophile, mésophile et neutrophile (Lechevalier, 1994). À la différence des Rhizobiums (bactéries à Gram négatif), *Frankia* est une bactérie à Gram positif, filamenteuse, capable de fixer l'azote de manière libre au sein de vésicules spécialisées, ou de manière symbiotique (Pawlowski et Bisseling, 1996). Les isolats de *Frankia* peuvent être cultivés en milieu liquide, mais très peu de souches sont capables de croître en milieu solide. Elles forment alors des colonies en forme d'étoile de mer, ou des colonies diffuses avec un réseau lâche d'hyphes, ou encore des colonies compactes avec des hyphes poussant profusément en périphérie. Du fait de leur croissance radiale, les bactéries du genre *Frankia* ont longtemps été considérées comme des champignons (**Figure 5 A**).

In vivo comme *in vitro*, l'actinomycète présente trois types de structures (Normand *et al.*, 1996) (**Figure 5 B-C**) :

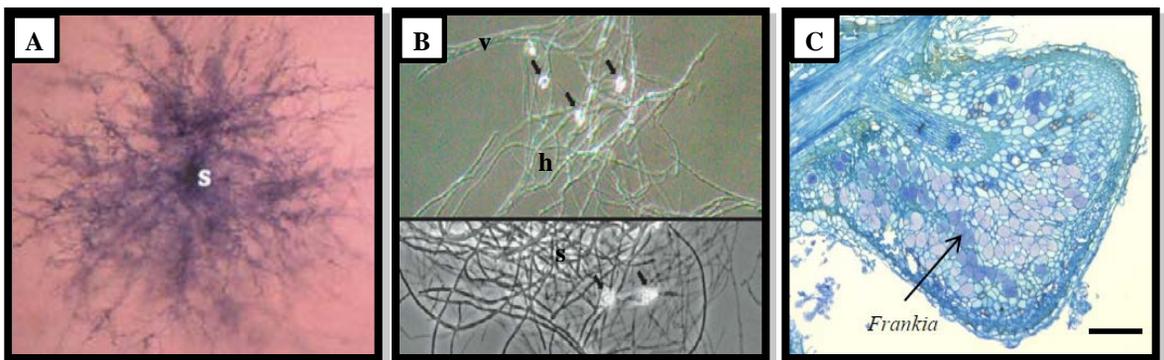


Figure 5 : Observation de *Frankia* à l'état libre et à l'état symbiotique.

A : Colonie de *Frankia* sur gélose. La bactérie filamenteuse développe des hyphes de façon radiale autour de la spore (s) (x200) ; **B** : Anatomie de *Frankia* (souche ACN1a) à l'état libre. Trois structures caractéristiques de *Frankia* : les vésicules (v), les hyphes (h) et les sporanges (s) (x1000) ; **C** : Coupe longitudinale d'un lobe nodulaire actinorhizien envahi par les hyphes de *Frankia* (barre d'échelle = 200 μ m).

A : D'après Duhoux et Nicole, 2004 ; **B** : D'après Kucho *et al.*, 2010 ; **C** : D'après Cesari, 2009.

- Les hyphes (ou filaments) ramifiés qui constituent la forme végétative et forment un mycélium.
- Les diazovésicules qui sont des cellules sphériques dans lesquelles s'effectue le processus de fixation biologique de l'azote. Elles sont différenciées en condition de carence azotée et observées en position terminale des hyphes. La présence de couches lipidiques d'hopanoïdes autour des vésicules assure la protection du complexe nitrogénase contre une inactivation par l'oxygène (Tisa et Ensign, 1987 ; Silvester *et al.*, 2008).
- Les sporanges multiloculaires sont formés en condition d'épuisement du milieu de culture et dans les nodules âgés. Ils constituent une forme reproductive et de résistance du microorganisme (Schwintzer, 1990).

2.4. Connaissances des génomes de *Frankia*

Le génome de *Frankia* est caractérisé par une teneur élevée en Guanine+Cytosine (GC), soit plus de 70% (Benson et Silvester, 1993 ; Normand *et al.*, 1996). En 2007, trois souches de *Frankia* ont été séquencées, CcI3, ACN14a, et EAN1pec, respectivement symbiotes de *C. glauca*, *A. glutinosa* et *E. angustifolia*. Les résultats mettent en évidence une taille des génomes extrêmement variable, allant de 5,4 Mb (avec près de 5300 gènes) pour CcI3, à 9,0 Mb (9000 gènes) pour EAN1pec (Normand *et al.*, 2007 ; Mastrorunzio *et al.*, 2009 ; Pujic et Normand, 2009). Récemment, la souche de *Frankia* symbiote obligatoire de *Datisca glomerata* a été séquencée. Son génome circulaire a une taille de 5,32 Mb (Persson *et al.*, 2011).

La recherche de séquences homologues aux gènes *nodA*, *B*, *C* de *Rhizobium* impliqués dans la synthèse des lipo-chito-oligosaccharides (ou facteurs Nod) servant de molécule signal lors de l'interaction symbiotique avec les Légumineuses, a révélé l'absence d'homologie avec *nodA* codant une acyl-transférase, dans les souches CcI3, ACN14a, et EAN1pec (Normand *et al.*, 2007 ; Alloisio *et al.*, 2010). Des séquences présentant entre 35 et 45% d'homologie avec *nodB* (codant une déacétylase) ont été identifiées et des séquences homologues à 25-42% ont été observées pour *nodC* codant une N-acétyl-glucosamine transférase. Ces résultats suggèrent que les molécules signal de *Frankia* pourraient être de nature différente de celle des facteurs Nod de *Rhizobium*. Neuf autres souches de *Frankia* sont en cours de séquençage (Luis Tisa et collaborateurs, University of

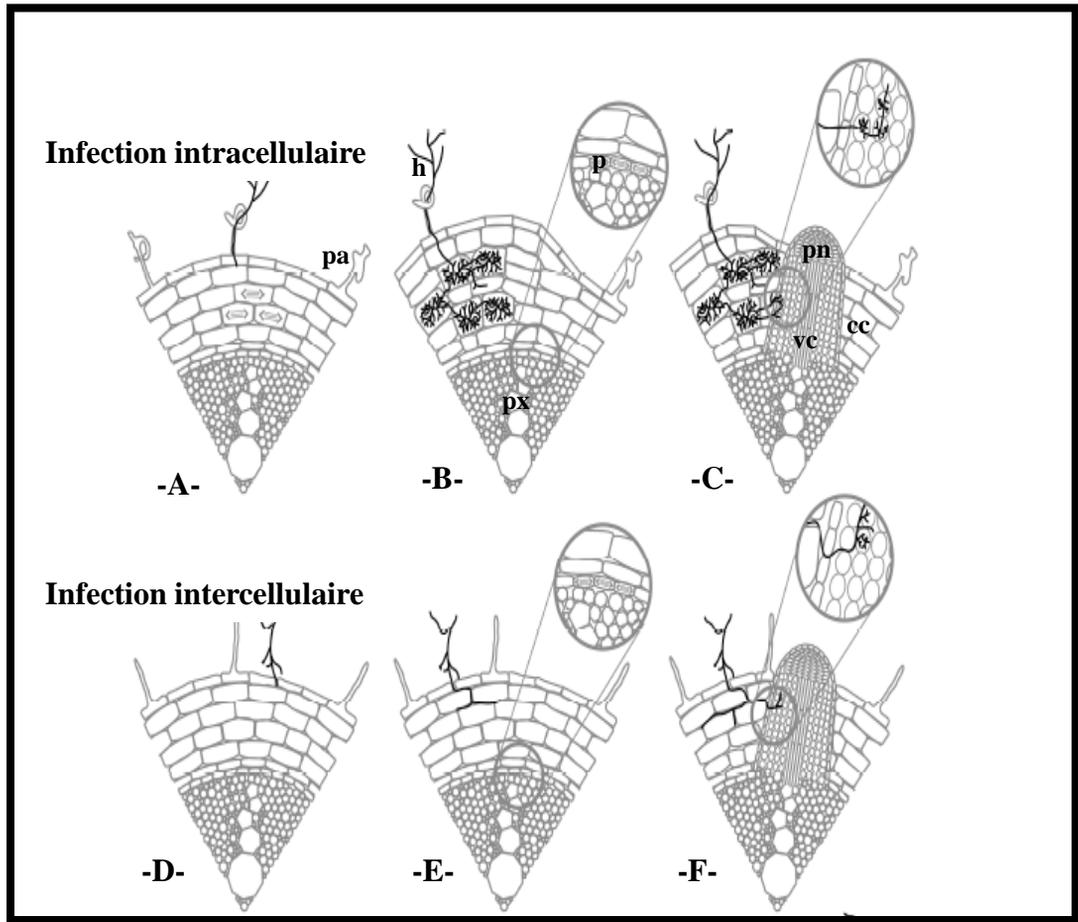


Figure 6 : Modes d'infection et organogenèse d'un lobe nodulaire chez les plantes actinorhiziennes (D'après Perrine-Walker *et al.*, 2011).

A : Pénétration de l'hyphes par le poil absorbant ; **B** : Formation de pré-nodule ; **C** : Primordium nodulaire infecté par *Frankia* ; **D** : Pénétration de l'hyphes à travers la lamelle moyenne ; **E** : Progression des hyphes dans les espaces intercellulaires ; **F** : Infection du primordium nodulaire. (cc) : cellules corticales ; (h) : hyphes de *Frankia* ; (p) : péricycle ; (pa) : poil absorbant ; (pn) : primordium nodulaire ; (px) : pôle de xylème ; (vc) : vascularisation centrale.

New Hampshire, résultats non publiés).

Encore peu de données sont disponibles pour ces microorganismes du fait de leur croissance lente (temps de génération environ égal à 15 h) et de l'absence d'outils d'analyse génétique. Les tentatives de transduction (transfert de gènes par un bactériophage), conjugaison (transfert par un plasmide conjugatif), transformation par électroporation ou encore de mutagenèse par transposon qui permettraient de révéler les gènes clés du processus de nodulation chez le partenaire bactérien, ont échoué (Cournoyer et Normand, 1992 ; Benson et Silvester, 1993 ; Myers et Tisa, 2003 ; Normand et Mullin, 2008 ; Franche *et al.*, 2009). Il en est de même des expériences entreprises pour compléter avec de l'ADN de *Frankia* des mutants de *Rhizobium* affectés dans le processus de nodulation. Les études du transcriptome et du protéome du microorganisme apportent cependant des éléments d'information intéressants (Alloisio *et al.*, 2007 et 2010). Malheureusement, l'absence de système d'analyse génétique de l'actinomycète constitue une limitation majeure pour l'étude des symbioses actinorhiziennes, et plus particulièrement pour l'analyse et la validation fonctionnelle des gènes candidats bactériens potentiellement impliqués dans le processus symbiotique (Lavire et Cournoyer, 2003 ; Normand et Mullin, 2008 ; Kucho *et al.*, 2010).

3. Établissement de la symbiose actinorhizienne

3.1. *Processus d'infection*

Deux modes d'infection ont été décrits chez les plantes actinorhiziennes : la voie intracellulaire (pénétration par le poil absorbant) et la voie intercellulaire (pénétration entre les cellules épidermiques des racines) (**Figure 6**) (Duhoux *et al.*, 1996 ; Perrine-Walker *et al.*, 2011 ; Franche et Bogusz, 2012). Selon Berry et Sunnel (1990), le type d'infection dépend de la plante hôte, une même souche de *Frankia* pouvant, selon l'espèce végétale, induire l'organogenèse nodulaire par un processus d'infection intra- ou intercellulaire.

3.1.1. Infection intracellulaire

L'infection de type intracellulaire est caractéristique des genres *Myrica*, *Comptonia*, *Alnus*, *Casuarina* et *Allocasuarina* (Callaham *et al.*, 1979). Elle commence par une déformation des poils racinaires (dans la zone d'élongation) dans les premières 24 h après

inoculation avec *Frankia* (Van Ghelue *et al.*, 1997). Suivant les espèces, tous les poils racinaires (par ex. *Casuarina*) (Torrey, 1976) ou seulement quelques-uns (par ex. *Comptonia*) se courbent, et seuls les jeunes poils racinaires en croissance et pas encore complètement différenciés sont aptes pour l'infection (Callaham *et al.*, 1979).

Le(s) facteur(s) déformant(s) de *Frankia* demeure(nt) à ce jour de nature inconnue (Franche et Bogusz, 2012). Les travaux de Cérémonie *et al.* (1999) ont mis en évidence que ces facteurs sont secrétés dans le milieu de culture de *Frankia*, inductibles par des exsudats racinaires, actifs à une dilution de 10^{-6} , et leur synthèse est inhibée par des ions nitrate ou ammonium. Les analyses biochimiques réalisées sur la souche ACN14 symbiotique de l'aune montrent que les facteurs déformants sont thermostables (pas de perte d'activité après 20 min à 120°C), de petite taille (moins de 10 kDa), hydrophiles et non dégradés par des pronases et certaines chitinases.

Après l'échange de signaux entre la plante hôte et le microorganisme compatible, les filaments de *Frankia* digèrent partiellement la paroi primaire dans la zone de courbure des poils absorbants et pénètrent par invagination à l'intérieur des cellules végétales (**Figure 6 A**) (Callaham et Torrey, 1977) où ils sont encapsulés à l'extrémité du poil racinaire par le plasmalemme de l'hôte et par une matrice polysaccharidique d'origine végétale, constituant ainsi une structure équivalente au cordon d'infection observé chez les Légumineuses (Berg, 1999). Ce cordon d'infection permet la progression des hyphes de l'actinomycète dans les cellules corticales de la plante hôte.

Suite à l'infection par *Frankia* des divisions sont observées dans les cellules corticales de la racine, dans une zone proche des poils absorbants infectés, ce qui entraîne l'apparition d'une protubérance à la surface de la racine, appelée « prénodule » (**Figure 6 B**). Les filaments de *Frankia* croissent et se ramifient dans ce massif cellulaire et envahissent certaines cellules nouvellement formées, provoquant leur hypertrophie (Duhoux *et al.*, 1996 ; Laplaze *et al.*, 2000a). La fonction de ce prénodule n'est pas encore très bien comprise ; il pourrait représenter une forme ancestrale de nodule proche de celle observée chez les Légumineuses. Ce prénodule fixe l'azote et constitue une étape obligatoire dans la formation du lobe nodulaire, mais il n'évolue jamais en nodule (Laplaze *et al.*, 2000a). En effet, le primordium nodulaire est initié suite à des divisions observées dans les cellules du pérycyle situées en face d'un pôle de protoxylème et près du site d'infection (**Figure 6 C**). Ce primordium a une structure de racine ; il croît en traversant des régions du cortex de la racine qui ne sont pas encore infectées par le microorganisme.

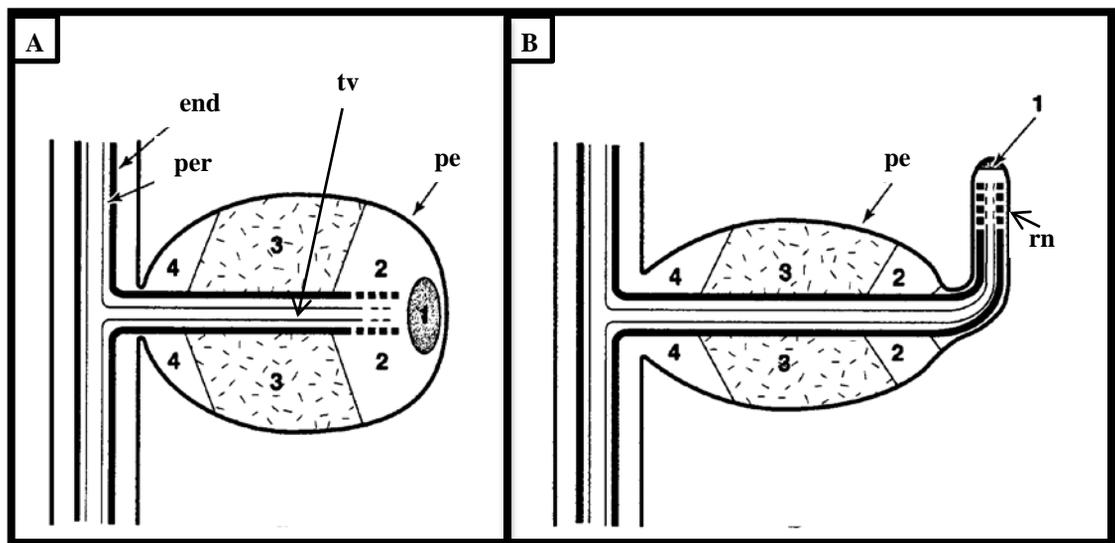


Figure 7 : Coupe longitudinale d'un lobe nodulaire actinorhizien (D'après Franche *et al.*, 1998).

A : Nodule dépourvu de racine nodulaire (*Alnus* sp.) ; **B** : Nodule avec racine nodulaire (*Casuarina* sp.). (end) : endoderme ; (pe) : périderme ; (per) : péricycle ; (rn) : racine nodulaire ; (tv) : tissu vasculaire central ; (1) : Zone méristématique ; (2) : Zone d'infection ; (3) : Zone de fixation ; (4) : Zone de sénescence.

La dernière phase du processus est l'infection du lobe nodulaire en formation. Les hyphes progressent depuis les cellules infectées du prénodule, en direction du lobe nodulaire, et envahissent progressivement les cellules corticales du jeune lobe nodulaire. Ces cellules infectées vont peu à peu s'élargir et leur paroi va s'enrichir en lignine. La mise en place de l'activité fixatrice d'azote s'accompagnera en général par la différenciation de vésicules chez *Frankia*. Chez quelques espèces cependant, comme dans la famille des Casuarinacées, il n'y a pas différenciation de vésicules au sein des nodules.

3.1.2. Infection intercellulaire

L'infection intercellulaire est considérée comme plus primitive (Madsen *et al.*, 2010). Elle a été décrite chez plusieurs espèces dont les genres : *Eleagnus*, *Hippophae*, *Shepherdia*, *Ceanothus*, *Cercocarpus* et l'arbuste de Patagonie *Discaria* (Miller et Baker, 1986 ; Valverde et Wall, 1999 ; Franche et Bogusz, 2012).

Ce mode d'infection débute par la pénétration de *Frankia* à travers la lamelle moyenne entre deux cellules du rhizoderme de la racine et les hyphes progressent de façon intercellulaire dans l'apoplaste (**Figure 6 D-E**). Aucune déformation, ni ramification des poils racinaires, ni même formation de prénodule, n'est associée à ce type d'infection. Comme pour l'infection intracellulaire, des divisions sont induites au niveau du péricycle et donnent naissance à un primordium nodulaire. Les hyphes deviennent intracellulaires en pénétrant, après encapsulation, dans les cellules (**Figure 6 F**).

3.2. *Structure, morphologie et originalité de l'actinorhize*

3.2.1. Structure de l'actinorhize

Le développement du primordium infecté donne naissance au lobe nodulaire qui se présente comme une structure oblongue avec un méristème apical, un cylindre central vascularisé non-infecté, et un cortex organisé en quatre zones qui correspondent aux différents stades du processus d'infection (**Figure 7**) (Franche *et al.*, 1998 ; Pawlowski, 2009) :

- La zone I correspond à la zone méristématique dépourvue de *Frankia*. Cette zone est responsable de la croissance indéterminée du lobe nodulaire.
- La zone II adjacente au méristème apical est la zone d'infection dans laquelle des

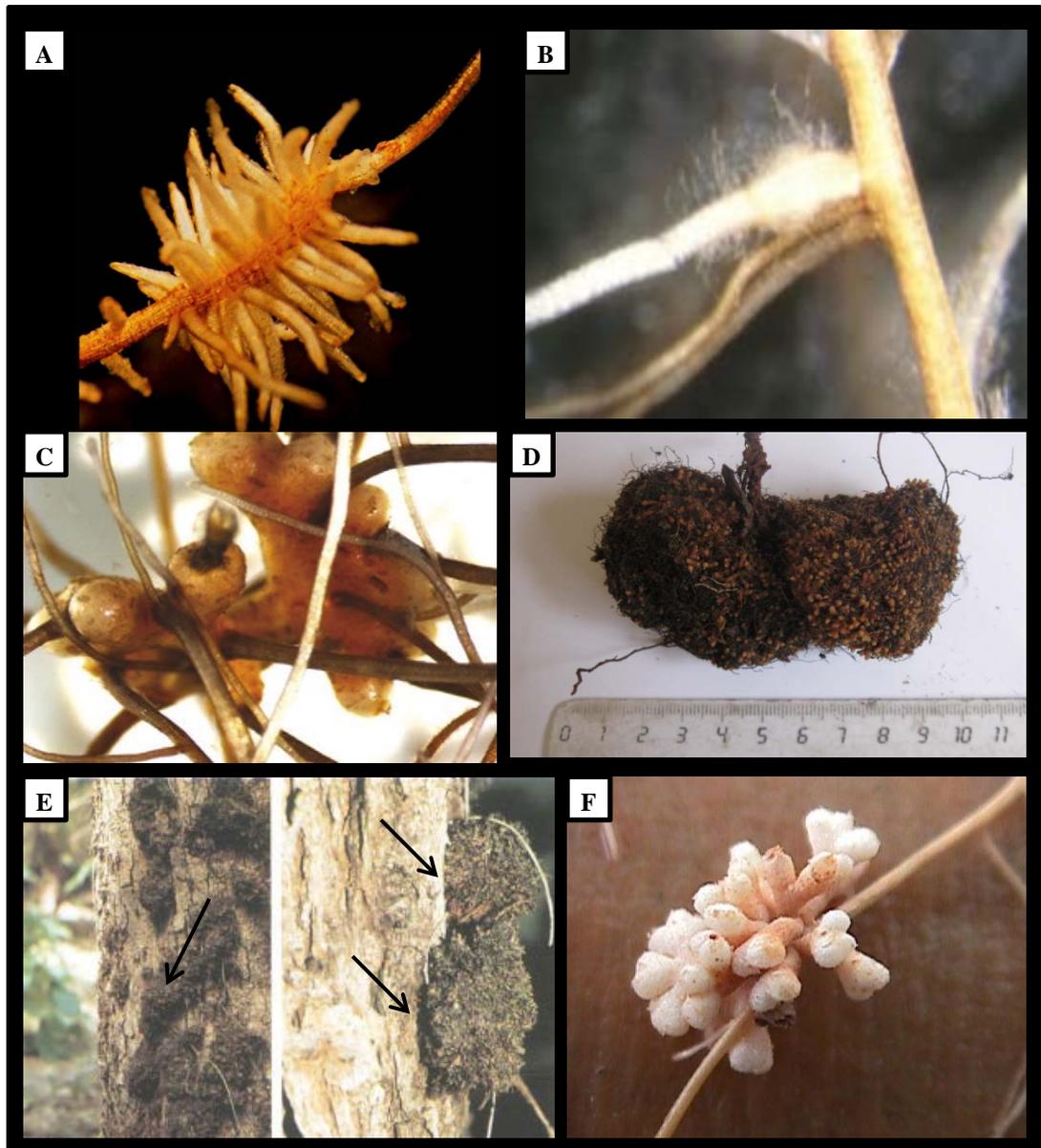


Figure 8 : Plasticité racinaire chez les plantes actinorhiziennes en cas de carence en éléments nutritifs.

A : Racine protéoïde de *Casuarina glauca* (carence en phosphate) ; **B** : Prénodule dans la racine latérale de *C. glauca* (carence en azote et infection par *Frankia*) ; **C** : Nodule coralloïde de *C. glauca* avec racines nodulaires ; **D** : Nodules âgés de *C. glauca* ; **E** : Nodules caulinaires de *C. cunninghamiana* ; **F** : Nodule coralloïde de *Discaria trinervis* sans racines nodulaires.

E : D'après Prin *et al.*, 1991.

hyphes de *Frankia* infectent les cellules corticales nouvellement formées (Berg, 1999). À ce stade, les diazovésicules ne sont pas encore différenciées, ce qui indique que les bactéries ne fixent pas encore l'azote.

- La zone III appelée zone de fixation, est constituée de cellules non-infectées (riches en polyphénols chez certaines espèces comme *C. glauca*) et de cellules infectées hypertrophiées dans lesquelles *Frankia* fixe activement l'azote (Pawlowski et Bisseling, 1996 ; Pawlowski, 2009). Ces cellules sont caractérisées par une autofluorescence des parois (comme chez les Casuarinacées) en raison d'un dépôt de lignine et par la relocalisation des organites (réticulum endoplasmique, vacuoles et polyribosomes) en périphérie de la cellule, suite au développement des filaments de *Frankia*. Cette zone de fixation est caractérisée par une forte activité mitochondriale (Berg et Mc Dowell, 1987).
- La zone IV ou zone de sénescence chez les nodules âgés, dans laquelle les cellules végétales et bactériennes dégènèrent et la fixation d'azote cesse. *Frankia* produit des sporanges à ce stade.

3.2.2. Morphologie et originalité de l'actinorhize

La formation du nodule actinorhizien requiert un programme d'organogenèse induit par la présence du microsymbiote. Les actinorhizes sont formés de plusieurs lobes qui apparaissent successivement à la base du premier lobe et se ramifient en formant une structure coralloïde (Duhoux *et al.*, 1996 ; Persson et Huss-Danell, 2009). Leur nombre varie selon les espèces. Les nodules actinorhiziens sont des structures pérennes pouvant parfois atteindre une taille de plus de 20 cm. Les jeunes lobes nodulaires sont initiés en périphérie des nodules les plus âgés.

Chez *Myrica* et *Casuarina*, les lobes nodulaires sont prolongés à l'apex par une racine nodulaire dépourvue de *Frankia*, possédant un gravitropisme négatif. Celle-ci jouerait un rôle dans les échanges gazeux. Chez *Discaria*, *Alloacasuarina* ou *Alnus*, les lobes nodulaires ne possèdent pas ou très rarement de racine nodulaire.

In fine, le nodule actinorhizien peut être comparé à une « racine latérale symbiotique », à la fois en raison de son origine (division des cellules du péricycle situées en face du pôle de xylème) et de son anatomie (vascularisation centrale) (Pawlowski et Bisseling, 1996 ; Pawlowski et Sprent, 2008). La **Figure 8** représente la différenciation de structures

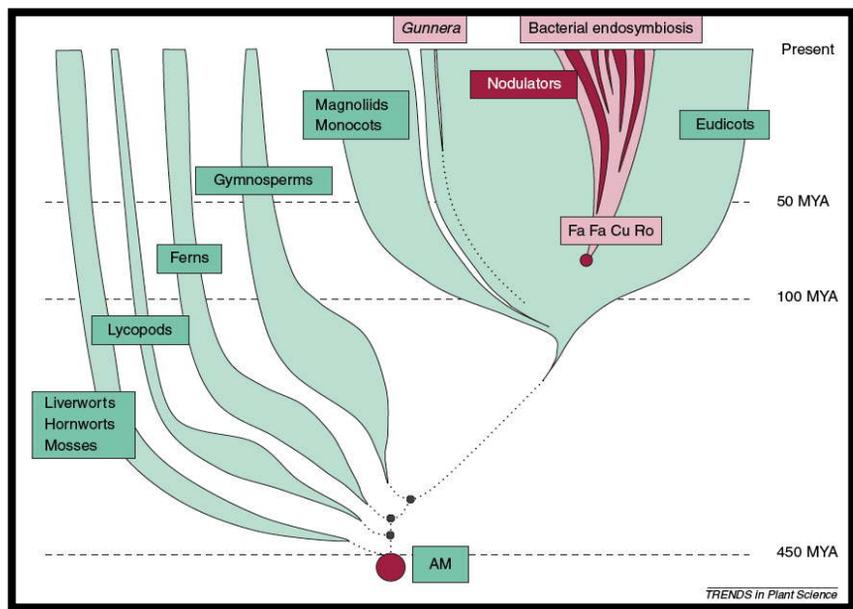


Figure 9 : Évolution des endosymbioses racinaires (D’après Kistner et Parniske, 2002).

Les symbioses les plus anciennes sont les symbioses mycorhiziennes à arbuscules (AM) qui datent de 460 millions d’années (MA). Ce type de symbiose concerne les grandes lignées du règne végétal (cératophylles, lycopodes, les fougères...). Les symbioses les plus récentes sont les endosymbioses nodulaires fixatrices d’azote qui datent de la fin du Crétacé (65 MA). Les plantes nodulées appartiennent au clade des « Eurosids I ». Les études de phylogénie suggèrent que les symbioses fixatrices d’azote ont évolué à partir d’un ancêtre commun qui avait la capacité à former des endomycorhizes.

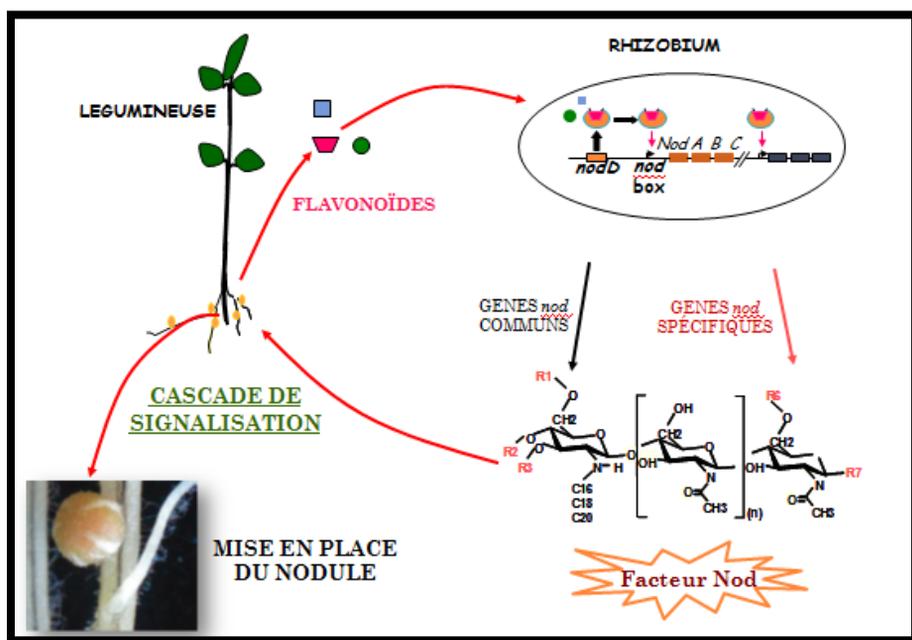


Figure 10 : Dialogue moléculaire Nod-dépendant du couple symbiotique Légumineuse-Rhizobium.

racinaires chez les plantes actinorhiziennes et la morphologie des actinorhizes.

III. Aspects évolutifs et moléculaires des symbioses fixatrices d'azote

1. Aspects phylogénétiques et évolutifs

La capacité à former une symbiose avec *Frankia* ne se retrouve pas forcément au niveau d'une même famille, ni même d'un genre. Par ex. *Dryas drumondii* est la seule espèce actinorhizienne de ce genre.

Cependant, les études de phylogénie moléculaire basées sur l'analyse des gènes chloroplastiques *rbcL* et *atpB*, et de l'ADNr 18S ont montré que toutes les Angiospermes qui ont l'aptitude à former des nodules fixateurs d'azote sont réunies dans un unique clade, celui des « Rosids I », appelé plus tard « Eurosids I » (Chase *et al.*, 1993 ; Soltis et Soltis, 2000 ; Gtari et Dawson, 2011). Ce clade est subdivisé en quatre sous-clades : les Rosales, les Fagales, les Cucurbitales et les Fabales, au sein desquelles on trouve des plantes actinorhiziennes, les Légumineuses et la non-Légumineuse *Parasponia* sp. qui s'associent aux Rhizobiums. Par ailleurs, ce clade « Eurosids I » inclut des plantes non-symbiotiques, ce qui indique que l'ancêtre commun ne devait pas être lui-même symbiotique mais devait posséder une certaine prédisposition à former des endosymbioses racinaires (**Figure 9**) (Soltis *et al.*, 1995). Cet ancêtre aurait recruté certains gènes de la voie de transduction des endomycorhizes arbusculaires apparues il y a environ 450 MA, pour permettre l'établissement des endosymbioses fixatrices d'azote (Parniske, 2008). Les équipes de Soltis *et al.* (1995) et de Swensen (1996) ont également suggéré que la capacité symbiotique serait apparue de manière indépendante au moins quatre fois au cours de l'évolution chez les Légumineuses (Doyle et Luckow, 2003) et chez les plantes actinorhiziennes (Swensen, 1996).

2. Aspects moléculaires de la symbiose rhizobienne

2.1. Dialogue moléculaire entre les partenaires symbiotiques

La reconnaissance mutuelle de la plante et du microorganisme symbiotique est le résultat d'un dialogue moléculaire entre les deux partenaires (**Figure 10**). Dans le sol, les

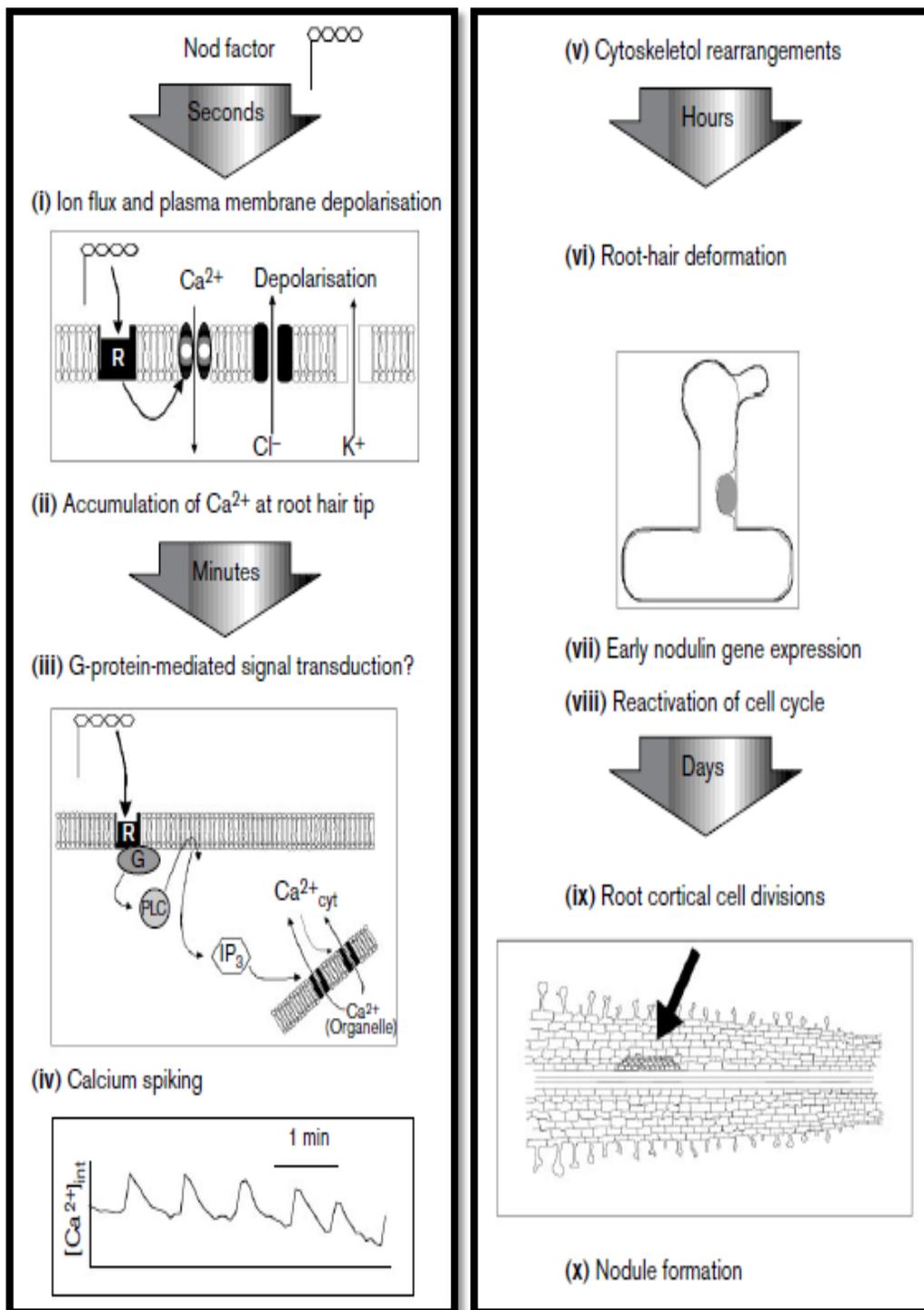


Figure 11 : Réponses physiologiques de la plante aux facteurs Nod (D'après Downie et Walker, 1999).

i-v : Réponses primaires ; **vi-x :** Réponses secondaires.

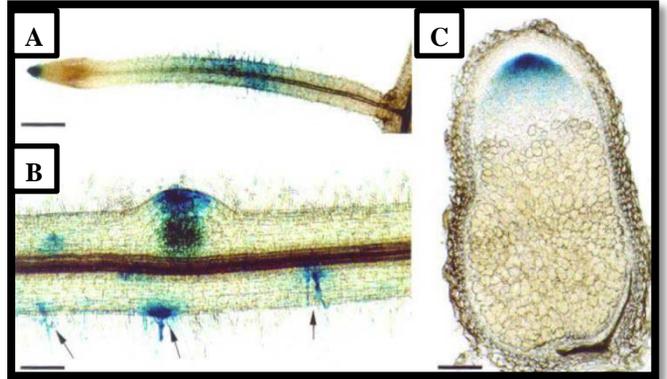
Légumineuses exsudent, par l'intermédiaire de leurs racines, une grande quantité de composés carbonés : acides organiques, acides aminés, vitamines, sucres et composés phénoliques (Perret *et al.*, 2000). C'est parmi ces derniers que l'on trouve les flavonoïdes issus du métabolisme secondaire, qui vont jouer un rôle important au cours de la symbiose rhizobienne (Bhattacharya *et al.*, 2010).

L'émission des flavonoïdes permet en effet l'attraction des bactéries dans la rhizosphère, par chimiotactisme. De plus, ces composés phénoliques ont une fonction de signalisation. Ils sont capables d'activer le régulateur transcriptionnel NodD qui va se fixer sur la « boîte nod », une région promotrice des gènes de nodulation, et induire l'expression des gènes de nodulation communs (*nodABC*) présents chez la plupart des *Rhizobium* (Fisher *et al.*, 1988). Ces gènes *nod* sont impliqués dans la biosynthèse de molécules symbiotiques de nature lipo-chito-oligosaccharidiques appelées facteurs Nod (NFs) (Lerouge *et al.*, 1990). Les NFs sont constitués d'un squelette d'oligomère de chitine comprenant de 3 à 5 résidus de N-acétyl glucosamine, substitués par une chaîne d'acide gras au niveau du résidu glucosamine terminal ayant une extrémité non-réductrice. La structure de l'acide gras, ainsi que les diverses substitutions aux extrémités de cette structure de base (acétylation, sulfatation, méthylation, fucosylation,...) sont caractéristiques de chaque espèce de *Rhizobium* (Dénarié *et al.*, 1996). Il faut cependant noter que le séquençage du génome des souches ORS278 et BTAi1 de *bradyrhizobia* a révélé l'absence des gènes *nod* communs, et donc l'absence de synthèse de NFs (Giraud *et al.*, 2007). Cette découverte remet en question l'universalité d'un dialogue moléculaire Légumineuses-*Rhizobium* régi par les NFs.

- Réponses physiologiques de la plante aux NFs

La perception des NFs par le partenaire plante engendre des réponses physiologiques (**Figure 11**). Des réponses primaires apparaissent quelques secondes ou quelques minutes après leur perception et comprennent un flux rapide d'ions, une dépolarisation membranaire, des oscillations calciques (au niveau du cytosol) et une réorganisation du cytosquelette observée au niveau du poil absorbant. Des réponses tardives apparaissent dans les heures et les jours qui suivent l'application des NFs aux Légumineuses, comme l'expression des gènes de nodulines précoces « Early NODulin genes » (ENOD) utilisés comme marqueurs de la mise en place de la symbiose (Journet *et*

Figure 12 : Localisation histochimique de l'activité GUS (β -glucuronidase) dans les racines transgéniques de *Medicago truncatula* au cours de l'infection par *Sinorhizibium meliloti*, à l'aide d'une construction *PromENOD11::GUS* (D'après Journet *et al.*, 2001).



A : Expression épidermique de GUS au niveau des poils absorbants à 18 h post-inoculation par *S. meliloti* ; **B :** À 3 jours post-inoculation, l'activité GUS est visible au niveau des sites d'infection (flèches), et au niveau du cortex et de l'épiderme du primordium nodulaire ; **C :** À 3 semaines post-inoculation, la coloration GUS est restreinte à l'apex correspondant au méristème et à la zone de fixation. Barre d'échelle = 900 μ m (A), 250 μ m (B), 200 μ m (C).

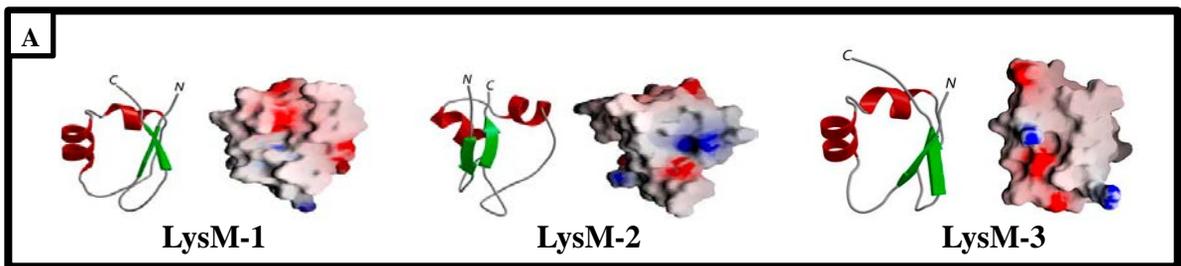
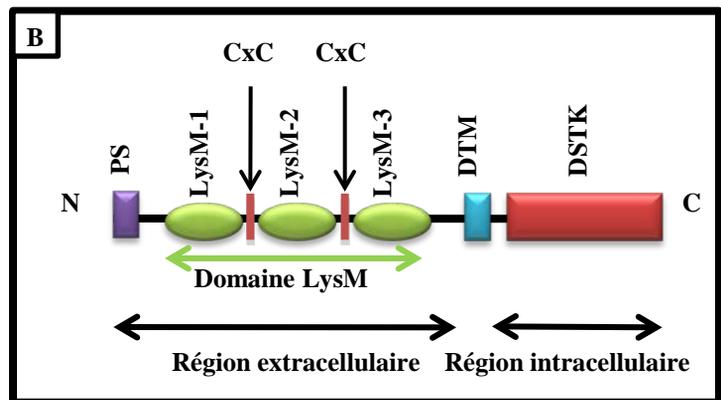


Figure 13 : Représentation schématique des domaines LysM-RLKs et organisation en domaines du récepteur kinase NFP de type LysM-RLKs chez *Medicago truncatula* (D'après Arrighi *et al.*, 2006).



A : Structure tridimensionnelle des 3 domaines LysM.-RLKs de la partie N-terminale (N) à la partie C-terminale (C) ; **B :** La protéine NFP (595 aa) de la famille des LysM-RLK présente de la partie N-terminale à la partie C-terminale (C), un peptide signal (PS) suivi de trois répétitions Lysin-motif (LysM) entrecoupées par deux motifs riches en cystéine (CxC), d'un domaine transmembranaire (DTM) et d'un domaine sérine/thréonine kinase (DSTK).

al., 2001) et la division cellulaire des cellules corticales (Downie et Walker, 1999 ; Geurts et Bisseling, 2002). Chez *Medicago truncatula*, une de ces nodulines précoces, ENOD11, a été très étudiée (Journet *et al.*, 2001). Le gène *Enod11* est exprimé dans l'épiderme des racines durant la pré-infection par *Rhizobium* (**Figure 12 A**), et répond également aux NFs purifiés (Catoira *et al.*, 2000). Son expression est ensuite observée durant les différentes étapes du processus symbiotique, dans les cellules en cours d'infection par *Rhizobium* (**Figure 12 B-C**) (Boisson-Dernier *et al.*, 2005).

2.2. Modèle de la voie de signalisation des facteurs Nod chez les Légumineuses

Depuis l'identification des NFs en 1990, et grâce notamment au développement des outils de génétique et de génomique chez les Légumineuses modèles *M. truncatula* (la luzerne) et *Lotus japonicus* (le lotier), les connaissances des mécanismes moléculaires impliqués dans le dialogue entre la bactérie et la plante ont beaucoup progressé. Ainsi, chez les Légumineuses, plusieurs gènes impliqués dans la perception et la transduction des facteurs de nodulation de *Rhizobium* ont été isolés et caractérisés (Kouchi *et al.*, 2010 ; Madsen *et al.*, 2011 ; Oldroyd *et al.*, 2011). Le criblage de mutants incapables de former des nodules (Nod-) a permis de disséquer la cascade de signalisation, et donc d'élaborer un schéma de voie de transduction du signal Nod (Kouchi *et al.*, 2010 ; Madsen *et al.*, 2011).

2.2.1. La perception des signaux bactériens par les récepteurs de la plante

Les NFs bactériens sont perçus et interprétés par la plante *via* la cascade signalétique. Cette perception engendre des réponses physiologiques de la plante telles que les oscillations calciques au niveau du poil absorbant (Wais *et al.*, 2002 ; Oldroyd et Downie, 2004). Des gènes codant pour des protéines de type sérine/thréonine kinase de la famille des LysM-RLKs sont présentés comme étant les récepteurs aux NFs. Ces protéines possèdent trois motifs lysine (LysM) dans leur domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et une région intracellulaire contenant un domaine kinase (**Figure 13**) (Madsen *et al.*, 2003 ; Radutoiu *et al.*, 2003 ; Arrighi *et al.*, 2006). Chez *M. truncatula*, le gène *NFP* « Nod Factor Perception » serait le récepteur de signalisation et le mutant *nfp* ne présente plus aucune réponse primaire induite par les NFs (Ben Amor *et al.*, 2003). Par ailleurs, un autre gène nommé *MtLYK3* « Lysine motif receptor-like Kinase 3 » serait le récepteur d'entrée contrôlant spécifiquement l'infection et notamment la formation du

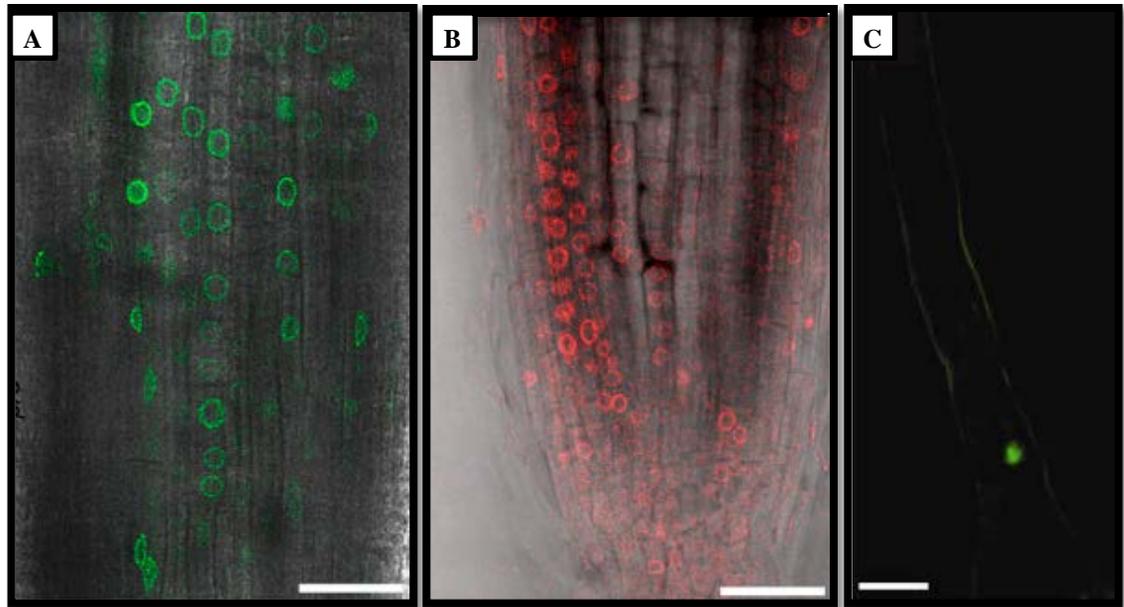


Figure 14 : Localisation subcellulaire des protéines NUP85 et NENA chez *Lotus japonicus* et IPD3 chez *Medicago truncatula*.

A : Localisation périnucléaire de la GFP dans l'apex des racines transformées avec la fusion *Prom35S::NUP85::GFP* ; **B** : Expression de la fluorescence rouge à l'aide du marqueur ER-GFP dans l'apex des racines transformées avec la construction *NENA::RFP* ; **C** : Expression de la GFP dans le noyau du poil absorbant chez *M. truncatula* transformée avec la construction *Prom35S::IPD3::GFP*. Barre d'échelle = 40 μm (A, B), 10 μm (C).
A et B : D'après Groth *et al.*, 2010 ; **C** : D'après Messinese *et al.*, 2007 .

cordon d'infection (Limpens *et al.*, 2003 ; Smit *et al.*, 2007). Chez *L. japonicus*, les plantes mutées dans les gènes *LjNFR5* et *LjNFR1* « Nod Factor Receptor », respectivement orthologue de *NFP* et orthologue putatif de *LYK3*, ne présentent plus de réponse induite par les NFs. Les protéines correspondantes agissent en complexe (Madsen *et al.*, 2003 ; Radutoiu *et al.*, 2003). Ainsi, il apparaît que les réponses induites par les NFs chez ces deux Légumineuses modèles dépendent de récepteurs LysM-RLKs. Il a été montré par ailleurs que l'expression chez *M. truncatula* du couple de récepteurs *LjNFR5/LjNFR1* de *L. japonicus* permet à *M. truncatula* de former des nodules non-fonctionnels après inoculation avec *Mesorhizobium loti*, symbiote de *L. japonicus*. Cette formation de nodules dépend de la production de NFs par *M. loti* (Radutoiu *et al.*, 2007). Ces résultats renforcent l'hypothèse selon laquelle les LysM-RLKs seraient impliqués dans la perception des NFs.

Plusieurs études sur des protéines contenant des motifs LysM suggèrent indirectement un rôle des LysM-RLKs dans la liaison des NFs. En effet, ce type de domaine a la propriété de se lier à des peptidoglycanes (PG) chez de nombreuses bactéries (Bateman et Bycroft, 2000). Cependant, la liaison directe des NFs par les LysM-RLKs symbiotiques reste à démontrer.

2.2.2. Dissection de la cascade signalétique chez les Légumineuses

a. Des gènes communs aux endosymbioses racinaires

En aval des gènes codant pour les récepteurs de type LysM-RLKs, plusieurs gènes indispensables à la transduction du signal symbiotique ont été identifiés chez les Légumineuses. Ces gènes sont positionnés soit en amont des oscillations calciques (« calcium spiking »), soit en aval. Il s'agit des gènes *MtDMI1/LjPollux/LjCastor* (Ané *et al.*, 2004 ; Imaizumi-Anraku *et al.*, 2005 ; Charpentier *et al.*, 2008) codant une protéine apparentée à un canal cationique ; du gène *MtDMI2/LjSymRK/MsNORK* (Endre *et al.*, 2002 ; Stracke *et al.*, 2002 ; Bersoult *et al.*, 2005 ; Limpens *et al.*, 2005) codant un récepteur kinase à domaine LRR ; des gènes *LjNUP85*, *LjNUP133* et *LjNENA* (Kanamori *et al.*, 2006 ; Saito *et al.*, 2007 ; Groth *et al.*, 2010) codant des nucléoporines. Les oscillations calciques n'ont plus lieu chez les mutants correspondants, indiquant que ces gènes sont situés en amont du « calcium spiking ». L'expression des protéines NUP et NENA est présentée sur la **Figure 14 A-B**.

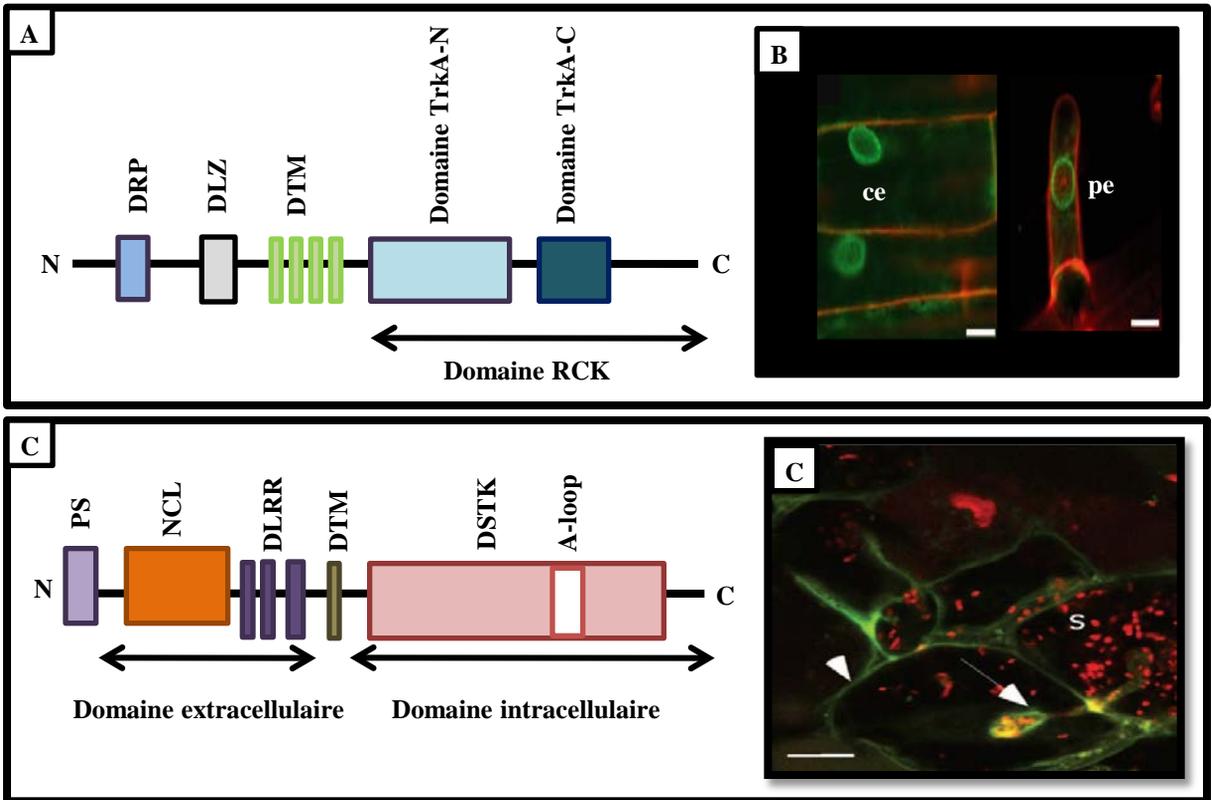


Figure 15 : Structure et localisation subcellulaire des protéines DMI1 et DMI2 chez *Medicago truncatula*.

A : Du côté N-terminal (N) au C-terminal (C), la protéine DMI1 (883 aa) est composée d'un domaine riche en proline (DRP) suivi d'un domaine de type « leucine zipper » (DLZ), de 4 domaines transmembranaires (DTM) et d'un domaine RCK (TrkA-N et TrkA-C) ; **B** : Localisation subcellulaire de la protéine DMI1 au niveau de l'enveloppe nucléaire des cellules épidermiques (ce) et des poils absorbants (pa) ; **C** : La protéine DMI2 (925 aa) se compose d'un peptide signal (PS) au niveau de la partie N-terminale (N), d'un domaine extracellulaire présentant un domaine NCL, 3 répétitions de type « Leucine Rich Repeat » (LRR), d'un domaine transmembranaire (DTM) et d'un domaine intracellulaire de type sérine/thréonine kinase. A-loop : présente une boucle d'activation au niveau du domaine kinase ; **D** : DMI2 est localisée dans la partie distale de la zone d'infection au niveau de la membrane plasmique (flèches) et dans la membrane du cordon d'infection. Les Rhizobiums (s) sont colorées avec l'iodure de propidium. Barre d'échelle = 10 μm (B), 20 μm (D).

A : D'après Peiter *et al.*, 2007 ; **B** : D'après Riely *et al.*, 2007 ; **C** : D'après Endre *et al.*, 2002 ; **D** : D'après Limpens *et al.*, 2005.

D'autres gènes dont les mutants correspondants présentent toujours les événements d'oscillations calciques sont aussi requis. Il s'agit du gène *MtDMI3/CCaMK* (Lévy *et al.*, 2004 ; Mitra *et al.*, 2004) codant une protéine kinase dépendante du calcium et de la calmoduline, et du gène *MtIPD3/LjCYCLOPS* (Messinese *et al.*, 2007 ; Yano *et al.*, 2008 ; Horváth *et al.*, 2011) codant une protéine avec un domaine « coiled-coil » court en C-terminal (voir **Figure 14 C** pour la localisation subcellulaire de la protéine IPD3).

Tous ces gènes présentent la caractéristique d'être également requis pour l'établissement de la symbiose mycorhizienne à arbuscule (AM) (Catoira *et al.*, 2000 ; Parniske, 2008 ; Groth *et al.*, 2010) démontrant une voie de signalisation symbiotique commune (« Common Symbiotic Pathway » ou CSP). Ces résultats renforcent l'hypothèse selon laquelle les symbioses nodulaires auraient recruté, au cours de l'évolution, des gènes impliqués dans les symbioses AM.

- Les gènes DMI (*Doesn't Make Infections*)

Chez *M. truncatula*, le gène *DMII* code une protéine similaire à des canaux potassiques bactériens (**Figure 15 A**) (Ané *et al.*, 2004). La protéine active est localisée au niveau de l'enveloppe péri-nucléaire (**Figure 15 B**) (Riely *et al.*, 2007) qui constitue une réserve intracellulaire en calcium importante. Ceci suggère son implication dans la régulation de l'activité de canaux calciques qui sont à l'origine des oscillations calciques (Peiter *et al.*, 2007). Les orthologues de *DMII* chez *L. japonicus* (*LjCastor/LjPollux*) codent pour des canaux cationiques putatifs localisés au niveau de la membrane péri-nucléaire ; ils génèrent indirectement le « calcium spiking » (Charpentier *et al.*, 2008).

Le gène *MtDMI2*, appelé *SymRK* « Symbiosis Receptor Kinase » chez le lotier, et *NORK* « NOdulation Receptor Kinase » chez *M. sativa*, a été isolé pour la première fois en 2002 grâce à l'analyse de mutants Nod-. De nombreux homologues ont ensuite été clonés non seulement chez d'autres Légumineuses, mais aussi chez des espèces non-symbiotiques (Markmann *et al.*, 2008). Le gène code pour un récepteur sérine/thréonine kinase de la famille des Leucine-Rich-Repeat RLKs (LRR-RLKs) qui est composé d'un domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et une région cytosolique contenant un domaine kinase (**Figure 15 C**) (Endre *et al.*, 2002 ; Stracke *et al.*, 2002).

Lors de l'interaction avec *Rhizobium*, les racines des mutants *symrk-* ne présentent pas de courbure des poils absorbants. Il n'y a pas d'entrée de la bactérie, ni de formation de

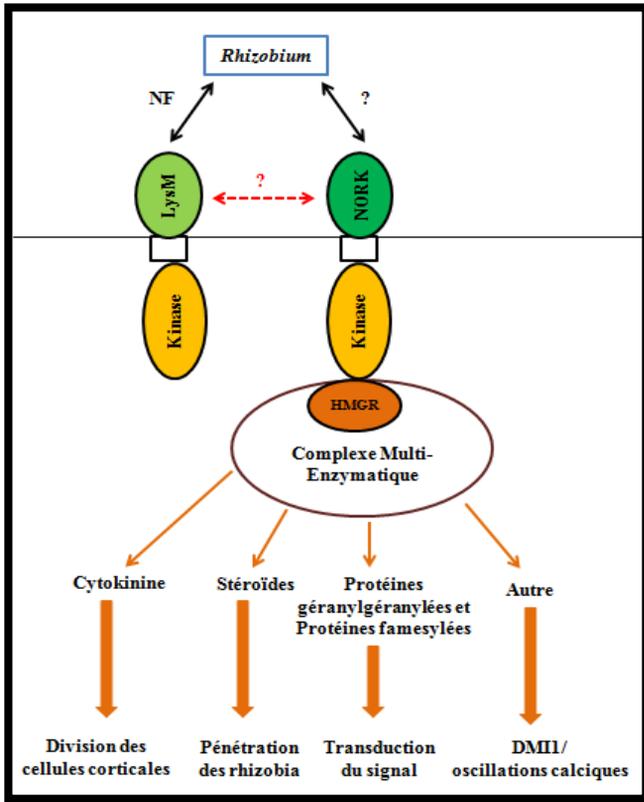


Figure 16 : Intervention du complexe protéique HMGR1-NORK dans le développement du nodule (D'après Kevei *et al.*, 2007).

Dans le poil racinaire, la perception des NFs par la plante implique l'interaction des protéines HMGR1 et NORK, ce qui mène à la synthèse des cytokinines. Le complexe NORK-HMGR1 pourrait aussi être impliqué dans la synthèse et l'accumulation des stéroïdes et serait actif au stade d'infection par la bactérie, lors de la pénétration des *Rhizobium* par le processus d'endocytose. En plus de HMGR, NORK interagit avec d'autres protéines qui lui assurent l'engagement dans la voie de signalisation symbiotique.

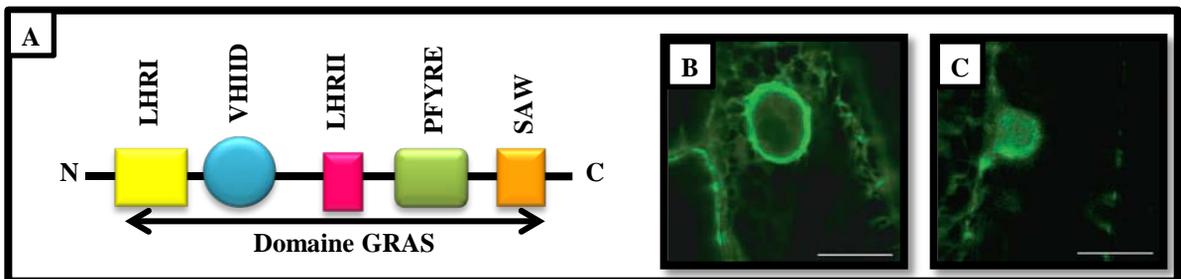


Figure 17 : Organisation en domaines des facteurs de transcription NSP1, NSP2 et localisation subcellulaire de la protéine de fusion NSP2::GFP (D'après Kaló *et al.*, 2005).

A : NSP1 et NSP2 (554 et 508 aa respectivement) sont composés d'un domaine GRAS comprenant 2 « Leucine Heptad Region » (LHR I et LHR II), et des sous domaines VHIID, PFYRE et SAW. (N) : Région N-Terminale ; (C) : Région C-Terminale ; **B** : Une forte expression de la GFP est repérée au niveau de l'enveloppe nucléaire et une faible expression est localisée dans le réticulum endoplasmique ; la localisation nucléaire est indépendante des NFs ; **C** : Sous l'application des NFs, la fluorescence verte disparaît dans l'enveloppe nucléaire et diffuse au niveau du noyau ; la localisation périnucléaire est dépendante aux NFs. Barre d'échelle = 10 µm (B, C).

cordon d'infection (Endre *et al.*, 2002 ; Stracke *et al.*, 2002). Chez *M. truncatula*, le gène *DMI2* est exprimé à un niveau basal dans l'épiderme et les cellules corticales racinaires avant inoculation. Après infection par *Rhizobium*, son expression est localisée dans les poils racinaires infectés, les cellules corticales situées en aval des cordons d'infection et dans la zone II d'infection du nodule mature (**Figure 15 D**) (Bersoult *et al.*, 2005 ; Limpens *et al.*, 2005). Jusqu'à présent, on ignore le mécanisme par lequel *DMI2* participe à l'activation des oscillations calciques.

En 2005, Limpens *et al.* (sur *M. truncatula*) et Capoen *et al.* (sur *Sesbania rostrata*) ont utilisé une approche par interférence de l'ARN (ARNi) afin d'étudier l'effet d'une extinction du gène *SymRK* sur la nodulation. Ils ont observé une baisse significative du nombre de plantes nodulées. De plus, lorsqu'il y a nodulation, les bactéries ne sont pas relarguées du cordon d'infection vers les cellules hôtes ; il n'y a pas de formation de symbiosome, ni de fixation d'azote. Le gène semble donc jouer un rôle non seulement dans la mise en place de la symbiose, mais aussi lors du développement du nodule.

La recherche de partenaires de *DMI2* par criblage double-hybride de levure a permis l'identification de la protéine HMGR1 (3-hydroxy-3-méthylglutaryl-Coenzyme A réductase), interagissant avec la région intracellulaire de *NORK* (**Figure 16**) (Kevei *et al.*, 2007). Cette protéine joue un rôle positif dans la nodulation, comme montré par l'absence de nodules sur des racines sous-exprimant *HMGR1* grâce à une approche ARNi. La protéine HMGR1 serait impliquée dans la voie de biosynthèse des mévalonates, précurseurs des cytokinines et des stéroïdes (Kevei *et al.*, 2007).

En aval du gène *DMI2/NORK/SymRK* se situe le gène *DMI3/CCaMK* qui sera abordé d'une manière détaillée dans le premier chapitre de thèse « Caractérisation du gène *CgCCaMK* ».

b. D'autres composants moléculaires de la cascade signalétique

En aval de *DMI3/CCaMK*, de nombreux gènes nécessaires à la formation du nodule sont activés chez les Légumineuses comme les régulateurs transcriptionnels *NSP1* et *NSP2* « Nodulation Signaling Pathway » qui codent des facteurs de transcription de la famille GRAS. La structure protéique de NSP est composée de deux domaines riches en leucine et trois domaines conservés (**Figure 17 A**) (Kaló *et al.*, 2005 ; Smit *et al.*, 2005). *NSP1* et *NSP2* sont localisées dans le noyau avant inoculation par *Rhizobium* (**Figure 17 B-C**).

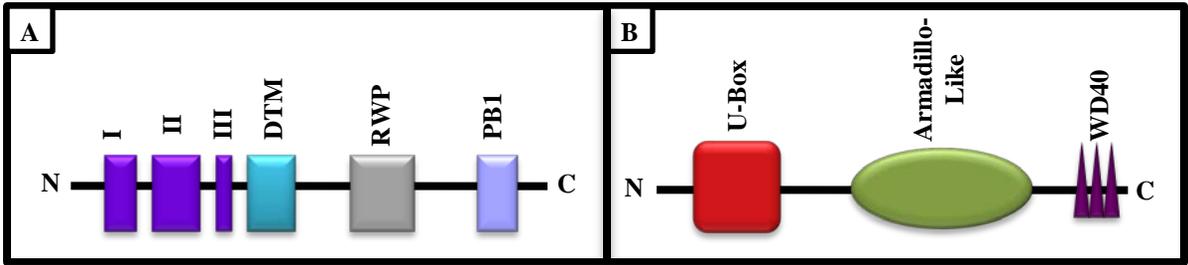


Figure 18 : Présentation schématique en domaines de NIN et LIN de *Medicago truncatula*.

A : La protéine NIN (933 aa) est composée de 3 domaines N-terminaux, d'un domaine transmembranaire (DTM), d'un domaine RWP de liaison à l'ADN et d'un domaine PB1 d'interaction protéine-protéine ; **B** : La protéine LIN (1488 aa) est composée d'un domaine U-Box, d'une région Armadillo-Like et de 3 répétitions WD40. (N) : Domaine N-terminal ; (C) : Domaine C-terminal.

A : D'après Marsh *et al.*, 2007 ; **B** : D'après Kiss *et al.*, 2009.

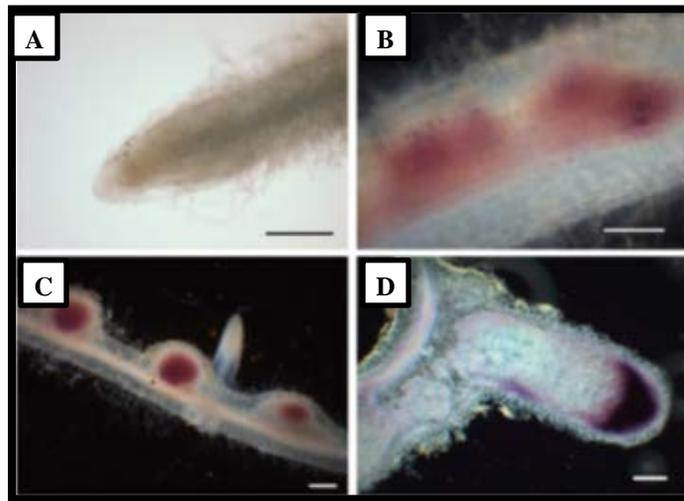


Figure 19 : Étude de l'expression spatio-temporelle du gène *LIN* chez *Medicago truncatula* au cours de l'infection par *Sinorhizobium meliloti*, à l'aide d'une construction *PromLIN::GUS* (D'après Kiss *et al.*, 2009).

A : Une faible expression de GUS est localisée dans la région apicale des racines non-inoculées ; **B** : Trois jours après inoculation, l'activité GUS serait associée à la division des cellules corticales conduisant à la formation du primordium nodulaire ; **C** : À 6 jours post-inoculation, une forte activité GUS est détectée au site d'infection par les Rhizobiums, et au point d'émergence des nodules ; **D** : Dans le nodule mature (21 jours après inoculation), une forte activité GUS est limitée à la zone d'infection, au niveau de l'apex racinaire. Barre d'échelle = 200 μ m.

Les oscillations calciques sont toujours observées chez les mutants *nsp*, mais aucune formation de cordon d'infection ni de division des cellules corticales n'est observée. D'après Catoira *et al.* (2000), les gènes *NSP* ne sont pas requis pour les symbioses AM. D'autres facteurs de transcription de la famille des *ERFs* « Ethylene Response Factor » nommés *ERN* pour « ERF Required for Nodulation », agissent en aval de *NSP1* et *NSP2* dans la voie de signalisation NFs (Middleton *et al.*, 2007). *ERN1* (chez *M. truncatula*) est codé par le gène *BIT1*, les mutants *bit1-1* et *bit1-2* « branching infection threads » présentent des cordons d'infection qui n'envahissent pas les cellules corticales (Andriankaja *et al.*, 2007 ; Hayashi *et al.*, 2010).

Il existe d'autres facteurs de transcription permettant l'activation de gènes impliqués dans le développement du nodule ; c'est le cas du gène *NIN* « Nodule INception » chez *M. truncatula*. *NIN* est un régulateur transcriptionnel positif de l'organogenèse nodulaire et de l'infection. Ce gène est induit en présence de bactéries et cette induction dépend des gènes *NFP*, *DMI* et *NSP*, ce qui place son rôle en aval des gènes *NSP*. Chez le mutant *nin*, on observe, lors des stades précoces de l'interaction avec les bactéries, une déformation exagérée de poils absorbants, dite de type « Hac », mais les cordons d'infection sont rarement formés (Marsh *et al.*, 2007). Les oscillations calciques sont toujours présentes, mais aucune activation de division des cellules corticales n'est observée et il n'y a pas de formation de nodule. De ces résultats, on peut conclure que *MtNIN* n'est pas indispensable pour le début de la voie de signalisation NFs ; en revanche, il est essentiel pour l'organogenèse des nodules. Des homologues du gène *NIN* (voir **Figure 18 A** pour l'organisation des domaines de *MtNIN*) ont été identifiés chez *Arabidopsis thaliana*, le riz et *L. japonicus* (Schauser *et al.*, 2005).

c. Des gènes requis pour l'infection

Plusieurs gènes de la voie de signalisation sont requis pour l'infection. Il s'agit par ex. du gène *IPD3* « Interacting Protein of DMI3 » ou *CYCLOPS* précédemment cités (Messinese *et al.*, 2007 ; Yano *et al.*, 2008). Ce gène a une localisation nucléaire et interagit avec la protéine *DMI3/CCaMK*. Aucun phénotype de nodulation n'est observé lors de l'extinction du gène par ARNi (Messinese *et al.*, 2007), et chez le mutant *Ljcylops*, l'infection bactérienne est bloquée au niveau recourbement du poil absorbant et l'organogenèse des nodules ne dépasse pas le stade du primordium nodulaire.

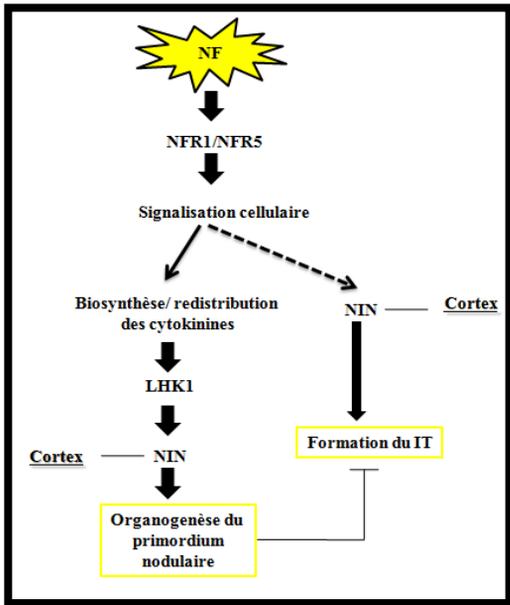


Figure 20 : Implication de la protéine LHK1 dans le processus de nodulation chez le lotier (D'après Murray *et al.*, 2007).

La perception des NFs par les récepteurs de la plante *NFR1/NFR5* stimule la biosynthèse de la cytokinine, ou sa redistribution dans l'épiderme et le cortex racinaires. Ceci est perçu par LHK1 induisant l'activation de l'expression du gène *NIN* dans le cortex racinaire et aboutit à l'organogenèse nodulaire. Les NFs régulent l'expression de *NIN* qui est requis pour la formation du cordon d'infection (IT). Contrairement à *NIN*, le gène *LHK1* n'est pas requis pour la formation de l'IT.

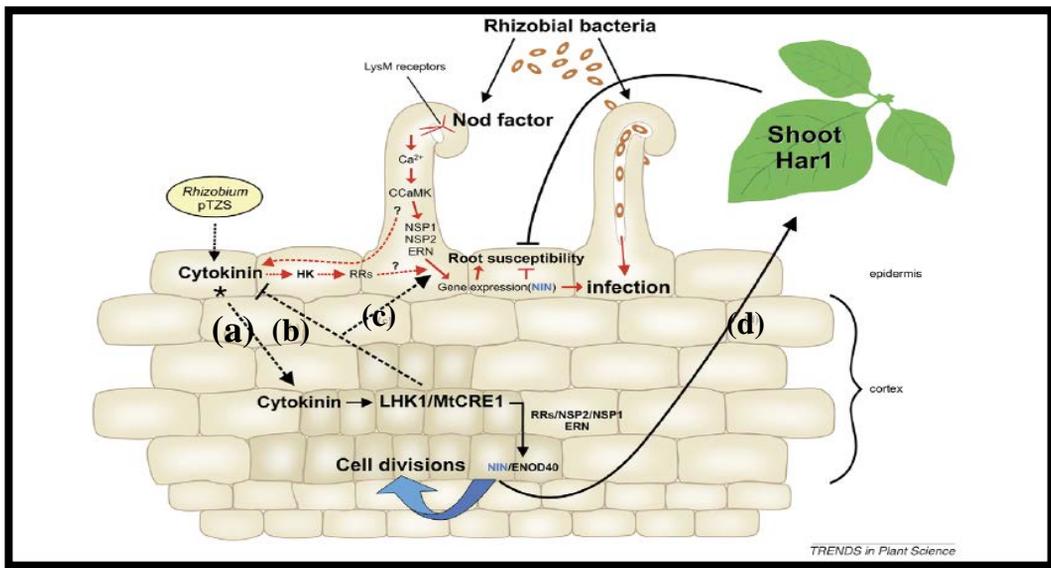


Figure 21 : Rôle des cytokinines (CK) dans le processus d'infection et de nodulation (D'après Frugier *et al.*, 2008).

Les NFs sont perçus par les récepteurs de la plante de type LysM, induisant une cascade signalétique. Cela conduit à la biosynthèse et/ou l'activation des CK par un mécanisme inconnu. Une part de la cascade signalétique peut être contournée par des bactéries synthétisant des CK (*Rhizobium pTZS*) permettant une nodulation indépendante des NFs ; (a) : Les CK sont alors perçues par *LHK1* ou son orthologue *MtCRE1* induisant l'organogenèse nodulaire (division des cellules). Ceci requiert les facteurs de transcription comme : NSP1, NSP2, et ERN ; (b) : Chez le lotier, le gène *LHK1* n'est pas requis pour l'initiation et la progression des événements d'infection, mais il participe à la régulation négative de l'infection ; (c) : Chez *Medicago*, l'apparition des nodules et la progression du cordon d'infection (mais pas son initiation) sont étroitement liées à la fonction de *MtCRE1* ; (d) : La CK pourrait participer au programme d'autorégulation de la nodulation (qui implique *Har1*) afin de restreindre le nombre de nodules.

Les gènes *MtLIN* et *LjCerberus* (Kiss *et al.*, 2009 ; Yano *et al.*, 2009) codent une E3 ubiquitine ligase de la famille des U-Box contenant un domaine U-Box en leur centre et au moins trois répétitions WD40 dans leur partie C-terminale (**Figure 18 B**). L'expression spatio-temporelle du gène *LIN* chez *M. truncatula* au cours de l'infection par *S. meliloti* est présentée sur la **Figure 19** (Kiss *et al.*, 2009). Les mutants *Mtlin* et *Ljcerberus* présentent un blocage dans la formation des cordons d'infection et les primordia nodulaires formés ne sont pas infectés (Kuppusamy *et al.*, 2004 ; Yano *et al.*, 2009).

d. Récepteurs cytokininine et organogénèse du nodule

Chez *M. truncatula* et *L. japonicus*, des études ont montré que les gènes *MtCRE1* « Cytokinin REceptor 1 » et *LjHIT1* « HyperInfecTed 1 » codant pour des récepteurs cytokininine, sont nécessaires à l'activation de la division cellulaire conduisant à l'organogénèse du nodule (Gonzalez-Rizzo *et al.*, 2006 ; Murray *et al.*, 2007). Par ailleurs, d'autres travaux menés chez le lotier ont montré que le mutant dominant positif *snf2* « spontaneous nodule formation » forme spontanément des nodules en l'absence de *Rhizobium* (Tirichine *et al.*, 2007). Les mutations *hit1* et *snf2* se trouvent sur le même gène appelé *LHK1* « Lotus Histidine Kinase 1 » et codant pour le récepteur cytokininine. L'étude de *LjHKL* a montré que son implication dans l'organogénèse nodulaire dépend de deux autres acteurs symbiotiques, *LjNIN* et *LjNSP2* (**Figure 20**). Les cytokinines pourraient remplir la fonction de « signal relais » entre l'épiderme et les cellules du cortex, coordonnant ainsi les processus d'infection et d'organogénèse (**Figure 21**) (Frugier *et al.*, 2008).

3. Aspects moléculaires de la symbiose actinorhizienne

Si les symbioses entre Légumineuses et *Rhizobium* sont particulièrement étudiées en raison de leur intérêt agronomique, peu de laboratoires s'investissent dans les recherches fondamentales concernant les plantes actinorhiziennes. La difficulté à isoler et cultiver le microorganisme *Frankia*, sa nature filamenteuse, l'absence de système de mutagenèse et d'analyse génétique sont autant de raisons qui ont contribué au manque d'intérêt pour ce système symbiotique pourtant très original (Lavire et Cournoyer, 2003). Du côté de l'hôte, il faut rappeler que les plantes actinorhiziennes sont des arbres et des arbustes (à l'exception de *Datisca*), ce qui rend difficile les approches génétiques, complique les

extractions d'acides nucléiques et conduit à des échelles de temps importantes pour la régénération de plantes transgéniques et le processus de nodulation (les nodules sont par ex. observés trois semaines après inoculation de *C. glauca* par *Frankia*). Toutefois, depuis les années 90, des gènes symbiotiques actinorhiziens ont été isolés chez l'aulne, *Datisca*, *Eleagnus* et *Casuarina*, soit par criblage différentiel de banques d'ADNc de nodules, soit grâce à des similarités de séquences avec des gènes symbiotiques de Légumineuses (pour revues Franche *et al.*, 1998 ; Vessey *et al.*, 2005 ; Franche et Bogusz, 2012).

3.1. Le rôle des flavonoïdes dans les phases précoces de l'interaction

Les premières étapes de l'interaction symbiotique plantes actinorhiziennes-*Frankia* sont encore peu connues en raison des difficultés d'analyse liées à la fois au microorganisme *Frankia* et à la plante hôte (Normand et Mullin, 2008 ; Franche et Bogusz, 2012). Contrairement aux Légumineuses, il n'y a pas de plante actinorhizienne « modèle » qui permettrait le développement d'approches génétiques.

L'une des premières étapes de l'interaction est l'émission par les racines des plantes actinorhiziennes de signaux de nature inconnue perçus par le microsymbiote *Frankia*. Les phénylpropanoïdes ou flavonoïdes sont suspectés jouer ce rôle par analogie avec les Légumineuses (Van Ghelue *et al.*, 1997). Plusieurs études appuient cette hypothèse ; en effet, la nodulation de l'aulne (*Alnus* sp.) est améliorée par l'addition de flavonones (Benoit et Berry, 1997) ou de flavonols (Hughes *et al.*, 1999). Des études récentes dans l'équipe Rhizogenèse (IRD de Montpellier) ont démontré qu'il existe dans la banque d'ESTs « Expressed Sequence Tags » de *C. glauca* huit gènes qui codent pour des enzymes de la biosynthèse des flavonoïdes (chalcone synthase). Les résultats préliminaires montrent qu'il y a induction de certains gènes responsables de la biosynthèse des isoflavonoïdes (chalcone isomerase et isoflavone reductase) après inoculation avec *Frankia* (Auguy *et al.*, 2011), suggérant l'implication des flavonoïdes comme molécules signal au cours de l'interaction *Casuarina-Frankia*. Une approche par interférence de l'ARN est actuellement développée sur le gène de la chalcone synthase de *C. glauca* afin de déterminer si l'extinction de celui-ci perturbe les phases précoces du processus symbiotique (Abdel-Lateif, Hocher et Bogusz, résultats non publiés).

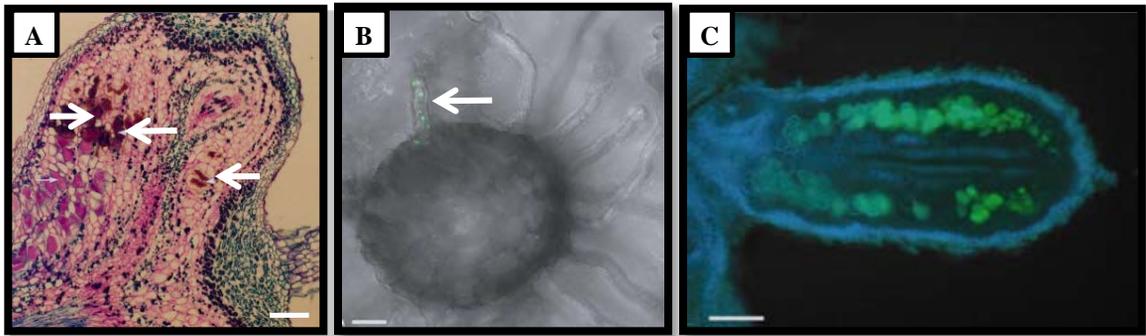


Figure 22 : Localisation de *Cg12* dans les racines et nodules des Casuarinacées.

A : Une forte expression de *Cg12* est localisée dans les cellules (zone de fixation) de *Casuarina glauca* infectées par *Frankia* (flèches) ; **B-C** : Expression du gène *Cg12* dans les racines d'*Allocasuarina verticillata* transformées avec la construction *Cg12::GFP* ; **B** : Coupe transversale d'une racine latérale à 20 jours post-inoculation par *Frankia* exprimant une fluorescence verte au niveau du poil absorbant déformé ; **C** : Coupe longitudinale d'un lobe nodulaire mature exprimant la GFP dans les cellules corticales infectées. Barre d'échelle = 100 μ m (A, B), 200 μ m (C).

A : D'après Laplaze *et al.*, 2000b ; **B et C** : D'après Svistoonoff *et al.*, 2003.

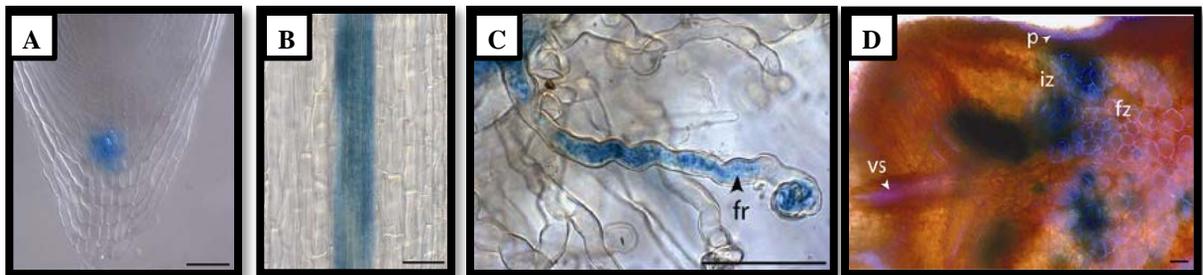


Figure 23 : Localisation histochimique de l'activité GUS dans les racines de *Casuarina glauca* exprimant la construction *PromMtEnod11::GUS* (D'après Svistoonoff *et al.*, 2010a).

A : Expression de GUS dans la coiffe des racines primaires non-inoculées ; **B** : Une forte activité GUS dans les tissus vasculaires des racines primaires non-inoculées ; **C** : Une forte activité GUS est observée dans certains poils absorbants déformés et dans le cordon d'infection à 7 jours post inoculation ; **D** : Coupe transversale d'un lobe nodulaire montrant une forte activité GUS dans les cellules infectées de la zone d'infection. (fz) : zone de fixation ; (iz) : zone d'infection ; (p) : périderme ; (vs) : système vasculaire. Barre d'échelle = 50 μ m.

3.2. Gènes symbiotiques exprimés lors des étapes précoces de l'interaction symbiotique

Parmi les gènes qui interviennent au cours des étapes précoces de la symbiose figure *Cg12* (Laplaze *et al.*, 2000b), un gène isolé chez *C. glauca* qui code une protéase à sérine de la famille des subtilisines. Les subtilases végétales appartiennent à des familles multigéniques et interviennent dans des processus biologiques variés tels que le développement, la réponse aux agents pathogènes et la signalisation cellulaire (Takeda *et al.*, 2009). Une étude détaillée du profil d'expression de *Cg12* a été réalisée grâce à l'utilisation de Casuarinacées transgéniques contenant des fusions transcriptionnelles entre le promoteur de *Cg12* et les gènes rapporteurs de la β -glucuronidase (Jefferson *et al.*, 1987) et de la protéine fluorescente verte (Haseloff et Siemering, 1998). Cette analyse a permis de montrer que l'expression de *Cg12* est spécifiquement liée à l'infection des cellules par *Frankia* et qu'elle débute dès les premières étapes de la symbiose quand *Frankia* pénètre dans des poils absorbants déformés. En revanche, l'expression de *Cg12* n'est induite ni durant la phase de pré-infection par *Frankia*, ni durant la symbiose endomycorhizienne (**Figure 22**) (Svistoonoff *et al.*, 2003). La construction *PromCg12::GUS* a été récemment introduite chez *Discaria trinervis* (un arbuste actinorhizien caractérisé par une infection intercellulaire). Les premiers résultats obtenus indiquent que le promoteur *Cg12* pourra être utilisé pour suivre la progression des hyphes de *Frankia* durant le processus d'infection intercellulaire (Équipe Rhizogénèse en collaboration avec L. Wall, Université de Quilmes, Argentine).

Par ailleurs, d'autres travaux ont montré que le promoteur de la noduline précoce de *M. truncatula* *ENOD11* (*PromMtENOD11::GUS*) introduit chez *C. glauca* était activé au cours de l'infection des poils absorbants par *Frankia*, dans les cellules infectées du pré-nodule et dans les cellules en cours d'infection de la zone II du lobe nodulaire (**Figure 23**). En revanche, aucune activation n'est observée par des surnageants de *Frankia* ou des NFs purifiés, ou encore en réponse à des champignons endo- ou ectomycorhiziens (Svistoonoff *et al.*, 2010a). Chez *D. trinervis*, l'expression de *PromMtEnod11::GUS* est localisée dans les cellules infectées du cortex racinaire et dans les cellules infectées de la zone II du lobe nodulaire (Imanishi *et al.*, 2011).

D'autres gènes symbiotiques tels que la chalcone synthase, l'hémoglobine ou l'asparagine synthase sont exprimés dans le nodule actinorhizen (**Figure 24**) (Guan *et al.*,

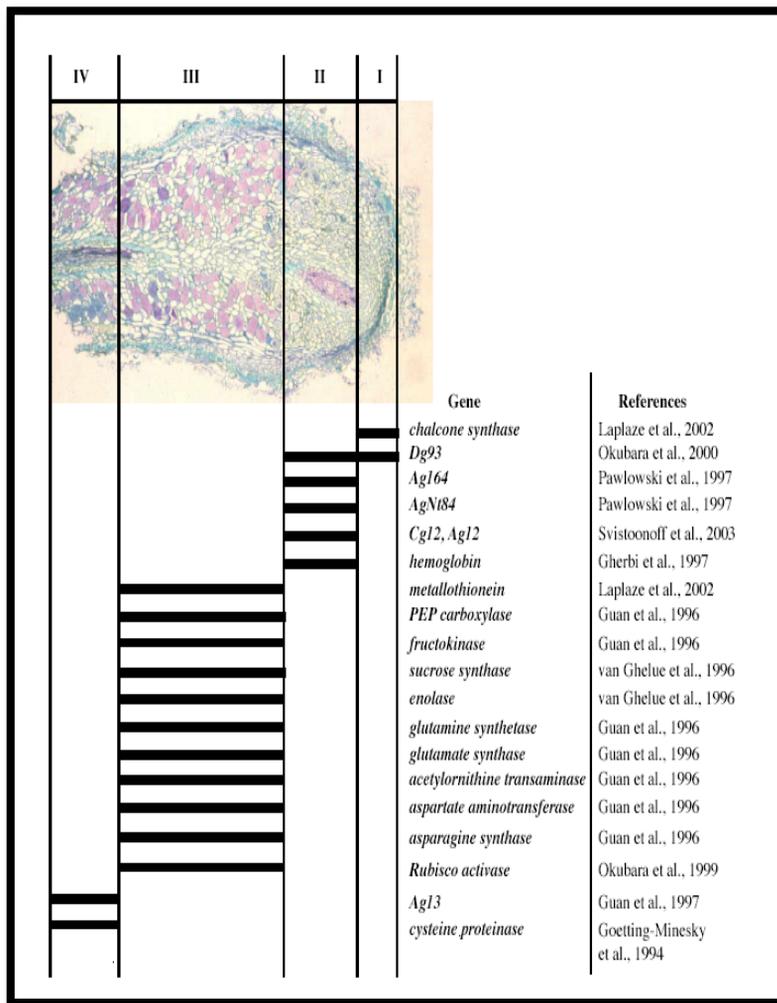


Figure 24 : Expression des gènes symbiotiques dans les différentes zones du nodule actinorhizien (D'après Obertello *et al.*, 2003).

I : Zone méristématique ;
II : Zone d'infection ;
III : Zone de fixation ;
IV : Zone de sénescence.
 Les barres noires indiquent la présence des transcrits (ARNm).

(Ag) : *Alnus glutinosa* ;
 (Cg) : *Casuarina glauca* ;
 (Dg) : *Datisca glomerata*.

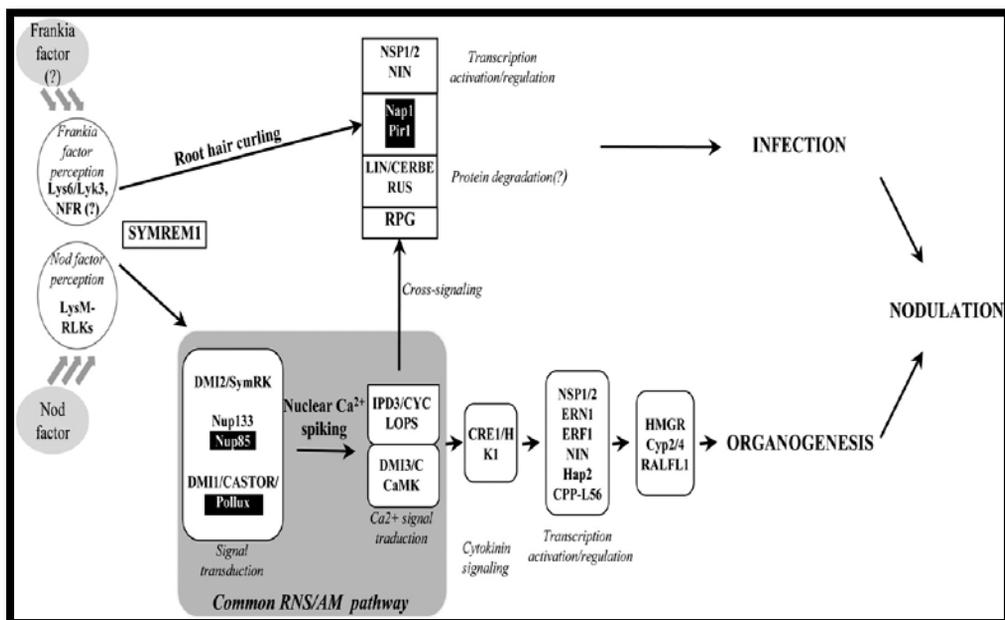


Figure 25 : Schéma représentatif de la voie de signalisation impliquée dans l'activation de l'organogenèse nodulaire et de l'infection par les bactéries (D'après Hocher *et al.*, 2011a).

1996 ; Gherbi *et al.*, 1997 ; Obertello *et al.*, 2003 ; Laplaze *et al.*, 2008).

3.3. *SymRK*, un acteur de la voie de signalisation symbiotique chez les plantes actinorhiziennes

Au niveau international, les études de génomique chez les plantes actinorhiziennes sont actuellement centrées sur trois espèces : *C. glauca*, *A. glutinosa* et *D. glomerata* (Franche *et al.*, 2009). L'équipe Rhizogénèse (IRD de Montpellier) a choisi pour modèle d'étude *C. glauca*, à la fois en raison de son rôle environnemental et économique très important dans certains pays du Sud, de son petit génome et des outils d'analyse moléculaire disponibles sur cet arbre : collections d'ESTs de racines et de nodules (Hocher *et al.*, 2006), systèmes de transformation génétique par *Agrobacterium tumefaciens* et *A. rhizogenes* (Franche *et al.*, 1997 ; Diouf *et al.*, 1995 ; Smouni *et al.*, 2002), et extinction des gènes par ARNi (Gherbi *et al.*, 2008b). Par ailleurs, dans un proche avenir, de nouveaux outils de génomique basés sur le séquençage à haut débit (454, Solexa) pourront également aider à élucider les étapes précoces de l'infection des plantes actinorhiziennes *via* l'actinomycète *Frankia* (Hocher *et al.*, 2011a).

L'équipe Rhizogénèse a développé des ressources génomiques en vue de l'identification de gènes impliqués dans la symbiose *Casuarina-Frankia*. 15000 unigènes ont été obtenus à partir des banques d'ADNc de nodules et de racines de *C. glauca* (Hocher *et al.*, 2011a). Les analyses d'ESTs chez *C. glauca* montrent qu'il y a une homologie de séquences avec les gènes impliqués dans la cascade signalétique Nod-dépendante chez les Légumineuses. De plus, l'analyse du transcriptome de *Casuarina* et de l'aulne, au moyen des puces à ADN (microarrays) lors des étapes précoces de la nodulation a permis, d'identifier des homologues de la plupart des gènes de la voie de signalisation symbiotique des Légumineuses comme les gènes *LysM-RLKS*, *DMI1*, *DMI3/CCaMK*, *NSP* ou *NIN* (Hocher *et al.*, 2011b). Ces résultats suggèrent que les symbioses actinorhiziennes et rhizobiennes partagent une cascade signalétique commune, et l'ensemble des travaux réalisés renforcent l'hypothèse d'un mécanisme génétique universel pour les endosymbioses racinaires (**Figure 25**) (Hocher *et al.*, 2011a).

En 2008, l'homologue du gène *SymRK* a été isolé chez *C. glauca* par l'équipe Rhizogénèse (Gherbi *et al.*, 2008a) et chez *D. glomerata* (Markmann *et al.*, 2008). Une hybridation de type Southern a montré que, comme chez les Légumineuses, le gène *SymRK*

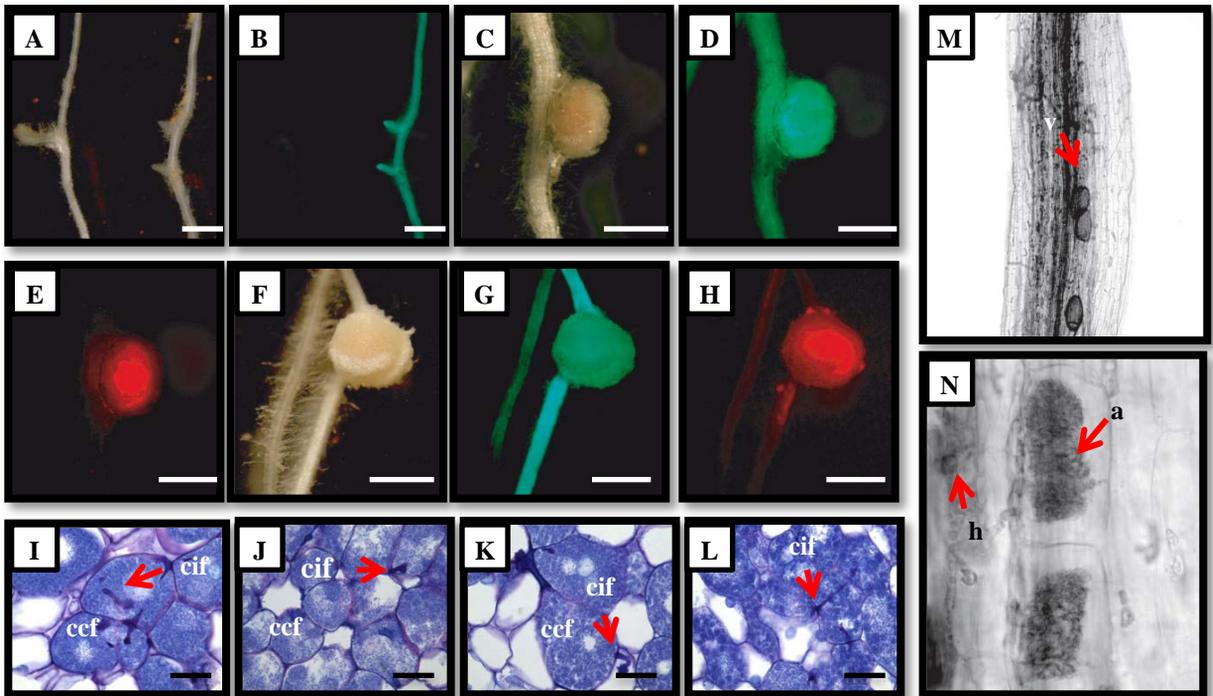


Figure 26 : Complémentation fonctionnelle du mutant *Ljsymrk-* avec la construction *PromLjSymRK::CgSymRK* et inoculation par *Mesorhizobium loti* et *Glomus intraradices* (D'après Gherbi *et al.*, 2008a).

A-B : Transformation des racines du lotier avec le mutant *symrk*. Aucune formation de nodule est observée ; **C-D-E** : Des racines transgéniques exprimant *CgSymRK*. Les bactéries dans le nodule sont colorées en rouge (E) ; **F-G-H** : Transformation des mutants *symrk* avec *CgSymRK*. On observe des nodules de phénotype sauvage ; **I-J** : Sections de nodules du mutant *symrk* (I), et des racines sauvages (J) complémentées avec *CgSymRK* ; **K-L** : Sections de nodules du mutant *symrk* (K), et des racines sauvages (L) complémentées avec le gène *LjSymRK* ; **A-C-F** : Photos prises sous lumière visible ; **B-D-G** : Racines transgéniques exprimant le gène rapporteur *GFP* ; **E-H** : Inoculation avec des Rhizobiums qui expriment une protéine fluorescente rouge (DsRed) ; **I-J-K-L** : Sections de nodules colorées avec le bleu de toluidine ; **L-M** : Les hyphes du champignon se développent dans l'épiderme et l'exoderme et forment des arbuscules et vésicules dans le cortex racinaire. (a) : arbuscule ; (cci) : cellule infectée ; (cif) : cordon d'infection ; (h) : hyphes ; (v) : vésicule. Barre d'échelle = 500 µm (A, B, C, D, E, F, G, H), 25 µm (I, J, K, L).

n'est présent qu'en une seule copie dans les plantes actinorhiziennes, et présente de fortes similarités avec le gène *SymRK/DMI2* de Légumineuses. Une étude détaillée de *CgSymRK* a permis de mettre en évidence que le gène est exprimé dans les racines et les nodules de *C. glauca*, et son extinction obtenue par ARNi conduit à une diminution significative de la nodulation. Lors d'une extinction partielle, les nodules sont de petite taille, souvent unilobés et altérés dans leur capacité à fixer l'azote. L'organisation cellulaire des nodules ARNi-*CgSymRK* est souvent anormale, les cellules corticales ne sont pas hypertrophiées et présentent une forte accumulation de polyphénols. De plus, l'extinction de *CgSymRK* affecte fortement le processus d'endomycorhization, en perturbant la pénétration des hyphes fongiques dans le cortex de la racine. La complémentation d'un mutant *symrk-* de lotier par *CgSymRK* restaure la nodulation et la mycorhization après inoculation avec respectivement *M. loti* et *Glomus intraradices*. Ces résultats indiquent que *CgSymRK* intervient dans le processus de symbiose racinaire et qu'il est fonctionnellement équivalent au gène *SymRK* de Légumineuse (**Figure 26**) (Gherbi *et al.*, 2008a).

L'implication du gène *SymRK* dans la transduction des signaux de *Frankia* a été confirmée chez *D. glomerata*. En effet, seulement 16% de racines ARNi-*DgSymRK* présentent des structures nodulaires (Markmann *et al.*, 2008). Les résultats obtenus sur le gène *SymRK* chez les plantes actinorhiziennes renforcent donc l'hypothèse d'un mécanisme génétique universel pour les endosymbioses racinaires. Ce gène symbiotique représente le premier élément commun à l'ensemble des voies de signalisation conduisant à des endosymbioses racinaires (Gherbi *et al.*, 2008a).

3.4. Autres acteurs de la voie de signalisation symbiotique chez les plantes actinorhiziennes

Parmi les gènes étudiés actuellement au sein de l'équipe Rhizogénèse, figurent les gènes *CCaMK* « Calcium and CalModulin dependent protein Kinase » qui fera l'objet d'une présentation détaillée dans le chapitre I et *NIN* « Nodule INception ». *CgNIN* et *CgCCaMK* ont été identifiés à partir de la banque EST de nodules de *C. glauca*.

CgNIN est homologue à *LjNIN* (63% d'homologie) et *MtNIN* (61% d'homologie) des Légumineuses (S. Svistoonoff, résultats non publiés). Son expression est localisée dans les noyaux des cellules de la plante hôte. *CgNIN* est surexprimé dans les nodules d'un facteur 20 par rapport à des racines non-inoculées. Des expériences récentes ont démontré que

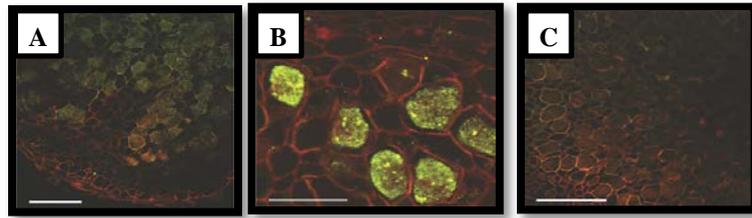


Figure 27 : Immunolocalisation de l'auxine dans les nodules de *Casuarina glauca* (D'après Perrine-Walker *et al.*, 2010).

A : Accumulation de l'IAA dans les cellules infectées par *Frankia* ; **B** : Un très fort signal auxinique (PAA) est détecté dans les cellules infectées par *Frankia* ; **C** : Dans le témoin négatif d'immunolocalisation, la fluorescence est restreinte aux parois des cellules infectées par *Frankia*. Barre d'échelle = 100 μm (A, B), 50 μm (C).

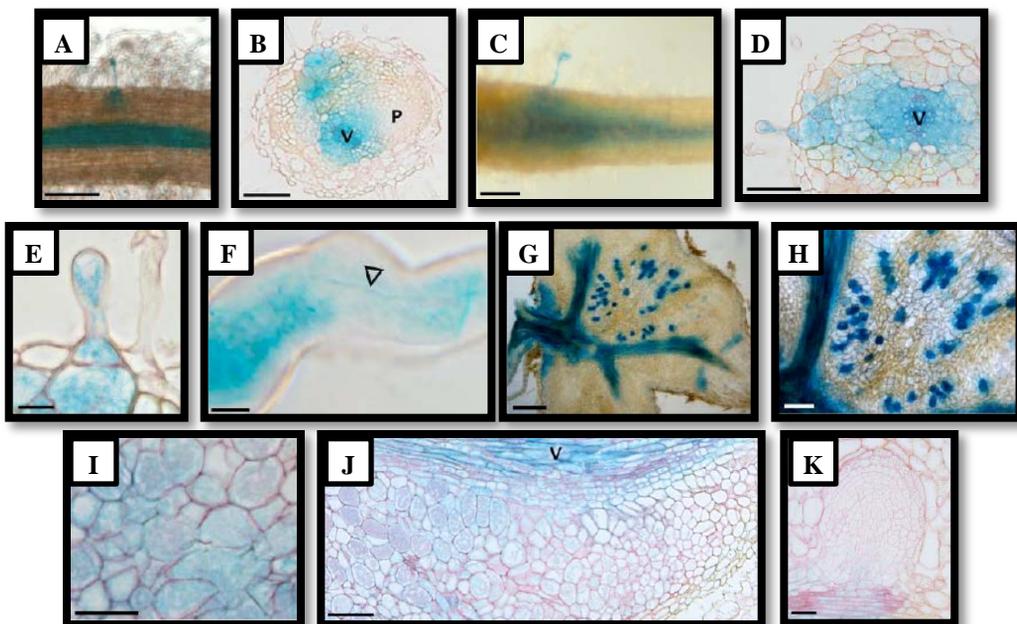


Figure 28 : Expression de *CgAUX1* au cours de l'infection de *Casuarina glauca* par *Frankia* (D'après Péret *et al.*, 2007).

L'expression de *CgAUX1* a été déterminée au cours de l'infection par *Frankia* dans les poils racinaires à 10 jours après inoculation (**A-B**), à 14 jours après inoculation (**C à F**), puis dans le nodule (**G à J**) et au niveau de la ramification du nodule (**K**). Les hyphes de *Frankia* visibles dans le poil racinaire déformé sont indiqués par une flèche (**F**). (p) : primordium nodulaire ; (v) : système vasculaire. Barre d'échelle = 5 μm (F), 10 μm (E), 25 μm (B, D), 50 μm (A, C, I, J, K), 125 μm (H), 250 μm (G).

CgNIN est activé en réponse à l'inoculation par *Frankia* au niveau de l'épiderme racinaire avec une forte expression dans les poils absorbants et tout au long de la formation du nodule. De plus, des expériences de complémentations de *Mtin* avec *CgNIN* ont montré une complémentation partielle de ce gène spécifique de la nodulation. Les résultats non encore publiés suggèrent que le gène *NIN* intervient dans les étapes précoces de la symbiose actinorhizienne. Le promoteur de ce gène pourrait être utilisé afin d'isoler les molécules signal de *Frankia*.

Le gène *DMII* n'a pas encore été formellement isolé chez les plantes actinorhiziennes. Cependant une EST avec une homologie significative a été identifiée dans la banque ESTs de *C. glauca*. De même, l'analyse des séquences de banques ESTs de racines et de nodules de *C. glauca* et *A. glutinosa*, a mis en évidence la présence d'homologues de gènes qui codent pour des récepteurs de type LysM-RLKs (Hocher *et al.*, 2011a).

3.5. Phytohormones et signalisation symbiotique

Des phytohormones synthétisées par *Frankia* sont supposées jouer un rôle dans la signalisation symbiotique. Il s'agit des auxines : l'acide 3-indole acétique (IAA) ou l'acide phénylacétique (PAA) qui sont produites par *Frankia in planta* (Wheeler *et al.*, 1979 ; Péret *et al.*, 2008 ; Perrine-Walker *et al.*, 2010 ; Franche et Bogusz, 2012), et de la cytokinine isopentényl adénosine (iPA) (Gordon *et al.*, 1988). Il a été suggéré que le PAA joue un rôle dans la formation de nodule chez *A. glutinosa* (Hammad *et al.*, 2003). De plus l'accumulation de ces deux phytohormones a été observée dans les nodules infectés de *C. glauca* (**Figure 27**) (Perrine-Walker *et al.*, 2010).

Deux transporteurs d'influx d'auxine nommés *AUX1* et *LAX3*, et un transporteur d'efflux d'auxine nommé *CgPIN1* ont été isolés chez *C. glauca* (Péret *et al.*, 2007 ; Perrine-Walker *et al.*, 2010). *CgAUX1* présente une fonction équivalente au gène *AUX1* d'*A. thaliana*, comme le mettent en évidence des expériences de complémentation de mutants d'*A. thaliana*. *CgAUX1* partage un profil d'expression spatio-temporelle proche de celui de *Cg12* durant les étapes précoces de l'infection par *Frankia*. Le gène est également exprimé dans les tissus vasculaires des nodules (**Figure 28**) (Péret *et al.*, 2007). Par contre, *CgAUX1* n'est pas exprimé dans les cellules de *C. glauca* infectées par *G. intraradices* (Péret *et al.*, 2008). D'autres expériences montrent que l'inhibition de transport d'influx d'auxine par le 1-NOA (1-naphtoxy acetic acid) perturbe la nodulation chez *C. glauca*,

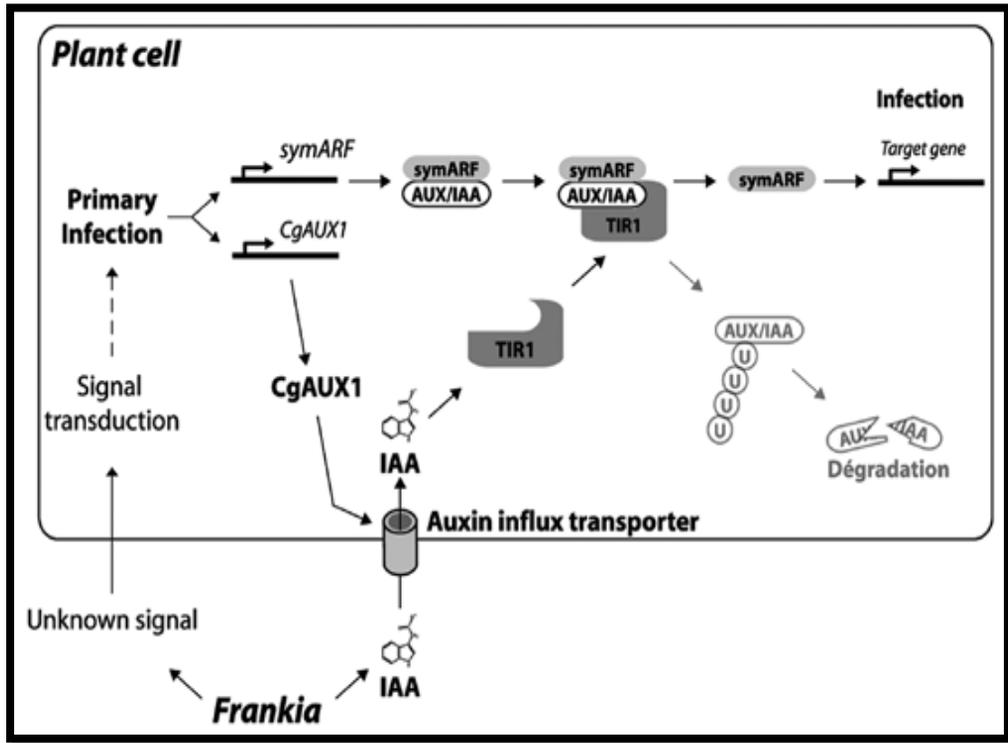


Figure 29 : Perception et signalisation de l’auxine durant l’infection de *Casuarina glauca* par *Frankia* (D’après Paciorek et Friml, 2006 et Péret et *al.*, 2008).

Grâce aux transporteurs d’influx d’auxine CgAux1, l’auxine produite lors de par *Frankia* entre dans les cellules infectées. Des récepteurs de l’auxine ont été identifiés, il s’agit de la protéine TIR1. À l’intérieur des cellules, l’auxine serait probablement perçue par le complexe de polyubiquitinylation SCFTIR1 qui programme la dégradation des protéines nucléaires Aux/IAA. Les Aux/IAA interagissent avec les facteurs de transcription ARF et se fixent sur les promoteurs au niveau des éléments de réponse à l’auxine (AuxRE) ce qui inhibe la transcription d’un grand nombre de gènes. La destruction des Aux/IAA par le protéasome permet aux facteurs de transcription ARF de se fixer sur les AuxRE et d’initier la transcription des gènes induits par l’auxine.

suggérant que l'influx d'auxine est impliqué dans le processus de nodulation (Péret *et al.*, 2007). Le rôle exact de cette phytohormone au cours de l'infection de *C. glauca* par *Frankia* reste cependant à déterminer. La **Figure 29** présente un modèle de signalisation auxinique chez *C. glauca* lors de l'interaction avec *Frankia* (Paciorek et Friml, 2006 ; Péret *et al.*, 2008).

IV. Présentation et objectifs du travail de thèse

1. Contexte général

Le projet de thèse s'inscrit dans le cadre d'une cotutelle (financement Averroès) entre les laboratoires GBBV « Génétique, Biochimie et Biotechnologies Végétales » de l'Université Mentouri (Constantine, Algérie) et l'équipe Rhizogenèse de l'IRD « Institut de Recherche pour le Développement » (Montpellier, France). La thématique générale de l'équipe Rhizogenèse est centrée sur l'étude des phases précoces de la symbiose *C. glauca*-*Frankia* et vise à décrypter le dialogue moléculaire entre la plante hôte et le microorganisme.

Dans ce cadre, les questionnements suivants sont abordés :

- Quelles sont les molécules signal impliquées dans le dialogue entre les deux partenaires symbiotiques ?
- Quels sont les gènes de *C. glauca* impliqués dans la perception et la transduction des signaux produits par *Frankia* ?
- Les mécanismes moléculaires mis en œuvre lors de la symbiose actinorhizienne sont-ils partagés avec les autres endosymbioses racinaires ?

2. Le projet de thèse

Le projet de thèse qui m'a été proposé avait pour objectif de contribuer à la caractérisation du gène *CgCCaMK*, l'homologue du gène *CCaMK/DMI3* de Légumineuses, isolé chez *C. glauca*. Lorsque j'ai rejoint l'IRD de Montpellier, l'isolement du gène avait déjà été réalisé et une partie de la caractérisation moléculaire effectuée par Dr. Hassen Gherbi et ses collaborateurs. J'ai complété ce travail en procédant à une analyse de

l'expression spatio-temporelle de la région promoteur du gène *CgCCaMK*, afin de confirmer son rôle potentiel lors du processus d'infection par *Frankia*. L'ensemble des résultats obtenus sur *CgCCaMK* fait l'objet de mon premier chapitre de thèse. Il comprendra également un article qui sera soumis prochainement à la revue « Plant Physiology ».

Le second chapitre de ma thèse est consacré à l'étude de la régulation de ce gène, en déterminant le rôle du domaine autoinhibiteur (CAM), travail qui a constitué le cœur de mon travail de recherche. L'ensemble des perspectives offertes par les résultats que j'ai obtenus sera discuté dans la dernière partie de mon manuscrit. Dans cette partie est jointe une revue en premier auteur, publiée en 2011 dans « Journal of Botany », dédiée à l'apport des plantes transgéniques composites à la connaissance de la symbiose actinorhizienne.

V. Revue

**« *FIXATION BIOLOGIQUE DE L'AZOTE : LA SYMBIOSE
ACTINORHIZIENNE CASUARINA-FRANKIA* »**

Sciences & Technologies C - N°35, p. 15-19 (2012)

FIXATION BIOLOGIQUE DE L'AZOTE : LA SYMBIOSE ACTINORHIZIENNE CASUARINA-FRANKIA

Reçu le 04/10/2011 – Accepté le 07/03/2012

M. BENABDOUN¹⁻², H. GHERBI² A.DJEKOUN¹, D. BOGUSZ², C. FRANCHE², N. YKHLEF¹

¹ Laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologies Végétales, Faculté SNV, Département de Biologie et Ecologie, Université Mentouri-Constantine, Route Ain El Bey, Constantine. Algérie

² Rhizogenèse, UMR DIADE, Institut de Recherche pour le Développement (IRD), 911 Avenue Agropolis, BP 64501, 34394, Montpellier, Cedex 5 (France)

Résumé

Casuarina glauca est une espèce tropicale ligneuse à croissance rapide, bien adaptée à la sécheresse et capable de réhabiliter les sols dégradés. Cet arbre a la capacité de développer au niveau racinaire une symbiose avec l'actinobactérie fixatrice d'azote *Frankia*. Le processus symbiotique aboutit à la formation de nodules ou « actinorhizes », au sein desquels *Frankia* transforme l'azote atmosphérique en ammoniac assimilable par la plante hôte. Depuis une quinzaine d'années, les connaissances sur les mécanismes moléculaires qui gouvernent cette symbiose dite « actinorhizienne » ont connu des progrès remarquables. Plusieurs gènes symbiotiques ont été identifiés et caractérisés et des programmes d'étude du génome ont été initiés tant sur *Casuarina* que sur la bactérie *Frankia*. L'objet de cette revue est de faire le point sur cette symbiose originale qui pourrait constituer un modèle intéressant pour définir des stratégies permettant de faire fixer l'azote aux céréales.

Mots clés : Fixation biologique de l'azote, *Casuarina*, *Frankia*, nodule actinorhizien, gène symbiotique

Abstract

Casuarina glauca is a fast-growing woody species, well adapted to drought in tropical areas, and able to rehabilitate degraded soils. This tree has the ability to develop a root symbiotic process with the nitrogen-fixing actinobacteria *Frankia*. The symbiotic process leads to the development of root nodules so-called actinorhizae, in which *Frankia* reduces the atmospheric nitrogen into ammonia used by the host plant. In the past years, knowledge on the molecular mechanisms governing this actinorhizal symbiosis have made remarkable progress. Several symbiotic genes were identified and characterized, and genomic studies were initiated both on the host plant *Casuarina* and its symbiont *Frankia*. The purpose of this article is to review the last advances on this original symbiosis that could be a valuable model to develop strategies for transferring the ability of nitrogen fixation into cereals.

Keywords: Biological nitrogen fixation, *Casuarina*, *Frankia*, actinorhizal nodule, symbiotic gene



.....*Casuarina glauca*.....
(actinorhizes).....
 (Actinorhizienne).....

Les plantes capables de développer une interaction symbiotique avec l'actinobactérie fixatrice d'azote *Frankia* sont appelées plantes actinorhiziennes. On compte environ 260 espèces de plantes actinorhiziennes, réparties en 25 genres et 8 familles [1]. Ce sont, à l'exception des membres de la famille des *Discariaceae*, des arbres et des arbustes que l'on trouve sur tous les continents et sous tous les climats, l'Antarctique étant exclu [2]. Parmi les espèces actinorhiziennes les plus connues, on peut citer l'aulne (*Alnus glutinosa*), le filao (*Casuarina equisetifolia*), l'olivier de bohème (*Eleagnus angustifolia*) ou encore le céanothe (*Ceanothus dentatus*). Comme chez les légumineuses, le processus symbiotique aboutit au développement, sur le système racinaire, de nodosités plus communément appelées nodules actinorhiziens ou actinorhizés, qui abritent le microorganisme. Au sein de ces structures, la plante hôte fournit des substrats carbonés à *Frankia* qui, en retour, transforme l'azote atmosphérique en ammoniac nécessaire à la croissance du partenaire végétal [3, 4].

Moins étudiée que la symbiose Rhizobium-légumineuses, la symbiose actinorhizienne permet une fixation d'azote comparable et joue un rôle important au niveau écologique. Les plantes actinorhiziennes sont en effet des plantes pionnières, que l'on peut qualifier d'édificatrices en raison de leur rôle dans l'évolution de la roche mère vers un sol véritable [5]. En conditions naturelles, il est également observé une association avec des champignons mycorhiziens qui assurent à la fois une meilleure assimilation du phosphate, protègent les racines de certains pathogènes et contribuent à une meilleure résistance à la sécheresse [6].

L'ensemble de ces caractéristiques permet l'utilisation des arbres actinorhiziens pour la réhabilitation de sols dégradés. Dans les régions tropicales arides et semi-arides, certaines espèces actinorhiziennes de la famille des Casuarinacées jouent un rôle environnemental très important. *C. equisetifolia*, *C. cunninghamiana* et *C. glauca* sont en effet plantés le long des zones littorales pour stabiliser les dunes, protéger les cultures du vent et de l'ensablement, et enrichir les sols en éléments organiques dans des activités d'agroforesterie, associant au sein de parcelles agricoles des rangées de Casuarinas espacées d'une dizaine de mètres [7,8]. En Algérie, Casuarina est utilisé comme espèce ornementale dans les villes, comme brise-vent par les paysans ou encore pour réhabiliter d'anciennes carrières.

Si les outils de la biologie moléculaire et de la génomique végétale ont tout d'abord bénéficié à des plantes dites « modèles », comme *Arabidopsis thaliana* ou le riz, les progrès techniques fantastiques obtenus ces dernières années permettent désormais des avancées importantes dans la connaissance de plantes d'intérêt diversifiées. Chez les plantes fixatrices d'azote, *Medicago truncatula* et *Lotus japonicus* se sont imposées comme des modèles pour décrypter les gènes clés du processus conduisant à la symbiose avec Rhizobium. Pour les plantes

actinorhiziennes, des études moléculaires ont été développées par différents groupes de recherche sur *A. glutinosa*, *C. glauca*, *D. glomerata* et *E. angustifolia* [9].

Le développement de techniques d'analyse fonctionnelle des gènes symbiotiques chez *C. glauca*, basées sur une approche d'interférence par l'ARN et des méthodes de transformation génétique bien maîtrisées, ainsi que l'obtention de données comparatives importantes sur les transcriptomes de nodule et de racine, font cependant de cette plante actinorhizienne un modèle pour l'étude du processus d'infection de la plante hôte par *Frankia* [10, 11, 12, 13]. Un bilan des connaissances de la symbiose *Casuarina-Frankia* est présenté dans cette revue, avec un intérêt particulier dédié aux phases précoces de l'interaction. Les données seront situées dans un cadre comparatif avec la symbiose Rhizobium-légumineuse.

Le microorganisme *Frankia*

Frankia est une bactérie filamenteuse, Gram positif, capable de fixer l'azote à l'état libre. Décrite la première fois à la fin du 19^{ème} siècle, il faudra attendre 1982 [14] pour que la première culture pure de *Frankia* symbiotique de Casuarina soit obtenue, et à ce jour, il existe encore des souches de *Frankia* qui ne peuvent être cultivées à l'état libre. En culture pure, l'actinomycète différencie des hyphes qui sont la forme végétative, et dans un milieu sans azote, des vésicules généralement sphériques sont observées en position terminale des hyphes. Ces cellules possèdent une enveloppe lipidique composée de multiples couches d'hopanoides qui assurent une protection du complexe nitrogénase contre une inactivation par l'oxygène, permettant ainsi la fixation de l'azote [15]. Au sein des nodules de Casuarina, les vésicules ne sont cependant pas observées, d'autres mécanismes de protection contre l'oxygène étant impliqués.

En 2007 est publiée la séquence de la souche de *Frankia* CcI3 isolée de nodules de *C. cunninghamiana* [16]. L'analyse révèle que le génome est circulaire, de petite taille (5,43 Mb), qu'il contient 4 499 séquences codantes et possède un GC% égal à 71%. Cette souche possède une spécificité d'hôte étroite, restreinte à quelques espèces du genre *Casuarina*. La recherche d'homologues des gènes *nodA,B,C* impliqués dans la synthèse du squelette du lipochitoooligosaccharide constitutif des facteurs Nod de Rhizobium, a permis d'identifier 3 candidats pour *nodB*, avec un pourcentage d'identité compris entre 35,2% et 48,1% ; l'identité est comprise entre 23,6% et 25,1% pour *nodC* ; en revanche, il n'y a aucun candidat pour *nodA* dans le génome de CcI3, ce qui suggère que les molécules signal de *Frankia* impliquées dans les phases précoces de l'interaction avec le système racinaire actinorhizien ont une structure un peu différente. Malheureusement, l'absence de systèmes d'analyse génétique chez l'actinomycète ne permet pas la validation fonctionnelle de ces candidats ; il n'existe pas non plus de méthode de mutagenèse par transposon qui permettrait de révéler les gènes clés du processus de nodulation chez le partenaire bactérien [9, 17].

Le développement du nodule actinorhizien

Le processus d'infection de Casuarina par Frankia est dit « intracellulaire », impliquant l'infection de poils racinaires (voir Figure 1) [18]. Le premier signe du processus symbiotique est une déformation des poils absorbants, induite par des molécules de nature inconnue secrétées par Frankia lors du contact avec les racines de la plante hôte. Les hyphes pénètrent ensuite dans la zone de courbure d'un poil racinaire, puis sont encapsulés dans une structure équivalente au cordon d'infection des légumineuses. Suite à des divisions dans le cortex de la racine infectée, une structure appelée pré-nodule est observée [19]. Ce pré-nodule contient de larges cellules corticales infectées par Frankia, qui fixent l'azote. Le primordium nodulaire est ensuite initié à partir de divisions observées dans le pérycèle de la racine, en face d'un pôle de protoxylème, dans une zone proche du pré-nodule. Les hyphes vont ensuite progresser du pré-nodule vers les cellules corticales du lobe nodulaire en formation. Un nodule mature est constitué de plusieurs lobes nodulaires, chacun possédant une vascularisation centrale, et un cortex organisé en plusieurs zones : zone méristématique, zone d'infection, et zone de fixation d'azote ; dans les nodules âgés, une zone de sénescence est observée. Des couches de cellules non infectées, riches en polyphénols, séparent les files de cellules infectées et induisent une compartimentation du lobe nodulaire chez *C. glauca* [20].

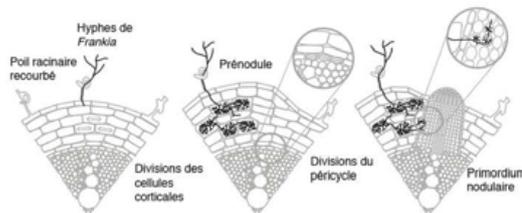


Figure 1 : Processus d'infection intracellulaire du système racinaire de *Casuarina glauca* par *Frankia*.

Approche moléculaire des étapes précoces de la symbiose

Chez les légumineuses, plusieurs gènes impliqués dans la perception et la transduction des facteurs de nodulation (facteurs Nod) de rhizobium ont été isolés sur la base d'approches génétiques. Le criblage de mutants chimiques incapables de former des nodules (Nod-) a permis d'identifier des gènes-clés de la voie de signalisation aux facteurs Nod [21, 22]. Parmi ces gènes, on peut citer par exemple *NFR1&5/LysM/LYK3/NFP*, un récepteur kinase à domaine LysM qui interagirait avec les facteurs Nod ; *DMI1/Castor/Pollux*, une protéine du canal cationique ; *SymRK/DMI2/NoRK*, un récepteur de type LRR ; *DMI3/CCaMK*, une « Calcium & Calmodulin-dépendant kinase » ; *NSP1*, *NSP2* et *NIN*, des régulateurs transcriptionnels. Ces gènes forment ainsi une cascade signalétique indispensable au dialogue entre les deux partenaires et à l'établissement de la symbiose. De plus, certains gènes de cette voie de signalisation sont

indispensables à l'établissement de symbioses endomycorhiziennes à arbuscules (AM).

Chez les plantes actinorhiziennes, la recherche de gènes symbiotiques a été effectuée soit par criblage de banques d'ADNc de nodosités, soit grâce aux homologues de séquences présentes avec des gènes symbiotiques de légumineuses. Récemment, l'homologue du gène *SYMRK* a été isolé. Ce gène symbiotique représente le premier élément commun à l'ensemble des voies de signalisation conduisant à des endosymbioses racinaires. Le gène *CgSYMRK* est exprimé dans les racines et les nodules de *C. glauca*, et son extinction obtenue par une approche d'interférence d'ARN (ARNi) conduit à une diminution significative de la nodulation et de la mycorhization. La complémentation d'un mutant *symrk* de lotier par *CgSymRK* restaure la nodulation et la mycorhization. Ces résultats indiquent que *CgSymRK* est essentiel à la nodulation et à la mycorhization chez *Casuarina*, et qu'il est fonctionnellement équivalent au gène *SymRK* de légumineuse [23].

Par ailleurs, des collections d'ESTs (Étiquettes de Séquences Exprimées) de nodules et de racines de *C. glauca* ont été obtenues [12, 13]. L'analyse du transcriptome de *Casuarina* lors des étapes précoces de la nodulation a permis d'identifier des homologues de la plupart des gènes de la voie de signalisation symbiotique des légumineuses comme les gènes *LysM-RLKS*, *DMI1*, *DMI3/CCaMK*, *NSP* ou *NIN* [13]. Ces résultats suggèrent que les symbioses actinorhiziennes et légumineuse-rhizobium partagent une cascade signalétique commune (Figure 2) et l'ensemble des travaux réalisés renforce l'hypothèse d'un mécanisme génétique universel pour les endosymbioses racinaires.

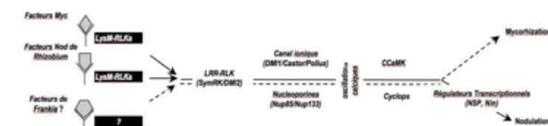


Figure 2 : Éléments génétiques communs partagés par les endosymbioses racinaires.

Représentation simplifiée de la voie de signalisation commune conduisant à la nodulation et à l'endomycorhization. Dans la symbiose *Frankia*-plantes actinorhiziennes, on retrouve la plupart de ces éléments génétiques. Les études fonctionnelles des gènes de *C. glauca* présentant des homologues avec les gènes symbiotiques de légumineuses sont en cours.

Un modèle adapté pour le transfert de la fixation d'azote aux céréales ?

L'un des enjeux de la compréhension du processus symbiotique de fixation d'azote est de pouvoir transférer cette propriété à des plantes incapables de développer des nodules, et en particulier les céréales [24].

La consommation d'engrais à l'échelle mondiale a augmenté de 40% entre 1980 et 2006. La production industrielle d'azote s'effectue grâce au procédé Haber-

bosch destiné à synthétiser de l'ammoniac (NH₃) par hydrogénation du diazote (N₂) gazeux atmosphérique avec le dihydrogène (H₂) gazeux. Ce processus est très coûteux, car le marché du pétrole et du gaz influence le cours des engrais azotés. Par ailleurs, les engrais azotés sont source de risques environnementaux et sanitaires importants. En effet, sous forme chimique (ion NO₃⁻ dit « nitrate »), l'azote est particulièrement soluble dans l'eau, et peut alors être à l'origine d'une eutrophisation du milieu. On sait également que les nitrates et les nitrites ont plusieurs effets sur la santé.

Plusieurs avancées récentes sont encourageantes dans la perspective d'un transfert de fixation symbiotique par exemple chez le riz ou le maïs. D'une part, comme pour la grande majorité des végétaux terrestres, les céréales sont capables de s'associer aux champignons mycorrhiziens et les nombreuses données résultant des programmes de séquençage des génomes de céréales ont permis d'identifier des gènes homologues à ceux déjà mis en évidence chez les légumineuses modèles impliqués dans le processus de mycorrhization. Comme indiqué dans le paragraphe précédent, certains de ces gènes sont communs au processus de nodulation et donc susceptibles d'être détournés vers un programme génétique permettant l'interaction avec des bactéries fixatrices d'azote.

D'autre part, les données moléculaires et génomiques générées sur les légumineuses ont apporté ces dernières années des connaissances précises sur les phases de reconnaissance nécessaires à la pénétration et à l'accommodation du microorganisme symbiotique dans la plante hôte [21, 25]. La conservation de certains de ces mécanismes chez les plantes actinorhiziennes permet de confirmer le rôle clé de certains gènes [23] et d'apprécier les modifications nécessaires pour reproduire chez les céréales un programme génétique aboutissant à la pénétration d'un microorganisme fixateur d'azote dans le système racinaire. Le lobe nodulaire actinorhizien qui se rapproche de par son origine et sa structure à une racine latérale modifiée, pourrait fournir un modèle particulièrement approprié pour tenter de noduler les céréales. De plus, le microorganisme *Frankia* présente également des caractéristiques intéressantes [9, 26]. Contrairement aux Rhizobia qui induisent des nodules sur des plantes d'une seule famille, celle des légumineuses ou Fabacées, *Frankia* interagit avec 8 familles de plantes différentes. La différenciation de vésicules chez *Frankia* permet également au microorganisme de protéger naturellement la nitrogénase de l'inactivation par l'oxygène.

Pour l'Algérie, ces recherches sont de première importance puisque les céréales sont à la base du système alimentaire, le blé représentant 88% des céréales consommées. Avec les progrès réalisés dans le séquençage des génomes végétaux complexes, les recherches sur le blé devraient progresser dans les prochaines années et conduire à l'introduction et l'expression de caractères d'intérêt agronomiques.

CONCLUSIONS

Avec des valeurs égales à 116 kg d'azote fixé par hectare et par an dans des plantations de *Casuarina*, les plantes actinorhiziennes constituent, après les légumineuses, le second groupe de plantes importantes capables de fixer l'azote [27]. Elles ont démontré toute leur utilité dans certains pays du Sud, comme par exemple en Egypte pour lutter contre la désertification, ou au Sud de la Chine pour protéger les fermes contre les typhons et les tsunamis.

L'étude comparative du mécanisme d'infection de *Casuarina* par *Frankia*, avec celui des légumineuses modèles *M. truncatula* et *L. japonicus*, permettra de mettre en évidence les mécanismes communs ou spécifiques développés lors de ces endosymbioses fixatrices d'azote [28, 29]. De la comparaison avec les symbioses endomycorhiziennes qui concernent 80% des plantes terrestres, devraient naître des stratégies innovantes pour élargir la fixation biologique de l'azote aux céréales. Si cet objectif a longtemps été considéré comme très complexe à réaliser, les connaissances générées sur la signalisation, la perception des signaux symbiotiques et leur transduction, ouvrent la voie à moyen terme à des applications qui seront de première importance en agronomie pour limiter l'utilisation des engrais azotés.

REFERENCES

- [1]- Wall L.G., « The actinorhizal symbiosis », *J. Plant Growth Reg.*, Vol. 19 (2000), pp. 167-182.
- [2]- Dawson J.O., « Ecology of actinorhizal plants », *Nitrogen fixation research: origins and progress*, vol VI: Nitrogen-fixing Actinorhizal symbioses, Pawlowski K., Newton W.E. (eds), (2008), Springer, pp. 199-234.
- [3]- Pawlowski K., « Induction of actinorhizal nodules by *Frankia* », *Prokaryotic symbionts in plants*, Microbiology Monographs, vol. 8 (2009), Pawlowski K. (ed.), Münster, Germany, pp. 127-154.
- [4]- Persson T., Huss-Danell K., « Physiology of actinorhizal nodules », *Prokaryotic symbionts in plants*, Microbiology Monographs, vol. 8 (2009), Pawlowski K. (ed.), Münster, Germany, pp. 155-178.
- [5]- Moiroud A., « Diversité et écologie des plantes actinorhiziennes », *Acta Bot. Gall.*, Vol. 143 (1996), pp. 651-661.
- [6]- Diem H.G., « Les mycorhizes des plantes actinorhiziennes », *Acta bot. Gallica*, Vol. 143 (1996), pp. 581-592.
- [7]- Diem H.G., Dommergues Y.R., « Current and potential uses and management of *Casuarinaceae* in the tropics and subtropics », *The biology of Frankia and actinorhizal plants*, Schwintzer R., Tjepkema J.D. (eds) (1990), Academic press Inc., San Diego, pp. 317-342.

- [8]- Zhong C., Zhang Y., Chen Y., Jiang Q., Chen Z., Liang J., Pinyopusarek K., Franche C., Bogusz D., « *Casuarina* research and applications in China », Vol. 50 (2010), pp. 107-114.
- [9]- Franche C., Lindström K., Elmerich C., "Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants", *Plant Soil*, Vol. 321(2009), pp. 35-59.
- [10]- Franche C., Diouf D., Le Q.V., N'Diaye A., Gherbi H., Bogusz D., Gobé C., Duhoux E., "Genetic transformation of the actinorhizal tree *Allocauarina verticillata* by *Agrobacterium tumefaciens*", *Plant J.*, Vol. 11 (1997), pp. 897-904
- [11]- Gherbi H., Nambiar-Veetil M., Zhong C., Félix J., Autran D., Girardin R., Vaissayre V., Auguy F., Bogusz D., Franche C., "Post-transcriptional gene silencing in the root system of the actinorhizal tree *Allocauarina verticillata*", *Mol. Plant-Microbe Interact.*, Vol. 21 (2008), pp. 518-524.
- [12]- Hocher V., Auguy F., Argout X., Laplaze L., Franche C., Bogusz D., "Expressed sequence -tag analysis in *Casuarina glauca* actinorhizal nodule and root", *New Phytol.*, Vol. 169 (2006), pp. 681-688.
- [13]- Hocher V., Alloisio N., Auguy F., Fournier P., Doumas P., Pujic P., Gherbi H., Queiroux C., Da Silva C., Wincker P., Normand P., Bogusz D., "Transcriptomics of actinorhizal symbioses reveals homologs of the whole common symbiotic signaling cascade", *Plant Physiol.*, Vol. 156 (2011), pp. 700-711.
- [14]- Diem H.G., Gauthier D., Dommergues Y., "Extranodular growth of *Frankia* on *Casuarina equisetifolia*", *FEMS Microbiol. Lett.*, Vol. 15 (1982), pp. 181-184.
- [15]- Berry A.M., Harriott O.T., Moreau R.A., Osman S.F., Benson D.R., Jones A.D., "Hopanoid lipids compose the *Frankia* vesicle envelope, presumptive barrier of oxygen diffusion to nitrogenase", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 90 (1993), pp. 6091-6094.
- [16]- Normand P., Lapiere P., Tisa L.S., Gogarten J.P., Alloisio N., Bagnarol E., Bassi C.A., Berry A.M., Bickhart D.M., Choisine N., Couloux A., Courmoyer B., Cruveiller S., Daubin V., Demange N., Francino M.P., Goltsman E., Huang Y., Martinez M., Mastrorunzio J.E., Mullin B.C., Nieman J., Pujic P., Rawnsley T., Rouy Z., Schenowitz C., Sellstedt A., Tvares F., Tomkins J.P., Vallenet D., Valverde C., Wall L., Wang Y., Medigue C., Benson D.R., "Genome characteristics of facultatively symbiotic *Frankia* sp. strains reflect host range and host plant biogeography", *Genome Res.*, Vol. 17 (2007), pp. 7-15.
- [17]- Lavire C., Courmoyer B., "Progress on the genetics of the N₂-fixing actinorhizal symbiont *Frankia*", *Plant Soil*, Vol. 254 (2003), pp. 125-137.
- [18]- Duhoux E., Diouf D., Gherbi H., Franche C., Ahé J., Bogusz D., « Le nodule actinorhizien », *Acta bot. Gallica*, Vol. 143(1996), pp. 593-608.
- [19]- Laplaze L., Duhoux E., Franche C., Frutz T., Svistoonoff S., Bisseling T., Bogusz D., Pawlowski K., "Casuarina glauca prenodule cells display the same differentiation as the corresponding nodule cells", *Mol. Plant-Microbe Interact.*, Vol. 13 (2000), pp. 107-12.
- [20]- Laplaze L., Gherbi H., Frutz T., Pawlowski K., Franche C., Macheix J.-J., Auguy F., Bogusz D., Duhoux E., « Flavan-containing cells delimit *Frankia*-infected compartments in *Casuarina glauca* nodules », *Plant Physiol.*, Vol. 121(1999), pp. 113-122.
- [21]- Oldroyd G.E.D., Downie J.A., "Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes", *Ann. Rev. Plant Biol.*, Vol. 59 (2008), pp. 519-546.
- [22]- Kouchi H., Imaizumi-Anraku H., Hayashi M., Hakoyama T., Nakagawa T., Umehara Y., Suganuma N., Kawaguchi M., « How many peas in a pod? Legume genes responsible for mutualistic symbioses underground », *Plant Cell Physiol.*, Vol. 51(2010), pp. 1381-97.
- [23]- Gherbi H., Markmann K., Svistoonoff S., Estevan J., Autran D., Giczey G., Auguy F., Péret B., Laplaze L., Franche C., Parniske M., Bogusz D., "*SymRK* defines a common genetic basis for plant root endosymbioses with AM fungi, rhizobia and *Frankia* bacteria", *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, Vol. 105 (2008), pp. 4928-4932
- [24]- Charpentier M., Oldroyd G., "How close are we to nitrogen-fixing cereals?", *Cur. Opin. Plant Biol.*, Vol. 13 (2010), pp. 556-564.
- [25]- Madsen L.H., Tirichine L., Jurkiewicz A., Heckmann A.B., Bek A.S., Ronson C.W., James E.K., Stougaard J., "The molecular network governing nodule organogenesis and infection in the model legume *Lotus japonicus*", *Nature com.*, Vol. 1 (2010), pp.1-12.
- [26]- Normand P., Fernandez M.P., "Evolution and diversity of *Frankia*", *Prokaryotic symbionts in plants*, Microbiology Monographs, vol. 8 (2009), Pawlowski K. (ed.), Münster, Germany, pp. 103-125.
- [27]- Dommergues Y., "La fixation d'azote chez les plantes actinorhiziennes et ses applications", *Acta. Bot. Gallica*, Vol. 143 (1996), pp. 663-680.
- [28]- Vessey J.K., Pawlowski K., Bergman B., "Root-based N₂-fixing symbioses: Legumes, actinorhizal plants, Parasponia sp and cycads", *Plant Soil*, Vol. 274 (2005), pp. 51-78.
- [29]- Pawlowski K., Sprent J., "Comparison between actinorhizal and legume symbiosis", *Nitrogen-fixing actinorhizal symbioses* (2008), Pawlowski K., Newton WE (eds), Dordrecht, Springer Netherlands, pp. 261-288.



Matériels et Méthodes

I. Matériels

1. Matériel végétal

Les graines de *Casuarina glauca* sont d'origine australienne (CSIRO : *The Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation*). Elles sont conservées à 4°C.

2. Matériel bactérien

2.1. *Escherichia coli*

La souche commerciale d'*E. coli* JM109 (Promega) a été utilisée pour les clonages moléculaires.

2.2. *Agrobactéries*

La transformation génétique des plantules de *C. glauca* par *A. rhizogenes* a été réalisée en utilisant soit la souche A4RS de type agropine, dérivée de la souche sauvage A4 (Jouanin *et al.*, 1986), soit la souche ARqua1 (Quandt *et al.*, 1993). Les souches A4RS et ARqua1 portent respectivement une résistance chromosomique à la rifampicine (10 mg.mL⁻¹) et à la streptomycine (20 mg.mL⁻¹).

La souche désarmée d'*A. tumefaciens* C58C1 (pGV2260) (Vancanneyt *et al.*, 1990) comportant le gène *nptII* a été employée pour transférer de manière stable les différentes constructions étudiées chez *C. glauca*.

2.3. *Frankia*

La souche de *Frankia* utilisée pour noduler *C. glauca* est la souche CcI3 (McEwan et Wheeler, 1997) isolée à partir de nodules de *C. cunninghamiana*. Cette actinobactérie a été gracieusement fournie par Philippe Normand (Université Claude Bernard Lyon 1, France).

3. Plasmides et oligonucléotides utilisés

Les clonages des produits PCR sont réalisés avec le kit pGEM-T Easy (Promega, Madison, WI, USA) selon les instructions du fournisseur. Le vecteur pGEM-T est

particulièrement pratique pour le clonage de produits de PCR car il possède une thymidine à chaque extrémité 3'. Il porte également une origine de répllication reconnue par *E. coli*, le gène de résistance à l'ampiciline *AmpR* et un site de polyclonage compris dans la séquence de l'enzyme LacZ. L'intégration d'un insert dans la séquence de la β -galactosidase permet un criblage blanc/bleu des colonies sur des boîtes de milieu LB gélosé contenant du X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside).

Le vecteur choisi pour la transformation génétique de *C. glauca* via *A. rhizogenes* est le plasmide pHKN29 fourni par le Dr. Kouchi (National Institute of Agrobiological Sciences, Ibaraki, Japon) et du terminateur *Nos* (nopaline synthase) (**Annexe 1**) (Kumagai et Kouchi, 2003). Ce vecteur possède le gène rapporteur de la *GFP* « Green Fluorescent Protein » (Haseloff et Amos, 1995) permettant de sélectionner par fluorescence les racines génétiquement transformées. Tous les plasmides utilisés pour les constructions géniques figurent dans l'**Annexe 2**. Les séquences nucléotidiques utilisées pour tester les clonages moléculaires sont rassemblées dans l'**Annexe 3**.

II. Méthodes

1. Culture du matériel

1.1. Culture du matériel végétal

1.1.1. Culture in vitro de *C. glauca*

La désinfection des graines de *Casuarina* a été réalisée selon le protocole décrit ci-dessous. Les graines sont scarifiées par un traitement de 2 min dans l'acide sulfurique (H_2SO_4) à 96%, puis rincées abondamment à l'eau distillée pendant 30 min. Elles sont ensuite trempées pendant 5 min dans 200 mL d'eau distillée stérile additionnée de quelques gouttes de Triton X-100, puis baignées rapidement dans de l'éthanol 75%. Après rinçage à l'eau distillée, les graines sont désinfectées à l'hypochlorite de calcium ($CaCl_2O_2$ à 5%) pendant 40 min. Elles sont ensuite rincées trois fois à l'eau stérile et séchées une nuit sous hotte avant d'être semées en boîtes de Petri contenant du milieu H gélosé (Hoagland et Arnon, 1938) dilué au quart (**Annexe 4**).

Après environ 3 semaines d'incubation en chambre de culture, les plantules sont transférées dans des boîtes Magenta contenant le même milieu gélosé (100 mL de milieu/boîte, 30 plantes/boîte). La propagation des plantes en culture *in vitro* est réalisée dans une chambre de culture conçue pour les Casuarinacées, avec une température de 26°C, une lumière de 75 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^2\cdot\text{sec}^{-1}$ fourni par des tubes fluorescents (Gro-Lux, Sylvania-Osram, Munich, Allemagne) et une photopériode de 16 h. Les plantes transgéniques de *C. glauca* obtenues par transformation génétique avec *Agrobacterium* sont également cultivées dans la même chambre de culture.

1.1.2. Transfert en hydroponie de C. glauca

Deux mois après germination des graines de *C. glauca*, les plantules sont transférées en hydroponie dans des pots contenant une solution nutritive BD modifié (Broughton et Dilworth, 1971) avec ajout d'azote (KNO_3 à 5 mM) (**Annexe 5**). Les pots (4 plantules/pot) sont placés dans une chambre de culture à 28°C sous un éclairage de 150 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^2\cdot\text{sec}^{-1}$ et une photopériode de 16 h. Les plantes sont arrosées ($\frac{3}{4}$ du système racinaire) 2 fois par semaine.

1.2. Culture des bactéries

1.2.1. Escherichia coli

Les souches d'*E. coli* sont cultivées à 37°C dans du milieu LB (**Annexe 6**) (Bertani, 1951), sous une agitation de 250 rpm (pour la culture liquide). Les bactéries sont conservées à -80°C dans le milieu de culture liquide contenant 25% de glycérol.

1.2.2. Agrobactéries

Les souches d'agrobactéries sont cultivées à 28°C dans un milieu Ag solide ou liquide (**Annexe 7**) avec les antibiotiques appropriés. Les souches bactériennes sont conservées à -80°C dans le milieu de culture liquide contenant 25% de glycérol.

1.2.3. Frankia

La souche de *Frankia* CcI3 (McEwan et Wheeler, 1997) a été cultivée et entretenue par

des repiquages hebdomadaires (Fontaine *et al.*, 1986) sur du milieu BAP-PCM liquide (**Annexe 8**) additionné extemporanément de MES-TRIS (5 mM, pH 6,8) et de phosphatidylcholine d'œuf (Sigma) (1 mg.L^{-1}) selon la technique décrite par Schwencke (1991). Une culture pure de *Frankia* présente 2 phases après décantation, une phase inférieure contenant les hyphes bactériens et un surnageant limpide.

Pour réaliser une sous-culture, la solution décantée de *Frankia* est prélevée (environ 50 mL pour 250 mL initial) et centrifugée (4000 rpm, 15 min, 25°C). Le surnageant est éliminé et le culot est repris dans environ 10 mL d'eau distillée stérile et centrifugé à nouveau. La moitié du surnageant est éliminée et le culot (environ 5-10 mL) est repris dans un tube à hémolyse (vacutainer). À l'aide d'une seringue de 10 mL munie d'une aiguille stérile Terumo (0,8 x 40 mm), les hyphes de *Frankia* sont fragmentés par une série de 10 aspirations-refoulements.

La culture estensemencée dans du milieu BAP-PCM liquide et mise sous agitation douce à 250 rpm à 28°C (à l'obscurité) pendant 4 jours (maximum de croissance). Les paramètres de pureté (qualité) de l'inoculum sont évalués sur les cultures 24 h après l'arrêt de l'agitation. Cette préparation de *Frankia* est utilisée pour ensemenecer de nouvelles cultures.

2. Méthodes de transformation génétique

2.1. Transformation génétique des bactéries

2.1.1. Préparation des agrobactéries électrocompétentes

Une culture d'un litre des agrobactéries (DO_{600} à 0,6) est laissée dans la glace pendant 15 min, puis centrifugée 10 min à 3000 rpm à 4°C. Le culot est repris successivement dans un litre d'eau stérile froide, 0,5 L d'eau stérile froide et deux fois dans 20 mL de glycérol 10% froid. Les bactéries sont aliquotées à raison de 40 μL dans des tubes de 1,5 mL et immédiatement plongées dans l'azote liquide (-196°C). Les bactéries compétentes sont conservées à -80°C jusqu'à utilisation.

2.1.2. Électroporation d'Agrobacterium

Les plasmides sont introduits dans les bactéries électrocompétentes après un choc

électrique. Un volume de 40 μL de bactéries est mélangé avec 2 μL de plasmide (1 ng. μL^{-1}), puis laissé sur glace pendant 2 min et transféré dans une cuve à électroporation de 2 mm. La solution est soumise à une décharge de 2,5 kV, 200 ohms et 25 μF . Un volume de 600 μL de milieu Ag liquide est immédiatement ajouté aux cellules qui sont ensuite incubées pendant 3 h à 28°C sous agitation, avant d'être étalées sur du milieu Ag gélosé sélectif.

2.1.3. Transformation d'*E. coli*

Pour le choc thermique, 50 μl de bactéries thermocompétentes (commerciales) sont mélangées avec 1 à 5 μL de la ligation. La solution est laissée 30 min dans la glace, puis incubée 45-50 min à 42°C et ensuite refroidie 2 min sur glace. Six cents μl de milieu LB sont ensuite rajoutés, et incubés 1 h 30 min à 37°C sous agitation douce (150 rpm). Le mélange est étalé sur du milieu LB solide contenant l'antibiotique approprié pour sélectionner les bactéries transformées, additionné de X-Gal (80 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

2.2. Transformation génétique des plantes

Les plasmides utilisés pour la transformation génétique de *C. glauca* via *Agrobacterium* sont mentionnés dans l'**Annexe 9**.

2.2.1. Transformation in vitro de *C. glauca* via *A. rhizogenes*

La transformation génétique des plantes a été réalisée selon le protocole établi par Diouf *et al.* (1995). Des plantes âgées de 45 jours et cultivées *in vitro*, sont piquées 3 fois au niveau de l'hypocotyle à l'aide d'une aiguille (Terumo, 0,45 X 12 mm) préalablement trempée dans une colonie d'*A. rhizogenes* contenant le vecteur de transformation choisi. Durant la phase de co-culture, les plantes sont disposées dans des boîtes de Petri (5 à 6 plantes par boîte) contenant un milieu MSC (Murashige et Skoog, 1962) dilué au demi mieux adapté pour les *Casuarinaceae* (**Annexe 10**) et incubées en chambre de culture pendant 6 jours, à 25°C, sous lumière réduite. Elles sont ensuite transférées sur le même milieu additionné de 400 mg.mL^{-1} d'Augmentin (antibiotique, Duchefa) afin d'éliminer les agrobactéries.

Après 4 à 5 semaines de culture, les plantes présentent des racines de type « hairy root » au niveau de l'hypocotyle. Ces plantes sont dites « composites » car elles se composent

d'une partie aérienne non-transformée et d'une partie racinaire transgénique. Les plantes dont les racines sont fluorescentes sous lumière GFP sont sélectionnées. Ces racines GFP+ sont identifiées sous une loupe binoculaire (Leica MZ FLIII) munie du filtre GFP3 (excitation : 470/40 nm, émission : 525/50 nm). Une à deux racines co-transformées sont conservées pour le développement des plantes composites en système hydroponique selon les conditions de culture décrites dans le § 1.1.1.

2.2.2. Transformation in vitro de *C. glauca* via *A. tumefaciens*

La transformation de *C. glauca* a été réalisée en modifiant le protocole décrit par Franche *et al.* (1997). Des fragments d'épicotyle d'environ 2 cm sont coupés à l'aide d'un scalpel sur des plantes cultivées *in vitro* et âgées d'environ 45 jours. Ces explants sont mis en contact avec une culture de nuit des agrobactéries contenant la construction d'intérêt, diluée au dixième dans du milieu MSC liquide. Ils sont laissés pendant 1 h sous agitation rotative lente. L'excès de bactéries sur les épicotyles est ensuite absorbé sur du papier filtre (Whatman, 3MM) stérile, puis les épicotyles sont déposés dans des boîtes de Petri contenant du milieu MSC solide additionné de 7 g.L⁻¹ de Bacto-agar (Difco), d'acide naphthalène acétique (ANA) à 0,1 mg.L⁻¹ et de benzylaminopurine (BA) à 1 mg.L⁻¹. Parallèlement, des explants non-transformés génétiquement sont cultivés, soit sur milieu sans antibiotique, constituant ainsi des contrôles positifs de régénération, soit sur milieu avec antibiotiques comme contrôles de la sensibilité du matériel végétal aux concentrations d'antibiotiques utilisées.

Après 3 jours de co-culture à 25°C sous lumière réduite, les explants sont lavés 3 fois pendant 1 h sous agitation dans du MSC liquide, puis placés dans des boîtes de Petri sur MSC gélosé avec régulateurs de croissance et antibiotiques de sélection : céfotaxime (250 mg.L⁻¹) et kanamycine (25 mg.L⁻¹). Après 15 jours, les concentrations en kanamycine sont augmentées à 50 mg.L⁻¹ et le milieu est renouvelé toutes les 3 semaines. Les boîtes de Petri sont scellées avec du parafilm et placées en chambre de culture sur une étagère éclairée.

Un mois après contact avec *A. tumefaciens* C58C1 (pGV2260) des cals poussant sur kanamycine apparaissent aux extrémités des épicotyles. Lorsque leur taille atteint environ 5 mm de diamètre, les cals sont transférés en tube de verre contenant du milieu MSC additionné d'ANA 0,1 mg.L⁻¹ (soit 0,5 µM), BA 0,5 mg.L⁻¹ (soit 2 µM), kanamycine (50 mg.L⁻¹) et céfotaxime (250 mg.L⁻¹). La céfotaxime est retirée au bout de 6 mois. Les cals

sont repiqués toutes les 3 semaines jusqu'à l'apparition de bourgeons qui donneront naissance aux rameaux. Lorsqu'ils atteignent 3 à 5 cm, les rameaux sont prélevés, soumis à un choc auxinique de 24 h sur milieu MSC gélosé contenant 8 g.L⁻¹ de Plant-agar et de l'AIB (acide 3-indole butyrique) à 10 mM, puis transférés sur milieu MSC additionné de 40 g.L⁻¹ de sucrose, de 6 g.L⁻¹ de Plant-agar et de 5 g.L⁻¹ de charbon actif. Les premières racines apparaissent environ une semaine après le choc auxinique. Les rameaux enracinés sont transférés en hydroponie (voir conditions de culture dans le § 1.1.1.).

3. Inoculation des plantes par *Frankia*

3.1. Préparation de l'inoculum

L'inoculum de *Frankia* est préparé en cultivant la souche CcI3 de *Frankia* pendant 4 jours selon le protocole décrit dans le § 1.2.3. La culture bactérienne fraîche est concentrée 5 fois dans du milieu BD sans azote, puis centrifugée et lavée dans les mêmes conditions que précédemment. Les hyphes bactériens sont cassés au Potter, étape répétée une seconde fois.

3.2. Inoculation

Après environ 3 semaines d'adaptation en milieu BD azoté, quand le système racinaire est suffisamment développé (environ 10 cm de long), les plantes destinées à la nodulation sont placées dans le même milieu dépourvu d'azote une semaine avant l'inoculation avec *Frankia*. Cent mL d'inoculum de *Frankia* sont mis au contact des racines de chaque plante pendant 2 h. Le système racinaire est ensuite immergé à moitié dans du milieu BD dépourvu d'azote dont le volume est ajusté toutes les semaines.

Les plantes testées pour leur aptitude à produire des nodules spontanés sans inoculation par *Frankia* sont transférées dans le même milieu avec une source différente d'azote (NH₄NO₃ à 1 mM), dans les conditions décrites dans le § 1.1.1.

4. Méthodes de biologie moléculaire

4.1. Extraction de l'ADN plasmidique

Les extractions d'ADN plasmidique d'*E. coli* sont réalisées à partir de cultures liquides

(5 mL) de bactéries en fin de phase exponentielle de croissance dans du milieu LB liquide additionné d'antibiotique de sélection. Le « Miniprep Kit » (Fermentas ou Qiagen) est utilisé selon les instructions du fournisseur. Le « Midiprep Kit » est utilisé pour extraire l'ADN plasmidique des agrobactéries.

4.2. Méthodes de clonage

Les sous-clonages dans pGEM-T Easy et dans le pHKN29 ont été réalisés comme suit :

4.2.1. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

a. Amplification avec une Taq polymérase

Afin de vérifier la présence de l'insert dans le vecteur, l'orientation de l'insert, cribler un fragment d'intérêt, identifier des clones positifs, les réactions d'amplification par PCR sont réalisées dans un volume réactionnel de 20 ou 50 μ L sur environ 1 ng d'ADN. Le mélange de réaction pour une PCR avec la Taq polymérase (Promega) est le suivant : Tampon Taq PCR 1X (1,5 mM $MgCl_2$), 200 μ M dNTPs, 125 μ M de chaque amorce et 1 U Taq ADN polymérase. En parallèle à chaque réaction de PCR, un contrôle négatif composé de milieu réactionnel et d'eau stérile, et un contrôle positif sont réalisés. Le programme utilisé suit le déroulement suivant : une première étape de dénaturation pendant 3 min à 94°C, puis 35 cycles comprenant : 15 sec à 94°C, 30 sec à 55°C, 45 à 90 sec à 72°C, et enfin, une dernière réaction d'élongation à 72°C pendant 5 min. Les temps d'incubation à 72°C sont ajustés selon la longueur des fragments que l'on désire amplifier. La température d'hybridation est ajustée selon la température de fusion des amorces utilisées.

b. Amplification des fragments pour le clonage

D'autres kits de PCR qui comportent une activité correctrice grâce à une enzyme « proof-reading » (activité correctrice), ont été utilisés pour les amplifications ayant servi au clonage de séquences d'intérêt. Un volume réactionnel de 50 μ L a été utilisé pour chaque réaction de PCR (selon les conditions établies par le fournisseur).

Pour le kit « Advantage-HF 2 PCR Kit » (Clontech), les paramètres utilisés pour programmer le thermocycleur sont les suivants : 15 sec à 94°C, 25 à 30 cycles de 15 sec à 94°C et 45 sec à 68°C, puis 3 sec à 68°C et 16 sec à 20°C. On compte environ 1 min

d'élongation (à 68°C) pour 1 kb de longueur de produit de PCR.

4.2.2. Digestion de l'ADN

Les réactions de digestion enzymatique sont effectuées dans 20 à 50 µL de solution contenant de 2 à 5 U par µg d'ADN à digérer (soit un volume maximal d'un dixième du volume réactionnel), 1 à 5 µg d'ADN, et un tampon défini par le fournisseur de l'enzyme (New England Biolabs ou Promega). Les réactions sont réalisées pendant 1 h 30 à 3 h (selon la nature de l'ADN digéré) à la température définie selon l'enzyme de restriction (généralement 37°C).

4.2.3. Purification des acides nucléiques

Les produits de digestion enzymatique sont déposés sur gel d'agarose. Les bandes correspondant à l'ADN désiré sont découpées à l'aide d'un scalpel, placées dans un tube Eppendorf, incubées au bain-marie 5 min à 55°C, puis purifiées à l'aide du kit « GeneClean » (Qbiogene) selon les instructions du fournisseur.

4.2.4. Ligation des fragments d'ADN dans le vecteur

Les ligations sont réalisées avec la T4 ADN ligase de Promega, le mélange plasmide-insert-tampon-T4 ADN ligase est incubé 16 h à 14°C (ou 2 h à 22°C) selon les indications du fournisseur.

Les produits de ligation destinés à l'électroporation (voir § 2.1.3.) sont d'abord purifiés par dialyse sur une membrane de nitrocellulose 0,025 µm (Millipore) avant d'être introduits dans la souche bactérienne appropriée.

4.2.5. Criblage des bactéries transformées

Afin de vérifier la présence de l'ADN inséré dans les bactéries résistantes à l'antibiotique, une PCR sur colonies est réalisée (en conditions stériles) sur 10-20 colonies résistantes pour chaque clone étudié. Un embout stérile piqué dans une colonie bactérienne est plongé une fois dans un tube contenant 20 µL du milieu réactionnel PCR. Deux séries de criblages sont réalisés jusqu'à l'obtention de résultats positifs sur l'ensemble des colonies testées.

Une dernière vérification des clones positifs consiste à extraire le vecteur contenant la construction génique par la méthode « Miniprep Kit », vérifier la présence de l'insert par PCR sur le plasmide purifié, puis digérer le fragment d'intérêt par les enzymes de restriction appropriés. Les plasmides positifs sont ensuite introduits dans *A. rhizogenes* par électroporation (voir § 2.1.2.).

Les paramètres utilisés pour programmer le thermocycleur sont les suivants : 94°C pendant 5 min ; 35 cycles de 15 sec à 94°C, 30 sec à 55°C (à la température d'hybridation des amorces) et 30 à 90 sec à 72°C, puis un dernier cycle de 5 min à 72°C.

4.3. Analyse des acides nucléiques

4.3.1. Électrophorèse

Les résultats d'extractions d'ADN plasmidique, de PCR, de digestions enzymatiques et de purification de fragments d'ADN sont analysés en général avec des mini-gels horizontaux d'agarose à 1% (ou à 1,5%) préparés dans du tampon TBE 0,5X (Tris-Borate 0,045 M, EDTA 1mM). Les échantillons sont déposés tour à tour dans les puits du gel avec un sixième de volume de tampon de charge (Promega) et 6 µL de marqueur de taille moléculaire 100 pb ou 1 kb (Promega). Après migration et séparation des fragments d'ADN dans une cuve d'électrophorèse (contenant du tampon TBE 0,5X) à 100 V (environ 30 min), les gels sont incubés 5 min dans une solution de bromure d'éthidium (BET à 0,1 µg.mL⁻¹) permettant la visualisation de l'ADN sous lumière ultraviolette (312 nm) et rincés à l'eau déminéralisée (Sambrook *et al.*, 1989), puis photographiés sous UV à l'aide d'une caméra numérique *Gel Doc 1000 (BIORAD)*.

4.3.2. Dosage et évaluation de la qualité d'ADN

L'ADN plasmidique a été dosé au spectrophotomètre (NanoDrop), puis déposé sur gel d'agarose afin de visualiser sa qualité.

4.3.3. Séquençage de l'ADN

Les séquençages d'ADN sont réalisés par la société MWG (<http://www.eurofinsdna.com/>).

4.3.4. *Analyse bioinformatique des séquences*

Les alignements des séquences nucléotidiques et protéiques sont soumis au logiciel « BLAST » (Altschul *et al.*, 1990) du serveur du National Center for Biotechnology Information (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Les séquences traduites ont été analysées via le serveur « Sequence Manipulation Suite - SMS » (<http://www.bioinformatics.org/sms2/>). La base de données « Rebase » (Restriction Enzyme data BASE) a été consultée pour avoir des informations concernant les enzymes de restriction et leurs sites de clivage, ainsi que leurs caractéristiques (<http://rebase.neb.com/rebase/>). Les amorces ont été synthétisées (à 0,01 μ mol) par MWG. L'arbre phylogénétique a été construit à l'aide du logiciel « CLC Sequence Viewer 6 » (<http://www.clcbio.com/>), et la séquence promotrice a été analysée via le logiciel « PLACE » (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html>).

5. Histologie

5.1. *Détection histochimique de l'activité β -glucuronidase*

Des échantillons de racines latérales ou de coupes épaisses (prénodules et nodules) réalisées au vibratome ont été incubés à l'obscurité à 37°C pendant environ 24 h, dans une solution X-Gluc contenant le substrat de la β -glucuronidase (acide 5-bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-glucuronique) à 1 mM, additionnée de 0,5 mM de ferri-ferrocyanure de potassium (Jefferson *et al.*, 1987) (**Annexe 11**). L'activité β -glucuronidase conduit, en présence de X-Gluc, à l'apparition de cristaux bleu-indigo. Le mélange ferri-ferrocyanure de potassium agit comme catalyseur de la réaction et limite d'éventuels phénomènes de diffusion.

Avant observation, les racines latérales de *C. glauca* sont fixées pendant 24 h dans une solution contenant 50% d'éthanol et 50% d'acide acétique à température ambiante et immergées plusieurs fois dans l'éthanol à 70%. Pour la clarification des racines, les échantillons ont été incubés dans du KOH (10%) à 90°C jusqu'à leur décoloration, puis rincées avec de l'eau distillée.

5.2. *Fixation, déshydratation et inclusion dans la résine*

Les échantillons prélevés sont plongés dans une solution de fixation (**Annexe 12**) constituée de 4 volumes de paraformaldéhyde 10% pour 1 volume de tampon phosphate (1 M à pH

7,2) (**Annexe 13**). La réaction est réalisée pendant 24 h à température ambiante. La fixation permet une meilleure préservation des tissus. Les échantillons sont ensuite déshydratés au cours de plusieurs bains d'éthanol successifs de concentrations croissantes : 10%, 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% et une nuit dans de l'éthanol absolu. L'imprégnation progressive du matériel végétal dans la résine (50 mL de Technovit 7100 et 0,5 g de durcisseur D) est réalisée par des bains de 1 à 2 h dans des solutions résine-éthanol (1:3, 1:1 et 3:1) et un bain de 1 à 3 jours dans la résine pure.

Les échantillons sont orientés et placés dans des moules contenant la solution d'inclusion (Technovit 3040) composée de résine et durcisseur hardener-II (15:1). Des adaptateurs sont collés aux blocs polymérisés (1 à 2 h à température ambiante) à l'aide d'un ciment de montage.

5.3. Réalisation des coupes

Afin de faciliter l'orientation des structures nodulaires pendant la polymérisation de la résine, les échantillons frais sont inclus dans l'agarose 3%, puis coupés au vibratome VT1000E (Leica Wetzlar, Allemagne). Des coupes épaisses de 200 à 300 μm sont réalisées dans du tampon phosphate froid afin de préserver l'activité GUS (β -glucuronidase), puis incubées à 37°C dans la solution de X-Gluc précédemment décrite. Les échantillons sont ensuite déshydratés et inclus en résine suivant le protocole ci-dessus. Des coupes fines de 3 à 6 μm d'épaisseur sont réalisées au microtome (Microm HM355S, Leica).

5.4. Coloration au bleu de toluidine

Quelques gouttes de la solution aqueuse de bleu de toluidine (0,01%) sont déposées sur les lames portant les coupes de tissus réalisées au microtome. Après 5 min, l'excès de colorant est éliminé par lavage des lames à l'eau MilliQ. Une fois lavées, les lames sont séchées sur une plaque chauffante à 20°C. Le bleu de toluidine génère des colorations métachromatiques, ce qui permet de colorer les différents tissus histologiques en nuances différentes. Les échantillons sont montés entre lame et lamelle dans un milieu de montage Isomount (Labo-nord) avant d'être observés sous microscope.

5.5. Coloration au rouge de ruthénium

Les coupes de nodules sont éventuellement placées (environ 1 min) dans un verre de montre contenant du rouge de ruthénium en solution aqueuse à (0,01%), puis lavées à l'eau MilliQ et montées entre lame et lamelle avec une goutte d'eau. Le rouge de ruthénium est un colorant minéral qui permet de mettre en évidence les matières pectiques.

5.6. Observations microscopiques

L'observation des échantillons non-coupés est faite à la loupe binoculaire (Leica) à faible grossissement avec un appareil photo intégré (DFC300FX). Un microscope DMRB (Leica) est utilisé pour les plus forts grossissements sur les coupes épaisses ou fines, et sur les racines non-coupées montées au préalable entre lame et lamelle avec des gouttelettes d'eau. Les images sont prises avec une caméra numérique « *Evolution™ MP 5.0 Mega-pixel Camera Kit* ».

Chapitre I :
Caractérisation du gène
CgCCaMK

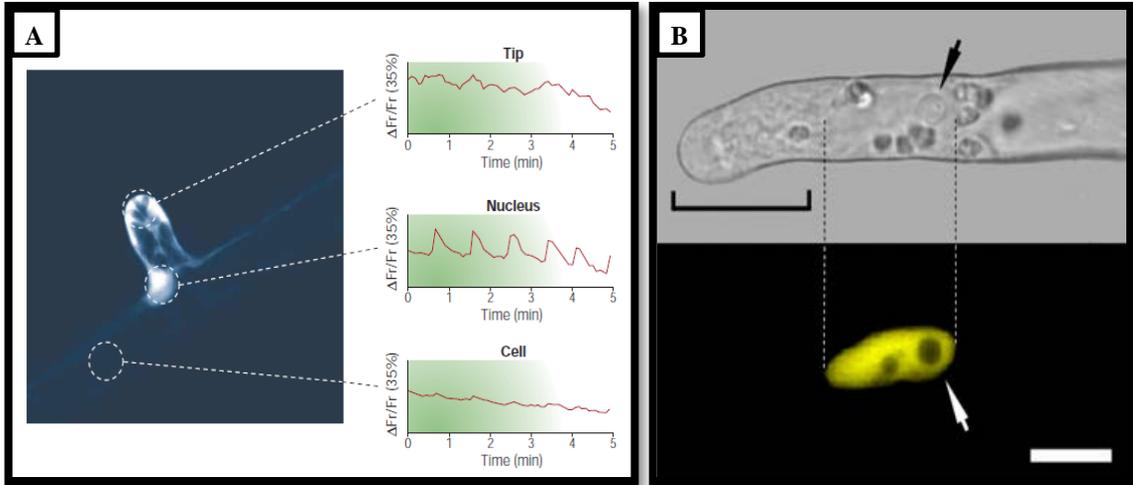


Figure 30 : Localisation du « calcium spiking » dans le poil absorbant de *Pisum sativum* et de *Medicago truncatula*.

A : L'intensité de la fluorescence du calcium a été mesurée (après injection d'Oregon Green) dans trois régions cellulaires différentes de *P. sativum*. Les traces du calcium ont été enregistrées après 30 min d'application des NFs. Les pics de concentration en calcium sont bien localisés autour de la région nucléaire et diffusent faiblement dans le cytoplasme environnant ; **B** : Détection du « calcium spiking » autour du noyau (flèche noire) chez *M. truncatula* par localisation de la protéine caméléon NupYC2.1 (en jaune) (barre d'échelle = 15 μ m).

A : D'après Oldroyd et Downie, 2004 ; **B** : D'après Sieberer *et al.*, 2009.

I. Introduction

1. *CCaMK/DMI3*, une kinase requise dans la symbiose rhizobienne et mycorhizienne à arbuscules

Le gène *DMI3* a été isolé en 2004 par deux équipes indépendantes chez la Légumineuse modèle *Medicago truncatula* (Lévy *et al.*, 2004 ; Mitra *et al.*, 2004). Il code une protéine kinase dépendante du calcium et de la calmoduline (ou « *CCaMK* » pour « Calcium and CalModulin dependent protein Kinase ») qui intervient dans les voies de signalisation nécessaires à l'établissement des symbioses mycorhizienne et rhizobienne. La protéine *DMI3* serait impliquée dans le décodage des oscillations calciques induites par les facteurs Nod ou les facteurs Myc. Elle dirigerait, par sa capacité à distinguer les oscillations induites par *Rhizobium* de celles induites par les champignons mycorhiziens à arbuscules, la signalisation symbiotique soit vers le processus de nodulation, soit vers celui de mycorhization (Oldroyd et Downie, 2006 ; Kosuta *et al.*, 2008).

Chez *M. truncatula*, le phénotypage des mutants *dmi3* « knock-out » montre que ceux-ci sont à la fois incapables de noduler et de former des mycorhizes à arbuscules (Catoira *et al.*, 2000). Cependant, contrairement aux mutants *dmi1* et *dmi2*, les mutants *dmi3* et *Pssym9* (l'orthologue chez *Pisum sativum*) ne présentent pas d'altération des oscillations calciques au sein des cellules racinaires infectées, ce qui permet de placer le gène *DMI3* en aval de cette étape dans la voie de transduction symbiotique (Wais *et al.*, 2000 ; Lévy *et al.*, 2004 ; Mitra *et al.*, 2004).

1.1. *CCaMK* et oscillations calciques (ou « calcium spiking »)

Les oscillations calciques ou « calcium spiking » sont définies comme des fluctuations rapides, non-linéaires et répétitives du calcium au niveau du cytosol. Lors de l'interaction symbiotique Légumineuses-*Rhizobium*, ces oscillations sont observées au niveau des poils absorbants, 10 min après traitement de *M. truncatula* aux NFs (Hazledine *et al.*, 2009 ; Sieberer *et al.*, 2009). Elles sont localisées dans le cytosol autour du noyau (**Figure 30**) des cellules épidermiques et corticales (Miwa *et al.*, 2006), ce qui pourrait indiquer le rôle du noyau dans le stockage interne du calcium. Actuellement, il y a très peu d'informations sur la façon dont la perception des NFs conduit à l'activation des oscillations calciques (Gleason *et al.*, 2005).

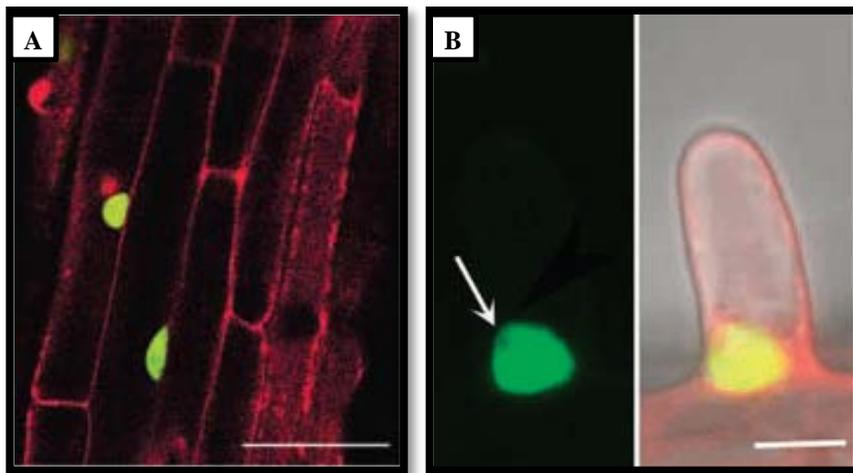


Figure 31 : Localisation subcellulaire de la protéine DMI3 chez *Medicago truncatula*.

A : DMI3 se localise fortement dans le noyau des cellules épidermiques des racines et n'est pas affectée par les NFs (barre d'échelle = 40 μ m) ; **B** : Détection de DMI3 dans le noyau des poils absorbants en utilisant la fusion *PromDMI3::DMI3::GFP*. Le DsRED est utilisé comme marqueur de sélection.

A : D'après Kaló *et al.*, 2005 ; **B** : D'après Smit *et al.*, 2005.

Sieberer *et al.* (2012) ont récemment montré que les oscillations calciques présentent des signatures spécifiques dont les profils sont corrélés avec les étapes précoces de l'infection. En effet, lors de toutes premières étapes de l'infection endosymbiotique, les réponses calciques sont caractérisées par des changements de fréquence qui passent d'oscillations à hautes fréquences à des oscillations à basses fréquences. Ces changements ou « switch » sont concomitants au stade d'infection apoplastique transcellulaire.

1.2. Localisation subcellulaire de *CCaMK*

La protéine *CCaMK* est localisée dans la région nucléaire des racines là où les oscillations calciques s'opèrent. Quelques protéines impliquées dans les étapes précoces de la signalisation symbiotique ont aussi une localisation nucléaire comme *NSP1* et *NSP2* (Parniske, 2008 ; Oldroyd *et al.*, 2009). Chez *M. truncatula*, la fusion du gène *CCaMK* avec le gène rapporteur *GFP* sous le contrôle du promoteur 35S du Virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV « Cauliflower Mosaic Virus ») montre une localisation nucléaire dans les cellules épidermiques des racines (**Figure 31 A**) (Kaló *et al.*, 2005) et dans quelques cellules épidermiques adjacentes au méristème des nodules (Lévy *et al.*, 2004). Une localisation similaire a été observée dans les poils racinaires quand la *GFP* est positionnée en N-terminal sous le contrôle du promoteur *DMI3* (**Figure 31 B**) (Smit *et al.*, 2005).

1.3. Protéines orthologues et fonctions de *CCaMK*

Il est à souligner que le gène *CCaMK* a été isolé pour la première fois chez une plante (le lys) en 1995 (Patil *et al.*, 1995). Plusieurs orthologues de *DMI3* ont été isolés chez des Légumineuses telles que *Lotus japonicus* (*LjCCaMK*) (Tirichine *et al.*, 2006a), *Sesbania rostrata* (*SrCCaMK*) (Capoen *et al.*, 2009), *Arachis hypogea* (Sinharoy et DasGupta, 2009) et chez des non-Légumineuses comme le riz (*OsCCaMK*) (Chen *et al.*, 2007). Il a été démontré que *OsCCaMK* peut compléter le mutant *dmi3* pour l'induction de mycorhizes complètement fonctionnelles chez *M. truncatula* et chez *L. japonicus* (Chen *et al.*, 2007 ; Banba *et al.*, 2008). Dans le cadre de l'interaction avec *Rhizobium*, la complémentation avec *OsCCaMK* conduit à l'expression du marqueur de noduline précoce *ENOD11* et aboutit à la formation de nodules ; cependant, ces structures sont vides, et la plupart des cordons d'infection avortent dans l'épiderme des poils racinaires infectés

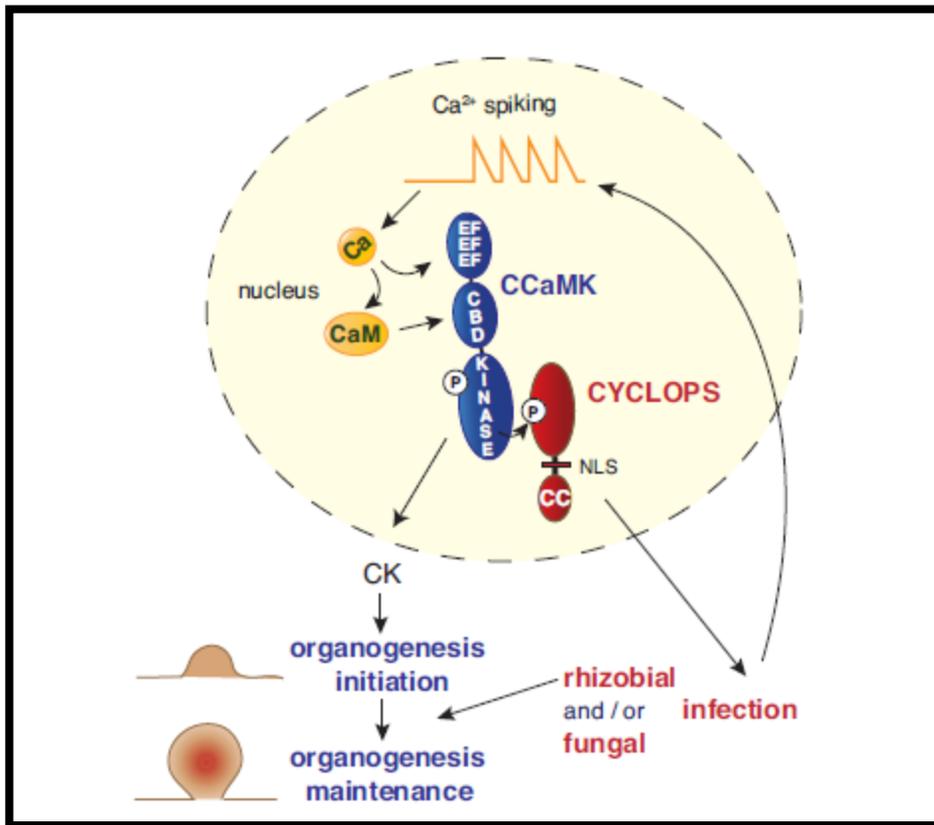


Figure 32 : Modèle d'interaction des deux protéines CCaMK et CYCLOPS (D'après Yano *et al.*, 2008).

Les oscillations calciques sont générées dans le nucléus ; les ions de Ca^{2+} vont se lier à la partie C-terminale des EF-Hands induisant l'autophosphorylation du domaine kinase. Ceci induit une augmentation de l'affinité du domaine de fixation à la calmoduline (CAM) qui se lie à cette dernière (CBD). Dans le cortex racinaire, CCaMK induit l'organogénèse nodulaire par augmentation de la concentration de la cytokinine (CK) ; alors que dans les cellules infectées par les bactéries, CCaMK interagit avec CYCLOPS. (NLS) : Localisation nucléaire du signal ; (CC) : Coiled-coil-domain.

(Gleason *et al.*, 2006 ; Godfroy *et al.*, 2006). Ce résultat démontre l'implication de DMI3 dans la formation des cordons d'infection et la libération des bactéries dans les cellules végétales. Des résultats comparables ont été observés chez *A. hypogea*, ce qui montre que le gène *DMI3* est essentiel au développement et au fonctionnement du nodule (Sinharoy et DasGupta, 2009).

À l'exception de son implication dans les phénomènes de nodulation et de mycorrhization, le rôle biologique de CCaMK est peu connu. D'après Poovaiah *et al.* (1999), CCaMK intervient dans le développement des anthères et de l'apex racinaire. D'autres chercheurs suggèrent que la protéine pourrait jouer un rôle dans la mitose et la méiose et interviendrait dans la réponse des plantes aux stress environnementaux (Yang et Poovaiah, 2003 ; Ikeda *et al.*, 2011). L'implication de la protéine kinase dépendante du calcium et de la calmoduline des mammifères (CaMKII) dans la biogenèse mitochondriale suggère que les protéines kinases des plantes telles que CCaMK interviennent dans la prolifération des endosymbiotes dans les cellules végétales (Wu *et al.*, 2002).

1.4. Interaction CCaMK/protéines

Des expériences de double hybride ont permis d'identifier un complexe protéique CYCLOPS/IPD3 chez *L. japonicus* et *M. truncatula* localisé dans le noyau en aval des oscillations calciques. CYCLOPS/IPD3 interagit avec la protéine CCaMK à travers le domaine « coiled-coil » (Messinese *et al.*, 2007 ; Chen *et al.*, 2008 ; Yano *et al.*, 2008 ; Kang *et al.*, 2011). Afin de comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans le décodage et la transduction des oscillations calciques, les études visent à une caractérisation structurelle et fonctionnelle du complexe protéique CCaMK/CYCLOPS par les approches physiologiques et biochimiques (Équipe du Dr. M. Parniske, Université de Munich, Allemagne). Yano *et al.* (2008) ont signalé que le complexe protéique CCaMK/CYLCOPS (**Figure 32**) est requis pour l'infection et que l'organogenèse nodulaire nécessite d'autres protéines (non encore identifiées) qui interagiraient avec CCaMK.

Récemment, une protéine de la superfamille des ubiquitines a été identifiée chez le lotier par Kang *et al.* (2011). Il s'agit de CIP73 « CCaMK-Interacting Protein », une protéine d'environ 73 kDa de localisation nucléaire. Cette protéine est exprimée dans les racines et une faible expression est détectée dans les feuilles, les tiges et les nodules.

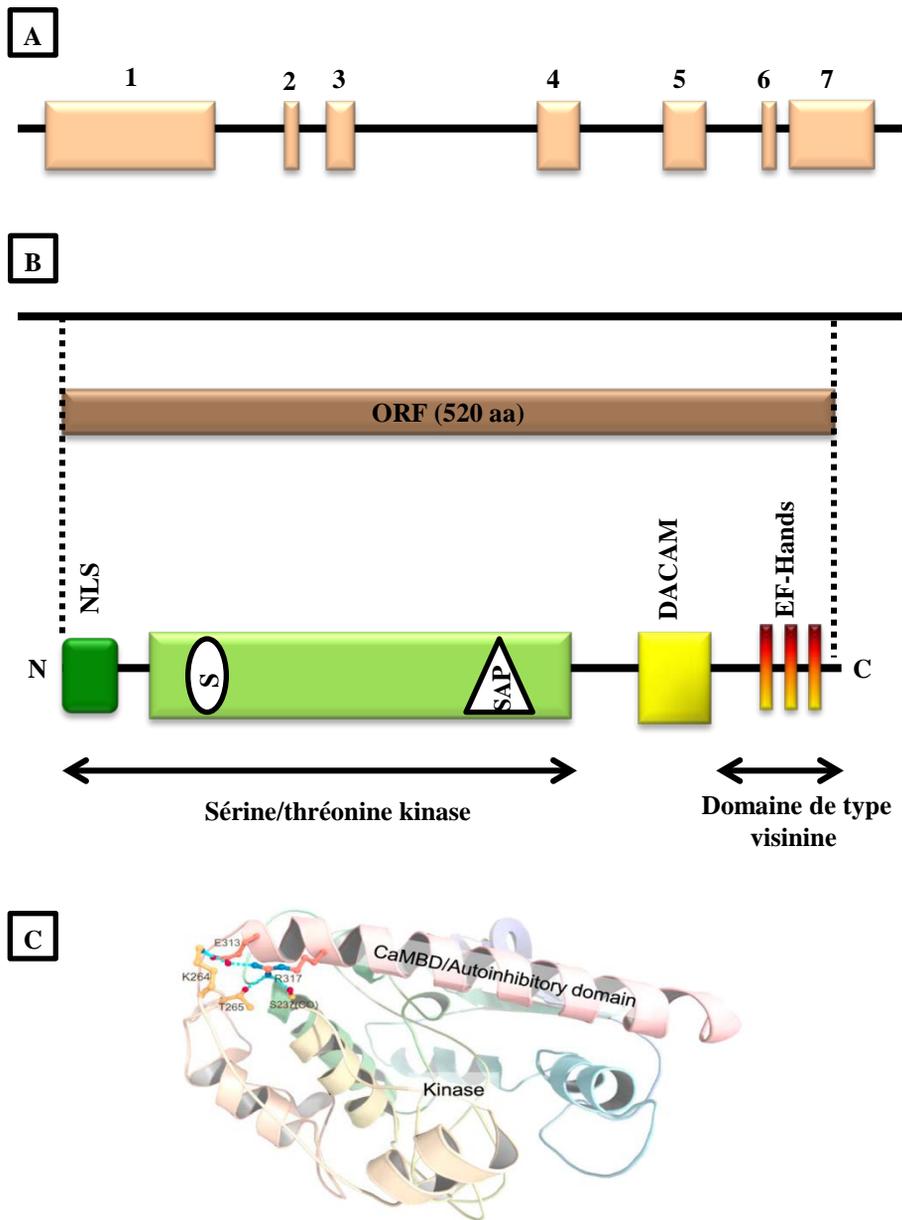


Figure 33 : Structure de la séquence du gène *CCaMK* de *Casuarina glauca* et de la protéine prédite.

A : Structure intron/exon du gène *CgCCaMK* (5,04 kb) ; **B** : La protéine *CgCCaMK* (520 aa) est composée du domaine N-terminal (N) au domaine C-terminal (C), d'une sérine/thréonine kinase avec un site de liaison de l'ATP (S), d'un site d'autophosphorylation (SAP). Le domaine kinase est précédé d'une séquence d'adressage de la protéine au noyau (NLS) et suivi d'un domaine central autoinhibiteur CAM (DACAM) pouvant lier la calmoduline et d'un domaine carboxyterminal de type visinine présentant 3 motifs EF-hands ; **C** : Structure en hélice de la protéine *CCaMK* non-phosphorylée.

B : D'après Patil *et al.*, 1995 ; **C** : D'après Shimoda *et al.*, 2012.

L'expression dans les racines est significativement diminuée après inoculation avec *M. loti*. De plus, l'extinction par ARNi de *CIP73* « knock-down » entraîne une diminution de la nodulation ; ce qui suggère que *CIP73* joue un rôle essentiel dans la formation des nodules. Contrairement à l'interaction CCaMK/CYCLOPS, *CIP73* peut seulement interagir avec le domaine kinase de la protéine CCaMK. *CIP73* est un substrat de phosphorylation de CCaMK, et les études suggèrent que *CIP73* peut être un nouveau régulateur de l'organogenèse nodulaire (Kang *et al.*, 2011).

2. Structure et mode de fonctionnement de la protéine CCaMK

La protéine CCaMK/DMI3 est caractérisée par plusieurs domaines (**Figure 33**) :

- En N-terminal se trouve un domaine sérine/thréonine kinase qui est précédé d'une séquence d'adressage au noyau ; un résidu Thr spécifique, situé dans ce domaine, est impliqué dans l'autophosphorylation de CCaMK en présence du calcium.
- Un domaine central d'autoinhibition qui peut lier la calmoduline. Le domaine kinase et son domaine CAM ont une forte homologie avec la protéine kinase dépendante du calcium et de la calmoduline CaMKII des mammifères (Kang *et al.*, 2011).
- Un domaine C-terminal de type Visinine présente trois motifs supersecondaires hélice-boucle-hélice appelés : mains-EF (ou « EF-hands ») capables de lier chacune un ion calcium (Boonburapong et Buaboocha, 2007). Ces motifs ont été mis en évidence pour la première fois chez la parvalbumine, une protéine cytosolique de liaison du calcium présente dans certains neurones et dans les muscles squelettiques (Kretsinger et Nockolds, 1973).

La protéine CCaMK a la propriété de se fixer soit au calcium libre, soit avec un complexe calcium/calmoduline. Des analyses biochimiques de la protéine CCaMK du lys (*Lillium longiflorum*) ont permis de proposer un mode de fonctionnement pour CCaMK selon lequel les ions Ca^{2+} libérés au cours du signal calcique se fixent sur les mains-EF du domaine de type Visinine ; ce qui induit l'activité du domaine kinase et provoque une autophosphorylation du résidu thréonine (Thr267 chez *L. longiflorum* ; Thr271 chez *M. truncatula* et Thr265 chez *L. japonicus*) (Patil *et al.*, 1995 ; Gleason *et al.*, 2006 ; Tirichine *et al.*, 2006a). Cette autophosphorylation provoque un changement de conformation de la protéine, qui augmente l'affinité du domaine central pour la calmoduline (CAM). Celle-ci, qui a elle-même fixé des ions calcium, vient alors se fixer au niveau du domaine central, ce

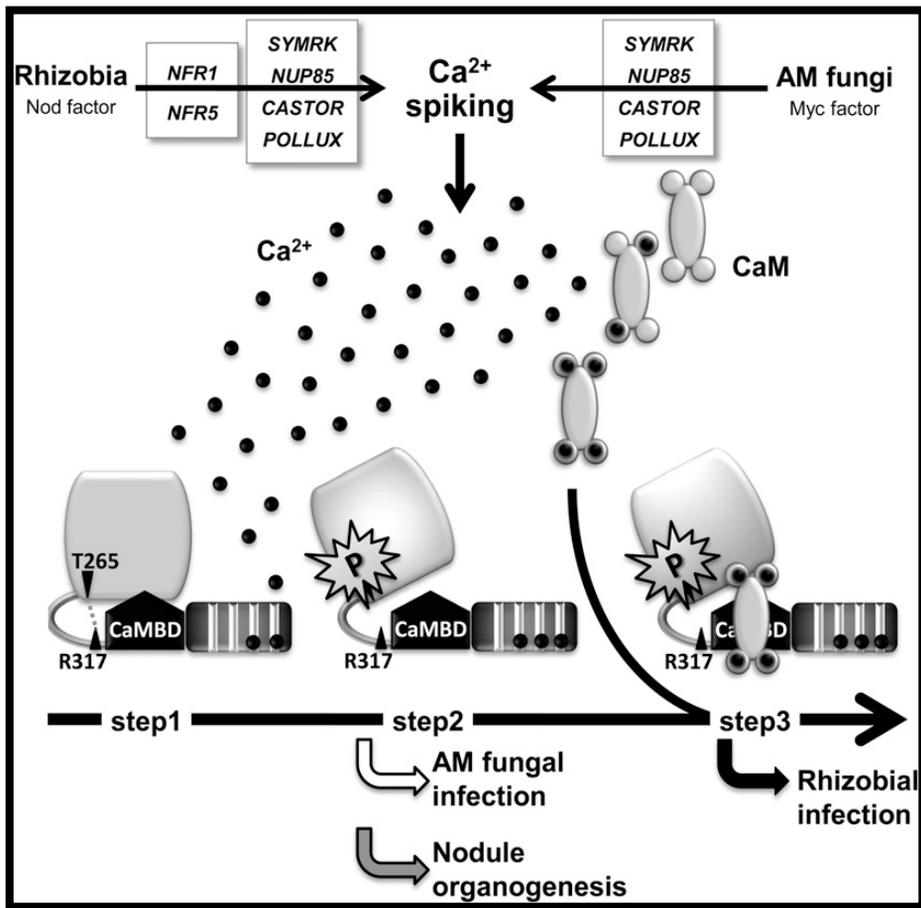


Figure 34 : Représentation du mode de fonctionnement de la protéine CCaMK/DMI3 (D'après Shimoda *et al.*, 2012).

Le signal calcique induit en réponse des signaux envoyés par les microsymbiontes est perçu par les EF-Hands (step 1) induisant l'autophosphorylation de la thréonine située sur le domaine kinase. La protéine CCaMK change de conformation (step 2) et la calmoduline vient se fixer au domaine central, ce qui entraîne la levée de l'autoinhibition de l'activité kinase de CCaMK qui confère la possibilité à l'infection rhizobienne (step 3).

qui entraîne la levée de l'autoinhibition de l'activité kinase de CCaMK (**Figure 34**) (Shimoda *et al.*, 2012). Les protéines cibles de CCaMK sont alors phosphorylées et le signal calcique est interprété (Sathyanarayanan *et al.*, 2000).

Cette double régulation de CCaMK par le calcium suggère que CCaMK pourrait reconnaître le signal calcique et le décoder ; ce qui conduit à la transcription des gènes situés en aval du CCaMK induisant l'organogenèse nodulaire (De Koninck et Schulman, 1998 ; Oldroyd et Downie, 2004 ; Miwa *et al.*, 2006 ; Kang *et al.*, 2011).

3. Objectifs

En raison de la fonction clé du gène *CCaMK/DMI3* dans la voie de transduction des NFs et des facteurs Myc chez les Légumineuses, l'équipe Rhizogenèse a choisi de rechercher l'homologue chez *C. glauca* et de déterminer si ce gène était impliqué dans la voie de transduction des signaux symbiotiques chez les plantes actinorhiziennes.

Dans ce chapitre, nous présenterons *CgCCaMK*, l'homologue de *DMI3/CCaMK*, isolé chez *C. glauca*. La partie II correspond aux travaux réalisés par H. Gherbi et ses collaborateurs avant mon arrivée dans l'équipe. La caractérisation de la région promotrice de *CgCCaMK* (partie III) s'inscrit dans mon travail de thèse. Un manuscrit intitulé « The central role of CCaMK in control of bacterial infection and nodule organogenesis is conserved between Rhizobium-Legume and actinorhizal symbioses », reprend certains de ces résultats. Ajouté en annexe de ce chapitre, ce manuscrit sera soumis prochainement à une revue de rang international.

II. L'homologue de *DMI3/CCaMK* chez *Casuarina glauca*

1. Isolement

Récemment, l'équipe Rhizogenèse (IRD de Montpellier) a pu identifier l'homologue du gène *MtDMI3* chez *C. glauca* grâce à une approche de criblage d'une banque d'ESTs de racines et de nodules de *C. glauca* (41000 ESTs) (Hoher *et al.*, 2011a) produite très récemment dans le cadre du projet Génoscope (collaboration avec P. Normand, CNRS/Université Lyon1). L'analyse bioinformatique a permis d'identifier 3 ESTs homologues au gène *CCaMK/DMI3* des Légumineuses. L'ADN complémentaire (ADNc)

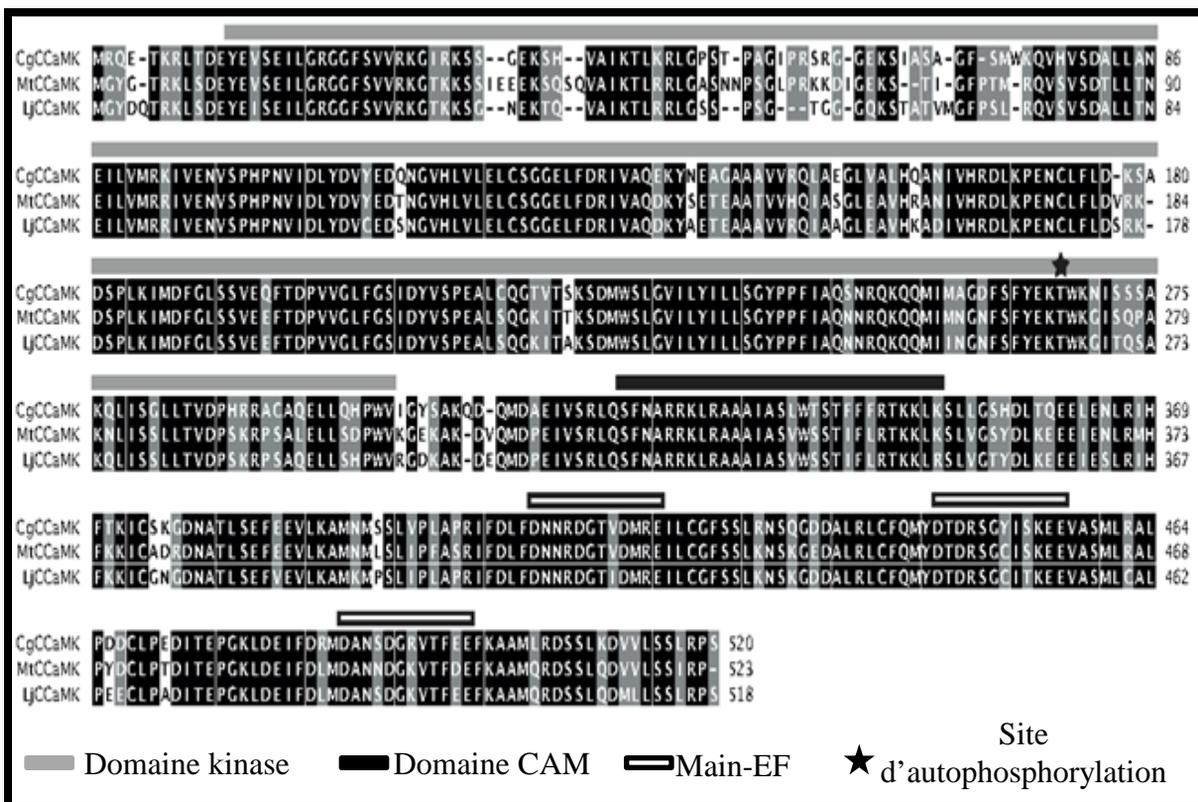


Figure 35 : Alignement de séquence de CcCaMK chez *Lotus japonicus* (LjCCaMK), *Medicago truncatula* (MtCCaMK) et *Casuarina glauca* (CgCCaMK).

Tableau 3 : Résultats d'alignements des différents domaines protéiques CcCaMK de *Medicago truncatula* (MtCCaMK), *Lotus japonicus* (LjCCaMK), *Sesbania rostrata* (SrCCaMK) et *Casuarina glauca* (CgCCaMK).

Les chiffres présentent les pourcentages de similarité et d'identité (entre parenthèses).

CgCCaMK	MtCCaMK	LjCCaMK	SrCCaMK
Domane kinase	84% (77%)	85% (78%)	89% (80%)
Domane CAM	93% (86%)	93% (83%)	93% (83%)
Main-EF 1	100% (100%)	100% (91%)	100% (100%)
Main-EF 2	91% (91%)	91% (83%)	91% (83%)
Main-EF 3	100% (75%)	100% (91%)	100% (83%)

ainsi que le fragment génomique ont été clonés (H. Gherbi et M. Nambiar-Veetil, équipe Rhizogenèse, Montpellier).

2. Structure du gène, alignements de séquences et analyses phylogénétiques

Le gène *CgCCaMK* code une protéine de 520 acides aminés. La structure du gène comprend 7 exons et 6 introns et le cadre ouvert de lecture comporte 1563 nucléotides. Les analyses des séquences nucléotidiques et protéiques de *CgCCaMK* révèlent une similitude dans la structure intron-exon avec les *CCaMK/DMI3* des Légumineuses (voir **Figure 33** pour la structure du gène *CgCCaMK* et de la protéine prédite). Les résultats d'alignement révèlent des pourcentages de similarité et d'identité très élevés entre les homologues protéiques des Légumineuses (**Figure 35**).

Le **Tableau 3** présente le pourcentage de similarité et d'identité entre les différents domaines protéiques de *CgCCaMK* avec ceux des Légumineuses (*M. truncatula* et *L. japonicus*). Cette similitude atteint respectivement 89 %, 93 % et 100 % pour le domaine kinase, le domaine autoinhibiteur/CAM et les 3 motifs mains-EF. Enfin, l'analyse Southern blot suggère que, comme chez les Légumineuses, le gène *CgCCaMK* est présent en copie unique chez *C. glauca*.

L'arbre phylogénétique, regroupant les séquences protéiques DMI3/CCaMK déduites de quelques espèces végétales appartenant à différentes familles, a été réalisé à l'aide du logiciel « CLC Sequence Viewer 6 ». Les analyses mettent en évidence que la protéine CCaMK de *C. glauca* et celle de *Vitis vinifera* appartiennent au même sous-groupe, et que *CgCCaMK* est proche des CCaMKs des Légumineuses (**Figure 36**).

3. Implication de *CgCCaMK* dans le processus symbiotique

La caractérisation fonctionnelle de *CgCCaMK* a débuté par une approche de type ARN interférent (ARNi) visant à éteindre l'expression du gène et à étudier l'impact de cette extinction sur les processus de nodulation et d'endomycorhization (H. Gherbi et collaborateurs, Rhizogenèse, Montpellier).

Les résultats obtenus, présentés en détail dans le manuscrit joint en annexe de ce chapitre, indiquent que l'introduction d'une construction *ARNi-CgCCaMK* induit chez *C. glauca* un retard de nodulation, une baisse de la quantité de nodules et une diminution du nombre d'événements d'infection précoces des poils absorbants. Au niveau cyto-

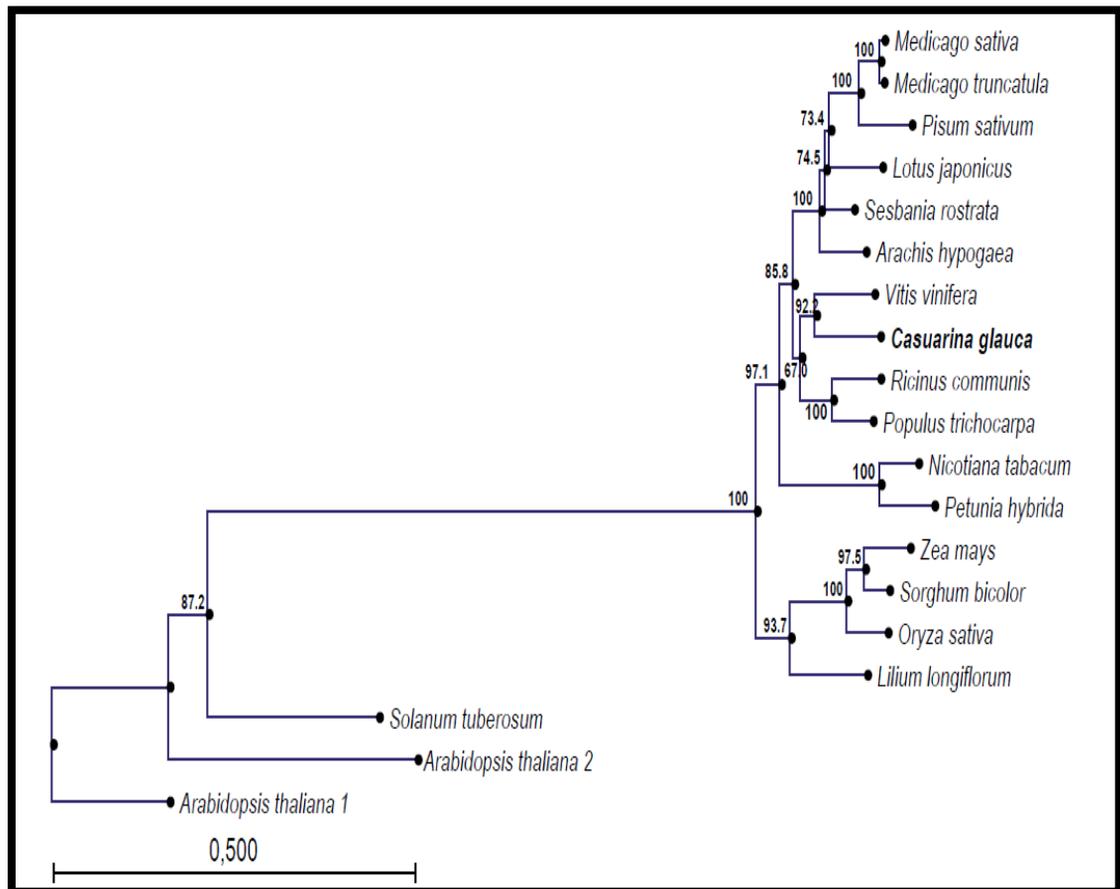


Figure 36 : Arbre phylogénétique contenant la protéine CCaMK de *Casuarina glauca* ainsi que des CCaMK des autres espèces, basé sur l'alignement par la méthode ClustalW.

L'arbre a été enraciné avec la séquence protéique du gène *CPKI* d'*Arabidopsis thaliana*. Les nombres indiquent les pourcentages de 1000 bootstraps. L'arbre a été construit en utilisant l'algorithme neighbor-joining dans le logiciel « CLC Sequence Viewer 6 » (<http://www.clcbio.com//>).

histologique, la zone d'infection apparaît restreinte et la taille des cellules de la zone de fixation d'azote est réduite dans les nodules *ARNi-CgCCaMK*. Le phénotype d'altération du processus de nodulation est cependant moins marqué que chez les plantes *ARNi-SymRK* (Gherbi *et al.*, 2008a). Ces résultats suggèrent l'implication précoce de *CgCCaMK* lors de la pénétration des actinobactéries dans les poils absorbants et plus tardivement, pour leur progression intracellulaire dans le nodule. Des résultats comparables ont été obtenus chez *S. rostrata* lors de l'extinction par ARNi du gène *SrCCaMK* (Capoen *et al.*, 2009). De plus, les inoculations avec le champignon *Glomus intraradices* ont également mis en évidence que la mycorhization est significativement altérée chez les plantes *ARNi-CgCCaMK* ; le nombre d'hyphes intraracinaires, de vésicules et d'arbuscules est significativement très bas.

Par ailleurs, des analyses de complémentation fonctionnelle d'un mutant *dmi3* de *M. truncatula* ont ensuite été entreprises en collaboration avec C. Rosenberg (LIPM de Toulouse). Les résultats mettent en évidence que la partie codante de *CgCCaMK*, placée sous le contrôle du promoteur de *M. truncatula PromMtDMI3*, restaure à la fois la nodulation et la mycorhization chez le mutant *dmi3*. Le gène *CgCCaMK* est donc capable de décoder les oscillations calciques lorsqu'il est exprimé chez une Légumineuse.

L'ensemble de ces résultats montre que la fonction du gène *CgCCaMK* est conservée entre plantes actinorhiziennes et Légumineuses ; ce qui renforce l'hypothèse selon laquelle les plantes aptes à la symbiose nodulaire dérivent d'un ancêtre commun à l'origine du clade des Eurosidi.

III. Caractérisation du promoteur *CgCCaMK*

1. Séquence du promoteur et analyse informatique

Afin de conforter l'implication de *CgCCaMK* dans le processus symbiotique, j'ai donc entrepris la caractérisation de la région promotrice de ce gène. Avant mon arrivée au laboratoire Rhizogénèse, un fragment de 2168 pb correspondant au promoteur *CgCCaMK* a été isolé par PCR à partir de l'ADN génomique de *C. glauca*, en utilisant le kit « Universal Genome Walking » de Clontech. Afin d'identifier des motifs régulateurs potentiels, j'ai analysé cette séquence *in silico* en utilisant le logiciel « PLACE » (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html>).

AAATTGGGTGCATGCTTTCCACGTATTTCTCACGGGATGTGCTCATTCCGATAGA**GTAC**ATAGACACAAGAG
 TCATTCCGACAAAAGTATACAAAAGCTCATAATAG**CATATG**CATTCCCAAAAAGTTGACTCAATACAAGTTT
 TCACTTACAATACTTATAAGTTTGAAGGTTTCATT**CTCTT**ACCATTGATGTGGTATAATATTGTGATAGATTTA
 ATTTGTTTCAAATGAAATGAGAAAATATAGGATCTAAATAGTTAGATCTAAAACACTAGACATAATTATGTA
 AATAAGATTAATAAAGAAAACATATCATTCTTTTGGTCCATGTT**AAAGAT**CAACAACACTACAAAATAGGATC
 TTTAGGTAAGATTCTTATCCTCTATTCTCAGTTAAGCACACTAGCATAATAAGACTACTACAAGAGGGACGG
 TTTATGAAAACCTTAGACTTCTACTATAAGACTTAACTTGTCTTTTATGTGCTACCTAATAGGTCTTACTTAT
 CACAAATCTATTTAGTAAGTTATAATATATACTAGTCAATCTATATTTAATTATAAGAACTATGTGTTTCA
 CTTTATTATATTAATCTTGAGTCCGTTAATATAAGCACACATTAGTAAGCCTAATAGAAAATTTGGCTAACATG
 TCAACATTTAACCTTGACAATATGGGTGGTTAAGCAAATTATGCAAATGATTATTTCACTACTTGTGTGTCT
 ATGTGTTTTTTTTTTTTTTTTTCC**CTCTT**CTTTATTTTTCTGTGAACAAAAGGAAACAAAAGCTACATCCTTAAT
 GGGATAAATAAAAATATTATGCTACTCCAAATACTAAAACCTGTAGACTATTTTTTTTTTTTTTACTAAAATAAGA
 CCTAGTAAACTAATTTTTAATATAAAAATTAATAATGAGCATAAAAACGTTCTATTCATT**GAAAAA**G
 TGCCAAGTTTAATTAGGACACTAATTTCTATTTAATATAAACTCAAAGTAAATAATATATGTATGTGTTTATA
 CATGTTGAGATACACCAGAAGCCTTAAACACCAATTGTATCACACACACAAAAAAAATCTTCTTATGGGAA
 CCTGAAGATTTAATTATAAATTGATAGTTAA**AAAGAT**AAACCTTTTTCTTAATGTTTTATCTTATAATTATTTT
 CTGCTCCTTAAATTAATTTCAAATTTGCCTTTGGTTGACACTTATCAGTTTTATAAGACAAATCACTAGG
 AATGGATCGTAAGGATTAATTTACATTTGAACCTTCACTATAATCGGCAACATAACGTTGTCTTTTTGTGCGA
 ATTCATCCTCCATCTGGATCCATTTGAATTTCAAATTTGGGCATTGAGCTGATGATACCAACGATGAAAATT
 CCTATTCA**AAAGAT**CCAAA**CTAACCA**ACGATGAAAATTCCTATTCA**AAAGAT**CCAAACTAGCATTAACATC
 GGCTAACCCCTATACGAATCTTTTTTCCATTGATCTAATCAACTACTTGGCATCTTTTTTCTGTTTGTCTTTTT
 ACAAGCACGCAGATCCCAACATAAACCTTGCAAGTTCATTGTGACCTTTGGGAGCTTAAATGGGTATGCTGA
 ACGTGGGAATTAACGTCTTCAATGGGCAGATCCTTTTTT**CTCTT**CTCTATCGCCGTTACACACTCCAAAGT
 ATCCGGTCTTTGTTCTTTTTGGCAACATTTATCTCATTGGCTGAATTTCTTGCAAACCTTTCCCATGTCGTGCT
 CGGCCAAATAGCAACCTATACT**GTAC**AAAAGTCAAAAATCAAAGGCTGTGGGAGAGAGAAAGAGTGCTGG
 CGAAGCCATGCATGAGGTGGAGGAATTTTTAAAGCAACGGACGAAAGTAGGAACCAAGTTTAGTTGACTA
 TGGCTTTGTCCCCTCCTCTGCAG**CTCTT**CCACCGACTAGATAATTGTCTCCTTTCCATCTGAATTAGGTTTCA
 ATTTTATGCTATAAACTAATGCACAAACTGTTACAGGCTGATGTCAATGCCTTTTCGTTCCAATCCGCAATTC
AACGTGCTCTCTTCTTGTCAATGAACCTACCCTATTCTCCGCTTTCATTGCTCTTTTCGCTGCAAGTTTCTC
 TCTCAGTTTTTCAGATTCCAGTTCTTGGCTCTTTGCAGTCGTTCAAGAATTTGTATT

Figure 37 : Identification des différents motifs dans la séquence nucléotidique du promoteur du gène *CgCCaMK*.

Les motifs sont indiqués par différentes couleurs.

CATATG : motif potentiellement impliqué dans la réponse à l'auxine ; **GTAC** : réponse au cuivre et à l'hypoxie ; **GAAAAA** : réponse aux pathogènes et à la salinité ; **CTAACCA** : réponse à l'acide abscissique ; **AAAGAT** et **CTCTT** : séquences spécifiques de gènes exprimés dans des cellules infectées de nodules fixateurs d'azote ; **AACGTG** : réponse au jasmonate.



Figure 38 : Présentation de la construction *PromCgCCaMK::GUS::TermNos*

Le vecteur de transformation utilisé est constitué d'une fusion transcriptionnelle du promoteur *CgCCaMK* et du gène rapporteur *GUS*, avec le terminateur *Nos* de la nopaline synthase d'*Agrobacterium tumefaciens*. Le marqueur de sélection des cellules végétales transformées génétiquement est le gène *nptII* qui confère la résistance à la kanamycine.

Les principaux motifs identifiés sont les suivants (**Figure 37**) :

- AAAGAT et CTCTT : ces séquences sont associées à des gènes exprimés dans des cellules infectées de nodules fixateurs d'azote. On les trouve par ex. dans le promoteur du gène d'hémoglobine de soja (Stougaard *et al.*, 1990).
- CATATG : il s'agit d'un motif potentiellement impliqué dans la réponse à l'auxine, qui a été identifié dans le promoteur du gène *SAUR 15A* de soja (SAUR : « Small Auxin-Up RNA ») (Xu *et al.*, 1997).
- GAAAAA : ce motif a été identifié dans la région promoteur du gène *SCaM-4* de soja ; il permet une réponse aux pathogènes et au stress salin (Park *et al.*, 2004).
- CTAACCA : cette séquence identifiée dans les gènes MYB d'*Arabidopsis* assure une réponse à l'acide abscissique (Busk et Pages, 1998).
- AACGTG : ce motif présent dans des promoteurs de gènes de tomate et d'*Arabidopsis* est impliqué dans la réponse au jasmonate.

Il est donc intéressant de noter que l'on retrouve bien chez *PromCgCCaMK* des séquences *cis* spécifiques de gènes symbiotiques. La détermination de la fonction réelle de l'ensemble de ces motifs nécessitera une analyse par délétion ou par mutation de ces séquences, et une étude de l'impact de ces altérations sur la fonctionnalité du promoteur *CgCCaMK*.

2. Expression spatio-temporelle conférée par le promoteur *CgCCaMK* chez *Casuarina glauca*

2.1. Approche méthodologique

2.1.1. Description de la construction *PromCgCCaMK::GUS::TermNos*

La séquence promotrice *PromCgCCaMK* de *C. glauca* a été clonée dans le vecteur binaire de transformation pBI101.3 (Clontech) en amont du gène rapporteur de la β -glucuronidase (appelé gène *uidA* ou plus communément *GUS*) (Jefferson *et al.*, 1987) afin d'en étudier la spécificité d'expression.

La conformité de la construction *PromCgCCaMK::GUS::TermNos* (**Figure 38**) a été vérifiée par séquençage. La construction chimère a ensuite été introduite dans la souche d'*A. tumefaciens* C58C1 contenant le plasmide Ti désarmé pGV2260 (Vancanneyt *et al.*, 1990).

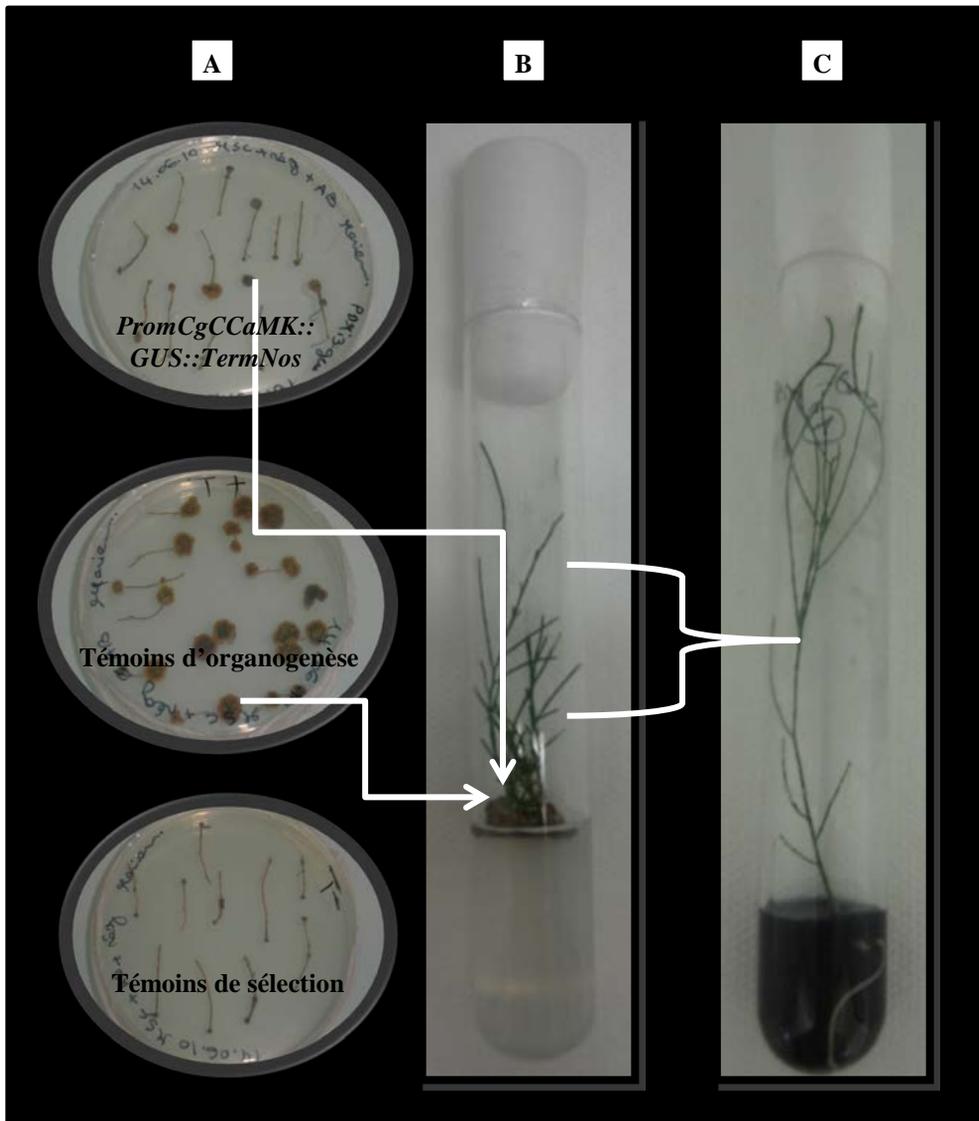


Figure 39 : Transformation génétique de *Casuarina glauca* avec la construction *PromCgCCaMK::GUS::TermNos* et obtention de nouvelles plantules par micropropagation.

A : Les épicotyles transformés génétiquement sont cultivés depuis 2 mois sur milieu sélectif nutritif. Les témoins positifs d'organogénèse et les témoins négatifs non-transformés sont cultivés sur kanamycine ; **B** : Des cals se développent sur les témoins positifs, alors que les témoins de sélection ne présentent aucune callogénèse ; **C** : Enracinement des rameaux de *C. glauca* dans du charbon actif.

2.1.2. Transformation de *C. glauca* par la souche *C58C1* d'*A. tumefaciens* contenant la construction *PromCgCCaMK::GUS::TermNos*

Afin de déterminer l'expression spatio-temporelle conférée par la région promotrice *CgCCaMK*, nous avons ensuite introduit, à l'aide de la souche désarmée d'*A. tumefaciens* *C58C1* (pGV2260), la fusion transcriptionnelle *PromCgCCaMK::GUS::TermNos* chez *C. glauca*. Ainsi, 193 fragments d'épicotyles de *C. glauca* ont été générés à partir de 150 plantes, puis co-cultivés avec *A. tumefaciens* *C58C1* (pGV2260, pBI101.3) contenant la construction *PromCgCCaMK::GUS::TermNos*. Après co-culture, les explants transformés ont été transférés sur milieu nutritif avec kanamycine de façon à sélectionner les cellules végétales transformées génétiquement. Par ailleurs, 50 plantes ont été utilisées comme témoins positifs ou négatifs.

Pour les témoins négatifs visant à vérifier l'efficacité de la sélection par la kanamycine, 24 fragments d'épicotyles non-transformés génétiquement ont été cultivés en présence de kanamycine à 50 mg.L⁻¹. Dans ce contexte, il est attendu qu'aucun cal ne puisse se développer. Pour le témoin positif d'organogenèse, 40 fragments d'épicotyles non-transformés génétiquement ont été cultivés sur milieu nutritif avec régulateurs de croissance et sans antibiotique ; il est attendu que des cals organogènes se développent sur tous les explants.

2.1.3. Sélection des plantes de *C. glauca* *PromCgCCaMK::GUS::TermNos* obtenues par transformation génétique avec *A. tumefaciens*

Après 2 mois de repiquage sur milieu nutritif sélectif, des cals poussant en présence de kanamycine sont observés aux extrémités de 32,64% des rameaux. Chacun de ces cals résulte d'un événement de transformation différent, et a été cultivé de façon à produire des lignées transgéniques indépendantes. Pour les témoins positifs d'organogenèse, des cals se sont développés à une ou aux deux extrémités des épicotyles non-transformés ; pour les témoins négatifs, aucun cal ne s'est développé ce qui confirme l'efficacité de l'antibiotique utilisé (**Figure 39 A**). Après 2 mois de culture, une activité β -glucuronidase a été recherchée sur ces cals.

Deux à trois mois après la transformation, des bourgeons sont observés sur 57,14% des cals *PromCgCCaMK::GUS::TermNos* et sur 100% des témoins d'organogenèse (**Figure**

Tableau 4 : Nombre de plantes étudiées lors de l'étude spatio-temporelle conférée par le promoteur *CgCCaMK*.

	<i>PromCgCCaMK:: GUS::TermNos</i>	Témoins d'organogenèse	Témoins de sélection
Nombre de lignées de cals (% de cals avec bourgeons)	21 (57,14%)	5 (100%)	0 (0%)
Nombre de plantes produites (micropropagation)	97	30	0
Nombre de lignées de cals sélectionnées	7	4	0
Nombre de plantes étudiées	36	4	0

Tableau 5 : Lignées transgéniques *PromCgCCaMK::GUS::TermNos* utilisées pour suivre la cinétique d'inoculation.

Lignée transgénique <i>PromCgCCaMK:: GUS::TermNos</i>	Nombre de plantes analysées/lignée
GUS1	4
GUS9	7
GUS13	8
GUS22	1
GUS23	4
GUS29	8
GUS37	4

39 B). Dans un premier temps, 21 lignées de cals résultant de la transformation génétique d'épicotyles par la souche d'*A. tumefaciens* exprimant la construction *PromCgCCaMK::GUS::TermNos* ont été sélectionnées. La sélection des lignées transgéniques a été basée sur la croissance rapide des cals sur milieu sélectif avec antibiotique, la forte coloration bleue lors de la révélation de l'activité β -glucuronidase dans les cals et le nombre de rameaux se développant sur les cals.

Lorsque les rameaux ont environ 3 à 4 cm (soit environ 6 mois après transformation par les agrobactéries), ils sont soumis à un choc auxinique destiné à induire la rhizogenèse. Au bout de 3 semaines, de 50% à 100% des rameaux ont développé des racines (**Figure 39 C**). L'efficacité d'enracinement est identique pour les rameaux transgéniques et les rameaux non-transgéniques prélevés sur des cals non-transformés. Les révélations histochimiques de l'activité GUS sur les plantes transgéniques ont été entreprises en incubant 2 à 3 racines latérales avec poils absorbants dans le tampon X-Gluc.

Afin d'étudier la cinétique d'expression spatio-temporelle conférée par la construction *PromCgCCaMK::GUS::TermNos* au cours des étapes précoces de l'interaction *C. glauca*-*Frankia* et de limiter le travail de culture *in vitro*, le nombre de lignées transgéniques indépendantes *PromCgCCaMK::GUS::TermNos* a ensuite été réduit à 7. Le niveau élevé d'expression GUS dans les racines latérales a été le principal critère pour choisir ces lignées. Trente-six plantes transgéniques de *C. glauca* présentant un développement racinaire important (au moins 10 cm de long et plusieurs racines latérales) issues de ces 7 lignées ont été transférées en culture hydroponique. Quatre plantes régénérées à partir de cals non-transformés ont été utilisées comme témoins négatifs. Le **Tableau 4** présente l'ensemble des résultats obtenus lors de cette expérience.

2.1.4. Mise en place de la cinétique d'inoculation

Après environ 2 à 3 semaines d'adaptation en culture hydroponique, les plantes ont été carencées en azote puis inoculées avec la souche CcI3 de *Frankia*, en suivant les conditions décrites dans la partie « Matériels et Méthodes ». L'expression du gène rapporteur *GUS* a été étudiée pour 1 à 8 plantes des 7 lignées indépendantes. Le **Tableau 5** présente le nombre de plantes/lignée utilisées pour suivre la cinétique d'inoculation.

Des prélèvements de racines ont été réalisés pendant 3 semaines. Après inoculation par *Frankia*, un fragment de racine de 2 à 4 cm de long avec des ramifications latérales a été

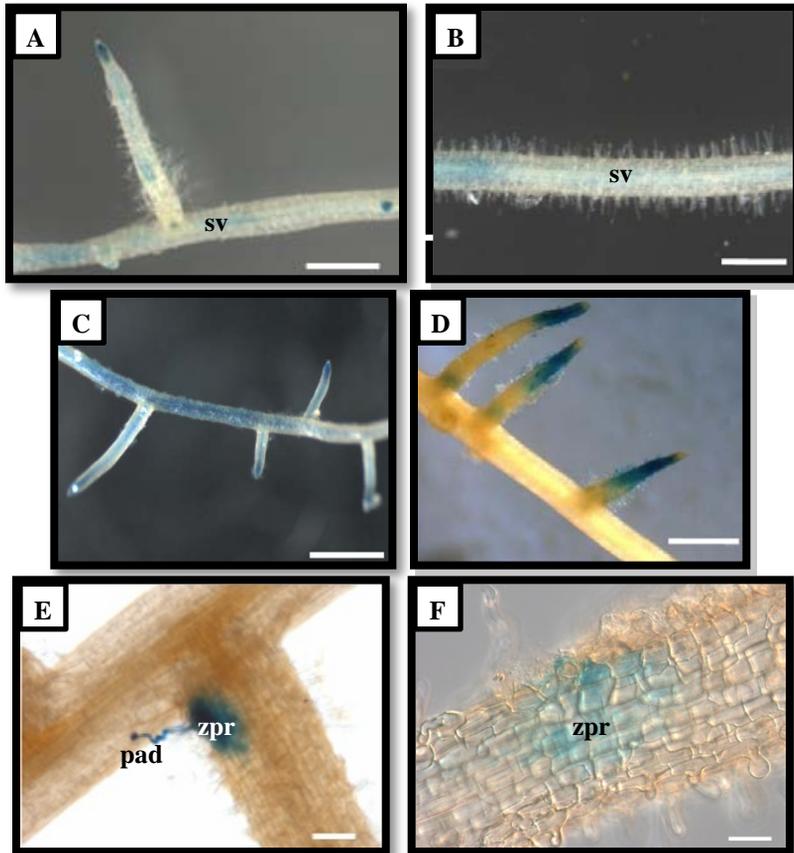


Figure 40 : Mise en évidence de l'activité GUS dans des racines *PromCgCCaMK::GUS::TermNos* lors de la phase précoce de la symbiose *Casuarina glauca*-*Frankia*.

A-B : Racines non-inoculées montrant une expression dans le système vasculaire et la coiffe ; **C** : Racines à 2 jours après inoculation par *Frankia*. On observe une forte induction de *PromCgCCaMK::GUS::TermNos* ; **D** : Racines à 7 jours après inoculation par *Frankia*. On observe une forte expression de GUS dans les racines secondaires et les poils absorbants qui sont majoritairement déformés ; **E-F** : Racines à 12 jours après inoculation. On observe une expression de GUS mais limitée à quelques poils absorbants déformés et aux zones d'émergence du prénodule correspondant aux sites d'infection par *Frankia*. Les racines ont été décolorées au KOH. (sv) : système vasculaire ; (pad) : poil absorbant déformé ; (zpr) : zone de prénodule. Barre d'échelle = 50 µm (A, B, C, D), 100 µm (E, F). Photographies prises sous loupe binoculaire (A, B, C, D) ; Photographies prises sous microscope optique (E, F).

prélevé sur chaque plante aux jours (J) suivants : 0 J, 1 J, 2 J, 4 J, 7 J, 12 J et 20 J.

Environ 2 semaines après inoculation, des renflements correspondant au stade prénodule sont apparus à la base des racines latérales, tandis que les premiers nodules formés de 1 à 5 lobes sont observés au bout de 3 semaines. De 4 à 6 prénodules et nodules à différents stades de développement ont été prélevés sur chacune des plantes transgéniques. La nodulation des plantes a été suivie sur une période de 2 mois et à raison de deux observations par semaine.

*2.2. Expression spatio-temporelle du *PromCgCCaMK::GUS::TermNos* dans les tissus non-symbiotiques*

L'expression du gène rapporteur a été examinée dans les racines de chacune des lignées obtenues et des plantes non-transformées. Les lignées transformées diffèrent par le niveau d'activité GUS, mais présentent toutes une spécificité d'expression identique. Aucune coloration bleue n'est observée dans les lignées non-transgéniques témoins.

Le test histochimique sur les racines *PromCgCCaMK::GUS::TermNos* prélevées juste avant inoculation révèle une expression basale peu intense dans les zones épidermiques, le cortex, le tissu vasculaire et l'apex racinaire (**Figure 40 A-B**). En revanche, aucune activité du gène rapporteur n'a été observée dans les poils racinaires.

*2.3. Expression spatio-temporelle du *PromCgCCaMK::GUS::TermNos* dans les tissus symbiotiques*

*2.3.1. Profil d'expression de *PromCgCCaMK::GUS::TermNos* lors des phases précoces de la symbiose*

Une déformation très prononcée de certains poils absorbants situés sur les racines latérales est observée 24 à 48 h après inoculation des racines par *Frankia*. Celle-ci est le résultat de la mise en place du dialogue moléculaire entre la plante hôte et le microorganisme symbiotique. Quatre jours après inoculation, l'intensité de la coloration augmente dans toutes les zones du système racinaire, incluant les tissus vasculaires, le cortex et l'épiderme (**Figure 40 C**). Une semaine après inoculation, l'expression demeure toujours aussi intense et se présente sous forme de « patches » denses, notamment dans les racines secondaires, au niveau de la zone d'émergence des poils racinaires. Les poils

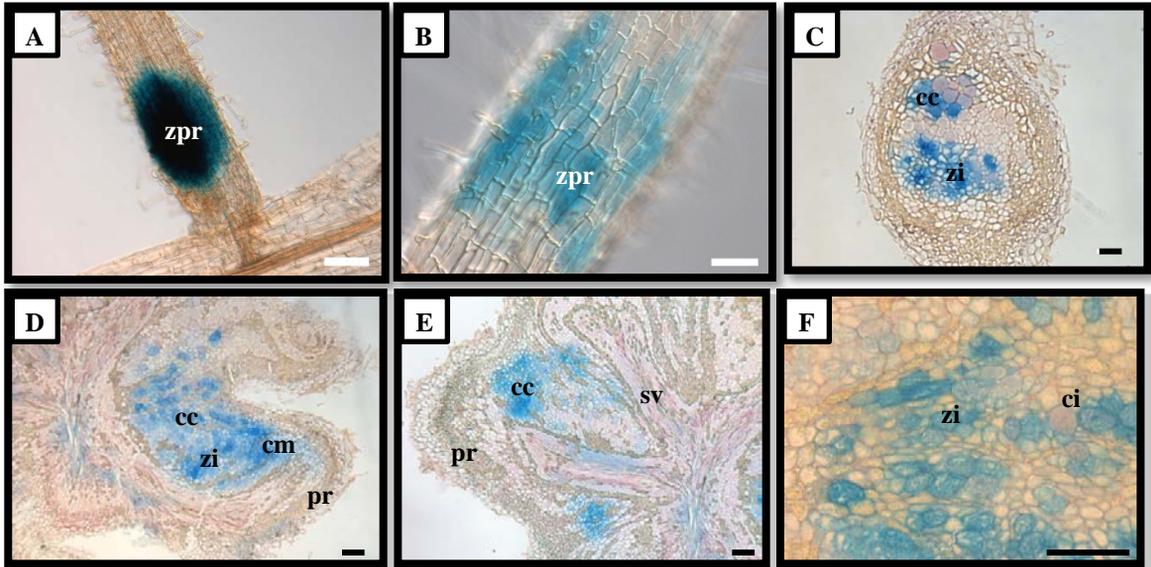


Figure 41 : Mise en évidence de l'activité GUS dans la zone d'émergence des prénodules, et coupes fines de prénodules et nodules de *Casuarina glauca* transformés avec la construction *PromCgCCaMK::GUS::TermNos*.

A-B : Racine à 15 jours après inoculation. On observe une très forte expression GUS dans la zone d'émergence des prénodules qui sont dans le prolongement des poils absorbants déformés ; **C** : Coupe longitudinale de prénodule. On observe une expression de GUS dans les jeunes cellules infectées du prénodule et dans les cellules corticales en cours d'infection ; **D-E** : Coupes longitudinales de nodules multilobés. On observe une expression de GUS principalement dans la zone méristématique et la zone de cellules en cours d'infection ; **F** : Cellules corticales infectées de la zone de fixation. On remarque que l'expression GUS est localisée dans les petites cellules en cours d'infection et que les cellules infectées hypertrophiées de grande taille présentent peu ou pas d'activité GUS. Les racines ont été décolorées au KOH et les coupes histologiques fines de 6 µm ont été réalisées au microtome et ont été colorées avec le rouge de ruthénium ; Les cellules infectées par *Frankia* apparaissent en rose. (cc) : cellules corticales ; (ci) : cellules infectées ; (cm) : cellules méristématiques ; (pr) : périoderme ; (sv) : système vasculaire ; (zi) : zone d'infection ; (zpr) : zone de prénodule. Barre d'échelle = 100 µm (A, B, F), 200 µm (C, D, E). Photographies prises sous microscope optique.

absorbants qui sont recourbés exhibent une forte coloration GUS (**Figure 40 D**). Au cours de la deuxième semaine après inoculation, l'expression devient plus localisée, mais reste très intense. Seuls quelques poils absorbants déformés présentent une coloration bleue. Les cellules adjacentes à ces poils racinaires présentent également une forte expression de la construction génique *PromCgCCaMK::GUS::TermNos* (**Figure 40 E-F**).

2.3.2. Profil d'expression de *PromCgCCaMK::GUS::TermNos* dans le prénodule et nodule

À dix-quinze jours, des zones GUS colorées de façon très intense sont visibles et correspondent à l'émergence de prénodules (**Figure 41 A-B**). Les observations réalisées sur des coupes fines montrent une forte expression, principalement dans les jeunes cellules infectées du prénodule (**Figure 41 C**).

Trois semaines après l'inoculation par *Frankia*, la formation de nodules possédant plusieurs lobes nodulaires est observée. Des coupes longitudinales fines ont été réalisées sur ceux-ci pour étudier précisément le profil d'expression du gène rapporteur. Les cellules infectées ont été examinées à fort grossissement (**Figure 41 D**). Dans les lobes nodulaires, une forte expression GUS est observée dans le méristème apical (Zone I), et dans les cellules corticales en cours d'infection par *Frankia* situées dans la partie apicale du nodule qui correspondent à la zone d'infection (Zone II) (**Figure 41 E**). Dans la zone de fixation (Zone III), on peut observer une expression GUS dans certaines cellules corticales non-infectées (**Figure 41 F**). Les coupes histologiques ont été colorées avec le rouge de ruthénium pour mettre en évidence les composés pectiques (Lachapelle, 2004).

IV. Discussion

La récente caractérisation du gène *CgSymRK* par l'équipe Rhizogénèse (Gherbi *et al.*, 2008a) a montré que celui-ci était le point de convergence des signalisations chez les endosymbioses racinaires. Dès lors, il est tentant d'émettre l'hypothèse que d'autres éléments génétiques de la voie de signalisation symbiotique identifiés chez les Légumineuses soient également communs à la symbiose actinorhizienne. Le gène *CgCCaMK* a été isolé par l'équipe Rhizogénèse et c'est dans ce cadre que s'inscrit sa

caractérisation fonctionnelle. Des études réalisées avant mon arrivée au laboratoire ont montré d'une part, que l'extinction de *CgCCaMK* par ARNi altère le processus d'infection et de nodulation ainsi que le taux de mycorhization, et d'autre part, que *CgCCaMK* complémente la nodulation et la mycorhization chez un mutant *mtdmi3* de *M. truncatula*.

C'est afin de compléter l'analyse que l'expression spatio-temporelle conférée par la région promoteur a été étudiée lors du processus de nodulation. La séquence promotrice étudiée est de 2168 pb. La longueur de cette séquence a été jugée suffisante pour ce genre d'analyse au regard des études de régulation de l'expression communément réalisées avec d'autres gènes chez les plantes. Des analyses précédentes réalisées sur d'autres promoteurs de gènes symbiotiques de *C. glauca*, tels que les promoteurs des gènes de la métallothionéine *CgMTI* (1,15 kb) (Laplaze *et al.*, 2002), de la subtilase *CgI2* (1,8 kb) (Svistoonoff *et al.*, 2003) et du transporteur d'auxine *CgAUXI* (1,7 kb) (Péret *et al.*, 2007), ont montré jusqu'à présent qu'une séquence promotrice comprise entre 1,15 et 1,8 kb permet d'avoir à la fois un niveau d'expression compatible avec l'analyse histochimique de l'activité β -glucuronidase et d'observer une régulation spatio-temporelle lors de la cinétique de nodulation.

Dans un premier temps, j'ai recherché grâce au logiciel « PLACE » si je pouvais identifier des séquences *cis* particulières au sein de la séquence *PromCgCCaMK*. J'y ai trouvé deux séquences, AAAGAT et CTCTT, qui sont caractéristiques de promoteurs de gènes symbiotiques ; elles ont également été observées au sein du promoteur *CgMTI* qui est exprimé dans les nodules de *C. glauca* (Laplaze *et al.*, 2002). L'isolement et la caractérisation du transporteur d'influx d'auxine *CgAUXI* a permis de mettre en évidence que l'auxine joue un rôle important lors du processus d'infection de *C. glauca* par *Frankia* (Péret *et al.*, 2007). Il est donc intéressant d'observer un motif CATATG potentiellement impliqué dans la réponse à l'auxine au sein du promoteur *CgCCaMK*.

Chez les Légumineuses, d'autres phytohormones sont impliquées dans le processus de nodulation. Les cytokinines sont des régulateurs positifs du processus de nodulation, alors que l'éthylène, l'acide abscissique (ABA) et le jasmonate (JA) sont des régulateurs négatifs (pour revue, Mortier *et al.*, 2012). L'éthylène interfère à la fois au stade de la perception des NFs et de la croissance des cordons d'infection. Les niveaux élevés de l'ABA contribuent à diminuer le nombre de nodules chez les Légumineuses, alors qu'un faible niveau d'ABA a un impact positif à la fois sur le nombre de nodules et l'activité de fixation d'azote (Suzuki *et al.*, 2004 ; Tominaga *et al.*, 2009). L'analyse de la séquence

PromCgCCaMK met en évidence un motif CTAACCA de réponse à l'ABA, mais l'implication de cette phytohormone dans le processus de nodulation par *Frankia* reste à établir. Récemment, Zdyb *et al.* (2011) ont tenté de déterminer si le JA avait un rôle régulateur dans les nodules des plantes actinorhiziennes *C. glauca* et *Datisca glomerata*. Les travaux ont mis en évidence que l'enzyme de l'allène oxyde cyclase (AOC) qui est impliquée dans la voie de biosynthèse du JA, est localisée dans les cellules non-infectées des nodules ; cependant, l'implication de cette molécule dans le processus de nodulation actinorhizienne n'a pu être démontrée. Concernant la séquence GAAAAA potentiellement impliquée dans la réponse aux pathogènes, l'étude du transcriptome de *C. glauca* a montré que le processus de nodulation déclenche des réactions de défense, qui sont ensuite contrôlées par la plante hôte pour permettre la colonisation du cortex nodulaire par le symbiote (Hocher *et al.*, 2006). Cependant, comme indiqué précédemment, la validation de l'ensemble de ces motifs reste conditionnée à une analyse plus fine de versions mutées et/ou délétées de la séquence *PromCgCCaMK*.

L'étude de la régulation spatio-temporelle conférée par la région *PromCgCCaMK* a été suivie grâce à l'utilisation du gène rapporteur *GUS*. Originaire d'*E. coli*, le gène *GUS* (β -glucuronidase) est l'un des gènes rapporteurs les plus utilisés chez les végétaux pour visualiser aisément l'expression spatio-temporelle conférée par des promoteurs. Son principal avantage réside dans les tests de détection histochimique et fluorométrique qui sont très sensibles. Parmi les inconvénients liés à l'utilisation du gène *GUS*, on cite le caractère létal de la révélation histochimique de l'activité *GUS*, ce qui implique le sacrifice d'une grande quantité de plantes lorsque l'on souhaite suivre la cinétique d'expression d'une construction chimère (Jefferson *et al.*, 1987). De plus, la révélation de l'activité *GUS* par histochimie peut engendrer d'éventuels problèmes de diffusion lorsque les niveaux d'expression conférés par les promoteurs sont élevés. Cependant, ce problème peut être limité par l'ajout de ferri- et ferrocyanure de potassium dans le tampon X-Gluc permettant de révéler l'activité du gène rapporteur.

Les analyses histochimiques réalisées sur des fragments de racines inoculées par *Frankia*, sur des prénodules et nodules prélevés à différents points de la cinétique d'inoculation, indiquent que l'expression conférée par *PromCgCCaMK* est très corrélée au processus d'infection par *Frankia*. En effet, le profil d'expression du *PromCgCCaMK::GUS::TermNos* suit les différents stades de ce processus. L'induction est d'abord forte dans les racines latérales 2 à 4 jours après l'inoculation, puis cette expression,

tout en restant très élevée, se localise principalement dans les poils absorbants recourbés et dans la zone d'émergence des prénodules, c'est-à-dire aux points d'infection de la racine par la bactérie. Dans le pré-nodule, l'expression de *PromCgCCaMK::GUS::TermNos* demeure très forte, notamment dans les cellules infectées.

Dans les nodules, les analyses histo-chimiques ont révélé une expression forte, principalement dans les cellules en cours d'infection (Zone II) et dans la partie proximale de la zone méristématique (Zone I). Cette expression forte mais compartimentée de *CgCCaMK* dans le nodule indique qu'elle est vraisemblablement liée au processus d'infection. Il est intéressant de noter que cette zone du nodule correspond à la zone où le processus d'infection par *Frankia* apparaît comme altéré dans les nodules *ARNi-CgCCaMK*.

Chez les Légumineuses *M. truncatula* et *S. rostrata*, des résultats similaires ont été rapportés (Godfroy, 2008 ; Capoen *et al.*, 2009). Chez *M. truncatula* par ex., les études d'expression d'une construction *PromMtDMI3::GUS* montrent une expression faible dans les racine non-inoculées, en particulier dans la zone de croissance des poils absorbants. Celle-ci devient plus forte et plus étendue 2 jours après inoculation. Dans le primordium nodulaire en formation, une expression forte au niveau du cortex est observée. Dans le nodule mature, la coloration GUS est observable principalement dans la zone d'infection (Zone II) (Godfroy, 2008). Chez *S. rostrata*, l'utilisation d'une cassette *PromSrCCaMK::GUS* a révélé un profil d'expression très proche de celui observé chez *M. truncatula* (Capoen *et al.*, 2009).

Ces similitudes montrent que *CgCCaMK* présente des caractéristiques proches des *CCaMK* de Légumineuses (Lévy *et al.*, 2004 ; Kaló *et al.*, 2005 ; Smit *et al.*, 2005) et indiquent que les endosymbioses racinaires partagent désormais au moins deux éléments génétiques de la voie de signalisation symbiotique, *SymRK* (Gherbi *et al.*, 2008a) et *CCaMK*.

Si les résultats obtenus par cette analyse du promoteur sont un complément à l'analyse fonctionnelle basée sur les résultats obtenus avec les constructions visant à éteindre l'expression de *CgCCaMK*, il faut conserver une vision critique d'une analyse d'expression basée sur une approche « promoteur-gène rapporteur ». En effet, il n'est pas exclu que d'autres éléments contribuant à la régulation du gène *CgCCaMK* puissent également se trouver en dehors de cette séquence, plus en amont, ou encore dans les

introns ou la séquence terminateur. Les possibles régulations post-transcriptionnelles et post-traductionnelles sont également des éléments à prendre en compte.

V. Article

***« THE CENTRAL ROLE OF CCAMK IN THE CONTROL OF
BACTERIAL INFECTION AND NODULE
ORGANOGENESIS IS CONSERVED BETWEEN
RHIZOBIUM-LEGUME AND ACTINORHIZAL
SYMBIOSES »***

Soumis à « Plant Physiol »

Running title: *CCaMK* Controls Actinorhizal Symbioses

Full title: The central role of *CCaMK* in the control of bacterial infection and nodule organogenesis is conserved between Rhizobium-Legume and actinorhizal symbioses

Faiza Meriem Benabdoun^{1,2,§}, Mathish Nambiar-Veetil^{1,3,§}, Stella Cesari^{1,†}, Sergio Svistoonoff¹, Nathalie Diagne^{1, ‡}, Valerie Hocher¹, Chonglu Zhong^{1,4}, Virginie Vaissayre¹, Françoise de Billy⁵, Didier Bogusz¹, Charles Rosenberg⁵, Claudine Franche¹, and Hassen Gherbi^{1,*}

¹Equipe Rhizogénèse, UMR DIADE (IRD, UM2), Institut de Recherche pour le Développement, 911 Avenue Agropolis, BP64501, 34394 Montpellier Cedex 5, France.

²Department of Biology and Ecology, University Mentouri, Constantine, Algeria.

³IFGTB, Coimbatore 641 002, India.

⁴RITF, Longdong, Guangzhou 510520, China.

⁵LIPM, UMR 2594/441, CNRS/INRA, 31326I Castanet-Tolosan Cedex, France.

* For correspondance (fax: +33 4 67 41 62 22; hassen.gherbi@ird.fr)

§ These authors contributed equally to this work.

† Present address: BGPI, Campus International de Baillarguet, TA A 54/K, 34398 Montpellier, France.

‡ Present address: LCM, IRD/ISRA/UCAD, BP 1386, Dakar, Sénégal.

SUMMARY

Actinorhizal symbiosis between the actinomycete *Frankia* and plant species belonging to eight families of angiosperms, collectively called actinorhizal plants, results in the formation of nitrogen-fixing nodules. Here, we report the isolation and characterization of a calcium and calmodulin-dependant kinase (*CgCCaMK*) in the actinorhizal tree *Casuarina glauca*, a key regulator gene for both rhizobial infection and nodule organogenesis in the Rhizobium-legume symbiosis. RNA interference (RNAi) knockdown of *CgCCaMK* expression by hairy root transformation in *C. glauca* led to decreased nodule formation and arbuscular mycorrhiza (AM) colonization, indicating that *CgCCaMK* performs an essential role in nodulation and mycorrhization. Importantly, we showed that *CgCCaMK* can fully complement the nodulation and mycorrhization phenotypes of the corresponding *Medicago truncatula* mutant and is therefore functionally equivalent to *MtCCaMK*. Our results provide further evidence of a common evolutionary history of legume and actinorhizal nitrogen-fixing symbioses and also represent a step towards the identification of a unique basic genetic program that governs root nodule symbioses.

Keywords: *CCaMK*, signaling pathway, *Casuarina glauca*, *Frankia*, actinorhizal symbiosis, mycorrhizae

INTRODUCTION

Root endosymbioses are one of the main evolutionary adaptations allowing plants to optimize their mineral nutrition. If the majority of land plants can establish symbioses with Glomeromycetes through arbuscular mycorrhizal (AM) association, only some species in four orders belonging to the Fabid (Eurosoid I) nodulating clade are able to enter symbiosis with nitrogen-fixing bacteria in root nodules. The Fabid clade includes plants of the legume family interacting with Gram negative proteobacteria collectively called rhizobia and actinorhizal plants associating with filamentous Gram positive bacteria of the genus *Frankia*. Actinorhizal plants are mainly woody species that belong to eight Angiosperm families. In both symbioses, bacteria are hosted in the nodule in which they fix nitrogen and provide ammonia in exchange for carbohydrates supplied by the host plant. Phylogenetic studies suggest that legumes and actinorhizal plants evolved from a common ancestor characterized by a “predisposition” to form symbiotic root nodules (Doyle, 1998; Kistner and Parniske, 2002).

The developmental process of the root nodule is the result of coordinated and sophisticated exchange of signals between the plant and the bacteria. In the well-studied *Rhizobium*-legume symbiosis, bacterial infection can occur either through root hair curls or cracks in the epidermis. The infection process and the formation of nodule primordia are initiated by bacterial signaling molecules called Nod factors (NFs). NFs are lipochitooligosaccharides that consist of an acylated chitin oligomeric backbone with different functional groups (Lerouge *et al.*, 1990; D'Haese and Holsters, 2002). NFs induce root hair curling and elicit several physiological reactions such as changes in ion fluxes, calcium oscillations, depolarization of the cell membrane, modification of cytoskeleton, and activation of cell division (Oldroyd and Downie, 2006). In recent years, important breakthroughs have been made in the identification of molecular mechanisms by which the plant perceives the secretion of bacterial signal(s) and activates the signaling pathway leading to nodule formation. Genetic studies based on large screening of legume mutants defective in infection and nodulation led to the identification of several essential genes of the signaling cascade (see Riely *et al.*, 2006; Oldroyd and Downie, 2008). These studies were mainly conducted on the two model plants *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus*. Rhizobial NFs are likely perceived by *LysM* domain receptor-like kinases (*LysM-RLKs*) encoded by *MtLyk3/MtNFP* in *M. truncatula* (Ben Amor *et al.*, 2003; Limpens *et al.*, 2003; Arrighi *et al.*, 2006) and *LjNFR1/LjNFR5* in *L. japonicus* (Madsen *et al.*, 2003; Radutoiu *et al.*, 2003). Several other elements act downstream from this perception step including a leucine-rich repeat receptor-like kinase (*LjSymRK /MtDMI2*) (Stracke *et al.*,

2002; Limpens *et al.*, 2005; Bersoult *et al.*, 2005), a putative cation channel (*MtDMI1/LjCastor&LjPollux*) (Ané *et al.*, 2004; Imaizumi-Anraku *et al.*, 2005), a putative nuclear pore component (*LjNup85* and *LjNup133*) (Kanamori *et al.*, 2006; Saito *et al.*, 2007), a calcium and calmodulin-dependant kinase (*CCaMK/MtDMI3*) (Lévy *et al.*, 2004; Mitra *et al.*, 2004) and a protein with a short C-terminal coiled-coil domain (*MtIPD3/LjCyclops*) (Messinese *et al.*, 2007; Yano *et al.*, 2008). Interestingly, these downstream-acting elements are also required for arbuscular mycorrhiza symbiosis (Catoira *et al.*, 2000). This shared signal transduction pathway was consequently named “Common Sym Pathway” (CSP) (Kouchi *et al.*, 2010). Following CSP, several regulatory elements that mediate transcriptional changes inducing early nodulation program were also identified. These include members of the GRAS family nodulation signaling pathway (*NSP1* and *NSP2*), nodule inception (*NIN*) and *AP2-ERF* (*ERN*) transcription factors (Kaló *et al.*, 2005; Smit *et al.*, 2005; Schauser *et al.*, 1999; Heckmann *et al.*, 2006; Middleton *et al.*, 2007; Vernié *et al.*, 2008). Cytokinin receptors *MtCRE1/LjHK1* were also shown to regulate downstream response leading to nodule primordium initiation (Gonzalez-Rizzo *et al.*, 2006; Murray *et al.*, 2007; Tirichine *et al.*, 2007).

A central event in the NF signal transduction pathway is the occurrence of intracellular calcium oscillations, also termed calcium spiking. Calcium signal is among the earliest measurable plant responses to NF signaling, and is reflected by a rapid calcium influx followed by oscillations of cytosolic calcium concentrations in the nuclear and perinuclear region of root hair cells. Perception and transduction of the calcium signal are likely mediated by a calcium- and calmodulin-dependent protein kinase (CCaMK/DMI3). CCaMK functions immediately downstream from calcium spiking and is localized in the nucleus of root cells where calcium oscillations occur. CCaMK has the capacity to bind calcium directly through its EF-hand protein domains and indirectly as a complex with the calmodulin/autoinhibition domain. Binding of free calcium to EF-hands induces autophosphorylation thereby enhancing the affinity to the calcium/calmodulin complex. This subsequently suppresses autoinhibition which, in turn, promotes substrate phosphorylation and enables kinase activity (see Oldroyd and Downie, 2008). Recent genetic studies demonstrated the crucial role of CCaMK regulation in the activation of the nodulation process. The gain-of-function mutation in *L. japonicus* triggers *de novo* nodule organogenesis in the absence of Rhizobium (Tirichine *et al.*, 2006). Parallel works performed on *M. truncatula* revealed that targeted mutagenesis or specific removal of the autoinhibition domain activates nodule morphogenesis independently of rhizobia (Gleason *et al.*, 2006). More recent works showed that expression of the gain-of-

function mutation *CCaMKT265D* or introduction of the *snf1* genetic background, in lotus CSP mutants positioned upstream from *CCaMK*, suppresses loss-of-function mutations and restores not only nodulation but also successful rhizobial and mycorrhizal infection (Hayashi *et al.*, 2010; Madsen *et al.*, 2010). This is evidence that *CCaMK* is essential for coordinated induction of nodulation and bacterial proliferation.

In actinorhizal symbioses, the molecular dialogue between *Frankia* and its host plant is much less known, mainly due to the lack of plant and bacterial genetic approaches. The nature of *Frankia* nodulation factor(s) as well as its perception and transduction by the host plant are poorly understood. However, the sequence information from different whole genomes of *Frankia* strains (Normand *et al.*, 2007) and access to genomic resources from actinorhizal plants (Hocher *et al.*, 2006; Hocher *et al.*, 2011) together with the development of gene silencing procedures for actinorhizal trees of the *Casuarinaceae* family (Gherbi *et al.*, 2008b) open the way to identifying the molecular bases of the dialogue between the two partners. Recently, we showed that *DMI2/SYMRK* at the top common AM and nodulation signaling pathway in legume, is needed for the establishment of the symbiosis between the actinorhizal tree *C. glauca* and the actinomycete *Frankia* (Gherbi *et al.*, 2008a). We also demonstrated that *CgSymRK* is able to fully complement the lotus *symrk* mutant for both rhizobial and AM symbioses. Similar results have been reported for the *SymRK* gene of the actinorhizal plant *Datisca glomerata* (Markmann *et al.*, 2008). These recent findings provided new insights into the evolution of nitrogen-fixing symbioses and revealed overlapping of the AM and nitrogen-fixing symbioses signaling pathways. This supports the hypothesis that plants belonging to the Fabid clade, which are able to develop root nodulation with rhizobia and *Frankia*, may have evolved from a common ancestor that probably acquired the nodulation capacity by redirecting part of the ancient AM program (Kistner and Parniske, 2002).

In this study, we tested the hypothesis of a highly conserved signaling program between Rhizobia/legume and actinorhizal symbioses by examining whether *C. glauca CCaMK* controls actinorhizal nodulation and AM. We also examined whether *C. glauca CCaMK* can restore symbiotic properties to a *M. truncatula dmi3* mutant. We observed that knockdown of *CgCCaMK* strongly disturbs *Frankia* infection and severely affects actinorhizal nodulation and AM. Furthermore, we showed that *CgCCaMK* is functionally equivalent to *M. truncatula DMI3*. Our data support the role of *CgCCaMK* in actinorhizal nodulation and AM and highlight the conservation of the root nodule symbiotic signaling pathway between legumes and actinorhizal plants.

RESULTS

Isolation of a *C. glauca* *CCaMK*

Screening of an expressed sequence-tag database of *C. glauca* nodules (Hocher *et al.*, 2011) allowed us to identify three ESTs corresponding to *CCaMK* gene transcripts. The overlap of the three sequences enabled isolation of a full-length cDNA as well as the genomic DNA fragment. The genomic sequence was 5045 bp long and contained seven putative exons like in the *M. truncatula* *MtDMI3* and *L. japonicus* *LjCCaMK* gene. The corresponding CDS fragment was 1563 bp long and encoded a putative protein containing 520-amino acid residues. The deduced amino acids sequence showed a high degree of similarity with several legumes (*M. truncatula*, *L. japonicus*, *S. rostrata*) *CCaMK*s. This similarity reached 89% and 93% in their PKc and CaM-binding domains respectively and up to 100% in the three EF-hand motifs (Figure S1a). In a distance-based phylogenetic tree, the *C. glauca* protein clustered with a *CCaMK* predicted protein from *Vitis vinifera* (Figure S1a) in the legume *CCaMK* subgroup (Figure S1b). Southern blot experiments suggest that there is only one *CCaMK* homolog in the *C. glauca* genome (data not shown). The corresponding gene was named *CgCCaMK*.

Changes in *CgCCaMK* expression are associated with the progression of *Frankia* infection

We have performed real-time PCR (qPCR) experiments to study the accumulation of *CgCCaMK* transcripts during the symbiotic interaction with *Frankia*. Total RNA was extracted from roots at 6, 12, 24 and 48 h and 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 and 22 days post inoculation. No significant change in transcript abundance was observed during the infection process (Figure S2a) and in mature nodules compared to non-infected roots (Figure S2b).

In addition, to determine whether the extinction of *CgSymRK* (Gherbi *et al.*, 2008; Markmann *et al.*, 2008) has an effect on the expression of *CgCCaMK* in *C. glauca* roots, we quantified transcripts of *CgCCaMK* in five *CgSymRK*-RNAi transformed plants, three transgenic control plants and two non-transgenic control plants. The qPCR revealed no significant variation in *CgCCaMK* expression compared to controls (data not shown).

To analyze the cell-specific expression of the *CgCCaMK* gene in *C. glauca* roots and nodules, a 2165 bp fragment from the promoter region of *CgCCaMK* was fused to the *GUS*-

marker gene (*uidA*). This construct was introduced in *C. glauca* roots via *A. rhizogenes*, and composite plants were inoculated with *Frankia*. The transgenic roots and nodules were analyzed histologically for GUS activity.

In non-inoculated roots, low *PCgCCaMK::GUS* expression was observed in most of the root system, in particular in the vascular bundle and in the epidermal zone. GUS activity increased progressively in root apices and was highest in zones where lateral roots emerge. However, no noticeable activity was detected in the root hairs (Figure 1a). On root sections, GUS staining was mainly detected in root vasculatures and in the epidermis, except in root hairs. To investigate *PCgCCaMK::GUS* expression during nodulation, *C. glauca* composite plants were inoculated with *Frankia* and GUS expression was analyzed in root or nodule samples 2, 4, 7, 10, 15 and 21 days later. In non-inoculated roots, basal expression of *PCgCCaMK::GUS* was generally localized in the vascular bundle and in root tips (Figure 1a). At 2-4 days post inoculation, most of the transgenic roots showed a strong increase in GUS activity throughout the root system, including the vascular bundle, cortex and epidermis (Figure 1b,c). GUS staining was more intense and more extensive than in non-inoculated roots. At one week post inoculation, the mostly curved root hairs also exhibited strong GUS staining (Figure 1c). GUS activity remained high but less extensive, dense patches were generally localized in secondary roots, at the point of emergence of lateral roots and in root apices. At 10-15 days post inoculation, increased expression was associated with *Frankia* infection sites, since GUS activity was visible in deformed root hairs (Figure 1d) and became very patchy at the emergence of prenodules (Figure 1e,f,g). The prenodule, which does not evolve into a nodule, is the result of limited cortical cell division triggered near a deformed root hair concomitantly to *Frankia* intracellular infection (Callaham and Torrey, 1977). GUS activity was particularly high in the hypertrophied infected cortical cells of the prenodule (Figure 1e).

At later stages (three weeks after inoculation), nodule sections showed strong GUS staining in the apical meristem (zone I) and in the infection zone (zone II). In the fixation zone (zone III), GUS activity was confined to non-infected cells (Figure 1h,i,j) and very weak GUS staining was detected in *Frankia*-containing hypertrophied cortical cells (Figure 1i,j). Taken together, these observations indicate that *CgCCaMK* expression is highly correlated with the progression of *Frankia* infection.

***CgCCaMK* RNAi roots are impaired in nodulation and AM**

We used an RNAi approach to investigate the symbiotic function(s) of *CgCCaMK* in *C. glauca*. Two RNAi constructs corresponding to the 5' UTR region (*CgCCaMK-RNAi-UTR*) and calmodulin domain (*CgCCaMK-RNAi-CAM*) were prepared and introduced into *C. glauca* roots by *A. rhizogenes*-mediated transformation (Diouf *et al.*, 1995). Control plants consisting of non-transformed roots and hairy roots obtained with the pHKN29 vector harboring only the *GFP* reporter gene were analyzed in parallel. A total of 55 RNAi composite plants (24 *CgCCaMK-RNAi-UTR* and 31 *CgCCaMK-RNAi-CAM*) and 23 transgenic control plants showing GFP expression in hairy roots were analyzed. Selected plants were inoculated with *Frankia* and examined three times a week for three months. Nodulation started three weeks and five weeks post inoculation in non-transgenic control (NTC) and composite plants, respectively (Figure S3). Seven weeks after inoculation, all NTC and 40% of transgenic controls (TC) were nodulated, while in *CgCCaMK-RNAi-UTR* and *CgCCaMK-RNAi-CAM* plants only 13% and 26% had nodules, respectively (Figure S3). Ten weeks post inoculation, the difference in the nodulation rate was highest between TC (61%) and RNAi plants (35% for *CgCCaMK-RNAi-UTR* and 38% for *CgCCaMK-RNAi-CAM* plants). Subsequently, the rate of nodulated plants stabilized in TC (65%) but increased in *CgCCaMK-RNAi-CAM* and *CgCCaMK-RNAi-UTR* to reach 55% and 71%, respectively, by the end of the experiment (Figure S3). The average number of nodules was also calculated and showed that *CgCCaMK-RNAi* plants formed fewer nodules than TC (Table S1). Thus, three months after inoculation by *Frankia*, 73% of TC developed at least seven nodules, whereas only 47% of *CgCCaMK-RNAi-CAM* and 29% of *CgCCaMK-RNAi-UTR* plants were able to develop nodules (Table S1). Some RNAi lines developed only one or two nodules, while others formed as many nodules as TC. Furthermore, RNAi lines developed nodules with phenotypes ranging from small one-lobed to large multi-lobed but no major alteration in the shape was observed. In conclusion, this kinetic study indicates that nodulation was delayed and fewer nodules developed in RNAi lines than in control lines.

To analyze the correlation between the phenotypic observations described above and *CgCCaMK* expression, we performed qPCR experiments on five lines for each RNAi construct. Down-regulation in *CgCCaMK* mRNA level was found for RNAi lines compared to TC. The decrease ranged from 40% to 94% in *CgCCaMK-RNAi-CAM* and from 58% to 94% in *CgCCaMK-RNAi-UTR* plants (Figure S4). RNAi knockdown lines with the strongest reduction in the *CgCCaMK* transcript level exhibited delayed nodulation and developed fewer and smaller nodules.

To examine the cytological organization of RNAi nodules, longitudinal sections of nodules

were prepared and stained with toluidine blue. TC and *CgCCaMK-RNAi-CAM* or *CgCCaMK-RNAi-UTR* nodule zones were compared. We observed a disruption of the infection zone in both *CgCCaMK-RNAi-CAM* and *-UTR* nodules (Figure 2): the distance between the apical meristem and the first infected cells was greater in RNAi nodules than in TC (Figure 2d,e,f and 2g,h,i). This suggests an alteration in the progression of infection. The structure of other zones of RNAi nodules did not appear to be significantly affected, as a large number of hypertrophied cortical cells were infected by *Frankia* (Figure 2j,k,l).

To analyze the effect of *CgCCaMK* knockdown on mycorrhization, composite *C. glauca* plants harboring *CgCCaMK-RNAi-CAM* or *CgCCaMK-RNAi-UTR* constructs were inoculated with *G. intraradices* and harvested nine weeks later. Roots showing strong GFP fluorescence were selected, stained with trypan blue and the fungal structures were examined. In total, 20 *CgCCaMK-RNAi-CAM*, 15 *RNAi-CgDMI3-UTR* and 10 TC plants were analyzed together with 10 wild type plants. AM colonization of RNAi roots was very weak compared to that of TC or WT roots. Fungal structures such as intraradical hyphae, vesicles and arbuscules were found at very low frequencies ranging from 0% to 10% (Table S2). Eight RNAi plants displayed complete absence of both vesicles and arbuscules and four RNAi plants (*CgCCaMK-RNAi-UTR*) had no fungal structures at all. In addition, RNAi plants often displayed extensive proliferation of extracellular hyphae growing along the rhizodermal cells, likely due to several aborted attempts at penetration. When colonization of roots was successful, intracellular hyphae, arbuscules and vesicles had similar morphologies to those found in control plants. However, root colonization was generally limited to small zones around the site of fungal entry, while in control plants the whole root system was colonized. These results indicate that knockdown of *CgCCaMK* gene strongly disturbs the early steps of the AM symbiosis, particularly fungal penetration.

Extinction of *CgCCaMK* disturbs early *Frankia* infection events

Among actinorhizal nodulin genes, *CgI2* is one of the earliest induced after *Frankia* inoculation (Svistoonoff *et al.*, 2003). This gene encodes a subtilase specifically expressed in plant cells being infected by *Frankia*. To investigate the involvement of *CgCCaMK* during root hair infection by *Frankia*, transgenic *C. glauca* expressing *PCgI2::GUS* construct were retransformed with *CgCCaMK-RNAi-CAM* or *CgCCaMK-RNAi-UTR* via *A. rhizogenes* (Diouf *et al.*, 1995). As transgenic control, *C. glauca* plants harboring the *PCgI2::GUS* construct were retransformed with *A. rhizogenes* containing the *pHKN29* vector containing

the *35S::GFP* expression cassette. A total of 14 plants (seven plants per RNAi construct) and three transgenic control plants showing high GFP expression in hairy roots were selected and inoculated with *Frankia*. Nine roots were sampled from each plant and GUS histochemical assays were performed. Root hairs in which GUS activity was detected (blue hairs) were counted. Root length was measured using EZ-Rhizo software (Armengaud *et al.*, 2009) and the mean number of blue hairs per cm of lateral root was calculated. The results showed that the mean number of blue root hairs in *CgCCaMK-RNAi-CAM* and *CgCCaMK-RNAi-UTR* were 48% and 90% lower than those of control plants, respectively. These observations indicate that early infection events are significantly reduced in RNAi plants.

***CgCCaMK* restores nodulation, nitrogen fixation and AM of the *M. truncatula dmi3* mutant**

To determine whether *CgCCaMK* is functionally equivalent to its homolog in *M. truncatula*, we performed complementation experiments on the null mutant *Mtdmi3-1* (TRV25) (Sagan *et al.*, 1995; Catoira *et al.*, 2000). The *Mtdmi3* mutant is unable to establish symbiotic associations with both Rhizobium and arbuscular endomycorrhizal fungi. The *CgCCaMK* coding sequence, under the control of the *MtDMI3* promoter and terminator (*PMtDMI3::CgCCaMKCDS::TMtDMI3*), was introduced in the *Medicago* mutant using *A. rhizogenes*-mediated hairy-root transformation. Composite plants were then inoculated either with *S. meliloti* or *G. intraradices* to test their symbiotic performance.

Four weeks after *S. meliloti* inoculation, the TRV25 mutant expressing the *CgCCaMK* cassette showed a wild-type nodulation phenotype, comparable to positive controls (Figure 3). The nodules exhibited a typical structure with a central zone containing infected and non-infected cells surrounded by a vascular bundle (Figure 3b), and infection threads as well as symbiosomes were observed (Figure 3d). Negative control mutant roots remained non-nodulated. Moreover, acetylene reduction activity (ARA) was performed on composite plants and indicated that nodules of mutants expressing *CgCCaMK* are able to fix nitrogen with similar efficiency (39.75 ± 13.85 Units) to positive control nodules expressing *MtCCaMK* (33.50 ± 18.10 Units), while only very low amounts of ethylene (1.50 ± 0.29 Units) were detected in negative control plants carrying the empty vector.

Furthermore, *G. intraradices* was able to colonize the *M. truncatula* mutant carrying the *PMtDMI3::CgCCaMKCDS::TMtDMI3* cassette (Figure 3f,h). The mycorrhizal structures were very similar to those detected in control transformed roots, and we were able to detect

the presence of arbuscules in the cortex, external and internal hyphae, vesicles and spores (Figure 3f,h).

These results indicate that *CCaMK* function is highly conserved in both AM and nodulation symbioses.

DISCUSSION

We recently demonstrated that a *C. glauca* ortholog of the receptor kinase *DMI2/SymRK*, which is at the convergence of AM and Nod-dependant legume-Rhizobium signaling, also controls *Frankia* nodulation and AM in this actinorhizal species. Based on this finding, we addressed the question of the extent of this common Nod symbiotic signaling pathway among root nodule symbioses. In this article, we report our investigation of the role of *C. glauca* *CCaMK*. In legumes, *CCaMK* is positioned downstream of calcium oscillations and is required for both nodulation and mycorrhization.

Expression studies using qPCR of *CgCCaMK* in roots and nodules revealed that transcript levels did not vary significantly during *Frankia* infection or in nodules compared to non-inoculated roots. Our analysis using the *PCgCCaMK::GUS* construct revealed strong GUS staining in curled root hairs and at the point of emergence of prenodules, suggesting that the *CgCCaMK* promoter is strongly associated with *Frankia* infection. In mature nodules, the *CgCCaMK* promoter is highly active in non-infected cells in the fixation zone and in young infected cells in the infection zone. In legumes, *CCaMK* displays a similar expression pattern (Lévy *et al.*, 2004; Tirichine *et al.*, 2006; Capoen *et al.*, 2009). Promoter-*GUS* fusion analyses revealed low GUS activity in non-inoculated roots but strong induction following inoculation with rhizobia (Godfroy, 2008; Capoen *et al.*, 2009). In mature nodules, *PCCaMK::GUS* expression was mainly associated with the infection zone. This comparable pattern of expression in *Casuarina* and legume *CCaMKs* suggests they share similar features.

We studied the role of *CgCCaMK* and our data indicate that this gene is involved in successful nodulation and mycorrhization in *Casuarina* and is functionally equivalent to legume *CCaMK*. In our experience, knock-down of *CgCCaMK* causes *Frankia* infection defects. RNA interference in *CgCCaMK* provokes a delay in nodulation kinetics, a significant decrease in the number of nodules and a reduction in their size. Furthermore, by monitoring expression of the infection marker gene *CgI2* in root hairs, we observed that down-regulation of *CgCCaMK* led to a significant decrease in the number of infection events. In addition, cytological observations performed on RNAi mature nodules revealed a distortion in the

infection zone where the first infected cells appeared to be more distant from the nodule meristem than in controls. This suggests a defect in the progression of *Frankia* infection caused by down-regulation of *CgCCaMK* expression. Since in legume CCaMK protein likely decodes and transduces the NF- and Myc-specific calcium spiking signal (Oldroyd and Downie, 2006; Kosuta *et al.*, 2008), we hypothesize that *CgCCaMK* decodes a likely Ca oscillation activated by an as yet unknown *Frankia* nodulation factor(s). The perturbation of *Frankia* and fungus infection in *Casuarina CgCCaMK*-RNAi plants could then be due to incorrect interpretation of a calcium signal. Similarly, in the tropical legume *Sesbania rostrata*, down-regulation of *SrCCaMK* led to a major reduction in nodulation as well as in the size of the nodule, and infection thread progression was severely altered whereas intracellular invasion of the cortex was barely affected (Capoen *et al.*, 2009). Inoculation of *CgCCaMK*-RNAi plants with *G. intraradices* led to a significant decrease in fungal colonization and in some cases, to a total absence of intracellular fungal structures. When colonization succeeded, arbuscules and vesicles were morphologically similar to those observed in controls. In both nodulation and AM, alteration or failure of the symbiotic process was highly correlated with the level of extinction of *CgCCaMK* expression. Taken together, these observations indicate that *CgCCaMK* is essential for early steps of nodulation and mycorrhization processes in actinorhizal plants and plays a critical role in the infection process.

In *M. truncatula*, the *dmi3* knock-out (k.o.) mutant is unable to establish Rhizobium and AM symbioses (Catoira *et al.*, 2000). To determine whether *Casuarina CCaMK* can functionally replace *CCaMK* in legumes, we introduced the coding sequence of *CgCCaMK*, under the control of the *MtDMI3* promoter and terminator, in a *M. truncatula dmi3* k.o. mutant. Phenotypic and cytological analyses of a rescued *dmi3* mutant clearly suggest that both symbiosis types can be fully supported by *CgCCaMK* in *M. truncatula*. This demonstrates, for the first time, full complementation for nodulation and nitrogen fixation in a legume *CCaMK* mutant with a non-legume *CCaMK*. It has previously been shown that a *M. truncatula dmi3* mutant expressing rice *CCaMK* led to the formation of nodules that did not contain bacteria (Godfroy *et al.*, 2006). In contrast, the same rice *CCaMK* gene was able to restore successful AM symbiosis in the *Medicago dmi3* mutant (Chen *et al.*, 2007). The full complementation of *Medicago dmi3* that results in functional root nodules indicates that the central role of CCaMK in nodule organogenesis and bacterial infection control is conserved between legume-Rhizobia and actinorhizal symbioses. The lack of complementation of the *Medicago* nodulation *dmi3* mutant by rice CCaMK, despite the strong similarity (84%),

suggests that the nodulation function of CCaMK might be achieved thanks to a specific sequence signature which is absent in rice but present in actinorhizal plants. Domain-swap experiments between rice, legume and actinorhizal CCaMKs might provide information about the motif which determines nodulation specificity. Transcriptomics analysis of *C. glauca* nodules recently identified a homolog of legume *Cyclops/lpd3* (Hocher *et al.*, 2011) which was identified as an interacting partner of CCaMK involved in rhizobial infection (Yano *et al.*, 2008). Although further research is required, this result suggests that *CgCCaMK* works in the same way as in legumes by coordinating organogenesis and the infection related pathway.

In summary, *CgCCaMK* gene plays an essential role in *C. glauca-Frankia* symbiosis and in AM formation. Its features appear to be highly similar to those of ortholog genes of the legume *CCaMK/DMI3*. The ability of *CgCCaMK* to functionally restore symbiotic capabilities in a *Medicago dmi3* mutant provides new evidence that, despite the phylogenetic distance between rhizobia and *Frankia* and striking differences in nodule ontogenesis and structure, actinorhizal and rhizobial symbioses share essential genetic components of the symbiotic signaling pathway. The data presented in this article and previous work on *CgSymRK* highlight the importance of the CSP for all root endosymbioses and provide new insights into plant genes that are essential for both bacterial and fungal endosymbioses. It is also a step forward in identifying the unique basic genetic program that governs root nodule symbiosis.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Biological Materials

Casuarina glauca seeds were provided by Carter Seeds (California, USA) and grown as described in Franche *et al.* (1997). Seeds of *Medicago truncatula* cv Jemalong A17 wild-type and *TRV25 dmi3* mutant were grown according to Catoira *et al.* (2000). *A. rhizogenes* strain A4RS (Jouanin *et al.*, 1986) and ARqual (Boisson-Dernier *et al.*, 2001) were used for hairy root transformation of *C. glauca* and *M. truncatula*, respectively. *Frankia* strain CcI3 (Normand *et al.*, 2007) was used to nodulate *C. glauca* as described in (Svistoonoff *et al.*, 2003). *Sinorhizobium meliloti* strain RCR2011 was used to nodulate *M. truncatula*. *Glomus intraradices* DAOM 197198 inoculum was provided by G. Bécard (Cell Surfaces and Plant Signaling, UMR CNRS - Paul Sabatier University, Toulouse, France) and prepared by extracting spores as described in St-Arnaud *et al.* (1996). The fungal inoculum was used for both *C. glauca* and *M. truncatula* mycorrhization.

Generation of composite *C. glauca* with transgenic roots by *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation

A. rhizogenes-mediated transformation of 45-day-old *C. glauca* seedlings was performed following the procedure of Diouf *et al.* (1995). Transgenic roots expressing GFP fluorescence were selected positively under UV light of a stereomicroscope MZFLIII (Leica) and non-transgenic roots were removed. For nodulation studies, composite plants were transferred in Gibson tubes containing a modified Hoagland solution as described in Santi *et al.* (2003). For mycorrhization analyses, transformed plants were transferred in pots containing a mixture of quartz sand and autoclaved soil (4:1). To study the *CgCCaMK* promoter, composite plants were grown in pots containing a modified Broughton and Dillworth (BD) hydroponic nutrient solution as described in Svistoonoff *et al.* (2010). After four weeks of culture, roots were incubated with *Frankia* and histochemical GUS staining was performed.

Identification and cloning of *CgCCaMK*

A full-length *CgCCaMK* fragment was amplified from a nodule cDNA library using *CgCCaMK-For1*: AGAGTGCTGGCGAAGCCATGCATG and *CgCCaMK-Rev4*: GTATGCCATGAAGGAAAACAGCTCC primers designed from *C. glauca* nodule ESTs

homologous to the *CCaMK* gene. The amplified fragment was then cloned into pGEM-T easy (Promega) vector and sequenced. Amplification of the *CgCCaMK* genomic fragment was performed on total DNA of a *C. glauca* young shoot apex using the same primer pair. An amplified fragment was cloned into pGEM-T vector and sequenced. Cloning of *C. glauca* *CCaMK* promoter was performed using the Universal GenomeWalker kit (Clontech) applied to genomic DNA as recommended by the manufacturer. Finally, a 2165-bp region upstream from the start codon was cloned into pTOPO2.1 vector (Invitrogen).

Expression analysis of *CgCCaMK* transcripts

Total RNA was extracted from roots or nodules using the RNEasy Plant MiniKit (Qiagen) and quantified using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer. One hundred ng per sample were reverse transcribed using SuperScriptIII H⁻ reverse transcriptase (Invitrogen). Real time qPCR was then performed as described in Gherbi *et al.* (2008a) with the following primer pair *qCgCCaMK-F*: ATGTCGTCGTTGGTTCCTC and *qCgCCaMK-R*: CTTCTTCCTTGCTGATGTATCC.

RNA interference

To produce the RNAi constructs, *CgCCaMK-RNAi-UTR* and *CgCCaMK-RNAi-CAM* were cloned into the pHKN29 binary vector (Kumagai and Kouchi, 2003) modified by introducing the Gateway RNAi cassette from the pHellsgate12 vector (Helliwell and Waterhouse, 2003) at *SpeI/SacI* sites. The *CgCCaMK-RNAi-UTR* fragment corresponds to 350 bp of the *CgCCaMK* untranslated region and was amplified using *AttB1-CgCCaMKRNAiUTR-F3*: *ggggacaagttgtacaaaaagcaggct*AGAGTGCTGGCGAAGCCATGCATG and *AttB2-CgCCaMKRNAiUTR-R4*: *ggggaccactttgtacaagaagctgggt*CTTGAACGACTGCAAAGAGCCAAG primers and cloned using Gateway recombination technology (Invitrogen). *CgCCaMK-RNAi-CAM* corresponds to 356 bp of the calmodulin binding domain and was amplified using *AttB1-CgCCaMKRNAiCAM-F1*: *ggggacaagttgtacaaaaagcaggct* ATCTTGTACATCCTGCTCTCTGGG and *AttB2-CgCCaMKRNAiCAM-R2*: *ggggaccactttgtacaagaagctgggt*GACTTCAGCTTCTTTGTCCG primers and also cloned using Gateway recombination technology.

***CgCCaMK* promoter-*GUS* construct**

The *CgCCaMK* promoter (*PCgCCaMK*) fragment was introduced into the pMDC162 binary vector (Curtis and Grossniklaus, 2003) modified by replacing the hygromycin resistance gene by the more convenient selective marker *P35S::eGF::TNos* (amplified from pHKN29 plasmid and cloned at the *Xho*I restriction site). Thus, *PCgCCaMK* was amplified with AttB1-*PCgCCaMK*-F1: *ggggacaagttgtacaaaaaagcagge*TTGGGTGCATGCTTTCCACG and AttB2-*PCgCCaMK*-R2:

ggggaccacttgtacaagaaagctgggtAATACAAATTCTTGAACGACTGCA primers and inserted upstream from the *GUS* coding sequence of pMDC162-GFP using Gateway recombination technology.

Functional complementation of the *Mtdmi3* mutant

The *PMtDMI3::CgCCaMKCDS::TMtDMI3* cassette was prepared by different cloning steps into pGEM-T Easy vector. The *CgCCaMK* coding sequence (1563 bp) was fused to the *MtDMI3* promoter (1048 bp) and terminator (320 bp) and cloned into pCambia 2202 binary vector. The binary vector pCambia2202 containing the whole *MtDMI3* genomic fragment including the promoter (1048 bp) and terminator (320 bp) was used as positive control.

A. rhizogenes-mediated transformation of a 4-day-old *M. truncatula dmi3* mutant was performed following the procedure previously described by Boisson-Dernier *et al.* (2001). Transformed roots were positively selected on Fahraeus agar medium (Catoira *et al.*, 2000) supplemented with kanamycin at 20 mg/liter for two weeks at 20 °C. Composite plants were then transferred either in growth pouches with 7 ml of Fahraeus (three to four plants per pouch) prior to inoculation with *S. meliloti* or to small pots containing the same substrate prior to inoculation with *G. intraradices*.

Expression analysis of *PCgI2::GUS* in *CgCCaMK-RNAi* roots

Transgenic *C. glauca* plants carrying the early infection marker *PCgI2::GUS* were retransformed with the *A. rhizogenes* strain carrying either *CgCCaMK-RNAi-UTR* or *CgCCaMK-RNAi-CAM* constructs. Retransformation was performed by adapting the *ex-vitro* method described in Collier *et al.* (2005). Shoots (4-5 cm in length) were excised from plants grown in BD hydroponic nutrient solution (Svistoonoff *et al.*, 2010) and a fresh culture of *A. rhizogenes* was inoculated approximately one cm from the base of the segment using a needle

as described in Diouf *et al.*, (1995). Inoculated segments were transferred into a stone wool cube (Grodan Plugs, Grodan BV). Plants were then cultivated in a growth chamber under normal conditions (25°C, average 45% humidity, a 16-h photoperiod, 150 uE/m²) and watered with demineralized water for 4-6 weeks. Segments that produced transformed roots were screened by observing GFP fluorescence. Selected composite plants were transferred to the hydroponic system containing BD solution.

Histochemical analyses, microscopy and root length measurements

C. glauca roots and nodules were fixed and dehydrated as described in Svistoonoff *et al.* (2003) and Svistoonoff *et al.* (2010). *M. truncatula* nodules were fixed in a solution containing 50% EtOH, 4% formaldehyde and 5% acetic acid and dehydrated in 70% EtOH. Samples were embedded in Technovit 7100 resin (Heraeus Kulzer) as recommended by the manufacturer. Thin 6- μ m sections were cut with a microtome (Microm HM355S). Sections were colored with toluidine blue or ruthenium red (0.01%) and mounted in Clearium Mountant (Surgipath).

To monitor the spatio-temporal expression of *PCgCCaMK::GUS*, sampled roots and nodules were immersed overnight at 37 °C in a 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) containing 1 mM X-gluc, 0.5 mM K₃Fe(CN)₆ and K₄Fe(CN)₆, and 1% (vol/vol) Triton X-100 according to Jefferson *et al.* (1987). The stained material then was incubated for 1 h in a fixation solution (5% formaldehyde, 5% acetic acid, and 50% ethanol) washed several times in 70% ethanol and stored in 70% ethanol solution. In some cases, to improve penetration of the substrate X-gluc in whole nodules, samples were embedded in 3% agarose and sliced into 40- to 50- μ m thick sections using a vibratome (Leica VT1000E) prior to histochemical treatment. Part of the stained material was also embedded and sectioned as described. Embedded sections and GUS stained material were observed under a DMRB microscope (Leica) or a stereomicroscope MZFLIII (Leica) and images were acquired using a MP5 (Q-imaging) digital camera.

To visualize AM structures in *C. glauca* and *M. truncatula*, inoculated roots were cleared for 1-2 days in 10% KOH at 90°C, rinsed and stained for at least 1 h with a 0.05% trypan blue 5% acetic acid solution at 60°C and destained in water as described in Vierheilig *et al.* (1998). Observations were made under a DMRB microscope (Leica). Colonization was assessed by the gridline intersect method (Brundrett *et al.*, 1984) on at least 150 intersections per sample.

To score the number of root hairs expressing *PCgI2::GUS* in re-transformed plants, lateral

root segments were excised and assayed for GUS activity. For each sample, root hairs showing strong blue staining were scored under a MZFLII stereomicroscope (Leica). Roots were placed in 12-cm square Petri dishes containing 10% agar, and overlapping roots were manually separated. Images (300 dpi) were obtained with a V350 photo scanner (EPSON) and root length measurements were performed with EZ-Rhizo software (Armengaud *et al.*, 2009).

Acetylene reduction assay (ARA)

Nitrogenase activity was determined by the acetylene reduction assay on composite plants carrying the *CgCCaMK* gene, the *MtCCaMK* gene for the positive control, or the empty vector pCAMBIA2202 for the negative control. For each construct, four test tubes containing two composite plants were tested for ARA according to Meilhoc *et al.* (2010). The amount of ethylene produced in each tube was assessed by measuring the height of the peak on the chromatogram, and expressed in arbitrary units.

Alignment and phylogenetic analyses

Amino acid sequences were aligned using the ClustalW algorithm in CLC Sequence Viewer (<http://www.clcbio.com/>) software. The phylogenetic tree was constructed using the neighbor-joining algorithm in CLC Sequence Viewer software with bootstrap values from 1000 replicates. The tree was visualized using CLC Sequence Viewer software.

Accession numbers. Gene sequences were deposited in the GenBank/EMBL databases under the following accession numbers *C. glauca* genomic fragment (XXX) and cDNA (XXX).

ACKNOWLEDGMENTS

We wish to acknowledge the contributions of Jocelyne Bonneau, Daniel Moukouanga and Joan Estevan for production of transgenic plants. We thank Florence Auguy for assistance with Southern blot. Financial support was provided by IRD, Agence Nationale de la Recherche Projects NewNod and SESAM (AN-06-BLAN-0095 and 2010 BLAN 1708 01).

F.M.B. was funded by the European Union (Averroes program). M.N.V. was funded by the Department of Biotechnology, Ministry of Science and Technology, Government of India.

C.Z. was supported by a DSF (Département Soutien et Formation) fellowship from IRD.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Figure S1. *C. glauca* *CCaMK* gene.

Figure S2. *CgCCaMK* mRNA levels in *C. glauca* roots and nodules determined by qPCR.

Figure S3. Nodulation kinetics of composite plants.

Figure S4. Quantification of *CgCCaMK* mRNA levels in RNAi plants determined by real-time qPCR.

Table S1. Reduced nodulation in RNAi plants.

Table S2. Reduced mycorrhization in RNAi plants.

REFERENCES

- Ané, J., Kiss, G.B., Riely, B.K., Penmetza, R.V., Oldroyd, G.E.D., Ayax, C., Lévy, J., Debellé, F., Baek, J., Kalo, P., Rosenberg, C., Roe, B.A., Long, S.R., Dénarié, J. and Cook, D.R. (2004) *Medicago truncatula DM11* required for bacterial and fungal symbioses in legumes. *Science*, **303**, 1364-1367.
- Armengaud, P., Zambaux, K., Hills, A., Sulpice, R., Pattison, R. J., Blatt, M.R. and Amtmann, A. (2009) EZ-Rhizo: integrated software for the fast and accurate measurement of root system architecture. *Plant J.* **57**, 945-956.
- Arrighi, J., Barre, A., Ben Amor, B., Bersoult, A., Soriano, L.C., Mirabella, R., de Carvalho-Niebel, F., Journet, E., Ghéardi, M., Huguet, T., Geurts, R., Dénarié, J., Rougé, P. and Gough, C. (2006) The *Medicago truncatula* lysin motif-receptor-like kinase gene family includes NFP and new nodule-expressed genes. *Plant Physiol.* **142**, 265-279.
- Ben Amor, B.B., Shaw, S.L., Oldroyd, G.E.D., Maillet, F., Penmetza, R.V., Cook, D., Long, S.R., Dénarié, J. and Gough, C. (2003) The NFP locus of *Medicago truncatula* controls an early step of Nod factor signal transduction upstream of a rapid calcium flux and root hair deformation. *Plant J.* **34**, 495-506.
- Bersoult, A., Camut, S., Perhald, A., Kereszt, A., Kiss, G.B. and Cullimore, J.V. (2005) Expression of the *Medicago truncatula DM12* gene suggests roles of the symbiotic nodulation receptor kinase in nodules and during early nodule development. *Mol. Plant Microbe Interact.* **18**, 869-876.
- Boisson-Dernier, A., Chabaud, M., Garcia, F., Bécard, G., Rosenberg, C. and Barker, D.G. (2001) *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Medicago truncatula* for the study of nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations. *Mol. Plant Microbe Interact.* **14**, 695-700.
- Brundrett, M.C., Piché, Y. and Peterson, R.L. (1984) A new method for observing the morphology of vesicular-arbuscular mycorrhizae. *Can. J. Bot.* **62**, 2128-2134.
- Callaham, D. and Torrey, J.G. (1977) Prenodule formation and primary nodule development in roots of *Comptonia* (*Myricaceae*). *Can. J. Bot.* **55**, 2306-2318.
- Capoen, W., Den Herder, J., Sun, J., Verplancke, C., De Keyser, A., De Rycke, R., Goormachtig, S., Oldroyd, G. and Holsters, M. (2009) Calcium spiking patterns and the role of the calcium/calmodulin-dependent kinase CCaMK in lateral root base nodulation of *Sesbania rostrata*. *Plant Cell*, **21**, 1526-1540.

- Catoira, R., Galera, C., de Billy, F., Penmetsa, R. V., Journet, E., Maillet, F., Rosenberg, C., Cook, D., Gough, C. and Dénarié, J.** (2000) Four Genes of *Medicago truncatula* controlling components of a Nod factor transduction pathway. *Plant Cell*, **12**, 1647-1666.
- Chen, C., Gao, M., Liu, J. and Zhu, H.** (2007) Fungal symbiosis in rice requires an ortholog of a legume common symbiosis gene encoding a Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase. *Plant Physiol.* **145**, 1619-1628.
- Collier, R., Fuchs, B., Walter, N., Lutke, W.K. and Taylor, C.G.** (2005) *Ex vitro* composite plants: an inexpensive, rapid method for root biology. *Plant J.* **43**, 449-457.
- Curtis, M.D. and Grossniklaus, U.** (2003) A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes *in planta*. *Plant Physiol.* **133**, 462-469.
- D'Haese, W. and Holsters, M.** (2002) Nod factor structures, responses, and perception during initiation of nodule development. *Glycobiology*, **12**, 79R-105R.
- Diouf, D., Gherbi, H., Prin, Y., Franche, C., Duhoux, E. and Bogusz, D.** (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.
- Doyle, J.J.** (1998) Phylogenetic perspectives on nodulation: evolving views of plants and symbiotic bacteria. *Trends Plant Sci.* **3**, 473-478.
- Franche, C., Diouf, D., Le, Q.V., Bogusz, D., N'Diaye, A., Gherbi, H., Gobé, G. and Duhoux, E.** (1997) Genetic transformation of the actinorhizal tree *Allocauarina verticillata* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant J.* **11**, 897-904.
- Gherbi, H., Markmann, K., Svistoonoff, S., Estevan, J., Autran, D., Giczey, G., Auguy, F., Péret, B., Laplaze, L., Franche, C., Parniske, M. and Bogusz, D.** (2008a) *SymRK* defines a common genetic basis for plant root endosymbioses with arbuscular mycorrhiza fungi, rhizobia, and *Frankia* bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 4928-4932.
- Gherbi, H., Nambiar-Veetil, M., Zhong, C., Félix, J., Autran, D., Girardin, R., Vaissayre, V., Auguy, F., Bogusz, D. and Franche, C.** (2008b) Post-transcriptional gene silencing in the root system of the actinorhizal tree *Allocauarina verticillata*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **21**, 518-524.
- Gleason, C., Chaudhuri, S., Yang, T., Muñoz, A., Poovaiah, B.W. and Oldroyd, G.E.D.** (2006) Nodulation independent of rhizobia induced by a calcium-activated kinase lacking autoinhibition. *Nature*, **441**, 1149-1152.
- Godfroy, O.** (2008) Etudes génétique et moléculaire de deux gènes de *Medicago truncatula*, DMI3 et RPG, contrôlant l'établissement de symbioses racinaires. *PhD thesis*. Toulouse III University, Toulouse, France.

- Godfroy, O., Debellé, F., Timmers, T. and Rosenberg, C.** (2006) A rice calcium- and calmodulin-dependent protein kinase restores nodulation to a legume mutant. *Mol. Plant Microbe Interact.* **19**, 495-501.
- Gonzalez-Rizzo, S., Crespi, M. and Frugier, F.** (2006) The *Medicago truncatula* CRE1 cytokinin receptor regulates lateral root development and early symbiotic interaction with *Sinorhizobium meliloti*. *Plant Cell*, **18**, 2680-2693.
- Hayashi, T., Banba, M., Shimoda, Y., Kouchi, H., Hayashi, M. and Imaizumi-Anraku, H.** (2010) A dominant function of CCaMK in intracellular accommodation of bacterial and fungal endosymbionts. *Plant J.* **63**, 141-154.
- Heckmann, A.B., Lombardo, F., Miwa, H., Perry, J.A., Bunnell, S., Parniske, M., Wang, T.L. and Downie, J.A.** (2006) *Lotus japonicus* nodulation requires two GRAS domain regulators, one of which is functionally conserved in a non-legume. *Plant Physiol.* **142**, 1739-1750.
- Helliwell, C. and Waterhouse, P.** (2003) Constructs and methods for high-throughput gene silencing in plants. *Methods* **30**, 289-295.
- Hoher, V., Alloisio, N., Auguy, F., Fournier, P., Dumas, P., Pujic, P., Gherbi, H., Queiroux, C., Da Silva, C., Wincker, P., Normand, P. and Bogusz, D.** (2011) Transcriptomics of actinorhizal symbioses reveals homologs of the whole common symbiotic signalling cascade. *Plant Physiol.* **156**, 700-11.
- Hoher, V., Auguy, F., Argout, X., Laplaze, L., Franche, C. and Bogusz, D.** (2006) Expressed sequence-tag analysis in *Casuarina glauca* actinorhizal nodule and root. *New Phytol.* **169**, 681-688.
- Imaizumi-Anraku, H., Takeda, N., Charpentier, M., Perry, J., Miwa, H., Umehara, Y., Kouchi, H., Murakami, Y., Mulder, L., Vickers, K., Pike, J., Downie, J.A., Wang, T., Sato, S., Asamizu, E., Tabata, S., Yoshikawa, M., Murooka, Y., Wu, G.J., Kawaguchi, M., Kawasaki, S., Parniske, M. and Hayashi, M.** (2005) Plastid proteins crucial for symbiotic fungal and bacterial entry into plant roots. *Nature*, **433**, 527-531.
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A. and Bevan, M.W.** (1987) GUS fusion: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* **6**, 3901-3907.
- Jouanin, L., Tourneur, J., Tourneur, C. and Casse-Delbart, F.** (1986) Restriction maps and homologies of the three plasmids of *Agrobacterium rhizogenes* strain A4. *Plasmid* **16**, 124-134.
- Kaló, P., Gleason, C., Edwards, A., Marsh, J., Mitra, R.M., Hirsch, S., Jakab, J., Sims, S., Long, S.R., Rogers, J., Kiss, G.B., Downie, J.A. and Oldroyd, G.E.D.** (2005)

Nodulation signaling in legumes requires NSP2, a member of the GRAS family of transcriptional regulators. *Science*, **308**, 1786-1789.

- Kanamori, N., Madsen, L.H., Radutoiu, S., Frantescu, M., Quistgaard, E.M.H., Miwa, H., Downie, J.A., James, E.K., Felle, H.H., Haaning, L.L., Jensen, T.H., Sato, S. Nakamura, Y., Tabata, S., Sandal, N. and Stougaard, J.** (2006) A nucleoporin is required for induction of Ca²⁺ spiking in legume nodule development and essential for rhizobial and fungal symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 359-364.
- Kistner, C. and Parniske, M.** (2002) Evolution of signal transduction in intracellular symbiosis. *Trends Plant Sci.* **7**, 511-518.
- Kosuta, S., Hazledine, S., Sun, J., Miwa, H., Morris, R.J., Downie, J.A. and Oldroyd, G.E.D.** (2008) Differential and chaotic calcium signatures in the symbiosis signaling pathway of legumes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 9823-9828.
- Kouchi, H., Imaizumi-Anraku, H., Hayashi, M., Hakoyama, T., Nakagawa, T., Umehara, Y., Suganuma, N. and Kawaguchi, M.** (2010) How many peas in a pod? Legume genes responsible for mutualistic symbioses underground. *Plant Cell Physiol.* **51**, 1381-1397.
- Kumagai, H. and Kouchi, H.** (2003) Gene silencing by expression of hairpin RNA in *Lotus japonicus* roots and root nodules. *Mol. Plant Microbe Interact.* **16**, 663-668.
- Lerouge, P., Roche, P., Faucher, C., Maillet, F., Truchet, G., Promé, J.C. and Dénarié, J.** (1990) Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature*, **344**, 781-784.
- Lévy, J., Bres, C., Geurts, R., Chalhoub, B., Kulikova, O., Duc, G., Journet, E., Ané, J., Lauber, E., Bisseling, T., Dénarié, J., Rosenberg, C. and Debelle, F.** (2004) A putative Ca²⁺ and calmodulin-dependent protein kinase required for bacterial and fungal symbioses. *Science*, **303**, 1361-1364.
- Limpens, E., Franken, C., Smit, P., Willemse, J., Bisseling, T. and Geurts, R.** (2003) LysM domain receptor kinases regulating rhizobial Nod factor-induced infection. *Science*, **302**, 630-633.
- Limpens, E., Mirabella, R., Fedorova, E., Franken, C., Franssen, H., Bisseling, T. and Geurts, R.** (2005) Formation of organelle-like N₂-fixing symbiosomes in legume root nodules is controlled by *DMI2*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 10375-10380.
- Madsen, E.B., Madsen, L.H., Radutoiu, S., Olbryt, M., Rakwalska, M., Szczyglowski, K., Sato, S., Kaneko, T., Tabata, S., Sandal, N. and Stougaard, J.** (2003) A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals.

Nature, **425**, 637-640.

- Madsen, L.H., Tirichine, L., Jurkiewicz, A., Sullivan, J.T., Heckmann, A.B., Bek, A.S., Ronson, C.W., James, E.K. and Stougaard, J.** (2010) The molecular network governing nodule organogenesis and infection in the model legume *Lotus japonicus*. *Nat. Commun.* **1**, 1-12.
- Markmann, K., Giczey, G. and Parniske, M.** (2008) Functional Adaptation of a Plant Receptor- Kinase Paved the Way for the Evolution of Intracellular Root Symbioses with Bacteria. *PLoS Biol.* **6**, e68.
- Meilhoc, E., Cam, Y., Skapski, A. and Bruand, C.** (2010) The response to nitric oxide of the nitrogen-fixing symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **6**,748-759.
- Messinese, E., Mun, J., Yeun, L.H., Jayaraman, D., Rougé, P., Barre, A., Lougnon, G., Schornack, S., Bono, J., Cook, D.R. and Ané, J.M.** (2007) A novel nuclear protein interacts with the symbiotic DMI3 calcium- and calmodulin-dependent protein kinase of *Medicago truncatula*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **20**, 912-921.
- Middleton, P.H., Jakab, J., Penmetsa, R.V., Starker, C.G., Doll, J., Kaló, P., Prabhu, R., Marsh, J.F., Mitra, R.M., Kereszt, A., Dudas, B., VandenBosch, K., Long, S.R., Cook, D.R., Kiss, G.B. and Oldroyd, G.E.D.** (2007) An ERF transcription factor in *Medicago truncatula* that is essential for Nod factor signal transduction. *Plant Cell*, **19**, 1221-1234.
- Mitra, R.M., Gleason, C.A., Edwards, A., Hadfield, J., Downie, J.A., Oldroyd, G.E.D. and Long, S.R.** (2004) A Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase required for symbiotic nodule development: Gene identification by transcript-based cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 4701-4705.
- Murray, J.D., Karas, B.J., Sato, S., Tabata, S., Amyot, L. and Szczyglowski, K.** (2007) A cytokinin perception mutant colonized by Rhizobium in the absence of nodule organogenesis. *Science*, **315**, 101-104.
- Normand, P., Lapierre, P., Tisa, L.S., Gogarten, J.P., Alloisio, N., Bagnarol, E., Bassi, C.A., Berry, A.M., Bickhart, D.M., Choisne, N., Couloux, A., Cournoyer, B., Cruveiller, S., Daubin, V., Demange, N., Francino, M.P., Goltsman, E., Huang, Y., Kopp, O.R., Labarre, L., Lapidus, A., Lavire, C., Marechal, J., Martinez, M., Mastronunzio, J.E., Mullin, B.C., Niemann, J., Pujic, P., Rawnsley, T., Rouy, Z., Schenowitz C, Sellstedt A, Tavares F, Tomkins JP, Vallenet D, Valverde, C., Wall, L.G., Wang, Y., Medigue, C. and Benson, D.R.** (2007) Genome characteristics of

- facultatively symbiotic *Frankia* sp. strains reflect host range and host plant biogeography. *Genome Res.* **17**, 7-15.
- Oldroyd, G.E.D. and Downie, J.A.** (2008) Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu. Rev. Plant Biol.* **59**, 519-46.
- Oldroyd, G.E.D. and Downie, J.A.** (2006) Nuclear calcium changes at the core of symbiosis signalling. *Curr. Opin. Plant Biol.* **9**, 351-357.
- Radutoiu, S., Madsen, L.H., Madsen, E.B., Felle, H.H., Umehara, Y., Grønlund, M., Sato, S., Nakamura, Y., Tabata, S., Sandal, N. and Stougaard J.** (2003) Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature*, **425**, 585-592.
- Riely, B.K., Mun, J. and Ané, J.** (2006) Unravelling the molecular basis for symbiotic signal transduction in legumes. *Mol. Plant Pathol.* **7**, 197-207.
- Sagan, M., Morandi, D., Tarengi, E. and Duc, G.** (1995) Selection of nodulation and mycorrhizal mutants in the model plant *Medicago truncatula* (Gaertn.) after [gamma]-ray mutagenesis. *Plant Sci.* **111**, 63-71.
- Saito, K., Yoshikawa, M., Yano, K., Miwa, H., Uchida, H., Asamizu, E., Sato, S., Tabata, S., Imaizumi-Anraku, H., Umehara, Y., Kouchi, H., Murooka, Y., Szczyglowski, K., Downie, J.A., Parniske, M., Hayashi, M. and Kawaguchi, M.** (2007) NUCLEOPORIN85 is required for calcium spiking, fungal and bacterial symbioses, and seed production in *Lotus japonicus*. *Plant Cell*, **19**, 610-624.
- Santi, C., von Groll, U., Ribeiro, A., Chiurazzi, M., Auguy, F., Bogusz, D., Franche, C., and Pawlowski, K.** (2003) Comparison of nodule induction in legume and actinorhizal symbioses: the induction of actinorhizal nodules does not involve *ENOD40*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **9**, 808-816.
- Schauser, L., Roussis, A., Stiller, J. and Stougaard, J.** (1999) A plant regulator controlling development of symbiotic root nodules. *Nature*, **402**, 191-195.
- Smit, P., Raedts, J., Portyanko, V., Debellé, F., Gough, C., Bisseling, T. and Geurts, R.** (2005) NSP1 of the GRAS protein family is essential for rhizobial Nod factor-induced transcription. *Science*, **308**, 1789-1791.
- St-Arnaud, M., Hamel, C., Vimard, B., Caron, M. and Fortin, J.A.** (1996) Enhanced hyphal growth and spore production of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in an *in vitro* system in the absence of host roots. *Mycol. Res.* **100**, 328-332.
- Stracke, S., Kistner, C., Yoshida, S., Mulder, L., Sato, S., Kaneko, T., Tabata, S., Sandal, N., Stougaard, J., Szczyglowski, K. and Parniske, M.** (2002) A plant receptor-like

- kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. *Nature*, **417**, 959-962.
- Svistoonoff, S., Laplaze, L., Auguy, F., Runions, J., Duponnois, R., Haseloff, J., Franche, C. and Bogusz, D.** (2003) *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.* **16**, 600–607.
- Svistoonoff, S., Sy, M.O., Diagne, N., Barker, D.G., Bogusz, D. and Franche, C.** (2010) Infection-specific activation of the *Medicago truncatula* *Enod11* early nodulin gene promoter during actinorhizal root nodulation. *Mol Plant Microbe Interact.* **23**,740-7.
- Tirichine, L., Imaizumi-Anraku, H., Yoshida, S., Murakami, Y., Madsen, L.H., Miwa, H., Nakagawa, T., Sandal, N., Albrektsen, A. S., Kawaguchi, M., Downie, A., Sato, S., Tabata, S., Kouchi, H., Parniske, M., Kawasaki, S. and Stougaard, J.** (2006) Deregulation of a Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase leads to spontaneous nodule development. *Nature*, **441**, 1153-1156.
- Tirichine, L., Sandal, N., Madsen, L.H., Radutoiu, S., Albrektsen, A.S., Sato, S., Asamizu, E., Tabata, S. and Stougaard, J.** (2007) A gain-of-function mutation in a cytokinin receptor triggers spontaneous root nodule organogenesis. *Science*, **315**, 104-107.
- Vernié, T., Moreau, S., de Billy, F., Plet, J., Combier, J., Rogers, C., Oldroyd, G., Frugier, F., Niebel, A. and Gamas, P.** (2008) EFD is an ERF transcription factor involved in the control of nodule number and differentiation in *Medicago truncatula*. *Plant Cell*, **20**, 2696-2713.
- Vierheilig, H., Coughlan, A.P., Wyss, U. and Piché, Y.** (1998) Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 5004-5007.
- Yano, K., Yoshida, S., Müller, J., Singh, S., Banba, M., Vickers, K., Markmann, K., White, C., Schuller, B., Sato, S., Asamizu, E., Tabata, S., Murooka, Y., Perry, J., Wang, T.L., Kawaguchi, M., Imaizumi-Anraku, H., Hayashi, M. and Parniske M.** (2008) CYCLOPS, a mediator of symbiotic intracellular accommodation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 20540-20545.

Figure legends

Figure 1. Histochemical localization of β -glucuronidase (GUS) activity in *C. glauca* roots and nodules expressing the *PCgCCaMK::GUS* construct.

- (a) Non-inoculated root showing GUS activity in the vascular system and root cap.
 - (b) Major increase in GUS activity throughout the root system two days after inoculation with *Frankia*.
 - (c) Root hair curling one week post inoculation. Strong GUS staining can be observed in roots and root hairs.
 - (d) Root hair infection 10-15 days post inoculation. Only a few curled root hairs show GUS activity.
 - (e, f, g) Prenodule formation two weeks post inoculation. GUS expression is very patchy at the point of emergence of the prenodule. Detail of longitudinal section (6 μ m) of prenodule (e). Hypertrophied cortical cells exhibit high GUS activity.
 - (h, i, j) *PCgCCaMK::GUS* expression in mature nodules. Thick section (50 μ m) of a nodule lobe showing intense GUS activity in cortical cells in the fixation and infection zones and in the vascular system (h). Semi-thin pseudo-longitudinal section (6 μ m) of a nodule lobe stained with ruthenium red (i). Infected cells are in red. GUS activity was mainly detected in uninfected cortical cells in the fixation and infection zones and in the vascular system. The same section under UV light to show the blue autofluorescence of the lignified cell walls of the periderm, vascular system, and infected cells in the fixation zone (j). *GUS* expression was mainly observed in non-lignified cells.
- PN, prenodule, VS, vascular system, M, apical meristem (zone I), IZ, infection zone (zone II), FZ, fixation zone (zone III).
- Scale bars: (a, b, d, e) 50 μ m; (c, f, g, h, i, j) 100 μ m.

Figure 2. Knockdown phenotype of *CgCCaMK* after *Frankia* inoculation.

- (a-l) Longitudinal sections (6 μ m) of nodules lobes stained with toluidine blue.
 - (a, d, g, j) Non-transgenic nodule.
 - (b, e, h, k). Transgenic control nodule.
 - (c, f, i, l) *CgCCaMK-RNAi-CAM* nodule formed 10 weeks post inoculation.
- Nodules in *CgCCaMK-RNAi* plants were often smaller than in controls (c). The area between the meristem and the infection zone appears to be wider in RNAi nodules indicating

disruption of the infection process (red arrows) (f, i).

(j, k, l) Magnification of the fixation zone showing the presence of *Frankia* bacteria in cortical cells.

FZ, fixation zone, IC, infected cells, IZ, infection zone, M, meristem, VS, vascular system.

Scale bars: 100 μ m.

Figure 3. Complementation of *M. truncatula dmi3* (TRV25) mutant with the *CgCCaMK* coding sequence under the control of the *MtDMI3* promoter.

(a-d) Nodulation of *Mtdmi3* mutant. Semi-thin section nodules lobes (6 μ m).

(a, c) *Mtdmi3* mutant transformed with *MtDMI3* control construct.

(b, d) *Mtdmi3* mutant transformed with *CgCCaMK* construct. Nodule sections (6 μ m) were stained with toluidine blue. Infected cells and infection threads (arrows) are visible.

(e-h) Mycorrhization of the *Mtdmi3* mutant.

(e, g) Cleared roots of the *Mtdmi3* mutant transformed with *MtDMI3* control construct.

(f, h) Cleared roots of the *Mtdmi3* mutant transformed with. Fungal hyphae grew through the epidermis and exodermis and formed arbuscules and vesicles in the inner root cortex. Roots were stained with trypan blue.

IC, infected cells, IT, infection thread, IZ, infection zone, A, arbuscule, IH, intraradical hyphae, V, vesicle.

Scale bars: (a, b) 500 μ m, (c-h) 50 μ m.

Figure 1

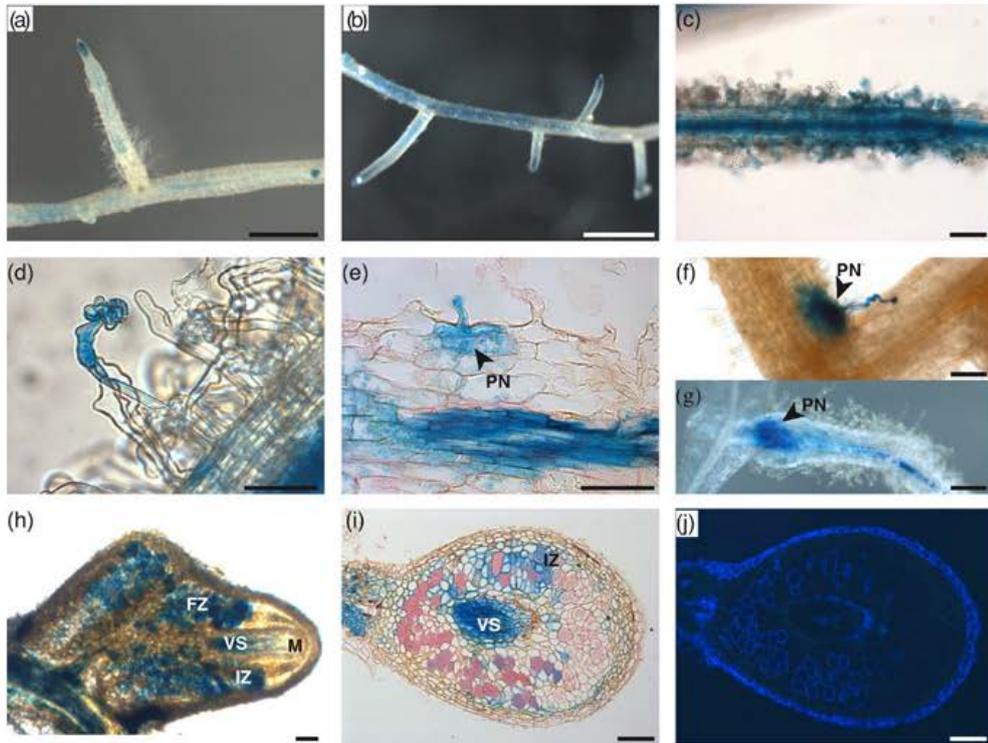


Figure 2

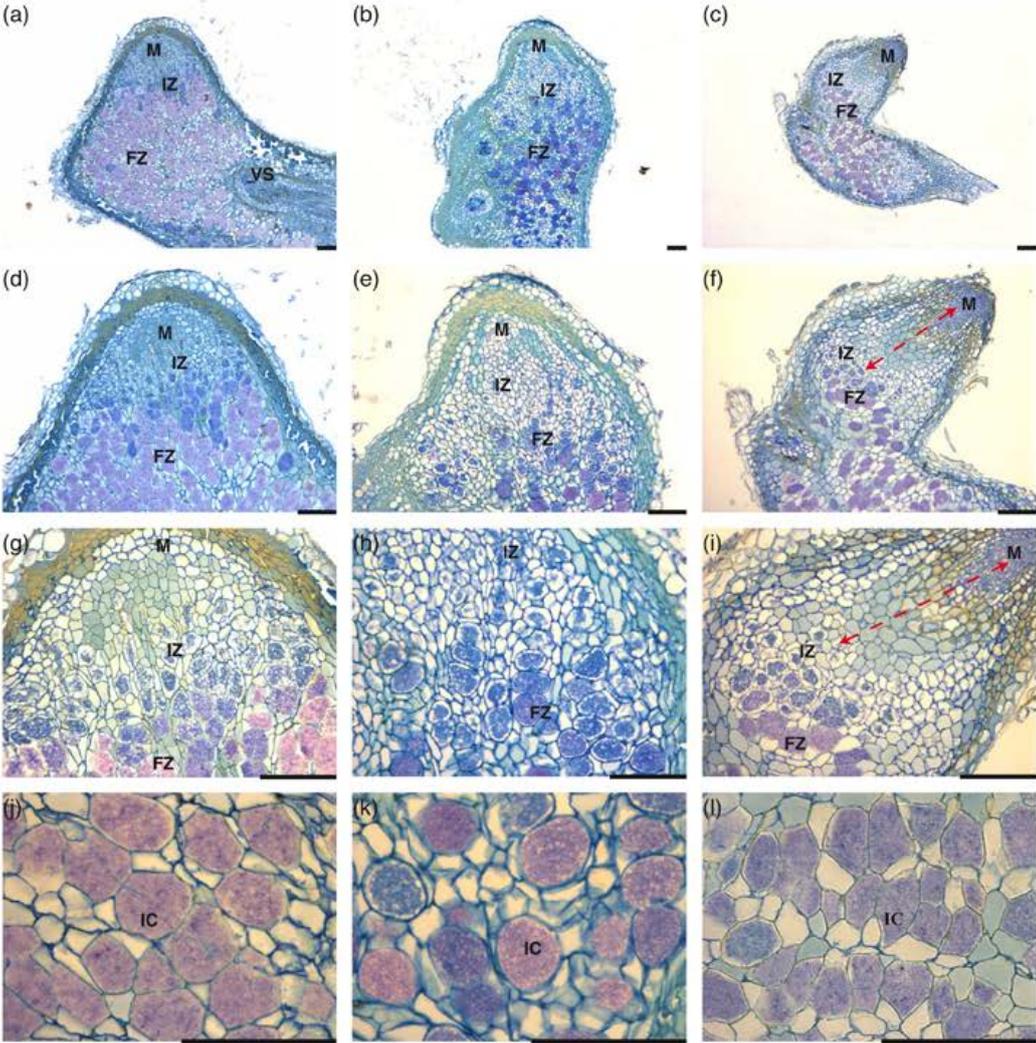
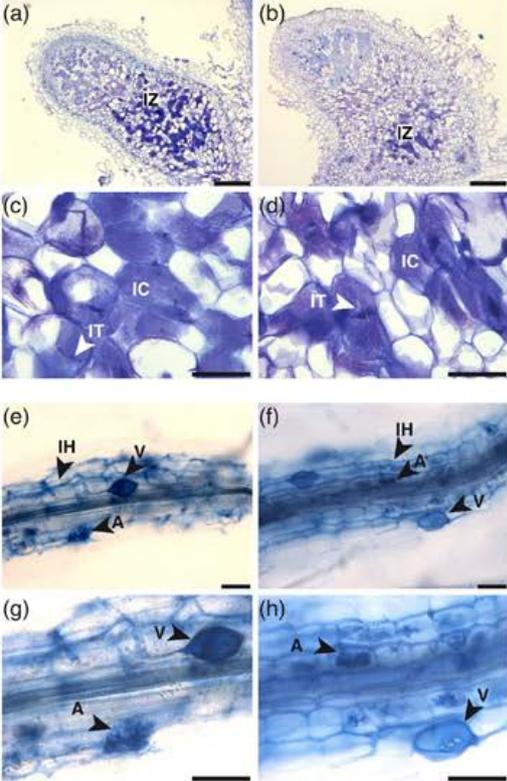


Figure 3



SUPPORTING INFORMATION

Figure S1. *C. glauca* CCaMK gene.

(a) Amino acid sequence alignment of CgCCaMK, *M. truncatula* DMI3 and *L. japonicus* CCaMK. Identity and similarity are shaded. The different protein domains are indicated by boxes: kinase domain (gray), calmodulin-binding domain (black), EF-hands (empty). The autophosphorylation site is indicated by an asterisk. Alignment was done using the ClustalW algorithm in CLC Sequence Viewer (<http://www.clcbio.com/>) software.

(b) Distance tree of predicted CCaMK protein sequences based on a ClustalW alignment. Numbers above the branches show the percentage of 1000 bootstrap replications. *A. thaliana* CPK1 was chosen to root the tree. The phylogenetic tree was built using the neighbor-joining algorithm in CLC Sequence Viewer (<http://www.clcbio.com/>) software. Accession numbers from the GenBank/EMBL databases: *Arabidopsis thaliana* 1 CPK1 (gi: 15238353), *A. thaliana* 2 putative CPDK (gi: 15292915), *Arachis hypogaea* CCaMK (gi: 195542475), *Lilium Longiflorum* CCaMK (gi: 71152362), *Lotus japonicus* CCaMK (gi: 116634228), *Medicago sativa* CCaMK (gi: 260619579), *Medicago truncatula* DMI3 (gi: 71152363), *Nicotiana tabacum* CCaMK (gi: 5814023), *Oryza sativa* CCaMK (gi: 115464591), *Petunia hybrida* CCaMK (gi: 148607974), *Pisum sativum* CCaMK (gi: 71152364), *Populus trichocarpa* predicted protein (gi: 224110060), *Ricinus communis* CPDK (gi: 255542283), *Sesbania rostrata* CCaMK (gi: 186909461), *Solanum tuberosum* CPDK (gi: 15289760), *Sorghum bicolor* hypothetical protein (gi: 242094178), *Vitis vinifera* hypothetical protein (gi: 225465367), *Zea mays* CCaMK (gi: 162459834).

Figure S2. *CgCCaMK* mRNA levels in *C. glauca* roots and nodules determined by qPCR.

(a) *CgCCaMK* expression in roots and mature nodules (gray bar).

(b) Expression kinetics upon *Frankia* infection. Expression levels are relative to non-inoculated roots. *CgUbi* was used as reference gene. T0: non-inoculated roots. Error bars represent standard errors of the mean of three technical replicates.

Figure S3. Nodulation kinetics of composite plants.

The mean number of nodules per nodulated plant was calculated for transgenic controls (TC),

CgCCaMK-RNAi-CAM and *CgCCaMK-RNAi-UTR* at T0 and weekly from 4 to 12 weeks post inoculation.

Figure S4. Quantification of *CgCCaMK* mRNA levels in RNAi plants determined by real-time qPCR.

Quantification was performed on 5 independent *CgCCaMK-RNAi-CAM* and 5 *CgCCaMK-RNAi-UTR* plants. *CgUbi* was used as reference. The average of two independent non-transgenic control roots and three transgenic control roots is shown. Expression levels are relative to transgenic control roots. All error bars indicate standard errors of the mean of 3 technical replicates in different samples. NTC: non-transgenic control roots, TC: transgenic control roots.

Table S1. Reduced nodulation in RNAi plants. The mean number of nodules per nodulated plant was calculated at 6, 9 and 12 weeks post inoculation (WPI). Standard errors are in brackets.

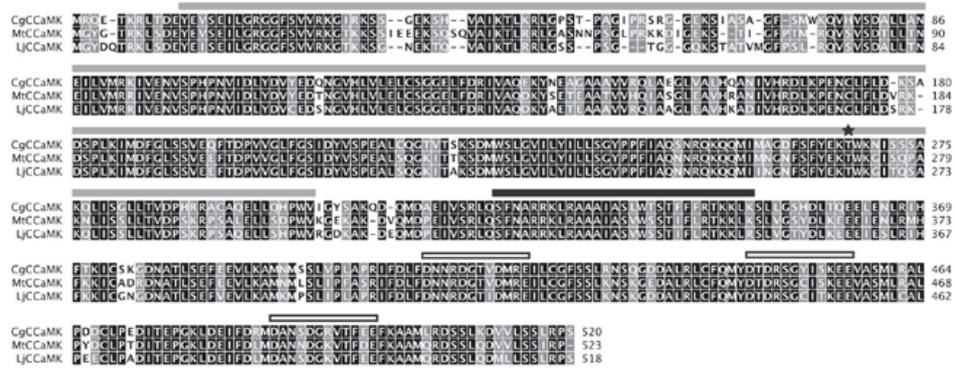
	Mean number of nodules/nodulated plants			> 7 nodules/nodulated plant
	6 WPI	9 WPI	12 WPI	12 WPI
<i>TC</i>	6,00 (± 1.78)	10.09 (± 2.48)	14.80 (±2.85)	73.33%
<i>CgCCaMK-RNAi-CAM</i>	4.0 (± 1.02)	7.50 (± 2.15)	11.11 (± 2. 52)	47.06%
<i>CgCCaMK-RNAi-UTR</i>	2.33 (± 0.67)	5.13 (± 1.67)	6.57 (± 1.88)	28.,57%

Table S2. Reduced mycorrhization in RNAi plants. Mycorrhization frequency corresponds to the percentage of mycorrhized roots in 10 NTC (Non Transgenic Control) plants, 10 TC (Transgenic Control) plants, 20 *CgCCaMK-RNAi-CAM* plants and 15 *CgCCaMK-RNAi-UTR* plants. Mycorrhization frequency was calculated on roots harvested 9 weeks post inoculation. Standard errors are in brackets.

	Number of plants	Mycorrhization frequency (%)
<i>NTC</i>	10	42.23 (± 6.93)
<i>TC</i>	10	41.01 (± 8.49)
<i>CgCCaMK-RNAi-CAM</i>	20	8.09 (± 2.14)
<i>CgCCaMK-RNAi-UTR</i>	15	5.03 (± 1.39)

Figure S1

(a)



(b)

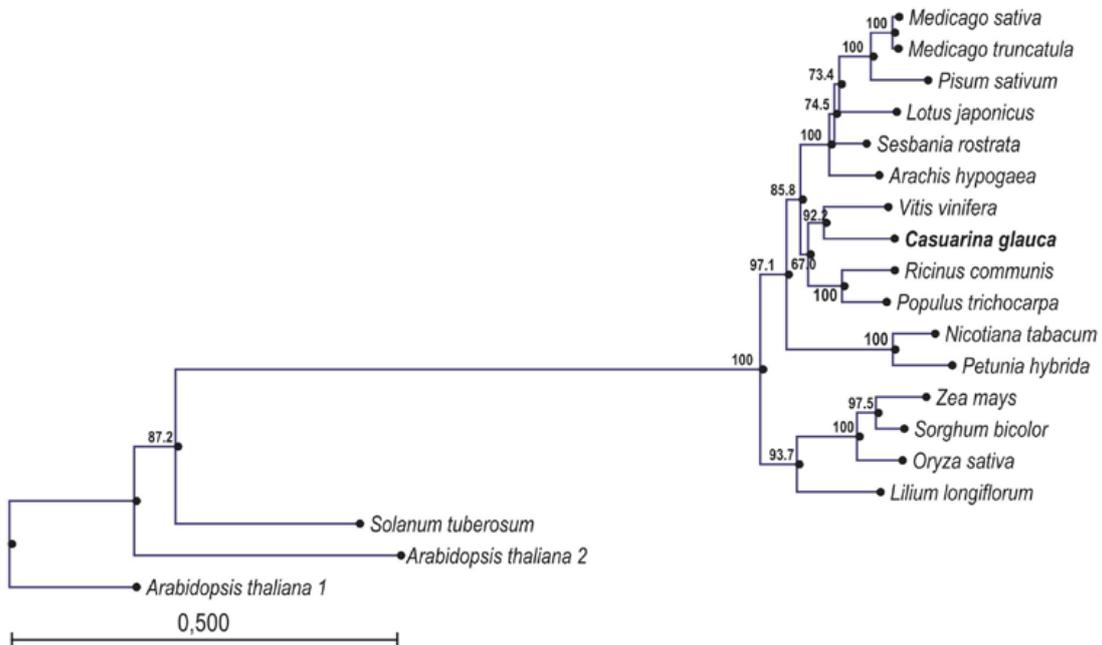


Figure S2

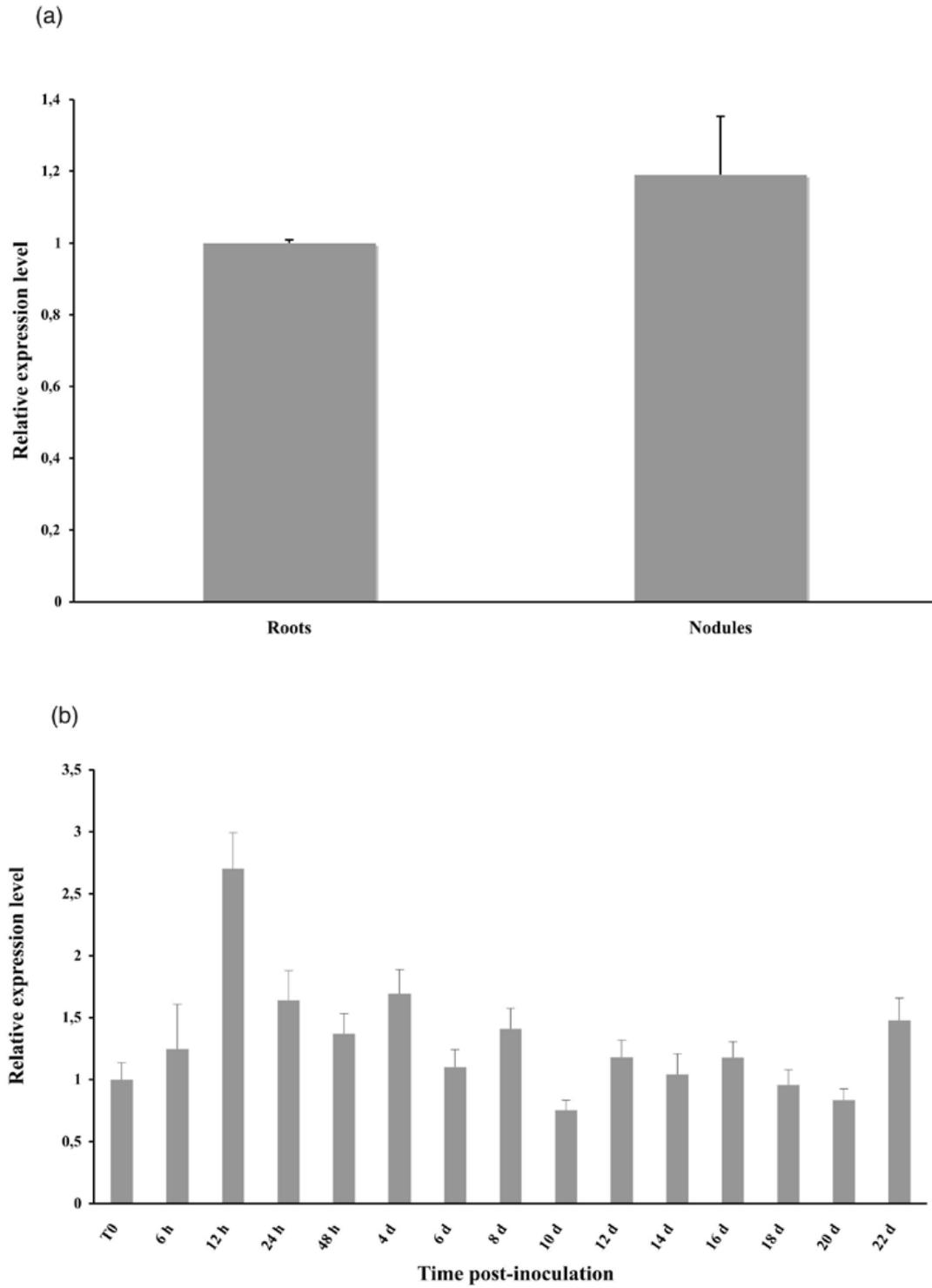


Figure S3

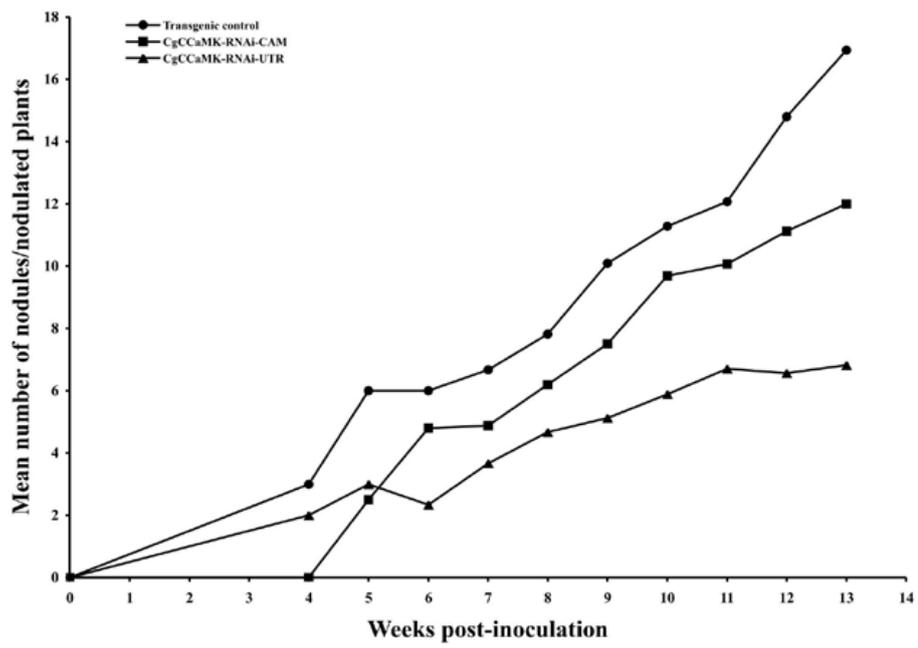
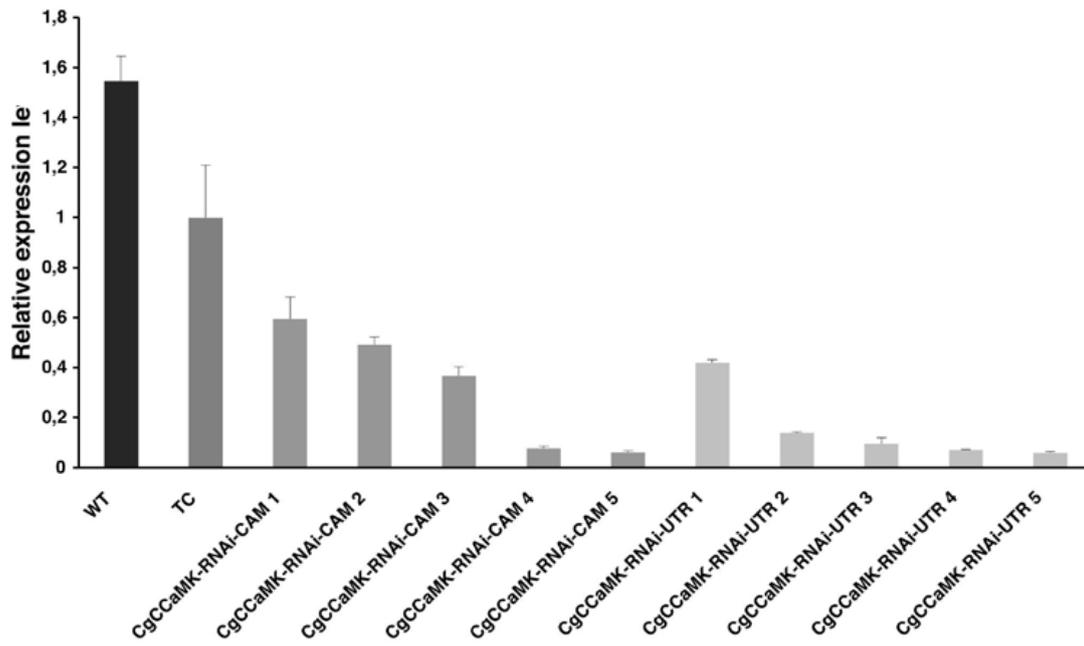


Figure S4



Chapitre II :
Étude de la régulation du gène
CCaMK* chez *Casuarina glauca

I. Introduction

1. Rôle du domaine autoinhibiteur (CAM) du gène *CCaMK*

Comme nous l'avons vu précédemment, la protéine CCaMK possède la particularité d'être autorégulée par certains de ses domaines. Le domaine autoinhibiteur qui est chevauchant avec le domaine de liaison à la calmoduline (CAM), est un régulateur majeur de l'activité protéique. En absence de calcium, il maintient la protéine dans un état inactif. La présence d'ions calcium va lever l'autoinhibition grâce notamment à la liaison de la calmoduline au domaine CAM (voir **Figure 34** pour le mode de fonctionnement de la protéine CCaMK) (Patil *et al.*, 1995 ; Ramachandiran *et al.*, 1997 ; Shimoda *et al.*, 2012).

Des expériences récentes ont montré que les protéines CCaMK de *Medicago truncatula*, ou de *Lotus japonicus* dépourvues de leur domaine autoinhibiteur/CAM recouvrent *in vitro* leur activité kinase en présence de substrat protéique (Gleason *et al.*, 2006 ; Shimoda *et al.*, 2012). Par ailleurs, l'analyse de certains mutants CCaMK ou l'expression de formes mutantes de CCaMK chez les Légumineuses induit une nodulation spontanée (Gleason *et al.*, 2006 ; Tirichine *et al.*, 2006a ; Hayashi *et al.*, 2010 ; Shimoda *et al.*, 2012). Cette induction de nodules a lieu soit lorsque le site d'autophosphorylation, résidu thréonine situé dans le domaine kinase, présente une mutation ponctuelle, soit lorsque la mutation engendre une forme tronquée dépourvue du domaine autoinhibiteur/CAM.

L'ontogenèse nodulaire en l'absence de la bactérie est due à l'activation des gènes de la cascade de signalisation situés en aval de CCaMK. En effet, ces mutants montrent une expression forte des marqueurs précoces de la symbiose comme le facteur de transcription *NIN* ou le gène *ENOD11* (Gleason *et al.*, 2006 ; Tirichine *et al.*, 2006a et b). Ces travaux montrent donc que la dérégulation de CCaMK, en particulier par la perte de l'autoinhibition, est suffisante pour induire l'expression des gènes précoces de la nodulation et produire des nodules spontanés en absence des Rhizobiums.

On peut dès lors se poser la question sur la régulation de CCaMK chez les plantes actinorhiziennes et de l'importance du domaine autoinhibiteur dans l'organogenèse nodulaire. Un des moyens rapides d'atteindre cet objectif est d'exprimer des formes tronquées de CCaMK chez *Casuarina glauca*.

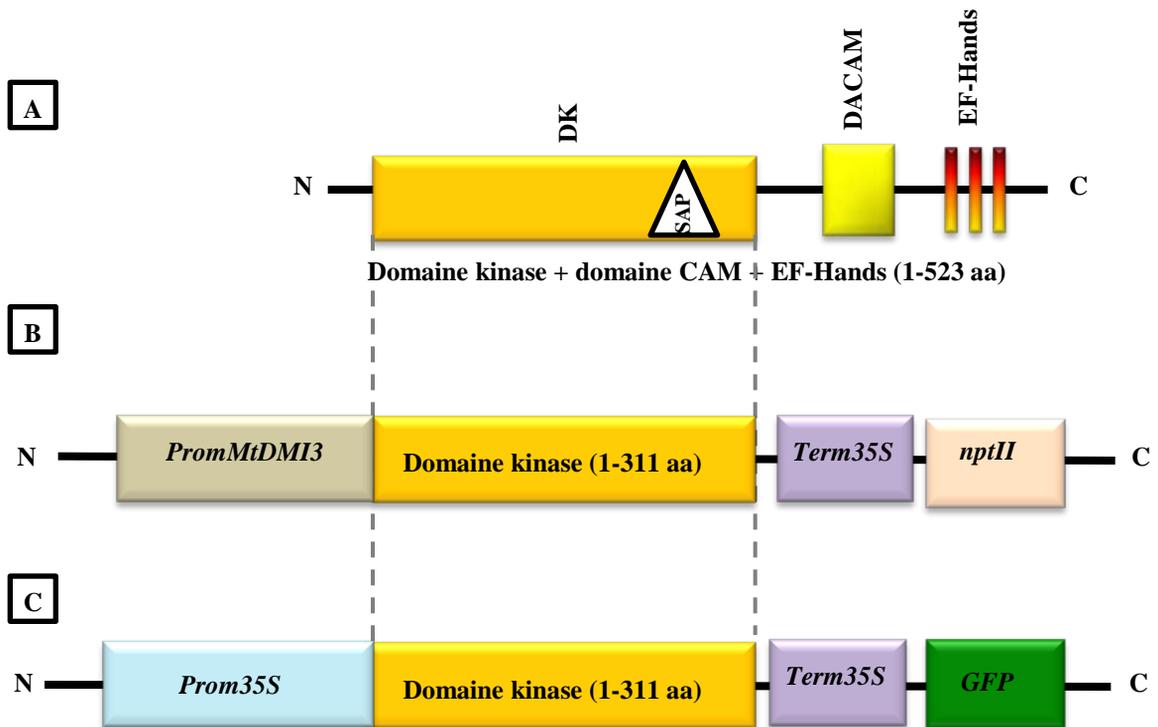


Figure 42 : Constructions géniques dérégulées de *MtDMI3* (Fournies amicalement par Giles Oldroyd - J. Innes, Norwich).

A : Structure de la protéine *MtDMI3* (523 aa) de la partie N-terminale (N) à la partie C-terminale (C). *MtDMI3* est constituée d'un domaine kinase (DK) avec un site d'autophosphorylation (SAP), suivi d'un domaine autoinhibiteur CAM (DACAM) et des motifs EF-Hands ; **B** : Construction dérégulée *PromMtDMI3::CDS-MtDMI3-dérégulé 1-311::Term35S* portée par le vecteur pK7WGF2 avec un gène de sélection à la kanamycine (*nptII*) ; **C** : Construction dérégulée *Prom35S::CDS-MtDMI3-dérégulé 1-311::Term35S* portée par le vecteur pK7WG2D avec le gène rapporteur *GFP*.

B : D'après Gleason *et al.*, 2006.

2. Objectifs

Dans cette seconde partie, je me suis intéressée à la régulation de l'activité de la protéine CCaMK en étudiant le rôle du domaine autoinhibiteur dans l'organogenèse du nodule actinorhizien. Afin de suivre la nomenclature adoptée par les laboratoires dans leurs publications, la protéine kinase dépendante du calcium et de la calmoduline de *M. truncatula* sera appelée MtDMI3 dans mon mémoire.

Dans un premier temps, la réalisation de constructions conduisant à la synthèse d'une protéine CgCCaMK dérégulée nécessitant un travail de clonage. J'ai introduit chez *C. glauca* deux constructions tronquées du gène *MtDMI3* de *M. truncatula*, obtenues auprès de Giles Oldroyd (John Innes Institute, Norwich). Dans un second temps, après avoir réalisé deux constructions du gène *CgCCaMK* de *C. glauca* visant à obtenir une protéine dérégulée, j'ai transformé génétiquement les racines de *C. glauca* via *Agrobacterium rhizogenes* et recherché si, comme chez les Légumineuses, je pouvais observer, en absence d'inoculation par *Frankia*, l'apparition de nodules spontanés sur le système racinaire.

Les questions que j'ai adressées à travers cette étude sont les suivantes :

- a) Des constructions permettant de déréguler l'activité de MtDMI3 de *M. truncatula* induisent-elles des nodules spontanés sur le système racinaire d'une plante actinorhizienne ?
- b) Des constructions permettant de déréguler l'activité de CgCCaMK de *C. glauca* induisent-elles des nodules spontanés chez *C. glauca* ?

II. Étude de la régulation de l'activité *MtDMI3* dans les racines de *Casuarina glauca*

1. Présentation de la construction dérégulée du gène *MtDMI3*

MtDMI3 1-311, une délétion de *MtDMI3* qui induit des nodules spontanés lorsqu'elle est introduite chez la plante native, a été utilisée lors de cette expérience. Elle correspond aux 311 premiers acides aminés du domaine kinase (933 pb) et se trouve délétée du domaine autoinhibiteur et des motifs EF-Hands (**Figure 42**) (Gleason *et al.*, 2006). Deux constructions contenant cette séquence délétée ont été obtenues auprès de Giles Oldroyd (John Innes Institute, Norwich). Elles diffèrent par la région promoteur qui gouverne l'expression de *MtDMI3 1-311* et par les gènes de sélection des cellules transformées

génétiquement. La première appelée *PromMtDMI3::CDS-MtDMI3-dérégulé 1-311::Term35S* est placée sous le contrôle du promoteur du gène natif de *M. truncatula* et contient le gène de sélection *nptII* de la néomycine transférase conférant une résistance à la kanamycine aux cellules végétales (**Figure 42 B**). La seconde, *Prom35S::CDS-MtDMI3-dérégulé 1-311::Term35S*, est placée sous le contrôle du promoteur constitutif 35S et porte le gène rapporteur de la *GFP* permettant une sélection visuelle des cellules transformées (**Figure 42 C**). Ces constructions ont été réalisées dans le vecteur pK7WGF2 ou pK7WG2D (Karimi *et al.*, 2002).

2. Introduction des constructions tronquées *MtDMI3 1-311* chez *Casuarina glauca* par la technique « hairy root » et obtention des plantes composites

Afin de déterminer si les constructions tronquées *MtDMI3 1-311* de *Medicago* induisent un phénotype de nodulation spontanée chez *C. glauca*, deux transformations génétiques successives ont été réalisées avec 3 constructions géniques. Des plantules de *C. glauca* ont été transformées avec la souche d'*A. rhizogenes* Arqua1 (Quandt *et al.*, 1993) contenant soit la construction dérégulée *PromMtDMI3::CDS-MtDMI3-dérégulé 1-311::Term35S*, soit la construction dérégulée *Prom35S::CDS-MtDMI3-dérégulé 1-311::Term35S*. Des plantes témoins ont également été inoculées avec la souche Arqua1 contenant une construction *Prom35S::GFP::TermNos* ne possédant que le gène rapporteur *GFP* sous contrôle du promoteur 35S ; ce vecteur de transformation appelé pHKN29 nous a été gracieusement fourni par le laboratoire de Kumagai et Kouchi (2003).

Lors de la première expérience, un nombre total de 537 plantes de *C. glauca* a été utilisé, dont 247 plantules ont été transformées avec la souche Arqua1 (*Prom35S::CDS-MtDMI3-dérégulé 1-311::Term35S*), 112 plantules avec la souche Arqua1 (*PromMtDMI3::CDS-MtDMI3-dérégulé 1-311::Term35S*) et 178 plantules avec la souche Arqua1 (pHKN29). Trente plantes témoins sauvages ont été piquées avec une aiguille non-imbibée avec des agrobactéries. Ces plantes sont utilisées pour discriminer le système racinaire sauvage d'un système « hairy root » induit par le transfert de l'ADN-T du plasmide Ri d'*A. rhizogenes*.

Lors de la seconde répétition, 119 plantes de *C. glauca* ont été transformées avec la construction *Prom35S::CDS-MtDMI3-dérégulé 1-311::Term35S* et 87 plantes témoins ont été piquées avec Arqua1 (pHKN29). En raison des difficultés à utiliser le gène *nptII* pour sélectionner des racines transgéniques résistantes à la kanamycine dans le système de

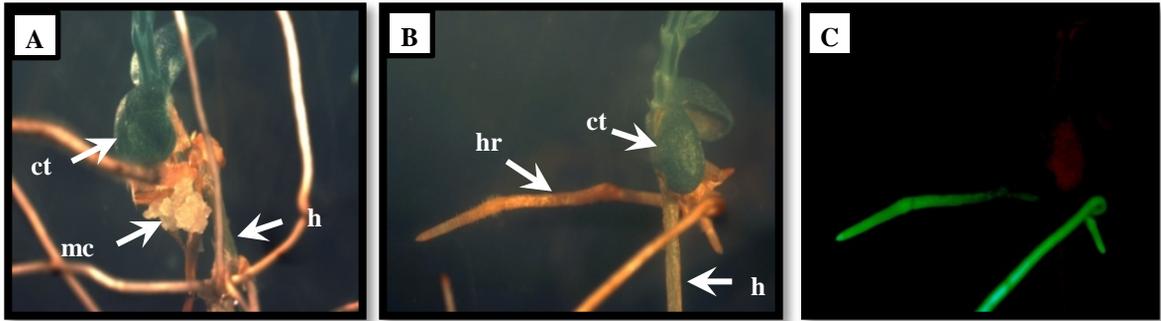


Figure 43 : Obtention de plantes composites de *Casuarina glauca* et observation de l'activité GFP dans le système racinaire.

A : Développement d'un micro-cal suite à la piqûre de l'hypocotyle de *C. glauca* avec une aiguille imbibée de la souche d'*Agrobacterium rhizogenes* Arqual (pHKN29) ; **B** : Observation du système racinaire de type « hairy root » en lumière blanche ; **C** : Observation sous UV du système racinaire présenté en B. Les racines co-transformées fluorescent en vert. (ct) : cotylédons ; (h) : hypocotyle ; (hr) : hairy root ; (mc) : micro-cal. Photographies prises sous loupe binoculaire.

Tableau 6 : Nombre et pourcentage de plantes *Casuarina glauca* transformées avec les constructions dérégulées *MtDMI3* ainsi qu'avec la construction témoin.

	pK7WG2D (<i>Prom35S::CDS-MtDMI3-dérégulé</i> <i>1-311::Term35S</i>)	pK7WGF2 (<i>PromMtDMI3::CDS-MtDMI3-dérégulé</i> <i>1-311::Term35S</i>)	pHKN29 (<i>Prom35S::GFP</i> <i>::TermNos</i>)
Nombre de plantes transformées « hairy root » (2 ^{ème} expérience)	116 (60,41%)	✘	38 (43,67%)
Nombre et % de plantes co-transformées (GFP+) (1 ^{ère} expérience)	14	75 plantes composites (66,94%)	10
Nombre et % de plantes co-transformées (GFP+) (2 ^{ème} expérience)	20 (17,24%)	✘	12 (31,57%)

plantes composites, je n'ai pas renouvelé l'expérience avec la construction *PromMtDMI3::CDS-MtDMI3-dérégulé 1-311::Term35S*. Par ailleurs, l'absence de connaissance sur l'expression conférée par le promoteur *MtDMI3* chez *C. glauca* a été un élément de plus pour ne pas poursuivre les expérimentations avec cette construction.

3. Sélection des racines co-transformées et transfert en hydroponie

L'approche de transformation « hairy root » permet d'obtenir des plantes dites « composites » dont seule la partie racinaire est transformée génétiquement (**Figure 43**) (Diouf *et al.*, 1995). D'après les résultats obtenus et présentés dans le **Tableau 6**, un total de 34 et 22 plantes composites, transformées respectivement avec les vecteurs *Prom35S::CDS-MtDMI3-dérégulé 1-311::Term35S* et pHKN29, présentent des racines co-transformées avec un phénotype de type chevelu racinaire (« hairy root ») et une activité GFP. Quarante-cinq jours après co-culture, les plantes composites ne présentant aucune racine fluorescente ont été éliminées ainsi que les racines non-fluorescentes présentes sur les plantes composites co-transformées GFP+. Ces dernières ont été transférées en hydroponie pendant 20 jours en milieu BD modifié (Broughton et Dilworth, 1971) avec une source d'azote (KNO_3 à 5 mM), puis carencées en azote pendant 20 jours, et enfin transférées dans le milieu BD additionné d'une faible concentration d'azote (NH_4NO_3 à 1 mM) jusqu'à apparition des nodules spontanés.

Concernant les plantes transformées avec la construction *PromMtDMI3::CDS-MtDMI3-dérégulé 1-311::Term35S*, le pourcentage de plantes développant des racines de type « hairy root » a été de 66,94%. Malgré la présence du gène *nptII* au sein de l'ADN-T, les tentatives pour effectuer une sélection des racines co-transformées grâce à leur résistance à la kanamycine n'ont pas abouti. Il est en effet possible d'appliquer une sélection avec une faible concentration de kanamycine ($12,5 \text{ mg. L}^{-1}$) pendant les trois semaines de culture sur boîte de Petri ; mais lorsque les plantes sont transférées en hydroponie, il n'est plus possible d'ajouter de la kanamycine. La cinétique d'apparition des pseudo-nodules qui s'étale sur 3 mois conduit à une croissance importante du chevelu racinaire, sans possibilité de distinguer les racines Km résistantes des racines Km sensibles. En raison de la présence résiduelle d'agrobactéries, il n'est pas non plus possible d'effectuer sur les racines des PCR visant à la reconnaissance des racines co-transformées contenant la construction *PromMtDMI3::CDS-MtDMI3-dérégulé 1-311::Term35S*.

Tableau 7 : Nodulation en absence de *Frankia* des plantes composites de *Casuarina glauca* issues de la transformation avec les constructions dérégulées *MtDMI3*.

Constructions géniques	Apparition des nodules spontanés		
	Nombre de plantes nodulées	Plantes nodulées formant plus de 2 structures/plante	Nombre de nodules/plantes
pK7WG2D (<i>Prom35S::CDS-MtDMI3-dérégulé 1-311::Term35S</i>)	6/24 (25,00%)	83,33%	1-54
pK7WGF2 (<i>PromMtDMI3::CDS-MtDMI3-dérégulé 1-311::Term35S</i>)	3/58 (ND)	33,33%	1-3
pHKN29 (<i>Prom35S::GFP::TermNos</i>)	0/13 (0,00%)	0,00%	0

ND : Non Déterminé.

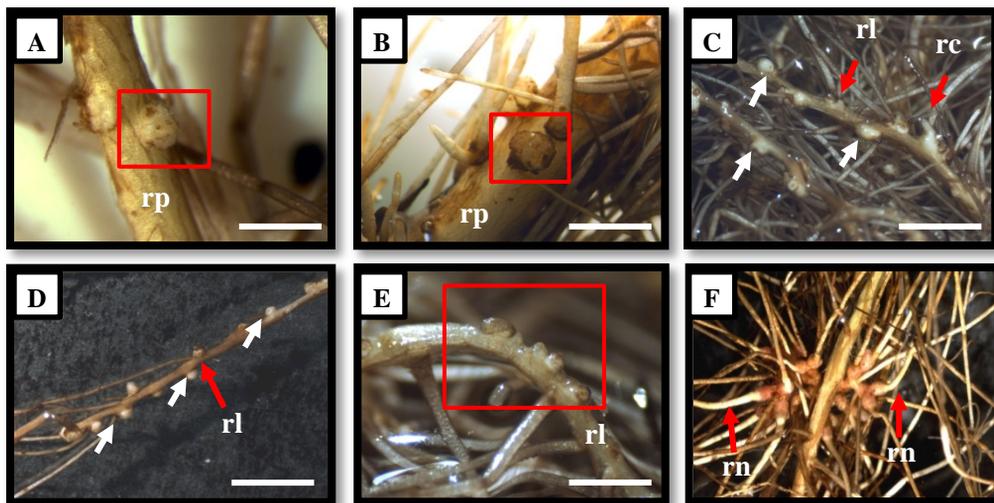


Figure 44 : Morphologie des nodules spontanés issus de la dérégulation du gène *CgCCaMK* par introduction des constructions dérégulées *MtDMI3* chez *Casuarina glauca*.

A : Nodules spontanés obtenus lors de la transformation de *C. glauca* avec la construction pK7WGF2 (*PromMtDMI3::CDS-MtDMI3-dérégulé 1-311::Term35S*). Nodule unilobé sur la racine principale ; **B-C-D-E :** Nodules spontanés obtenus lors de la transformation de *C. glauca* avec la construction pK7WG2D (*Prom35S::CDS-MtDMI3-dérégulé 1-311::Term35S*). Nodule unilobé (B) ; Chapelets de nodules unilobés (flèches blanches) sur les racines latérales (avec ou sans racine courte <1 mm) (C, D, E) ; **F :** Nodule multilobé (WT). (rc) : racine courte ; (rl) : racine latérale ; (rn) : racine nodulaire ; (rp) : racine principale. Photographies prises sous loupe binoculaire en lumière visible. Barre d'échelle = 10 µm (A, D) , 40 µm (B), 30 µm (C), 80 µm (E).

4. Développement des nodules spontanés suite à l'introduction des constructions tronquées *MtDMI3 1-311* chez *Casuarina glauca*

Après environ 3 mois de culture en milieu hydroponique, quelques structures de type pseudo-nodules sont observées sur 25% (6 plantes sur un effectif de 24) des plantes co-transformées avec la construction génique *Prom35S::CDS-MtDMI3-dérégulé 1-311::Term35S*. Au nombre de 1 à 4, ces nodules spontanés sont observés soit sur les racines secondaires et/ou sur la racine principale. La présence d'une activité GFP a permis de vérifier que les racines présentaient une fluorescence après illumination sous lumière UV. Il est à noter que pour une des plantes, un très grand nombre de nodules spontanés se sont différenciés sur le système racinaire, avec un comptage de 54 nodules.

Avec la construction *PromMtDMI3::CDS-MtDMI3-dérégulé 1-311::Term35S*, 3 plantes parmi les 58 plantes composites présentant le seul phénotype chevelu racinaire (mais sans indication possible d'une co-transformation avec la construction tronquée de *MtDMI3*) développent de 1 à 3 nodules spontanés sur les racines latérales. Aucun nodule spontané n'a été observé sur le système racinaire des 13 plantes composites témoins transformées avec le vecteur pHKN29 portant la seule construction *Prom35S::GFP::TermNos*. Les résultats obtenus lors de cette expérimentation sont mentionnés sur le **Tableau 7**.

5. Analyses phénotypiques et histologiques des nodules spontanés

Au niveau phénotypique, ces nodules sont différents d'une structure nodulaire classique. En effet, les nodules induits par la souche de *Frankia* CcI3 chez *C. glauca* sont multilobés, chaque lobe nodulaire étant de forme oblongue et prolongé par une racine nodulaire (**Figure 44 F**). Les nodules spontanés résultant de l'expression des formes tronquées du gène *MtDMI3* sont généralement plus petits, arrondis et unilobés (**Figure 44 A-B-D-E**). La présence de longue racine nodulaire n'a pas été observée. Dans certains cas, les nodules sont prolongés par une racine très courte (<1 mm) (**Figure 44 C**).

Les nodules spontanés ont été inclus dans la résine, et des coupes longitudinales et transversales de 4 µm ont été réalisées à l'aide d'un microtome. Les coupes ont été colorées au bleu de toluidine (0,01%) afin de s'assurer de l'absence de *Frankia* dans les cellules corticales des nodules spontanés (**Figure 45**). En effet, ce composé fait apparaître une coloration violet-rose dans les cellules infectées par *Frankia* comme le montre la coupe témoin présentée sur la **Figure 45 F**. Aucune cellule infectée n'a été observée dans

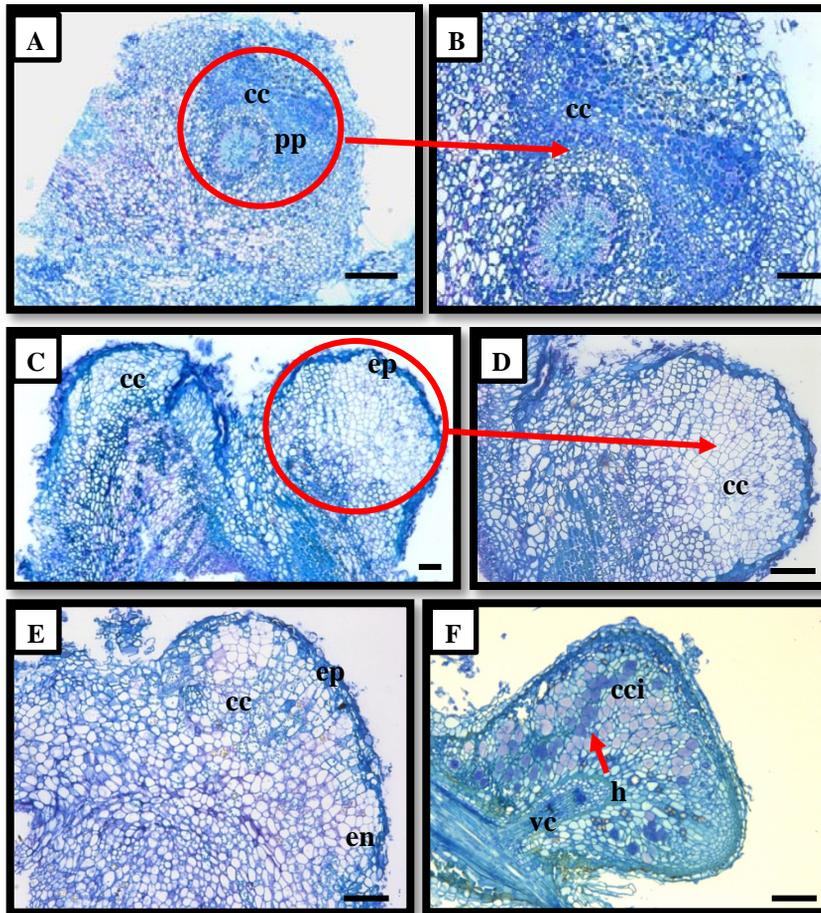


Figure 45 : Analyse des coupes histologiques (épaisseur 4 μm), des nodules spontanés issus de la dérégulation du gène *CgCCaMK* par introduction des constructions dérégulées *MtDMI3* chez *Casuarina glauca*.

A-B : Nodules spontanés obtenus lors de la transformation de *C. glauca* avec la construction pK7WGF2 (*PromMtDMI3::CDS-MtDMI3-dérégulé 1-311::Term35S*). Coupes transversales des nodules unilobés ; **B** : Grossissement de la coupe (A) ; **C-D-E** : Nodules spontanés obtenus lors de la transformation de *C. glauca* avec la construction pK7WG2D (*Prom35S::CDS-MtDMI3-dérégulé 1-311::Term35S*). Coupe longitudinale d'un nodule bilobé (C) ; **D** : Grossissement de la photo (C) ; **E** : Coupe longitudinale d'un nodule unilobé ; **F** : Coupe longitudinale d'un lobe nodulaire actinorhizien (WT) envahi par les hyphes de *Frankia*. Les coupes histologiques ont été colorées au bleu de toluidine. (cc) : cellules corticales indemnes de *Frankia* ; (cci) : cellules corticales infectées par *Frankia* ; (en) : endoderme ; (ep) : épiderme ; (h) : hyphes de *Frankia* ; (vc) : vascularisation centrale. Photographies prises sous microscope optique. Barre d'échelle = 25 μm (A), 100 μm (B, C, D, E), 200 μm (F).

les pseudo-nodules. Ces structures ne sont donc pas le résultat d'une contamination des plantes par des hyphes ou des spores de *Frankia*, et résultent bien de l'introduction des constructions dérégulées de *MtDMI3*.

Les analyses cytologiques révèlent que le nodule spontané est formé presque exclusivement de cellules corticales, même si l'on note la présence de couches cellulaires comme l'épiderme et l'endoderme probablement lignifiés. La vascularisation centrale n'est pas clairement différenciée comme c'est le cas pour un nodule actinorhizien ou pour une racine latérale. De plus, contrairement à l'actinorhize, ces cellules corticales ne sont pas hypertrophiées et sont indemnes de bactéries (**Figure 45 C-D-E**). On remarque par ailleurs la présence d'une grande quantité d'inclusions de polyphénols (**Figure 45 A-B**) et l'absence de méristème apical.

III. Étude de la régulation de l'activité *CgCCaMK* dans les racines de *Casuarina glauca*

1. Présentation des constructions tronquées de *CgCCaMK* obtenues par clonage moléculaire

Mon objectif a été d'obtenir deux constructions tronquées de *CgCCaMK*, analogues aux constructions *DMI3 1-311* et *DMI3 1-326* de *Medicago* (Gleason *et al.*, 2006). Elles comportent toutes deux le domaine kinase de *CgCCaMK* et sont dépourvues du domaine CAM et du domaine Visinine contenant les motifs « EF-hands » (**Figure 46**).

La première construction *PromCgCCaMK::CDS-CgCCaMK-dérégulé 1-307::TermNos* contient les 307 premiers aa de *CgCCaMK* sous le contrôle du promoteur *CgCCaMK* caractérisé précédemment et du terminateur *Nos* (293 pb) de la nopaline synthase d'*A. tumefaciens* (**Figure 46 C**) (Bevan *et al.*, 1983). Elle comporte le domaine kinase et correspond à la construction *PromMtDMI3::CDS-MtDMI3-dérégulé 1-311::Term35S* de *M. truncatula*.

La seconde construction *PromCgCCaMK::CDS-CgCCaMK-dérégulé 1-322::TermNos* contient les 322 premiers aa de *CgCCaMK* sous le contrôle du *PromCgCCaMK* et du terminateur *Nos* (**Figure 46 D**). Elle comporte le domaine kinase ainsi que la partie protéique située entre les domaines kinase et le domaine autoinhibiteur/CAM. Elle

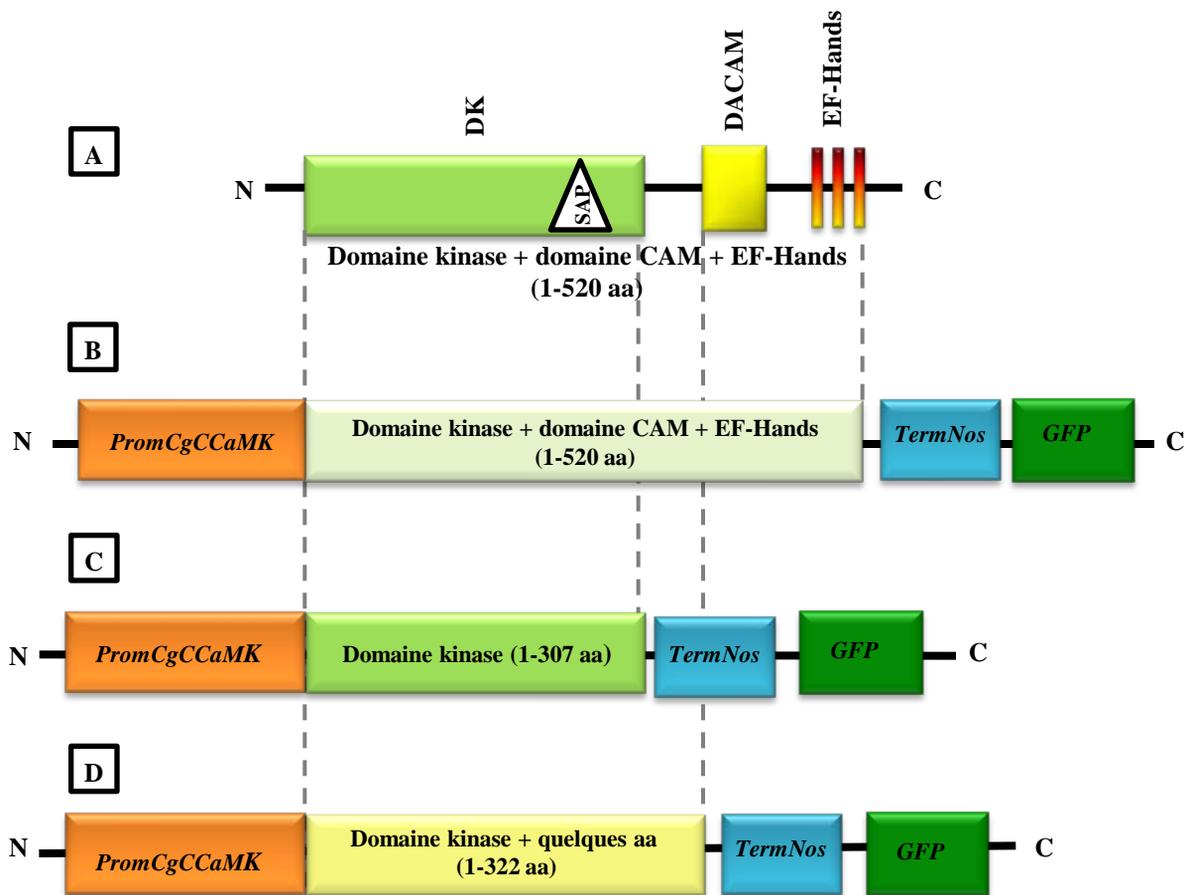


Figure 46 : Constructions géniques dérégulées de *CgCCaMK* obtenues par clonage moléculaire.

A : Structure de la protéine *CgCCaMK* (520 aa) de la partie N-terminale (N) à la partie C-terminale (C). *CgCCaMK* est constituée d'un domaine kinase (DK) avec un site d'autophosphorylation (SAP), suivi d'un domaine autoinhibiteur CAM (DACAM) et des motifs EF-Hands ; **B** : 1^{er} contrôle négatif transgénique formé de toute la partie codante du gène *CgCCaMK* ; **C** : Construction dérégulée *PromCgCCaMK::CDS-CgCCaMK-dérégulé 1-307::TermNos* ; **D** : Construction dérégulée *PromCgCCaMK::CDS-CgCCaMK-dérégulé 1-322::TermNos* . Les constructions géniques comportent le gène rapporteur *GFP* et sont portées par le vecteur pHKN29.

correspond à la construction *PromMtDMI3::CDS-MtDMI3-dérégulé 1-326* de *M. truncatula*. Nous avons choisi de réaliser ces deux constructions car chez *M. truncatula*, les formes tronquées analogues (*DMI3 1-311* et *DMI3 1-326*) ont toutes les deux induit une expression forte du marqueur précoce *ENOD11* et la formation de nodules spontanés en l'absence de *Rhizobium* (Gleason *et al.*, 2006). La stratégie de clonage étant rigoureusement identique, nous avons donc préféré tester deux constructions et augmenter les chances d'atteindre nos objectifs.

Deux constructions témoins ont été ajoutées lors des expérimentations. La première appelée *PromCgCCaMK::CDS-CgCCaMK::TermNos* comporte la partie codante entière de *CgCCaMK* (520 aa) sous le contrôle du promoteur *CgCCaMK* et du terminateur *Nos* (**Figure 46 B**). Ce témoin est utilisé pour vérifier que l'introduction de la partie codante entière du gène de « Calcium and CalModulin dependent protein Kinase » de *C. glauca* ne conduit pas à une activité d'organogenèse nodulaire spontanée en absence du symbiote. La seconde construction contrôle ne contient que la cassette *Prom35S::GFP::TermNos* portée par le vecteur binaire pHKN29 (voir **Annexe 1** pour la construction du 2^{ème} contrôle négatif transgénique). Elle sert également de témoin négatif d'organogenèse nodulaire spontanée.

Après réalisation des clonages dans le vecteur pGEM-T Easy (Promega), les constructions géniques ont été introduites dans le vecteur de transformation binaire pHKN29 qui contient la cassette *Prom35S::GFP::TermnNos* au sein de l'ADN-T (Kumagai et Kouchi, 2003). Comme précédemment, l'expression de la GFP permettra une sélection des racines co-transformées grâce à la visualisation de la fluorescence dans le système racinaire (Haseloff et Siemering, 1998).

2. Introduction des constructions tronquées de *CgCCaMK* chez *Casuarina glauca* par la technique « hairy root » et obtention des plantes composites

Les constructions géniques réalisées ont été introduites par électroporation dans la souche Arqual d'*A. rhizogenes* et un total de 861 plantes de *C. glauca* âgées de 45 jours ont été piquées avec les différentes souches en vue de l'obtention de plantes composites (**Tableau 8**).

Environ 15 jours après infection, un micro-cal a été observé sur la zone d'inoculation de 44 à 77% des plantes transformées, et des racines de type « hairy root » à croissance rapide

Tableau 8 : Nombre et pourcentage de plantes *Casuarina glauca* transformées avec les constructions dérégulées *CgCCaMK* ainsi qu'avec les constructions témoins.

	pHKN29 (<i>PromCgCCaMK</i> :: <i>CDS-</i> <i>CgCCaMK-</i> <i>dérégulé 1-307::</i> <i>TermNoS</i>)	pHKN29 (<i>PromCgCCaMK</i> :: <i>CDS-</i> <i>CgCCaMK-</i> <i>dérégulé 1-322::</i> <i>TermNoS</i>)	pHKN29 (<i>PromCgCCaMK</i> :: <i>CDS-</i> <i>CgCCaMK</i> <i>1-520::</i> <i>TermNoS</i>)	pHKN29 (<i>Prom35S::</i> <i>GFP::</i> <i>Term35S</i>)
Nombre et % de plantes transformées « hairy root »	130 (63,50%)	154 (77,38%)	136 (52,50%)	89 (43,84%)
Nombre et % de plantes co-transformées (GFP+)	27 (20,76%)	30 (19,48%)	29 (21,32%)	27 (30,33%)

Tableau 9 : Nodulation en absence de *Frankia* des plantes composites de *Casuarina glauca* issues de la transformation avec les constructions dérégulées *CgCCaMK*.

Constructions géniques	Apparition des nodules spontanés		
	Nombre de plantes nodulées	Plantes nodulées formant plus de 2 structures/plante	Nombre de nodules/plante
pHKN29 (<i>PromCgCCaMK::CDS-CgCCaMK-</i> <i>dérégulé 1-307::TermNoS</i>)	4/20 (20,00%)	25,00%	1-5
pHKN29 (<i>PromCgCCaMK::CDS-CgCCaMK-</i> <i>dérégulé 1-322::TermNoS</i>)	7/27 (25,92%)	42,85%	1-9
pHKN29 (<i>PromCgCCaMK::CDS-CgCCaMK-</i> <i>dérégulé 1-520::TermNoS</i>)	0/24 (0,00%)	0,00%	0
pHKN29 (<i>Prom35S::GFP::TermNos</i>)	0/19 (0,00%)	0,00%	0

se sont développées sur ce cal (voir **Figure 43** pour le développement d'un micro-cal et des racines « hairy root » sur l'hypocotyle de *C. glauca*). Le phénotype « hairy root », lié au transfert de l'ADN-T du plasmide Ri, permet l'identification des racines transformées. Trente plantes témoins ont également été piquées avec une aiguille dépourvue d'agrobactéries ; le développement de racine n'a pas été observé sur la zone de blessure.

3. Sélection des racines co-transformées et transfert en hydroponie

Chez les plantes composites, un système racinaire constitué à la fois de racines de type « hairy root » (HR) contenant l'ADN-T du plasmide Ri d'Arqua1 et de racines co-transformées présentant le phénotype « hairy root » et l'activité GFP (GFP+) se met en place.

L'efficacité de co-transformation (Nbre de plantes composites avec un système HR::GFP+ / Nbre de plantes composites avec un système HR) est égale à 20,76% , 19,48% et 21,32% pour les plantes transformées respectivement avec les constructions *PromCgCCaMK::CDS-CgCCaMK-dérégulé 1-307::TermNos*, *PromCgCCaMK::CDS-CgCCaMK-dérégulé 1-322::TermNos*, et *PromCgCCaMK::CDS-CgCCaMK::TermNos* (**Tableau 9**). Le pourcentage de co-transformation avec le vecteur vide pHKN29 est égal à 30,33%. Ces valeurs sont celles généralement observées lors des expériences de transformation génétique avec Arqua1 sur *C. glauca*.

Les plantes composites ne présentant pas de fluorescence ont été éliminées. Les plantes avec des racines GFP+ ont été transférées en milieu hydroponique, après élimination des racines GFP-. Au bout d'une semaine de croissance dans une solution nutritive BD modifié (Broughton et Dilworth, 1971) additionné d'azote (KNO₃ à 5 mM), elles ont été transférées dans le même milieu additionné de NH₄NO₃ à 1 mM jusqu'à apparition des structures nodulaires.

4. Développement des nodules spontanés suite à l'introduction des constructions tronquées *CgCCaMK* chez *Casuarina glauca*

Après environ 2 mois de transfert des plantes en hydroponie, on note sur certaines racines latérales de *C. glauca* des renflements de type pseudo-nodules. Le pourcentage de plantes sur lesquelles on observe ces structures est respectivement de 20% et 26% pour les constructions *PromCgCCaMK::CDS-CgCCaMK-dérégulé 1-307::TermNos* et

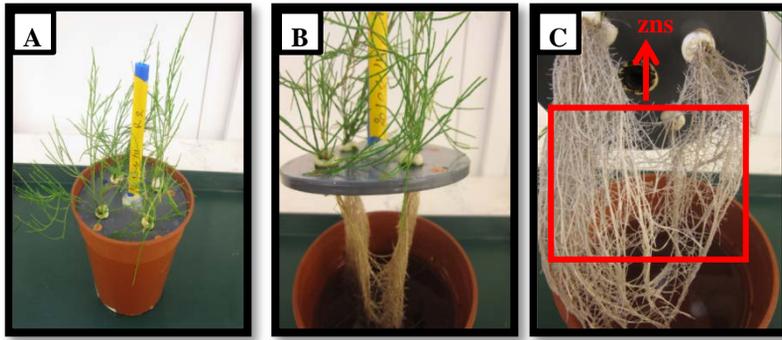


Figure 47 : Plantes composites de *Casuarina glauca* en système hydroponique après transformation *via Agrobacterium rhizogenes*.

A : Présentation du dispositif expérimental ; **B-C** : Observation du système racinaire ramifié sur les plantes composites. (zns) : zone du système racinaire dans laquelle les nodules spontanés apparaissent.

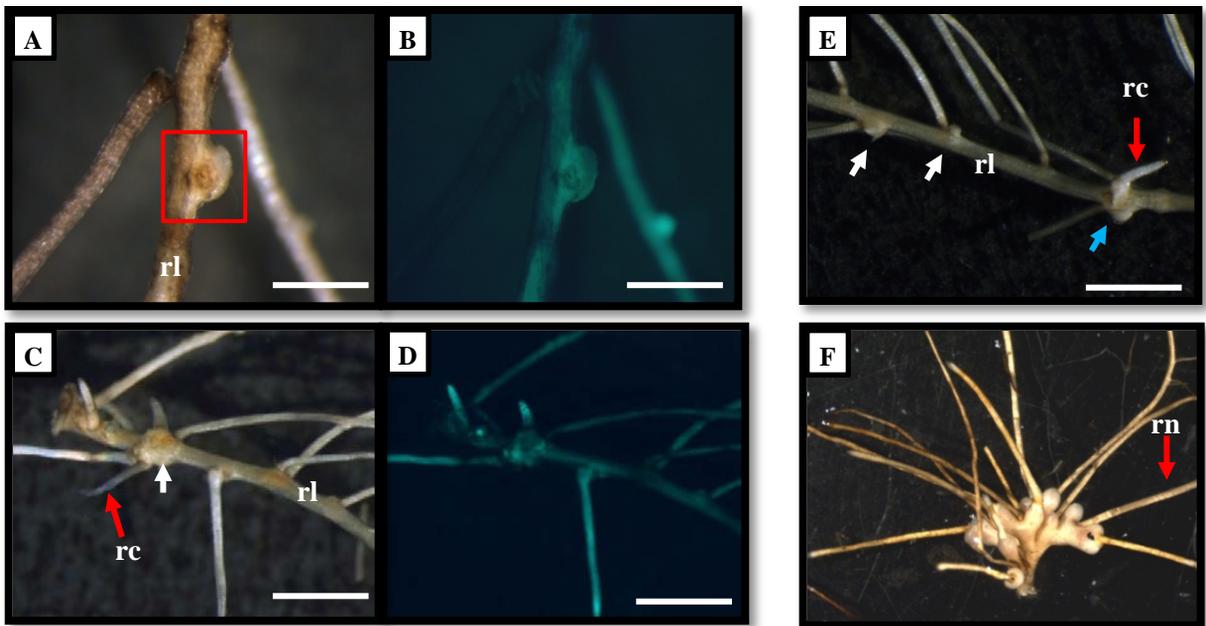


Figure 48 : Morphologie des nodules spontanés issus de la dérégulation du gène *CgCCaMK* par introduction des constructions dérégulées *CgCCaMK* chez *Casuarina glauca*.

A-B : Nodules spontanés obtenus lors de la transformation de *C. glauca* avec la construction pHKN29 (*PromCgCCaMK::CDS-CgCCaMK-dérégulé 1-322::TermNoS*). Nodule unilobé sur la racine latérale ; **C-D-E** : Nodules spontanés obtenus lors de la transformation de *C. glauca* avec la construction pHKN29 (*PromCgCCaMK::CDS-CgCCaMK-dérégulé 1-307::TermNoS*). Nodules unilobés (flèches blanches) et bilobés (flèche bleue) sur la racine latérale avec racine courte ; **F** : Nodule multilobé (WT) avec racines nodulaires. (rc) : racine courte ; (rl) : racine latérale ; (rn) : racine nodulaire. Photographies prises sous loupe binoculaire en lumière visible (A, C, E, F) et sous UV et filtre spécifique à la GFP (B, D). Barre d'échelle = 40 μ m (A, B), 25 μ m (C, D, E).

PromCgCCaMK::CDS-CgCCaMK-dérégulé 1-322::TermNos. L'organogenèse nodulaire est le plus souvent détectée sur les racines latérales situées dans le deuxième et le troisième quart du système racinaire (**Figure 47**). Aucun pseudo-nodule n'a été observé sur les plantes composites témoins résultant de l'inoculation avec les souches d'*A. rhizogenes* contenant les constructions *PromCgCCaMK::CDS-CgCCaMK::TermNos* et pHKN29.

Les résultats obtenus semblent indiquer que la construction *PromCgCCaMK::CDS-CgCCaMK-dérégulé 1-322::TermNos* correspondant aux 322 aa du domaine kinase est un peu plus efficace que la construction un peu plus courte de 307 aa, tant au niveau du nombre de plantes répondant que du nombre de pseudo-nodules. Cependant, les faibles effectifs invitent à rester prudent sur ces conclusions.

La nodulation spontanée a été suivie pendant 2 mois afin d'observer l'évolution du nombre de structures nodulaires. De 1 à 9 nodules spontanés sont visualisés par plante, sur des racines exprimant l'activité GFP.

5. Analyses phénotypiques et histologiques des nodules spontanés

Les structures symbiotiques observées ont la morphologie d'un petit nodule unilobé, bilobé ou plus rarement trilobé. Les structures nodulaires ne sont pas prolongées par une racine sauf dans de rares cas, où l'on observe une racine très courte (<1 mm) (**Figure 48**).

Des coupes pseudo-longitudinales de nodules spontanés ont ensuite été réalisées au microtome, puis colorées au bleu de toluidine (0,01%). La structure de ces nodules ressemble beaucoup à celle des nodules spontanés obtenus avec les constructions *MtDMI3* tronquées de *M. truncatula*. Le parenchyme cortical est majoritaire, les cellules ne sont pas hypertrophiées et sont dépourvues de *Frankia* (**Figure 49 A-B**). Les tissus vasculaires sont également moins différenciés (**Figure 49 D-E**). Les composés phénoliques sous forme de gouttelettes sont présents dans les cellules endodermiques ainsi que dans les cellules corticales (**Figure 49 B-C**). Ces structures nodulaires sont donc différentes de celle d'un nodule actinorhizien infecté par *Frankia* (**Figure 49 I**).

IV. Discussion

Dans le but de déterminer si le gène *CCaMK* est capable d'induire l'organogenèse

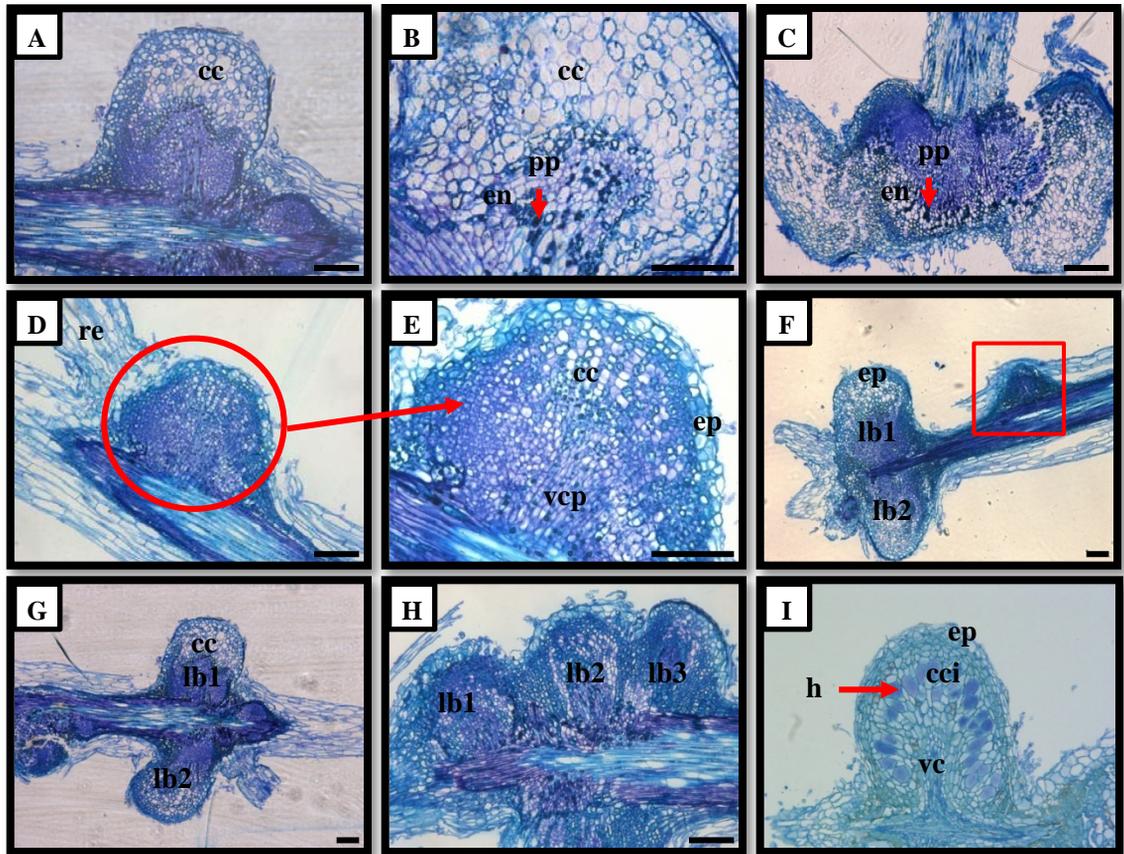


Figure 49 : Analyse des coupes histologiques (épaisseur 6 μm) des nodules spontanés issus de la dérégulation du gène *CgCCaMK* par introduction des constructions dérégulées *CgCCaMK* chez *Casuarina glauca*.

A-B-C : Nodules spontanés obtenus lors de la transformation de *C. glauca* avec la construction pHKN29 (*PromCgCCaMK::CDS-CgCCaMK-dérégulé 1-322::TermNoS*). Coupes longitudinales des nodules unilobés ; **D-E-F-G-H** : Nodules spontanés obtenus lors de la transformation de *C. glauca* avec la construction pHKN29 (*PromCgCCaMK::CDS-CgCCaMK-dérégulé 1-307::TermNoS*). Coupes longitudinales des nodules unilobés (D, E), bilobés (F, G) et trilobé (H) . **E** : Grossissement de la photo (C) ; **I** : Coupe longitudinale d'un lobe nodulaire actinorhizien (WT) envahi par les hyphes de *Frankia*. Les coupes histologiques ont été colorées au bleu de toluidine. (cc) : cellules corticales indemnes de *Frankia* ; (cci) : cellules corticales infectées par *Frankia* ; (en) : endoderme ; (ep) : épiderme ; (h) : hyphes de *Frankia* ; (lb) : lobe nodulaire ; (pp) : polyphénols ; (re) : racine émergente ; (vc) : vascularisation centrale ; (vcp) : vascularisation centrale peu caractérisée. Photographies prises sous microscope optique. Barre d'échelle = 100 μm .

nodulaire en l'absence de bactéries, des constructions dérégulées de *MtDMI3* et de *CgCCaMK* dépourvues de leur domaine autoinhibiteur ont été introduites chez *C. glauca* par la technique du « hairy root ». Les résultats obtenus montrent que ces formes tronquées de *CCaMK* induisent une nodulation en absence de *Frankia*. Ce phénotype a été observé chez certains mutants « gain de fonction » dans les gènes *CCaMK* ou *LHK* du lotier (Tirichine *et al.*, 2006a ; 2007). Il a aussi été observé après introduction de formes mutées ou tronquées de *DMI3/CCaMK* chez *M. truncatula* et chez la non-Légumineuse *Parasponia andersonii* (famille des Celtidacées) nodulées par *Rhizobium* (Gleason *et al.*, 2006 ; Op Den Camp *et al.*, 2011).

Dans le cas de *C. glauca*, l'introduction des deux constructions tronquées de *M. truncatula* induit également une nodulation spontanée. L'apparition des premiers nodules a lieu environ 2 mois après transfert des plantes en milieu hydroponique contenant une source minimale d'azote. Chez *M. truncatula*, la nodulation spontanée intervient 2 à 4 semaines après transfert en système de poches en papier absorbant (« pouches ») (Gleason *et al.*, 2006). Par ailleurs, l'apparition des nodules spontanés des mutants « gain de fonction » du lotier débute 10 à 15 jours après germination (Tirichine *et al.*, 2006b). Chez ces deux Légumineuses, l'inoculation avec *Rhizobium* induit des nodules infectés au bout de 5-7 jours alors que chez *C. glauca*, la formation d'actinorhizes n'a lieu que 3 semaines après inoculation par *Frankia*. Chez les Légumineuses comme chez *C. glauca* l'apparition des nodules spontanés semble intervenir plus tardivement.

Environ 25% des plantes transformées avec la construction *Prom35S::CDS-MtDMI3-dérégulé 1-311::Term35S* ont développé des nodules spontanés. Concernant la construction *PromMtDMI3::CDS-MtDMI3-dérégulé 1-311::Term35S*, il n'a pas été possible de connaître le pourcentage de nodulation car l'absence de la GFP ne nous permettait pas de sélectionner des racines co-transformées. Les formes tronquées de *MtDMI3* chez *C. glauca* forment des pseudo-nodules dont le nombre varie entre 1 et 4 nodules. Le nombre moyen des nodules/plante nodulée est égale à 2,37 avec un écart type de 0,98. De manière très surprenante, une plante a formé 54 nodules. Une explication possible est une forte expression de la construction suite à l'intégration de plusieurs copies. En incluant cette plante avec 54 pseudo-nodules, la moyenne de nodules/plante nodulée sera égale à 8,11.

Concernant les plantes transformées avec les constructions *PromCgCCaMK::CDS-CgCCaMK-dérégulé 1-307::TermNos* et *PromCgCCaMK::CDS-CgCCaMK-dérégulé 1-322::TermNos*, respectivement 20% et 26%, ont développé des nodules spontanés dont le

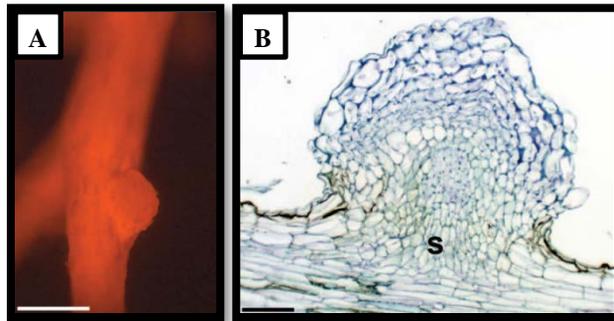


Figure 50 : Nodules spontanés chez *Parasponia andersonii* obtenus par des mutants « gain de fonction » du gène *MtDMI3* (D'après Op Den Camp *et al.*, 2011).

A : Nodule spontané sur une racine transgénique de *P. andersonii* qui exprime une protéine fluorescente rouge (DsRed) ; **B :** Coupe longitudinale du nodule spontané formé de cellules corticales et péricycliques avec une vascularisation centrale (s). Barre d'échelle = 50 μm (A), 0,5 μm (B).

nombre varie entre 1 et 9 avec une moyenne de nodules/plante nodulée de 3,08 et un écart type de 2,72. Chez *M. truncatula*, 43% et 53% des plantes exprimant respectivement les formes tronquées *PromMtDMI3::CDS-MtDMI3-dérégulé 1-311 ::Term35S* et *PromMtDMI3::CDS-MtDMI3-dérégulé 1-326* ont développé des nodules spontanés avec un nombre moyen de 5,4 et 4,4 nodules par plante (Gleason *et al.*, 2006). Chez *L. japonicus*, le pourcentage de nodulation chez des plantes exprimant une construction dérégulée (mutation ponctuelle dans le site d'autophosphorylation) est de 39% avec un nombre moyen de nodules de 4,3 (Tirichine *et al.*, 2006b). Le pourcentage de nodulation spontanée semble donc inférieur chez *C. glauca*. Cependant, il faudra répéter l'expérience avec un effectif plus important avant d'arriver à cette conclusion.

Les nodules spontanés obtenus avec les constructions *CCaMK* tronquées de *M. truncatula* ou de *C. glauca* ont une morphologie différente d'un nodule actinorhizien infecté par *Frankia*. Ils ont le plus souvent une forme arrondie et cessent de croître après leur formation. Ils ne sont jamais ramifiés, mais peuvent être dans de rares cas bilobés ou trilobés. Les analyses cytologiques réalisées sur des coupes pseudo-longitudinales ont révélé une organisation également différente d'un actinorhize. Les nodules sont essentiellement formés de cellules corticales. Le système vasculaire est très mal différencié et le méristème apical n'est pas distinguable. Ces structures ressemblent plus à des prénodules hypertrophiés. Chez les Légumineuses, les nodules spontanés obtenus ont une forme et une structure similaires à celles de nodosités infectées par *Rhizobium* (tissu cortical central et vascularisation périphérique), sans toutefois la présence de cellules corticales hypertrophiées (Gleason *et al.*, 2006 ; Tirichine *et al.*, 2006b). Cette différence de résultats entre Légumineuses et *C. glauca* n'est pas très surprenante. En effet, le nodule de Légumineuses est initié à partir de la division des cellules corticales de la racine, c'est donc un organe nouveau. En revanche, chez *C. glauca*, l'infection par *Frankia*, induit une division cellulaire dans le cortex donnant d'abord naissance à un pré-nodule. Celui-ci n'évolue pas en nodule mais c'est une étape obligatoire. Le primordium nodulaire est initié à partir des cellules du péricycle en face d'un pôle de protoxylème.

Il est intéressant de signaler les travaux d'Op Den Camp *et al.* (2011) réalisés sur *Parasponia*, la seule non-Légumineuse nodulée par *Rhizobium* et pour laquelle la formation d'un pré-nodule est une étape obligatoire du processus de nodulation. Ces auteurs ont obtenu des nodules spontanés par expression d'une construction *MtDMI3* tronquée et dont la structure est très similaire à celle obtenue chez *C. glauca* (**Figure 50**).

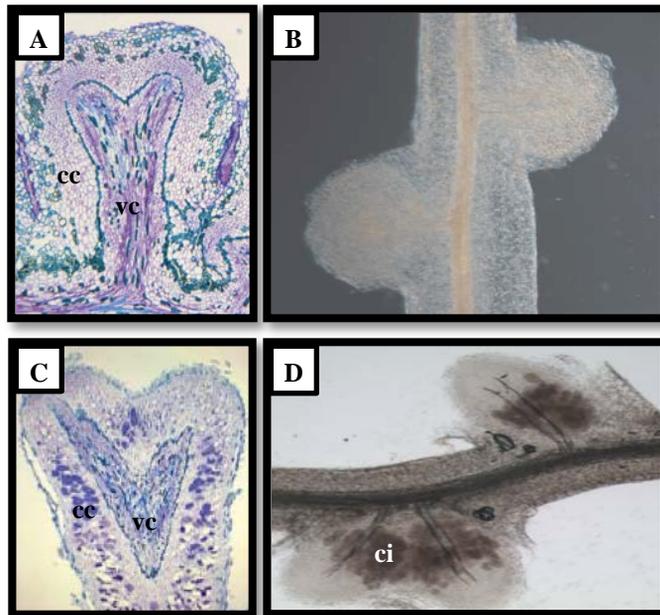


Figure 51 : Induction de nodules spontanés dans une plante de *Discaria trinervis* transformée génétiquement avec une forme autoactive de CgCCaMK.

A : Coupe longitudinale d'un nodule spontané de *D. trinervis*. Le lobe nodulaire présente une vascularisation centrale (vc) et les cellules corticales (cc) sont dépourvues de *Frankia* ;
B : Observation d'une racine transgénique de *D. trinervis* avec deux nodules spontanés ;
C : Coupe longitudinale d'un nodule témoin de *D. trinervis* inoculé avec la souche de *Frankia* BCU. Les cellules corticales (cc) infectées par *Frankia* sont colorées en violet ;
D : Observation d'une racine transgénique témoin de *D. trinervis* nodulée par *Frankia*. Les cellules infectées (ci) sont visibles en gris foncé. Les coupes de lobes nodulaires ont été colorées au bleu de toluidine. Les racines ont été décolorées au KOH.

Il n'est donc pas exclu qu'un autre signal, dépendant celui-ci de l'infection bactérienne, soit requis pour initier la formation d'un primordium nodulaire à partir du péricycle. Par ailleurs, dans le cadre d'une collaboration avec le professeur Luis wall (Université Nacional de Quilmes, Argentine), les formes tronquées de *CgCCaMK* réalisées au cours de notre étude ont été introduites chez la plante actinorhizienne *D. trinervis*. Ces travaux ont permis l'obtention de nodules spontanés dont la structure cellulaire est similaire à un nodule infecté par *Frankia* (résultats non publiés, **Figure 51**). Chez *D. trinervis*, à la différence de *C. glauca*, l'infection est intercellulaire et l'initiation du primordium nodulaire ne nécessite pas la formation préalable d'un prénodule. Cela pourrait donc expliquer cette dissimilitude de résultats.

Les résultats obtenus au cours de cette étude suggèrent que la perte de l'autoinhibition de *CCaMK* est suffisante pour déclencher *de novo* le processus d'organogenèse nodulaire chez *C. glauca* indépendamment de l'infection bactérienne. Afin de confirmer ces résultats, ces formes tronquées ont été introduites chez une lignée transgénique de *C. glauca* exprimant la construction génique *PromCgNIN::GUS* (expérience en cours dans l'équipe). Ce facteur de transcription de la cascade de signalisation symbiotique est situé en aval de *CCaMK* et est induit dans les nodules spontanés chez le lotier (Tirichine *et al.*, 2006b). L'expression GUS sera ainsi analysée dans les nodules spontanés qui seront obtenus.

Nos résultats soulignent donc le rôle majeur joué par le domaine autoinhibiteur de *CCaMK* dans le processus de nodulation. Le fait que les formes tronquées de *CCaMK* de *M. truncatula* induisent une nodulation spontanée de manière similaire que celle de *C. glauca* indiquent que les protéines de ces deux espèces partagent des propriétés fonctionnelles communes. Ces résultats montrent donc l'étendue de la conservation des signaux parmi les symbioses nodulaires.



Discussion générale et Conclusion

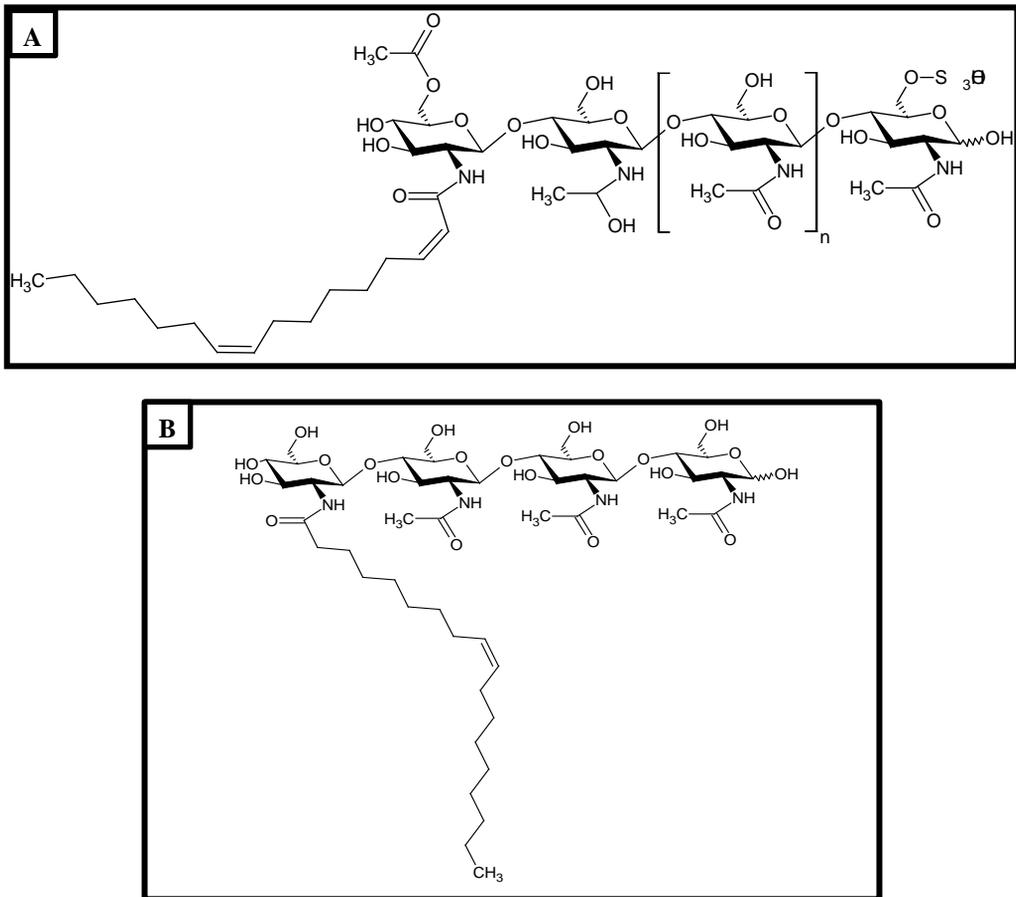


Figure 52 : Structure chimique des facteurs Nod de *Rhizobium* et des facteurs Myc de *Glomus intraradices* (D'après Maillet *et al.*, 2011).

A : Facteurs Nod ; **B :** Facteurs Myc.

L'établissement d'une interaction symbiotique entre les plantes et les microorganismes implique un dialogue moléculaire entre les deux partenaires symbiotiques. Ce dialogue se traduit par un échange de signaux permettant la reconnaissance mutuelle et le déclenchement du processus symbiotique. L'étude des endosymbioses racinaires chez les Légumineuses a permis d'élucider, au moins en partie, ce dialogue moléculaire. Dans le cas de la symbiose fixatrice d'azote Légumineuses-Rhizobium, la sécrétion par la bactérie des facteurs Nod (NFs), molécules signal de nature lipo-chito-oligosaccharidique (Lerouge *et al.*, 1990 ; D'Haeze et Holsters, 2002), et leur reconnaissance constituent le point de départ du processus d'infection et d'initiation du primordium nodulaire. Les mécanismes moléculaires par lesquels la plante perçoit ce signal et active la voie de signalisation symbiotique conduisant à la formation du nodule sont désormais mieux connus (Oldroyd *et al.*, 2011). Il a été en particulier mis en évidence que plusieurs éléments de cette voie de signalisation sont aussi requis pour l'établissement de la symbiose endomycorhizienne à arbuscules (Parniske, 2008). Récemment, une molécule signal émise par le partenaire fongique a été caractérisée ; elle présente une structure très proche de celle des NFs (**Figure 52**) (Maillet *et al.*, 2011). L'ensemble de ces résultats met en évidence, chez les Légumineuses, l'existence d'une voie de signalisation commune à la nodulation et au processus d'endomycorhization.

En 2008, l'implication, dans la formation du nodule actinorhizien du récepteur kinase *SymRK* qui est le point de convergence de cette voie partagée, a été démontrée à la fois chez *Casuarina glauca* (Gherbi *et al.*, 2008a) et chez *Datisca glomerata* (Markmann *et al.*, 2008). Cette découverte indique que les trois endosymbioses racinaires, symbiose Légumineuses-Rhizobium, symbiose actinorhizienne et symbiose endomycorhizienne (AM), utilisent des éléments de signalisation communs, et soutient l'hypothèse selon laquelle les symbioses nodulaires auraient recruté, au cours de l'évolution, des gènes impliqués dans la symbiose AM (Kistner et Parniske, 2002). On peut dès lors s'interroger sur l'étendue de cette base génétique conjointe.

L'étude du gène *CgCCaMK* chez *C. glauca* s'inscrit dans ce contexte et fait partie d'un programme de recherche visant à recréer l'histoire évolutive des symbioses nodulaires. Dans la cascade signalétique déterminée chez les Légumineuses, le gène *CCaMK* est jusqu'à présent le dernier élément commun conduisant à la nodulation et à la mycorhization.

Au cours de mon travail de thèse, j'ai contribué à l'analyse fonctionnelle du gène *CgCCaMK*. Mon travail a porté sur deux aspects :

- J'ai étudié l'implication du gène *CgCCaMK* dans la mise en place de l'interaction symbiotique *C. glauca-Frankia*. Grâce à la transformation génétique *via A. tumefaciens*, j'ai généré des lignées transgéniques de *C. glauca* exprimant une construction *PromCgCCaMK::GUS::TermNos*, puis réalisé l'analyse spatio-temporelle de son expression au cours du processus d'infection du système racinaire par *Frankia*.
- J'ai cherché à déterminer l'importance du domaine autoinhibiteur de la protéine CCaMK dans l'activation du processus d'organogenèse du nodule. Pour cela, j'ai utilisé la technique du « hairy root » qui, grâce à *A. rhizogenes*, permet d'obtenir des plantes transgéniques composites dont seule la partie racinaire est transformée. J'ai ainsi réalisé et introduit des constructions géniques de *CgCCaMK* chez *C. glauca* permettant l'expression de formes tronquées constitutivement actives, car dépourvues du domaine autoinhibiteur/CAM. J'ai par ailleurs introduit, chez *C. glauca*, des constructions géniques de *DMI3* de *M. truncatula* permettant l'expression de formes également tronquées dépourvues du domaine autoinhibiteur/CAM. Cette stratégie m'a permis d'obtenir des mutants « gain de fonction » (dominants positifs).

L'analyse de l'expression du promoteur a montré que l'induction de *CgCCaMK* et sa localisation étaient corrélées à la présence de *Frankia* tout au long du processus symbiotique soulignant ainsi le rôle clé de CCaMK dans l'infection. L'expression des formes tronquées de CCaMK a révélé que la levée de l'autoinhibition déclenchait le processus de nodulation indépendamment de la bactérie et démontre ainsi l'importance de la régulation de CCaMK dans l'activation de l'organogenèse nodulaire, tant chez les Légumineuses que chez les plantes actinorhiziennes.

I. Contribution de la transgénèse à la connaissance de la symbiose actinorhizienne

Comme le montre le travail réalisé au cours de ma thèse, les plantes transgéniques constituent un outil majeur pour l'étude de la symbiose actinorhizienne et la caractérisation fonctionnelle des gènes clés du processus symbiotique. Selon les objectifs et le nombre de

lignées à étudier, l'approche méthodologique est basée sur l'utilisation de souches désarmées d'*A. tumefaciens* comme C58C1, ou sur des souches virulentes d'*A. rhizogenes* (pour revue, Svistoonoff *et al.*, 2010b).

L'intérêt d'*A. tumefaciens* réside dans le fait que les plantes obtenues sont entièrement transformées génétiquement, à la fois pour la partie aérienne et le système racinaire ; par ailleurs, il n'y a pas d'altération du phénotype des plantes obtenues (Smouni *et al.*, 2002). Le facteur limitant est lié au temps nécessaire à la régénération des plantes, qui est compris entre 6 à 9 mois, avec des repiquages du matériel végétal devant être effectués toutes les trois semaines. Cette stratégie, particulièrement intéressante pour la caractérisation des promoteurs de gènes symbiotiques, a donc été suivie dans le cadre de l'étude de la région promotrice du gène *CgCCaMK*. Après sélection de quelques lignées stables présentant un bon niveau d'expression, les plantes peuvent être micropropagées en grand nombre pour des études de cinétique d'expression ou encore d'induction par différents stress ou facteurs biotiques.

A. rhizogenes permet, grâce à l'approche « plantes composites », la production en un temps plus limité (environ 4 mois), d'un grand nombre de plantes avec un système racinaire transformé, chaque racine transformée pouvant être assimilée à une lignée transgénique indépendante. Par ailleurs, il n'y a pas de repiquages réguliers à effectuer, les plantes étant rapidement transférées en hydroponie. Cependant, le pourcentage de co-transformation par *A. rhizogenes* atteint rarement plus de 50% (30% dans le cadre de mon travail), ce qui implique l'inoculation initiale d'un grand nombre de plantes (plus de 500 plantes pour l'étude des constructions tronquées de *MtDMi3* et plus de 860 plantes pour celles de *CgCCaMK*). Des pertes de matériel végétal sont également à déplorer en raison de contaminations diverses survenant en milieu hydroponique dans la chambre de culture. Un dernier inconvénient est l'altération phénotypique du système racinaire résultant du transfert des oncogènes présents sur l'ADN-T du plasmide Ri d'*A. rhizogenes*. Cette altération racinaire a un impact sur le processus de nodulation, puisque seulement 30 à 50% des plantes composites peuvent être nodulées par *Fankia*, les plantes témoins non-transformées étant nodulées à plus de 90% (Diouf *et al.*, 1995 ; Benabdoun *et al.*, 2011). Cependant, l'altération du système racinaire est moins marquée avec la souche d'*A. rhizogenes* Arqua1 qu'avec la souche A4RS. Au cours de mes expérimentations, j'ai donc choisi d'utiliser Arqua1.

L'utilisation combinée d'*A. tumefaciens* et d'*A. rhizogenes* permet également d'obtenir des doubles transformants. Ainsi, avant de quitter le laboratoire Rhizogénèse, j'ai utilisé des rameaux transgéniques *PromCgNIN::GUS* obtenus par Dr. S. Svistoonoff, après transformation génétique par *A. tumefaciens*. *CgNIN* code un facteur de transcription exprimé très précocement lors de l'organogénèse nodulaire (S. Svistoonoff, résultats non publiés). Les rameaux transgéniques *PromCgNIN::GUS* ont été transformés avec la souche Arqual contenant les constructions *PromCgCCaMK::CDS-CgCCaMK-dérégulé 1-307::TermNos*, *PromCgCCaMK::CDS-CgCCaMK-dérégulé 1-322::TermNos* et *PromCgCCaMK::CDS-CgCCaMK::TermNos*. La manipulation en cours devrait permettre d'établir si la construction *PromCgNIN::GUS* est exprimée, comme ce qui est observé chez les Légumineuses (Tirichine *et al.*, 2006a) durant la nodulation spontanée induite par les formes tronquées de *CgCCaMK*.

La contribution des plantes composites à la connaissance de la symbiose actinorhizienne fait l'objet d'une publication dans le Journal à Comité de lecture « Journal of Botany », présentée à la fin de la discussion.

II. *CCaMK*, le gène clé de la symbiose nodulaire fixatrice d'azote

1. Un rôle majeur de *CgCCaMK* dans le processus d'infection

L'analyse spatio-temporelle de l'expression de *CgCCaMK* en utilisant la construction *PromCgCCaMK::GUS::TermNos* a permis de montrer que ce gène présentait un profil d'expression qui suit le processus d'infection. En effet, si les tests histochimiques réalisés sur des fragments de racines non-inoculées ne montrent qu'une expression basale dans la zone épidermique ou le système vasculaire, une induction forte est en revanche observée après inoculation avec *Frankia*, en particulier au niveau de la zone des poils absorbants. Cette induction au cours des étapes précoces est d'abord très étendue puis, tout en demeurant très intense, devient plus localisée dans les zones où les poils absorbants sont déformés et dans les zones d'émergence des prénodules. Ces résultats indiquent que la présence de la bactérie et l'échange de signaux avec la plante induisent l'expression de *CgCCaMK*. La déformation des poils absorbants et la pénétration de *Frankia* à travers le poil déformé marquent le début de l'infection.

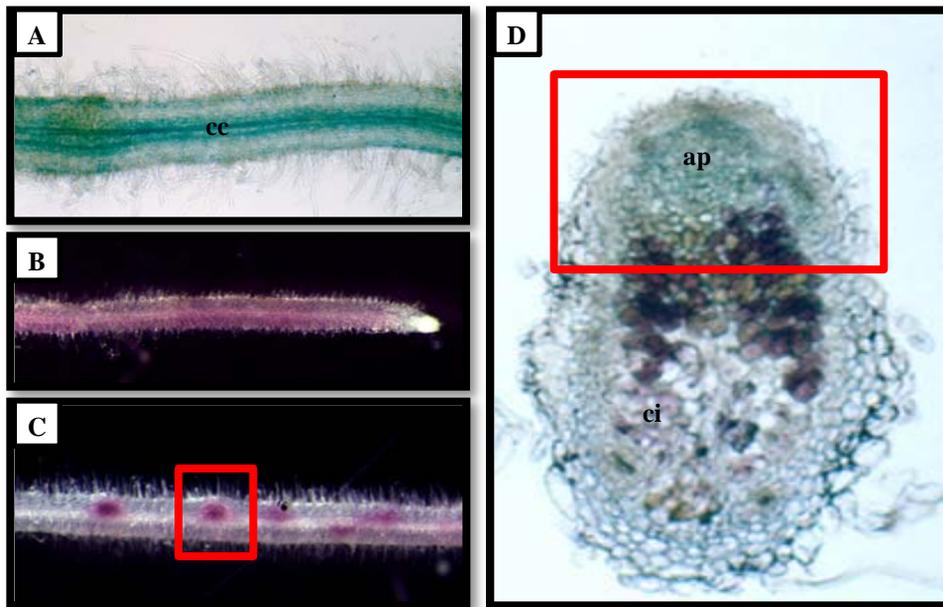


Figure 53 : Suivi de l'expression spatio-temporelle de *DMI3* par fusion transcriptionnelle *PromDMI3::GUS* chez *Medicago truncatula* (D'après Godfroy, 2008).

A : Expression constitutive de *DMI3* (en bleu) dans les racines transformées de *M. truncatula* non-stimulées par le symbiote. On distingue notamment le cylindre centrale ; **B** : 2 jours après inoculation par la bactérie *Sinorhizobium meliloti* la coloration GUS (en rose) épidermique est sensiblement plus intense et plus étendue ; **C** : À 5 jours après inoculation, l'expression de *DMI3* (en rose) est restreinte au site d'infection ; **D** : À 14 jours après infection, les cellules sont infectées par les bactéries (coloration β -Gal en rose) et l'expression de *DMI3* (coloration GUS en bleu) est visible à l'apex du nodule. (ap) : apex ; (cc) : cylindre centrale ; (ci) : cellules infectées.

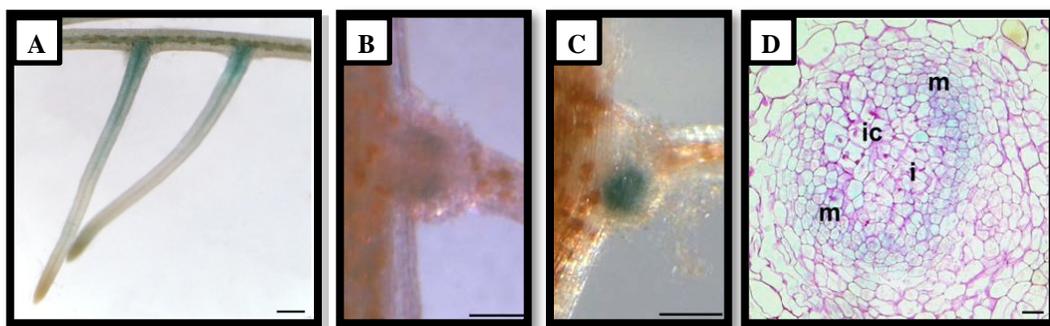


Figure 54 : Profil d'expression de *CCaMK* chez *Sesbania rostrata* (D'après Capoen *et al.*, 2009).

A : L'activité GUS est visible dans les racines non-inoculées ; L'activité GUS est visible à 2 (**B**) et à 3 (**C**) jours après inoculation avec *Azorhizobium caulinodans* ORS571 ; **D** : Coupe histologique de nodule jeune. On observe une activité GUS au niveau des cellules corticales et dans la zone d'infection. (i) : zone d'infection ; (ic) : centre d'infection ; (m) : méristème. Barre d'échelle = 500 μ m.

Cette infection se poursuit par la colonisation du pré-nodule dont la formation résulte de la division des cellules corticales concomitamment à la pénétration de la bactérie et non loin du site d'infection. Le fait remarquable est que c'est dans ces zones que l'expression de *PromCgCCaMK::GUS::TermNos* est la plus forte. Dans le nodule mature, on observe une activité GUS particulièrement prononcée dans la zone II ou zone d'infection. Cette zone correspond aux jeunes cellules corticales nouvellement différenciées qui sont en passe d'être colonisées par *Frankia*. Ces résultats permettent de déduire qu'il existe une corrélation entre le processus d'infection et l'expression de *CgCCaMK* et viennent conforter d'autres travaux réalisés dans l'équipe sur *CgCCaMK*. En effet, l'extinction ciblée de *CgCCaMK* par ARNi induit un retard de la nodulation, une baisse de la quantité de nodules et une diminution du nombre d'événements d'infection précoces des poils absorbants. Au niveau cyto-histologique, la zone d'infection apparaît plus distante du méristème nodulaire dans les nodules *ARNi-CgCCaMK*. Chez les Légumineuses, les études d'expression, à travers des fusions *PromDMI3::GUS*, réalisées chez *M. truncatula* (Godfroy, 2008) et *S. rostrata* (Capoen *et al.*, 2009) ont montré des profils très similaires aux nôtres (**Figure 53 et 54**). Ces travaux conjugués permettent de conclure que les CCaMK de *C. glauca* et de Légumineuses partagent des caractéristiques communes.

Dans la symbiose Légumineuses-Rhizobium, une des premières réponses physiologiques de la plante à l'inoculation bactérienne ou au traitement par les NFs est l'occurrence des oscillations calciques ou « calcium spiking » (Oldroyd et Downie, 2008). Un influx calcique suivi de pulsations calciques sont observés quelques minutes après l'inoculation. De par sa structure et son affinité pour le calcium, CCaMK est sans doute le décodeur de ces oscillations (Lévy *et al.*, 2004 ; Gleason *et al.*, 2006) et le relais du signal calcique aux différents éléments impliqués dans le processus de nodulation.

Dans une étude récente réalisée chez *M. truncatula*, il est intéressant de noter qu'au cours des étapes précoces de l'infection, des oscillations calciques s'opèrent dans les poils absorbants, les cellules épidermiques et le cortex externe. Ces oscillations présentent des amplitudes caractéristiques passant de hautes ou basses en fonction du stade d'infection des cellules et de la progression du cordon d'infection de cellule en cellule (Sieberer *et al.*, 2012). La corrélation de l'expression de CCaMK avec le processus d'infection suggère que celle-ci interprète ce signal calcique. Cela montre que la régulation du message calcique et son décodage constituent une étape clé de la voie de signalisation permettant l'activation des autres éléments de la cascade conduisant à la nodulation. Chez *C. glauca*, l'occurrence

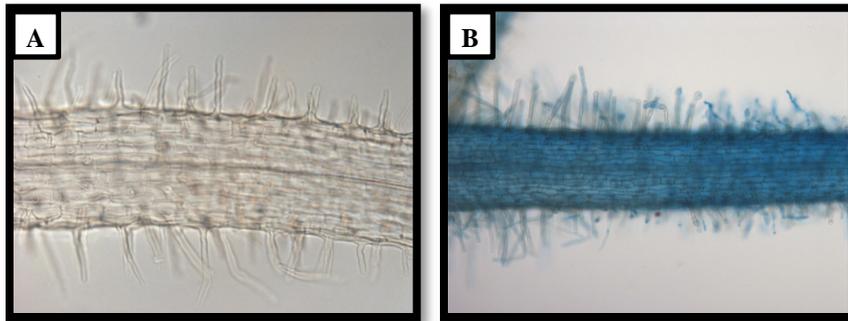


Figure 55 : Induction de *PromCgCCaMK::GUS::TermNos* chez *Casuarina glauca* par les surnageants de *Frankia*.

L'expression de *PromCgCCaMK::GUS* n'est pas induite dans les racines de *C. glauca* en absence de surnageants de *Frankia* (A), et elle est fortement induite après inoculation avec les surnageants de *Frankia* (B).

des oscillations calciques n'a pas été rapportée jusqu'à présent. Les résultats obtenus avec cette étude d'expression de *CgCCaMK* suggèrent que de tels événements pourraient avoir lieu au cours des étapes précoces de l'interaction. Des travaux sont en cours dans l'équipe afin de déterminer si une réponse calcique peut être mise en évidence chez *C. glauca* consécutivement à l'inoculation par *Frankia*.

Enfin, *CgCCaMK* est aussi impliqué dans la mycorhization puisque des expériences d'extinction de ce gène par ARNi menées dans l'équipe, chez *C. glauca*, ont montré une baisse significative de la fréquence de mycorhization. Il serait donc intéressant d'analyser son expression après inoculation par un champignon endomycorhizien.

2. *CgCCaMK*, un marqueur moléculaire précoce permettant la purification des facteurs de *Frankia*

Si plusieurs éléments de la voie de signalisation aux NFs de *Rhizobium* sont aussi présents chez les plantes actinorhiziennes (Hoher *et al.*, 2011a), on ignore encore la nature du signal émis par *Frankia* ; cela, malgré les efforts de plusieurs laboratoires et le séquençage du génome de quatre souches bactériennes (voir partie bibliographique). Un des moyens pour identifier le ou les facteur(s) de *Frankia*, permettant la mise en place de l'interaction entre le système racinaire et le symbiote, est d'utiliser des marqueurs précoces de la plante-hôte susceptibles d'être induits par des surnageants bactériens contenant ces molécules signal. Ce test biologique peut être réalisé grâce à l'utilisation de plantes transgéniques exprimant des fusions transcriptionnelles entre des promoteurs de gènes symbiotiques et des gènes rapporteurs tels que les gènes *GUS* ou *GFP*.

L'étude de la régulation spatio-temporelle de *CgCCaMK* a montré que celui-ci était fortement induit après inoculation avec *Frankia* ou par des surnageants de *Frankia* (**Figure 55**). Les lignées transgéniques exprimant la construction *PromCgCCaMK::GUS::TermNos* seront utilisées dans l'équipe pour tenter d'isoler la fraction de surnageant de *Frankia* provoquant cette forte induction. Les fractions seront ensuite caractérisées au niveau biochimique.

3. Un rôle majeur de *CCaMK* dans le processus d'organogenèse nodulaire

Chez le lotier, une nouvelle classe de mutants chimiques formant spontanément des nodules a été rapportée par Tirichine *et al.* (2006b). Les gènes responsables de ce

phénotype ont été identifiés par clonage positionnel. Il s'agit de mutations gain de fonction dans les gènes *CCaMK* (Tirichine *et al.*, 2006b) et *LHK*, un récepteur cytokinines (Tirichine *et al.*, 2007). Des études parallèles réalisées chez *M. truncatula* ont montré que des formes mutées du gène *DMI3/CCaMK* introduites chez la plante déclenchaient spontanément la nodulation (Gleason *et al.*, 2006). Ce gain de fonction est dû à la dérégulation du gène correspondant. Dans le cas de *CCaMK*, la formation de nodules spontanés peut être obtenue soit par mutation du site d'autophosphorylation, soit par la levée de l'autoinhibition qui résulte de la suppression du domaine autoinhibiteur/CAM et du domaine Visinine contenant les motifs « mains-EF » (Gleason *et al.*, 2006 ; Tirichine *et al.*, 2006a).

Nous avons voulu tester, chez *C. glauca*, l'hypothèse d'une implication de *CCaMK* dans l'activation de l'organogenèse nodulaire en l'absence du partenaire bactérien. Pour cela, nous avons introduit des formes tronquées de *DMI3/CCaMK* de *M. truncatula* d'une part et de *CgCCaMK* d'autre part. Deux constructions de *DMI3/CCaMK* correspondant à une protéine tronquée de *MtDMI3* ne contenant que le domaine kinase situé dans la partie N-terminale ont été utilisées. L'une sous le contrôle du promoteur de *MtDMI3*, l'autre sous le contrôle du promoteur 35S. Deux constructions de *CCaMK* de *C. glauca* correspondant à une protéine tronquée déléetée des domaines autoinhibiteur/CAM et Visinine ont été réalisées et utilisées. Les deux constructions contiennent le domaine kinase sous le contrôle du promoteur de *CgCCaMK*, l'une d'une longueur de 307 aa, l'autre de 322 aa. L'expression de ces formes tronquées de *CCaMK* a permis d'obtenir des nodules spontanés chez *C. glauca* indépendamment de l'inoculation par *Frankia*.

Les résultats obtenus suggèrent que la protéine dérégulée est capable de réactiver la voie de signalisation, ainsi que les gènes situés en aval, qui sont nécessaires à l'organogenèse nodulaire. En l'absence de calcium, le domaine CAM, qui est chevauchant avec le domaine autoinhibiteur, maintient la protéine dans un état inactif (Sathyanarayanan *et al.*, 2000). La levée de l'autoinhibition activerait donc la fonction de phosphorylation des substrats de la protéine *via* le domaine kinase. Shimoda *et al.* (2012) ont récemment montré que le domaine kinase seul de *CCaMK* du lotier conservait *in vitro* son activité de phosphorylation, quoique moins efficacement que la protéine complète activée.

Chez *M. truncatula* et *L. japonicus*, l'induction de nodules spontanés a été observée chez les plantes exprimant différentes formes mutées ou déléetées de *CCaMK* (Gleason *et al.*, 2006 ; Tirichine *et al.*, 2006a ; Shimoda *et al.*, 2012). Chez ces plantes, des marqueurs

moléculaires spécifiques de l'organogenèse nodulaire sont induits comme *MtENODII* chez *M. truncatula* (Gleason *et al.*, 2006) ou *NIN* chez *L. japonicus* (Tirichine *et al.*, 2006a et b). Ces travaux indiquent que la voie de signalisation conduisant à la nodulation est activée.

Chez *C. glauca*, le gène *NIN* a été isolé dans l'équipe et est en cours de caractérisation. C'est afin de tester l'hypothèse de l'induction de *CgNIN* dans les nodules spontanés que, comme je l'ai indiqué précédemment, une lignée transgénique de *C. glauca* exprimant la construction *PromCgNIN::GUS* a été transformée par « hairy root » avec les formes tronquées de *CgCCaMK*. Les plantes sont en cours de génération et l'expression du *PromCgNIN::GUS* dans les nodules spontanés sera analysée.

L'induction de nodules spontanés chez *C. glauca* suite à l'expression des formes tronquées de *DMI3/CCaMK* de *M. truncatula* est un résultat très intéressant. Il montre en effet qu'un gène hétérologue muté dominant positif est capable d'initier le processus de nodulation. Ce gène de Légumineuse dans sa forme dérégulée permettrait donc d'activer la cascade signalétique chez une espèce actinorhizienne. Notre équipe a déjà montré que la complémentation fonctionnelle d'un mutant « knock-out » *mtdmi3* avec le gène *CgCCaMK* a permis de restaurer la nodulation et la mycorhization chez *M. truncatula*. Ces nouveaux résultats obtenus chez *C. glauca* apportent des données supplémentaires sur l'étendue de la conservation de la voie de signalisation chez les espèces nodulantes.

Dans l'équipe, l'introduction des formes tronquées de *CgCCaMK* chez une autre espèce actinorhizienne, *D. trinervis*, dont le mode d'infection intercellulaire est différent de celui de *C. glauca* (infection intracellulaire par le poil absorbant) a permis aussi d'induire des nodules indépendamment de *Frankia*. Il est intéressant de noter que ces nodules ont une organisation identique à celle des nodules résultant de l'infection par la souche de *Frankia* BCU ; on note en particulier la présence d'une vascularisation centrale ramifiée, comme dans les nodules témoins infectés. Ce résultat suggère que si les processus d'infection sont distincts, les processus d'initiation nodulaire sont similaires.

4. *CCaMK*, un gène à l'interface des voies de signalisation conduisant à l'infection et à l'organogenèse

Notre étude fonctionnelle sur *CCaMK* montre le rôle déterminant de ce gène à la fois dans le processus d'infection et dans l'organogenèse nodulaire. Cette dualité fonctionnelle indique que la cascade de signalisation qui résulte du dialogue moléculaire entre la bactérie

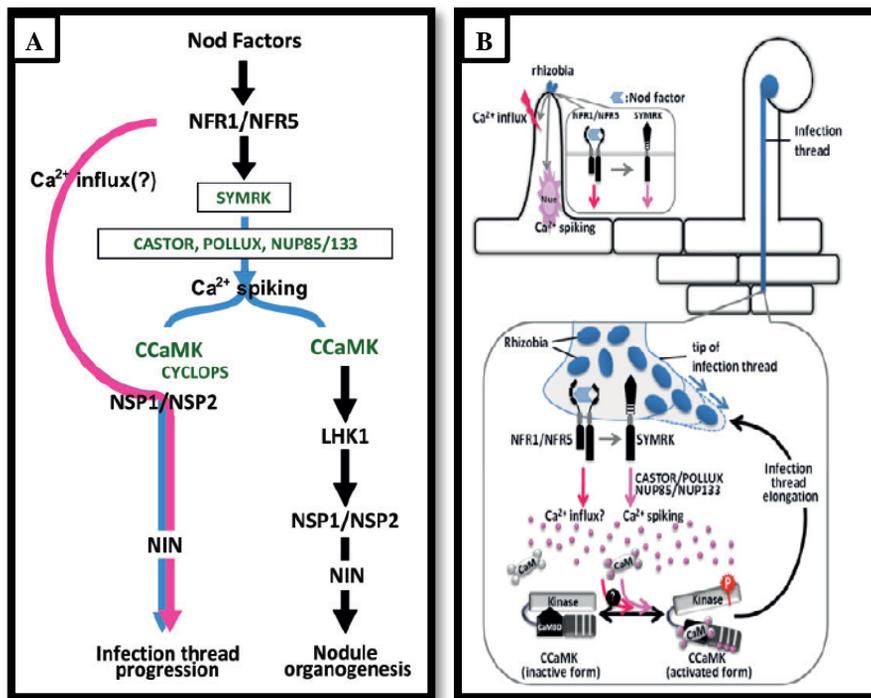


Figure 56 : Modèle de la voie de signalisation symbiotique chez les Légumineuses (D'après Kouchi *et al.*, 2010).

A : En réponse aux facteurs Nod (NFs), le signal généré par les récepteurs NFR1/NFR5 se divise en deux voies, l'une écoule de la voie de signalisation commune (ligne bleu), et l'autre (ligne rose) est requise pour l'infection rhizobienne. Les gènes communs de la voie de signalisation symbiotique sont de couleur verte ; **B** : Rôle du Ca^{2+} dans la signalisation et l'activation du gène *CCaMK* au cours de la formation et la croissance du cordon d'infection. La localisation exacte et la composition du complexe récepteur des NFs n'ont pas encore été déterminées.

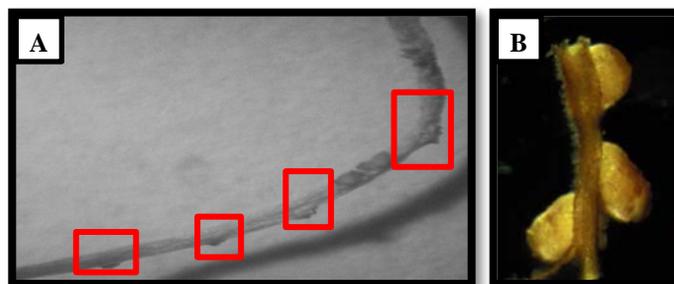


Figure 57 : Induction de nodules spontanés en présence d'auxine (2,4-D).

A : Apparition des nodules spontanés chez *Triticum aestivum* à 2 semaines après incubation des racines dans le 2,4-D en présence de bactéries diazotrophes ; **B** : Chez *Allocasuarina verticillata*, les nodules spontanés apparaissent après 2 mois d'incubation es racines dans le 2,4-D.

A : D'après Biabani *et al.*, 2012 ; **B** : D'après Svistoonoff, 2003.

et la plante fait appel à deux processus parallèles ; l'un impliqué dans l'organogenèse nodulaire, l'autre dans l'infection. Du fait de cette dualité fonctionnelle, le gène *CCaMK* semble donc être un acteur majeur du dialogue moléculaire.

Chez les Légumineuses, des études récentes ont démontré l'importance de *CCaMK* (Singh et Parniske, 2012). Ces études sont basées sur l'expression de formes dérégulées de *CCaMK* chez des plantes mutées dans des gènes essentiels de la voie de signalisation situés en amont de *CCaMK* comme les gènes *SymRK* ou *NUP*. Les plantes obtenues développent des nodules spontanés qui peuvent être infectés par *Rhizobium* (Hayashi *et al.*, 2010 ; Madsen *et al.*, 2010 ; Shimoda *et al.*, 2012). De plus, certaines de ces plantes peuvent aussi être mycorhizées (Hayashi *et al.*, 2010 ; Shimoda *et al.*, 2012).

D'autres travaux rapportés récemment soulignent l'importance des différents domaines protéiques dans l'activation de la nodulation ou dans le processus d'infection. Grâce à l'expression de différentes formes mutées de *CCaMK* chez une plante « knock-out » *ccamk* du lotier, il a été possible de montrer par ex. que le domaine autoinhibiteur/CAM étaient requis pour l'infection par *Rhizobium*, tandis que le domaine Visinine était nécessaire à l'infection par *Rhizobium* et par le champignon endomycorhizien (Shimoda *et al.*, 2012).

Chez les Légumineuses, il est désormais admis que la voie de signalisation aux NFs s'appuie sur deux processus liés et concomitants : l'un contrôlant l'organogenèse du nodule, l'autre contrôlant l'infection et l'accommodation du microsymbiote. Ces deux processus sont en partie dépendants de *CCaMK* (**Figure 56**) (Hayashi *et al.*, 2010 ; Madsen *et al.*, 2010). La caractérisation fonctionnelle de *CgCCaMK*, conjuguée avec d'autres travaux menés dans l'équipe (Hocher *et al.*, 2011a) suggère que la signalisation symbiotique chez *C. glauca* suit une voie similaire.

L'induction de nodules est un phénomène connu chez les plantes, y compris chez les espèces non-nodulantes comme le blé, le maïs ou le riz (Ridge *et al.*, 1993 ; Buvana et Kannaiyan, 2002 ; Narula *et al.*, 2006). Elle est rendue possible grâce à certains traitements hormonaux comme les cytokinines ou le 2,4-D (**Figure 57**) (Svistoonoff *et al.*, 2003 ; Biabani *et al.*, 2012). Chez le lotier, le mutant dans le récepteur cytokinine LHK1 induit des nodules spontanés, ce qui souligne l'importance des hormones dans l'organogenèse nodulaire (Murray *et al.*, 2007 ; Tirichine *et al.*, 2007). L'originalité de *CCaMK* réside dans sa dualité de fonction, au niveau de l'infection et de l'organogenèse.

Tableau 10: Analyse comparative des différentes stratégies envisagées pour le transfert de la fixation d'azote aux céréales.

Stratégie	Azote potentiellement fixé (kg/ha/an)	Avantages	Limitations	Probabilité de succès
Bactéries dans la rhizosphère	1-50	La stratégie existe déjà et reste à optimiser	Difficulté de maîtriser le système en raison de la complexité de la rhizosphère ; des inoculations répétées sont anticipées	- moyenne - stratégie court à moyen terme
Transfert des gènes <i>nif</i> dans les céréales	ND	La technologie sera applicable à l'ensemble des céréales ; le fonctionnement du complexe nitrogénase est bien étudié et maîtrisé	Toutes les technologies nécessaires ne sont pas encore maîtrisées ; les organites constituent un environnement complexe	- faible - stratégie à long terme
Champignons endomycorhiziens avec bactéries fixatrices d'azote	ND	Intérêt dans le large spectre d'hôte des champignons endomycorhiziens qui permet la colonisation des racines des céréales	Peu de connaissances de la relation champignons-bactéries et de la probabilité d'optimiser le système	-faible à moyenne - stratégie de moyen à court terme
Induction de nodosités fixatrices d'azote	75-300	Le processus de nodulation est très étudié au niveau moléculaire ; existence de certains gènes symbiotiques chez les céréales	Complexité de l'approche qui repose sur des modifications des bactéries et des céréales hôtes	- moyenne - stratégie de moyen à long terme

ND : Non Déterminé.

La majorité des plantes, dont les céréales, sont capables d'établir des symbioses endomycorhiziennes et possèdent par conséquent les gènes communs de la voie de signalisation comme *CCaMK*. En revanche, seul un groupe restreint d'espèces est capable d'interagir avec des bactéries et former des nodules fixateurs d'azote. La compréhension du mode de fonctionnement de gènes comme *CCaMK* devrait nous aider à imaginer des stratégies permettant de transférer cette capacité d'interagir avec les bactéries *Rhizobium* ou *Frankia* et de former des nodules fixateurs d'azote.

III. Un objectif à long terme : des céréales fixatrices d'azote

Les recherches entreprises sur le thème de la fixation biologique de l'azote ont pour vocation, à court terme, de générer des connaissances sur les mécanismes moléculaires mis en œuvre, afin d'utiliser au mieux dans un contexte agronomique les différentes bactéries fixatrices d'azote, qu'elles soient symbiotiques ou non. Mais il y a également un objectif à plus long terme, qui est de transférer l'aptitude à fixer l'azote chez les céréales, telles le blé, le maïs et le riz. Il s'agit là d'un enjeu extrêmement important pour le développement d'une agriculture durable respectueuse de l'environnement. Quatre stratégies sont actuellement envisagées (**Tableau 10**) (pour plus d'informations, consultez : Ladha et Reddy, 2000 ; Charpentier et Oldroyd, 2010 ; Beatty et Good, 2011).

1. L'introduction de bactéries fixatrices d'azote dans la rhizosphère

Cette stratégie, qui est sans doute la plus simple, repose sur l'utilisation de bactéries fixatrices d'azote libres de type PGPR « Plant Growth Promoting Rhizobacteria », tel *Azospirillum*, qui s'associe avec le système racinaire de certaines céréales, sans pour autant induire le développement de nodules (Saharan et Nehra, 2011). Cette approche est déjà au stade commercial, avec par ex. le bioengrais « Gmax Nitromax » commercialisé par la Société « Greenmax Agro Tech », qui contient un mélange d'*Azospirillum* et d'*Azotobacter*. Ce bioengrais peut être utilisé avec les céréales pour fournir, selon les données du fournisseur, environ 30% de l'azote nécessaire à la croissance des plantes (<http://www.greenmaxagrotech.com/azospirillum.html>).

Il reste cependant que les bactéries introduites dans la rhizosphère restent soumises à une forte compétition avec une microflore très abondante et que les échanges métaboliques

avec le système racinaire de la plante hôte sont limités par rapport à une véritable symbiose. La quantité d'azote fixé ne dépasserait pas en moyenne 5 kg d'azote/ha, ce qui ne répond pas à la totalité des besoins en azote des céréales. L'optimisation de cette stratégie repose sur des programmes de sélection de PGPR adaptés aux céréales cultivées et possédant un fort potentiel de fixation d'azote.

2. L'introduction du complexe nitrogénase chez les céréales

L'objectif est de transférer les gènes permettant la biosynthèse et l'activité du complexe enzymatique nitrogénase dans des organites des végétaux. Les bactéries fixatrices d'azote possèdent une vingtaine de gènes impliqués dans le processus de transformation de l'azote atmosphérique en ammoniacque, ou gènes *nif* « nitrogen fixation ». Les techniques de transformation génétique des plantes permettent désormais de faire du « multigene engineering », c'est-à-dire de réaliser l'introduction de caractères complexes et multigéniques (Naqvi *et al.*, 2010). Cependant, une des propriétés limitant cette approche est que le complexe nitrogénase est extrêmement sensible à l'oxygène ; il doit donc bénéficier d'un environnement anaérobie pour éviter une inactivation irréversible par l'oxygène. Les organites cibles envisagés dans le contexte de cette stratégie sont soit les chloroplastes, soit les mitochondries, qui sont tous deux en mesure de fournir les concentrations d'adénosine 5' triphosphate et le pouvoir réducteur nécessaires pour l'activité nitrogénase.

Pour ce qui est des chloroplastes, bien que l'activité photosynthétique conduit à la production d'oxygène, ce qui est *a priori* incompatible avec l'activité du complexe nitrogénase, on sait qu'il existe chez les fougères, les mousses et les gymnospermes des enzymes sensibles à l'oxygène capables de fonctionner dans cet environnement (Muraki *et al.*, 2010). Photosynthèse et activité fixatrice d'azote pourraient donc être réalisées dans un même compartiment cellulaire, mais à des moments différents, l'utilisation de promoteurs spécifiques permettant de réguler de façon appropriée les gènes *nif*. Si les chloroplastes peuvent être transformés génétiquement (Wang *et al.*, 2009), l'utilisation des mitochondries a pour facteur limitant l'absence de technique d'introduction de matériel génétique dans ce compartiment cellulaire. Il faudrait donc, dans l'état actuel des connaissances, introduire les gènes *nif* dans le noyau des cellules végétales de la plante hôte, puis adresser les protéines dans les mitochondries.

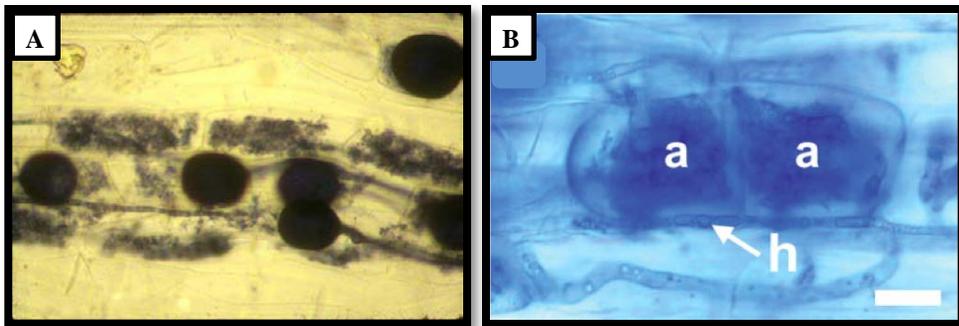


Figure 58 : Colonisation des racines des céréales par des champignons endomycorhiziens.

A : Endomycorhizes de blé ; **B** : Endomycorhizes de riz. (a) : arbuscules ; (h) : hyphes.

A : Photo INRA, A. Trovelot ; **B** : D'après Gutjahr *et al.*, 2008.

3. Des champignons endomycorhiziens abritant des bactéries fixatrices d'azote

L'équipe de P. Bonfante a mis en évidence que certains champignons endomycorhiziens contiennent des bactéries intracellulaires à l'intérieur des spores et du mycélium (Bianciotto *et al.*, 1996). Les analyses moléculaires ont révélé que ces bactéries appartiennent au genre *Burkholderia* et qu'elles possèdent l'opéron *nifKDH* codant pour les composants du complexe nitrogénase. Cette découverte de bactéries *nif* endosymbiotiques de mycorhizes est extrêmement intéressante puisque 80% des plantes, dont les céréales (**Figure 58**), peuvent développer des symbioses mycorhiziennes à arbuscules. La recherche de souches de champignons abritant des bactéries très performantes au niveau de la fixation d'azote est actuellement en cours dans certains laboratoires.

4. Le transfert de l'aptitude à former des nodosités fixatrices d'azote

Comme l'a mis en évidence mon mémoire de thèse, des progrès énormes ont été accomplis ces dernières années dans la connaissance des mécanismes moléculaires impliqués dans le dialogue plante-bactérie, et dans ceux qui permettent le développement des nodosités fixatrices d'azote chez les Légumineuses (pour revues Kouchi *et al.*, 2010 ; Oldroyd *et al.*, 2011 ; Yokota et Hayashi, 2011). Si la communauté de chercheurs étudiant les plantes actinorhiziennes est plus restreinte, il n'en reste pas moins que des résultats majeurs ont été obtenus récemment, avec en particulier la démonstration que deux acteurs de la voie SYM commune, *SymRK* (Gherbi *et al.*, 2008a) et *CCaMK* (Benabdoun *et al.* article soumis à publication), sont nécessaires à la mise en place de la symbiose actinorhizienne.

Le succès de la nodulation chez les céréales repose d'une part sur des modifications induites chez les bactéries fixatrices d'azote choisies (*Frankia* ou *Rhizobium*), permettant une infection du système racinaire des céréales, et d'autre part sur des modifications de l'hôte permettant le développement de nodosités qui abriteront le microorganisme symbiotique. Il a été découvert récemment que la structure des facteurs Myc produite par les champignons endomycorhiziens est très voisine de celle des NFs (voir **Figure 52** pour la structure chimique des NFs et des facteurs Myc) (Maillet *et al.*, 2011) ; les modifications permettant à un symbiote de produire les molécules signal conduisant à l'infection des céréales ne semblent donc pas trop complexes à réaliser.

L'existence de la voie SYM commune entre le processus de nodulation et d'endomycorhization est également un élément encourageant pour la mise en place de cette stratégie, puisque comme je l'ai indiqué, les céréales vivent en symbiose avec les champignons endomycorhiziens (Gutjahr *et al.*, 2008). Les résultats obtenus dans le chapitre II de ma thèse mettent en évidence que des formes tronquées de CgCCaMK sont à elles seules capables d'induire une organogénèse nodulaire chez *C. glauca*. Une des perspectives de mon travail de thèse sera bien sûr de déterminer si ces constructions peuvent induire des nodules spontanés chez le blé, le maïs ou le riz.

En complément à cette approche ciblée sur des gènes clés du processus symbiotique, des approches génomiques sont en cours, tant au niveau des Légumineuses que des plantes actinorhiziennes et des céréales, pour comparer les programmes endosymbiotiques (Hochoer *et al.*, 2011a ; Moreau *et al.*, 2011). Les résultats mettront en évidence quels sont les gènes d'endosymbiose qui existent déjà chez les céréales, et ceux qui devront être introduits pour assurer une fixation d'azote.

Longtemps considéré comme un objectif relevant de l'utopie, faire fixer l'azote aux céréales relève désormais du domaine du possible, même s'il est encore difficile de prédire combien d'années seront encore nécessaires pour atteindre cet objectif.

IV. Revue

**« COMPOSITE ACTINORHIZAL PLANTS WITH
TRANSGENIC ROOTS FOR THE STUDY OF SYMBIOTIC
ASSOCIATIONS WITH FRANKIA »**

J. Bot. vol 2011, p. 1-8 (2011)

Review Article

Composite Actinorhizal Plants with Transgenic Roots for the Study of Symbiotic Associations with *Frankia*

Faiza Meriem Benabdoun,^{1,2} Mathish Nambiar-Veetil,^{1,3} Leandro Imanishi,^{1,4} Sergio Svistoonoff,¹ Nadia Ykhlef,² Hassen Gherbi,¹ and Claudine Franche¹

¹Institut de Recherche pour le Développement (IRD), 911 avenue Agropolis, BP 64501, 34394 Montpellier Cedex 5, France

²Laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologies Végétales, Département de Biologie et d'Ecologie, Université Mentouri, Route Ain El Bey, Constantine, Algeria

³Institute of Forest Genetics and Tree Breeding, Forest Campus, R. S. Puram, Coimbatore 641002, India

⁴Laboratorio de Bioquímica, Microbiología e Interacciones Biológicas en el Suelo (LBMIBS), Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes, R. Sáenz Peña 352, Bernal B1876BXD, Argentina

Correspondence should be addressed to Claudine Franche, claudine.franche@ird.fr

Received 8 July 2011; Accepted 24 August 2011

Academic Editor: Johann Greilhuber

Copyright © 2011 Faiza Meriem Benabdoun et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

More than 200 species of dicotyledonous plants belonging to eight different families and 24 genera can establish actinorhizal symbiosis with the nitrogen-fixing soil actinomycete *Frankia*. Compared to the symbiotic interaction between legumes and rhizobia, little is known about the molecular basis of the infection process and nodule formation in actinorhizal plants. Here, we review a gene transfer system based on *Agrobacterium rhizogenes* that opens the possibility to rapidly analyze the function of candidate symbiotic genes. The transformation protocol generates “composite plants” that consist of a nontransgenic aerial part with transformed hairy roots. Composite plants have already been obtained in three different species of actinorhizal plants, including the tropical tree species *Casuarina glauca*, the Patagonian shrub *Discaria trinervis*, and the nonwoody plant *Datisca glomerata*. The potential of this technique to advancing our understanding of the molecular mechanisms underlying infection by *Frankia* is demonstrated by functional analyses of symbiotic genes.

1. Introduction

Actinorhizal plants have the ability to form root nodules in symbiotic association with the soil actinomycete *Frankia* and are capable of high rates of nitrogen fixation, comparable to those of legumes [1–3]. More than 200 species of dicotyledonous plants, belonging to eight different families and 24 genera, can establish actinorhizal symbioses. They are trees and woody shrubs, such as *Alnus*, *Casuarina*, *Eleagnus*, and *Myrica*, with one exception, the nonwoody species *Datisca*. They are distributed throughout temperate and tropical regions and, due to their ability to grow on poor and degraded soils, are often pioneer species. Like Legumes, actinorhizal symbioses can add a large amount of fixed nitrogen to several ecosystems including temperate forests, sandy

tropical areas, and mine wastes. In symbiotic association with both *Frankia* and mycorrhizal fungi, actinorhizal trees can help rehabilitate degraded areas and are also used in forestry for the production of timber and pulpwood, to stabilize desert and coastal dunes, and crop windbreak [4–6].

Possibly due to their wide range of host plants, actinorhizal nodules show considerable variability in structure, oxygen protection mechanisms, and physiology, making it difficult to choose a single model actinorhizal plant to acquire the necessary basic knowledge on the symbiotic interaction with *Frankia*. In recent years, molecular and genomic studies have mainly focused on three actinorhizal species including two trees, the tropical species *Casuarina glauca* and the temperate species *Alnus glutinosa*, plus the herbaceous species *Datisca glomerata* [7–10]. Both *C. glauca*

and *A. glutinosa* are infected by *Frankia* via an intracellular process involving penetration into deformed root hairs [11–13]. In *D. glomerata*, although the colonization process is not fully understood, the nodulation process is likely to occur via intercellular colonization of the host root [14].

The recent development of transcriptomics in actinorhizal plants has led to the identification of many candidate genes that could play a key role in different stages of the symbiotic process [9, 10]. The production of genetically modified actinorhizal plants is a prerequisite for the molecular and physiological analysis of gene function during the symbiotic interaction with *Frankia*. However, developing a genetic transformation procedure based on *A. tumefaciens* is often challenging since it requires both an efficient gene transfer protocol and the development of a reliable *in vitro* regeneration method. With the exception of the two *Casuarinaceae* trees, *Allocasuarina verticillata* [15] and *C. glauca* [16] in which stable genetic transformation has been achieved using the disarmed strain of *A. tumefaciens* C58C1 [17], there are no other reports of stably transformed actinorhizal plants [18].

Agrobacterium rhizogenes could provide an alternative to the labor intensive genetic transformation by *A. tumefaciens*. *A. rhizogenes* is a gram-negative soil bacterium responsible for the development of hairy root disease in a number of dicotyledonous plants [19]. It transfers into the genome of the infected host plant a T-DNA fragment from the bacterial root-inducing (Ri) plasmid that carries genes encoding enzymes that control auxin and cytokinin biosynthesis [20]. The resulting modifications in the hormonal balance induce the formation of roots at the wounding site that are morphologically different from normal roots. Hairy roots are characterized by a rapid hormone-independent growth, are much more highly branched, possess numerous root hairs, and exhibit plagiotropic root development. *A. rhizogenes* has proven to be a valuable tool for generating transgenic roots that are easy to grow and can be used for a range of applied biological purposes including metabolic engineering and phytoremediation, and the production of valuable metabolites [21].

A. rhizogenes hairy roots have other applications in many areas of research including symbiotic nitrogen fixation where they provide a tool for root nodule studies. This pathogenic bacterium can be used to generate composite plants consisting of transformed hairy roots induced on a nontransgenic shoot [22, 23]. This procedure allows a more rapid analysis of transformed roots than the methods used to generate plants that are stably transformed by *A. tumefaciens*. The approach was first used in Legumes to study the symbiotic interaction with rhizobia. Transformation techniques that generate composite plants have been then reported for *Lotus corniculatus* [23], *Trifolium rupens* [24], *Vigna aconitifolia* [25], *Glycine max* [26–28], *Vicia hirsuta* [29], *Lotus japonicus* [30], *Trifolium pratense* [31], *Medicago truncatula* [32], *Lupinus albus* [33], *Phaseolus vulgaris* [34, 35], *Arachis hypogea* [36], and *Aeschynomene indica* [37].

Composite plants appear to be a suitable tool for functional analysis of the symbiotic genes in actinorhizal plants. Since most actinorhizal plants are trees or shrubs, developing

TABLE 1: Induction of hairy roots by *A. rhizogenes* on actinorhizal plants.

Actinorhizal plants	Strains of <i>A. rhizogenes</i>	References
<i>Alnus glutinosa</i> , <i>Alnus acuminata</i>	A4, 1855, 8196, K599	[38]
<i>Elaeagnus angustifolia</i>	K599	[38]
<i>Allocasuarina verticillata</i>	A4RS, 8196, 2659	[42]
<i>Casuarina glauca</i>	A4RS, ARqual	[43, 44]
<i>Datisca glomerata</i>	LBA 1334	[45]
<i>Discaria trinervis</i>	A4RS, ARqual	[46]

rapid genetic transformation procedures to generate data on candidate symbiotic genes is of particular interest. In the present paper, we review transformation methods in which *A. rhizogenes* has been used in actinorhizal species. Recent advances in knowledge of the *Frankia* infection process based on the use of composite plants have been described.

2. *Agrobacterium rhizogenes*-Mediated Transformation of Actinorhizal Plants

2.1. Susceptibility of Actinorhizal Plants to *A. rhizogenes*. *A. rhizogenes*-mediated transformation was first described in the actinorhizal plants *Alnus glutinosa*, *A. acuminata*, and *Elaeagnus angustifolia* [38]. Inoculations were performed with two agropine-type strains, A4 [39] and 1855 [40], the manopine-type strain 8196 [41] and the cucumopine-type strain K599 [38] (Table 1). Whereas hairy roots were observed on the seedlings of *Alnus*, the authors reported that nodule-like structures, so called pseudoactinorhizae, proliferated following the inoculation of *E. angustifolia* with the strain K599.

In 1991, it was subsequently shown that *A. verticillata*, a member of the *Casuarinaceae* family, was susceptible to three different strains of *A. rhizogenes*, A4, 8196, and 2659, a cucumopine-type strain [47] (Table 1). All three agrobacteria induced hairy roots on inoculated hypocotyls of 30-day-old germinated seedlings [42]. It was noted that shoot regeneration occurred spontaneously in 90% of the 2659-transformed roots after three months of culture on hormone-free nutrient medium, thereby, allowing the regeneration of fully transformed plants of *A. verticillata*. Since this actinorhizal tree species was not chosen for the isolation of symbiotic genes, the composite plant approach was never developed further.

Due to its small genome size, *C. glauca* was the species in the *Casuarinaceae* family chosen to decipher the symbiotic interaction between *Frankia* and its host at the molecular level. As a result, genetic transformation procedures allowing functional analysis of the candidate symbiotic genes were developed together with the genomic resources. In 1995, Diouf et al. [43] reported that the *A. rhizogenes* strain A4RS could be used to obtain composite plants that were nodulated by *Frankia*. The strain of *A. rhizogenes* ARqual [29] that is used to obtain composite plants of *M. truncatula* [32] has

also been shown to be effective on *C. glauca* (H. Gherbi, unpublished data).

More recently, two other actinorhizal plants, the non-woody plant *D. glomerata*, and *Discaria trinervis*, a shrub from Patagonia [48], were shown to be effectively transformed by *A. rhizogenes* to generate hairy roots [45, 46] (Table 1). Composite plants of *D. glomerata* were generated using the *A. rhizogenes* strain LBA 1334 [49]. In *D. trinervis*, both A4RS and ARqual induced transgenic roots in wounded plants, but they differed in their phenotype because the genetic transformation by A4RS had a strong impact on the alteration of root architecture [46].

2.2. Transformation Procedures. Inoculations with *A. rhizogenes* involve wounding on the hypocotyls of young seedlings with a needle dipped in a fresh colony (or culture in exponential growth) of the chosen *A. rhizogenes* strain. This technique was successful in *A. glutinosa*, *A. acuminata*, *A. verticillata*, *C. glauca*, and *D. trinervis*. In *D. glomerata*, an original transformation system consisted of injecting the agrobacterium culture into the stem of 12-week-old plants [45].

In *C. glauca*, an alternative procedure consisted in sectioning the radicle of the seedlings with a scalpel and then coating the sectioned surface with *A. rhizogenes*. However, hairy roots developed in less than 30% of the sectioned plants, whereas when hypocotyls were inoculated with a needle, hairy roots developed in 95% of the plants.

To generate composite plants, the normal nontransformed root system is removed from the actinorhizal plants about three weeks after inoculation with *A. rhizogenes*, and, when possible, cotransformed roots containing the newly introduced genes from the appropriate binary vector are selected. The whole process of generating composite actinorhizal plants takes 2-3 months. It then takes an additional 2-3 months to perform the nodulation or mycorrhization experiments [43]. In *C. glauca*, it was observed that, although the shoot was not transgenic, composite plants exhibited an altered aerial part with shorter internodes. This alteration of phenotype is probably linked to the modification of the hormonal balance in the transgenic root system displaying the hairy root phenotype.

2.3. Selection of Cotransformed Hairy Roots. One advantage of *A. rhizogenes*-mediated transformation is that transgenic roots can be obtained without using a selection agent. Hairy root morphology is used for the primary selection of transgenic root. However, when performing a cotransformation with an *A. rhizogenes* strain harboring a binary vector, a selection procedure with either a reporter gene or an antibiotic resistance gene is usually necessary to detect the cotransformed roots and to facilitate molecular and phenotypic analyses of the composite plants. According to our experience with *C. glauca*, following the analysis of several hundred of composite plants, the rate of cotransformed hairy roots could vary from 20% to 65%. In order to identify the cotransformed roots, a constitutively expressed reporter gene such as β -glucuronidase (GUS) [52], DsRED1 [53], or green

fluorescent protein (GFP) [54] gene can be included in the T-DNA of the binary vector. DsRED1 and GFP appeared to be the best candidates since they can be visualized in roots under UV light. DsRED1 fluorescence was chosen to select the cotransformed roots of *D. glomerata* emerging at the sites of inoculation with LBA 1334 [45]. In *C. glauca* and *D. trinervis*, cotransformation events were usually monitored with GFP fluorescence [44, 46]. The intensity of fluorescence was generally correlated with the level of expression of the other genes carried on the T-DNA of the binary vector. In RNAi experiments designed to downregulate symbiotic genes in *C. glauca*, hairy roots displaying a high level of fluorescence also exhibited a strong extinction of the candidate symbiotic gene as determined by q-RT-PCR (H. Gherbi, unpublished data).

Kanamycin selection of cotransformed roots of *C. glauca* has occasionally been performed using the *nptII* gene in the transferred T-DNA. A range of kanamycin concentrations was tested to inhibit the growth of noncotransformed hairy roots on agar plates. A concentration of 12.5 mg per liter was found to be sufficient to alter the growth of roots deprived of the *nptII* gene without affecting the nontransformed shoot. After three weeks of incubation with kanamycin, the noncotransformed roots were gray whereas the cotransformed roots remained pink and continued to undergo rapid growth in the agar. However, once the composite plants were transferred in hydropony for nodulation experiments with *Frankia*, the selection with kanamycin could not be applied, and the noncotransformed roots could grow due to the long kinetics experiments of nodulation in actinorhizal plants (2-3 months in RNAi experiments).

2.4. Nodulation of Actinorhizal Composite Plants. Hairy root morphology in plants varies considerably between species with differences in root thickness, degree of branching, and amount of root hair production. The differences in response to *A. rhizogenes* infection could be due to combined factors resulting from genotype-strain interactions, response to *rol* gene products, together with the effects of endogenous and exogenous hormones [20]. In the actinorhizal tree *C. glauca*, A4RS-induced hairy roots exhibited a marked hairy root phenotype [43]. It was found that the nodulation process was affected since only 30% to 60% of the composite plants developed nodules after inoculation with *Frankia*, whereas 90% to 100% of the nontransformed plants were nodulated. Although hairy roots usually tend to have very profuse root hairs, composite plants of *C. glauca* have fewer root hairs, which possibly affected the efficiency of nodulation. In addition, the nodulation process was often delayed by about two weeks. However, nodules that developed on composite plants were found to fix nitrogen, and their anatomy resembled that of nontransformed control nodules, making it possible to use this approach for promoter and RNAi studies. With the ARqual strain, the hairy-root phenotype was less pronounced in *C. glauca*, but this had no significant impact on the efficiency of nodulation by *Frankia*.

In *D. trinervis*, the nodulation process was not affected in composite plants resulting from the inoculation with ARqual [46]. Nodules exhibited the same structural features

as those of control plants. Furthermore, the negative regulation of nodulation by nitrogen was maintained in the transgenic roots since the addition of NH_4NO_3 at 100 ppm was found to inhibit nodule formation in composite plants. In *D. glomerata*, the possible alteration of the nodulation resulting from the expression of the oncogenes of *A. rhizogenes* LBA 1335 was not reported by the authors [45].

3. Studies of the Infection Process

Actinorhizal nodules only develop under conditions of nitrogen deprivation, and it is assumed that plant roots emit signals of still unknown nature that are perceived by *Frankia*. To date, the early stages of this original nodulation process remains rather poorly known [55–58]. In particular, the lack of a genetic transformation system in *Frankia* has prevented the introduction of a *gfp* gene that would allow visualisation of the progression of the hyphae in the host [59, 60]. The early stages of the infection process can thus be studied mainly by the analysis of transgenic roots expressing reporter genes under the control of promoters from early expressed symbiotic genes.

Two promoters, *PCg12* and *PMtEnod11*, have been found to drive the reporter gene in *Frankia*-infected cells. *Cg12* is an actinorhizal symbiotic gene isolated from *C. glauca* [61] that encodes a subtilisin-like serine protease (subtilase). Plant subtilases are represented by large gene families and have been shown to be involved in stomata and seed development, in the maintenance of the shoot apical meristem and of the cell wall, in the processing of peptide growth factors, and in response to the biotic and abiotic environment [62]. Using roots of *C. glauca* genetically transformed with a *PCg12-GUS* or a *PCg12-GFP* construct, it was shown that reporter gene expression occurred during the first steps of the infection process, when *Frankia* was invading deformed root hairs and in root and nodule cortical cells containing growing infection threads [63]. *Cg12* expression was correlated with plant cell invasion by the endosymbiont from the start of the symbiotic process, thereby, providing a valuable tool to visualize and count the number of infected root hairs, and subsequently to monitor the progression of the hyphae in the plant root. This promoter is currently being introduced into *D. trinervis* to monitor the progression of *Frankia* hyphae during the intercellular infection process (S. Svistoonoff and L. Wall, unpublished data).

The second sequence is *PMtEnod11*, the promoter region from the early nodulin gene *MtEnod11* from *M. truncatula* [64]. In legumes, *PMtEnod11-GUS* is transcribed in the root epidermis in response to Nod factors, during preinfection and infection stages of root and nodule tissues [32]. It is also expressed during endomycorrhization, thereby, providing a valuable tool to study the initial stages of endosymbiotic interactions [65]. Interestingly, it was found that, in *C. glauca* plants transformed with *PMtEnod11-GUS*, although no induction was observed in the root epidermis, reporter gene expression was conserved in the infected zones of the roots and actinorhizal nodules [66]. The same construct was introduced using the composite plant approach in

D. trinervis. In the nodules, GUS activity was observed in the infection zone, in cortical cells infected by *Frankia* that do not yet fix nitrogen [46]. Therefore, this heterologous promoter from a legume is an additional tool to monitor both intracellular and intercellular infection processes in actinorhizal plants.

4. RNAi to Downregulate Actinorhizal Symbiotic Genes

The development of genetic and genomic tools for the model legumes *M. truncatula* and *Lotus japonicus* has contributed to the isolation and characterization of genes required for root nodule symbiosis [65, 67, 68]. Some of these genes have been designated as “common Sym” genes since they are involved in the establishment of both rhizobia and mycorrhizal symbioses. The “common Sym pathway” includes genes encoding a leucine-rich-repeat (LRR) receptor kinase (*SymRK*), cation channels, nuclear pore complex proteins, a calcium and calmodulin-dependent protein kinase (*CCaMK*), a nuclear coiled protein, and a transcription factor (*NSP1*) [68]. The question was whether these symbiotic genes were shared in the signal transduction pathway in response to *Frankia* factors.

To answer this question, studies focused on the receptor-like kinase gene *SymRK* and based on RNAi experiments using composite plants were undertaken in both *C. glauca* and in *D. glomerata*. In legumes, *SymRK* (also referred to as *NORK* in *Medicago sativa* and *DMI2* in *M. truncatula*) encodes a leucine-rich receptor kinase that is needed for bacterial and endomycorrhizal infection, and Nod factor induced calcium spiking in the root epidermis [69–71]. Based on similarity with legume *SymRK* sequences, *CgSymRK* and *DgSymRK* were isolated from *C. glauca* and *D. glomerata*, respectively. Downregulation of both actinorhizal *SymRK* genes resulting from a RNAi approach revealed that the frequency of nodulated RNAi-*CgSymRK* and RNAi-*DgSymRK* plants was dramatically reduced compared to that in control plants. In *C. glauca*, a two-fold reduction in the number of nodulated plants was observed [51], and in *D. glomerata*, only 16% of the transformed roots exhibited some nodule-like structures [45]. In addition, a range of morphological alterations was observed in the downregulated *SymRK* nodules. Whereas mature nodules in the control *C. glauca* plants were multilobed, RNAi nodules were considerably reduced in size and consisted, in the strongly silenced lines, of a single thin lobe that did not fix nitrogen and had a very short nodular root [51]. Cytological analysis showed that these aberrant nodular structures accumulated high levels of phenolic compounds and contained cortical infected cells that were smaller than those of control nodular lobes. In *D. glomerata*, small primordial swellings were occasionally observed when *Frankia* infection was able to proceed due to incomplete downregulation of *DgSymRK*.

Additional experiments revealed that *SymRK* was also necessary for the establishment of the symbiosis with the arbuscular mycorrhiza *Glomus intraradices* in actinorhizal plants. The knockdown of both *CgSymRK* and *DgSymRK*

was seen to strongly affect penetration of the fungal hyphae into the root cortex, thus, revealing the key role of SymRK in root endosymbioses for both *C. glauca* and *D. glomerata* [45, 51].

The conservation of the SymRK function between legumes and actinorhizal plants could reflect a common genetic program for endosymbiosis development and suggests that, during their evolution, root nodule endosymbioses recruited the genes necessary for arbuscular mycorrhizal symbiosis. To further investigate the conservation of the common Sym pathway in actinorhizal plants, additional studies to functionally characterize *C. glauca* sequences homologous to the calmodulin-dependent protein kinase (*CCaMK*) gene are in progress using the composite plant system.

5. Knowledge Generated by Composite Plants Derived from Shoots Stably Transformed by *A. tumefaciens*

Genetic transformation of *C. glauca* can also be achieved using the *A. tumefaciens* strain C58C1 (pGV2260) [16], and stably transformed plants can be regenerated in six to nine months. Using transgenic shoots, it was possible to induce hairy roots after inoculation by *A. rhizogenes* and hence to introduce a second set of genes in the root system for additional study.

We used this procedure to study the impact of the down-regulation of *CgCCaMK* on the number of infection sites following inoculation by *Frankia*. *CgCCaMK* was isolated in *C. glauca* and is homologous with the calmodulin-dependent protein kinase genes from Legumes [72, 73]. In absence of a GFP-expressing *Frankia* strain, transgenic *PCg12-GUS* plants are the best tools to visualize and count the infection sites during the early stages of the symbiotic process [63]. *PCg12-GUS* transgenic shoots were retransformed by *A. rhizogenes* A4RS containing in a binary vector the RNAi-*CgCCaMK* construct and a 35S-GFP transcriptional fusion, and then inoculated by the *Frankia* strain Cd3. Control plants included *PCg12-GUS* shoots transformed with A4RS. Seven to 10 days after inoculation, a GUS test was performed on the whole GFP-positive hairy-root systems to locate blue-stained infected root hairs [46]. Total root length was measured and that and the number of blue root hairs were compared with data obtained in the control hairy roots. The average number of blue hairs per cm of root decreased about 10-fold in RNAi-*CgCCaMK* hairy roots compared to the number in the control composite plants, revealing the essential role of *CgCCaMK* in the root hair infection process by *Frankia* (H. Gherbi, unpublished data).

Functional analysis of *CgAUX1*, a gene that encodes a high-affinity auxin influx transporter in *C. glauca*, also produced interesting results. Using the *GUS* gene driven by the *CgAUX1* promoter, it was established that auxin plays an important role during plant cell infection in actinorhizal symbiosis [72]. *CgAUX1-GUS* was found to be strongly expressed both during root hair infection and cortical cell invasion by *Frankia*. In mature nodules, strong reporter gene expression was observed in the nodule vascular system

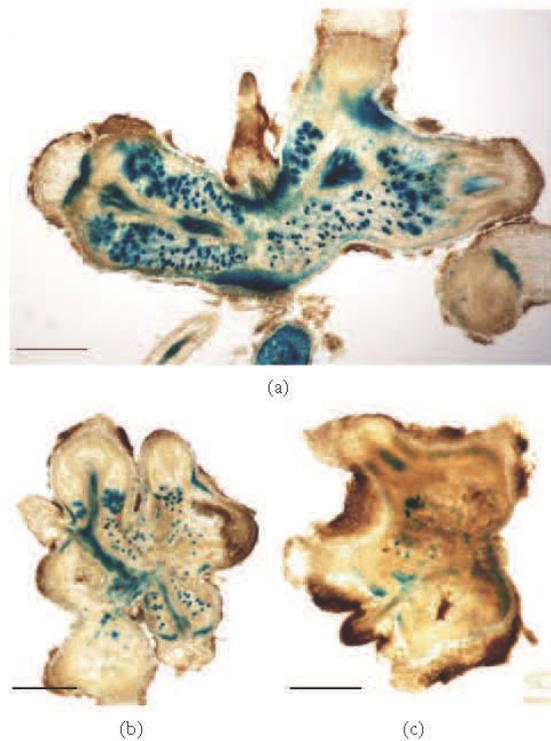


FIGURE 1: β -glucuronidase expression in hairy roots of *AUX1-GUS* *C. glauca* plants silenced with a RNAi-*CgSymRK* construct. *AUX1-GUS* plants were obtained after genetic transformation with the strain of *A. tumefaciens* C58C1 as described in [50], and transgenic shoots were then inoculated with a strain of *A. rhizogenes* A4RS containing either an empty vector (a) or a vector with a 35S-*CgSymRK*-hairpin construct to downregulate the expression of the receptor-like kinase gene *SymRK* from *C. glauca* (b, c) [51]. Composite plants were screened for GFP expression, inoculated with *Frankia*, and β -glucuronidase gene expression was studied in 50 μ m three-week-old nodule sections. (a) In nonsilenced nodules, *AUX1-GUS* expression was observed in the nodule vascular system, the nodule apical zone at the basis of the nodular root, in the *Frankia* infected cells, and in the phellogen. (b, c) In the RNAi-*CgSymRK* nodules from two different composite plants, *AUX1-GUS* expression was found to be strongly affected; a strong alteration of the nodule size correlated with a low residual activity of the reporter gene (c). Bars: a = 1 mm, b = 500 μ m, and c = 250 μ m.

and at the base of the nodular root, and in the large cortical cells infected by *Frankia*, corresponding to the nitrogen-fixation zone; some reporter gene activity was also observed in the nodule secondary meristem corresponding to the phellogen (Figure 1(a)). When *CgAUX1-GUS* plants obtained after genetic transformation by *A. tumefaciens* were retransformed with the *A. rhizogenes* strain A4RS containing a RNAi-*CgSymRK* construct [70], a major alteration of the *CgAUX1-GUS* expression was observed in the small nodules whose phenotype was deeply altered by downregulation of *CgSymRK* (Figures 1(b) and 1(c)). The blue staining was hardly visible in the infected cortical cells; reporter gene

expression was also greatly reduced in the phellogen and in the apex of the nodule. These data indicate a strong alteration of *CgAUX1* expression linked to the low expression of the receptor kinase gene *CgSymRK*. A disturbance of the influx of auxin could be involved in the modification of the phenotype of the RNAi nodules. The smallest nodules were observed on composite plants exhibiting a strong GFP fluorescence. These nodular structures were characterized by a low *AUX1*-driven reporter gene expression and by the absence of nodular root (Figure 1(c)).

6. Conclusions

The potential of *A. rhizogenes* to investigate the nitrogen fixing interactions between *Frankia* and actinorhizal plants has been shown in *C. glauca*, a member of the *Casuarinaceae* family [47], in *D. glomerata*, a member of the *Datisceae* [43], and in *D. trinervis*, a member of the *Rhamnaceae* [48]. These actinorhizal plants are characterized by either intracellular or intercellular infection processes; they exhibit nodules with different structures and are infected by specific strains of *Frankia*. Composite plants provide a valuable and fast strategy to downregulate or overexpress putative symbiotic genes and to acquire fundamental knowledge on their role during infection and nodule ontogenesis in these diverse nitrogen-fixing plants. This knowledge will certainly help understand the wide range of molecular mechanisms underlying the actinorhizal nodulation process in different plant families.

Acknowledgments

This work was supported by the *Institut de Recherche pour le Développement* (IRD) and by the *Agence Nationale de la Recherche* (ANR) Blanc project NewNod (ANR-06-BLAN-0095) and SESAM (BLAN-1708-01), by the ECOS-SUD project A07B02 and Bernardo Houssay program (2998). F. M. Benabdoun was supported by a Ph.D. grant from Averroes program (EU). M. Nambiar-Veetil was financially supported by a grant from the Department of Biotechnology, Ministry of Science and Technology, Government of India. L. Imanishi was supported by the IRD Department of Capacity-Building for Southern Scientific Communities (IRD-DPPF), University of Quilmes, and the Argentinean National Research Council (CONICET).

References

- [1] L. G. Wall, "The actinorhizal symbiosis," *Journal of Plant Growth Regulation*, vol. 19, no. 2, pp. 167–182, 2000.
- [2] J. O. Dawson, "Ecology of actinorhizal plants," in *Nitrogen-Fixing Actinorhizal Symbioses-Nitrogen Fixation Research: Origins and Progress*, K. Pawlowski and W. E. Newton, Eds., vol. 6, pp. 199–234, Springer, New York, NY, USA, 2008.
- [3] C. Franche, K. Lindström, and C. Elmerich, "Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants," *Plant and Soil*, vol. 321, no. 1-2, pp. 35–59, 2009.
- [4] J. O. Dawson, "Actinorhizal plants: their use in forestry and agriculture," *Outlook on Agriculture*, vol. 15, no. 4, pp. 202–208, 1986.
- [5] H. G. Diem and Y. R. Dommergues, "Current and potential uses and management of *Casuarinaceae* in the tropics and subtropics," in *The Biology of Frankia and Actinorhizal Plants*, R. Schwintzer and I. D. Tjepkema, Eds., pp. 317–342, Academic Press, San Diego, Calif, USA, 1990.
- [6] C. Zhong, Y. Zhang, Y. Chen et al., "Casuarina research and applications in China," *Symbiosis*, vol. 50, no. 1-2, pp. 107–114, 2010.
- [7] L. Laplaze, S. Svistoonoff, C. Santi, F. Auguy, C. Franche, and D. Bogusz, "Molecular biology of actinorhizal symbioses," in *Nitrogen Fixation Research: Origins and Progress*, K. Pawlowski and W. E. Newton, Eds., vol. 6, pp. 235–259, Springer, New York, NY, USA, 2008.
- [8] K. Pawlowski, "Induction of actinorhizal nodules by *Frankia*," in *Prokaryotic Symbionts in Plants, Microbiol Monographs*, K. Pawlowski, Ed., vol. 8, pp. 127–154, Springer, Berlin, Germany, 2009.
- [9] V. Hocher, F. Auguy, X. Argout, L. Laplaze, C. Franche, and D. Bogusz, "Expressed sequence-tag analysis in *Casuarina glauca* actinorhizal nodule and root," *New Phytologist*, vol. 169, no. 4, pp. 681–688, 2006.
- [10] V. Hocher, N. Alloisio, F. Auguy et al., "Transcriptomics of actinorhizal symbioses reveals homologs of the whole common symbiotic signaling cascade," *Plant Physiology*, vol. 156, no. 2, pp. 700–711, 2011.
- [11] D. Callahan, W. Newcomb, J. G. Torrey, and R. L. Peterson, "Root hair infection in actinomycete-induced root nodule initiation in *Casuarina*, *Myrica* and *Comptonia*," *Botanical Gazette*, vol. 140, pp. S1–S9, 1979.
- [12] A. M. Berry, L. McIntyre, and M. E. McCully, "Fine structure of root hair infection leading to nodulation in the *Frankia-Ainus* symbiosis," *Canadian Journal of Botany*, vol. 64, no. 2, pp. 292–305, 1986.
- [13] A. M. Berry and L. A. Sunnel, "The infection process and nodule development," in *The Biology of Frankia and Actinorhizal Plants*, C. R. Schwintzer and J. D. Tjepkema, Eds., pp. 61–81, Academic Press, New York, NY, USA, 1990.
- [14] R. H. Berg, B. Langenstein, and W. B. Silvester, "Development in the *Datisca-Coriaria* nodule type," *Canadian Journal of Botany*, vol. 77, no. 9, pp. 1334–1350, 1999.
- [15] C. Franche, D. Diouf, Q. V. Le et al., "Genetic transformation of the actinorhizal tree *Allocauarina verticillata* by *Agrobacterium tumefaciens*," *Plant Journal*, vol. 11, no. 4, pp. 897–904, 1997.
- [16] A. Smouni, L. Laplaze, D. Bogusz et al., "The 35S promoter is not constitutively expressed in the transgenic tropical actinorhizal tree *Casuarina glauca*," *Functional Plant Biology*, vol. 29, no. 5, pp. 649–656, 2002.
- [17] G. Vancanneyt, R. Schmidt, A. O'Connor-Sanchez, L. Willmitzer, and M. Rocha-Sosa, "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," *Molecular and General Genetics*, vol. 220, no. 2, pp. 245–250, 1990.
- [18] S. Svistoonoff, H. Gherbi, M. Nambiar-Veetil et al., "Contribution of transgenic *Casuarinaceae* to our knowledge of the actinorhizal symbioses," *Symbiosis*, vol. 50, no. 1-2, pp. 3–11, 2010.
- [19] D. Tepfer, "Genetic transformation using *Agrobacterium rhizogenes*," *Physiologia Plantarum*, vol. 79, pp. 140–146, 1990.
- [20] M. T. Britton, M. A. Escobar, and M. Dandekar, "The oncogenes of *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium rhizogenes*," in *Agrobacterium: From Biology to Biotechnology*, T. Tzfira and V. Citovsky, Eds., pp. 525–563, Springer, 2008.

- [21] S. Guillon, J. Trémouillaux-Guiller, P. K. Pati, M. Rideau, and P. Gantet, "Hairy root research: recent scenario and exciting prospects," *Current Opinion in Plant Biology*, vol. 9, no. 3, pp. 341–346, 2006.
- [22] K. H. Beach and P. M. Gresshoff, "Characterization and culture of *Agrobacterium rhizogenes* transformed roots of forage legumes," *Plant Science*, vol. 57, no. 1, pp. 73–81, 1988.
- [23] J. Hansen, J. E. Jørgensen, J. Stougaard, and K. A. Marcker, "Hairy roots—a short cut to transgenic root nodules," *Plant Cell Reports*, vol. 8, no. 1, pp. 12–15, 1989.
- [24] C. L. Díaz, P. C. van Spronsen, R. Bakhuizen, G. J. J. Logman, E. J. J. Lugtenberg, and J. W. Kijne, "Correlation between infection by *Rhizobium leguminosarum* and lectin on the surface of *Pisum sativum* L. roots," *Planta*, vol. 168, no. 3, pp. 350–359, 1986.
- [25] N. G. Lee, B. Stein, H. Suzuki, and D. P. S. Verma, "Expression of antisense nodulin-35 RNA in *Vigna aconitifolia* transgenic root nodules retards peroxisome development and affects nitrogen availability to the plant," *Plant Journal*, vol. 3, no. 4, pp. 599–606, 1993.
- [26] C. Cheon, N. G. Lee, A. B. M. Siddique, A. K. Bal, and D. P. S. Verma, "Roles of plant homologs of Rab1p and Rab7p in the biogenesis of the peribacteroid membrane, a subcellular compartment formed *de novo* during root nodule symbiosis," *EMBO Journal*, vol. 12, no. 11, pp. 4125–4135, 1993.
- [27] A. Kereszt, D. Li, A. Indrasumunar et al., "*Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of soybean to study root biology," *Nature Protocols*, vol. 2, no. 4, pp. 948–952, 2007.
- [28] D. Cao, W. Hou, S. Song et al., "Assessment of conditions affecting *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of soybean," *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, vol. 96, no. 1, pp. 45–52, 2009.
- [29] H. J. Quandt, A. Pühler, and I. Broer, "Transgenic root nodules of *Vicia hirsuta*: a fast and efficient system for the study of gene expression in indeterminate-type nodules," *Molecular Plant-Microbe Interactions*, vol. 6, no. 6, pp. 699–706, 1993.
- [30] J. Stiller, L. Martirani, S. Tuppale, R. J. Chian, M. Chiurazzi, and P. M. Gresshoff, "High frequency transformation and regeneration of transgenic plants in the model legume *Lotus japonicus*," *Journal of Experimental Botany*, vol. 48, no. 312, pp. 1357–1365, 1997.
- [31] C. L. Díaz, H. P. Spaink, and J. W. Kijne, "Heterologous rhizobial lipochitin oligosaccharides and chitin oligomers induce cortical cell divisions in red clover roots, transformed with the pea lectin gene," *Molecular Plant-Microbe Interactions*, vol. 13, no. 3, pp. 268–276, 2000.
- [32] A. Boisson-Dernier, M. Chabaud, F. Garcia, G. Bécard, C. Rosenberg, and D. G. Barker, "*Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Medicago truncatula* for the study of nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations," *Molecular Plant-Microbe Interactions*, vol. 14, no. 6, pp. 695–700, 2001.
- [33] C. Uhde-Stone, J. Liu, K. E. Zinn, D. L. Allan, and C. P. Vance, "Transgenic proteoid roots of white lupin: a vehicle for characterizing and silencing root genes involved in adaptation to P stress," *Plant Journal*, vol. 44, no. 5, pp. 840–853, 2005.
- [34] G. Estrada-Navarrete, X. Alvarado-Affantranger, J. E. Olivares et al., "*Agrobacterium rhizogenes* transformation of the *Phaseolus* spp.: a tool for functional genomics," *Molecular Plant-Microbe Interactions*, vol. 19, no. 12, pp. 1385–1393, 2006.
- [35] N. Colpaert, S. Tilleman, M. van Montagu, G. Gheysen, and N. Terry, "Composite *Phaseolus vulgaris* plants with transgenic roots as research tool," *African Journal of Biotechnology*, vol. 7, no. 4, pp. 404–408, 2008.
- [36] S. Sinharoy, S. Saha, S. R. Chaudhury, and M. DasGupta, "Transformed hairy roots of *Arachis hypogaea*: a tool for studying root nodule symbiosis in a non-infection thread legume of the Aeschynomeneae tribe," *Molecular Plant-Microbe Interactions*, vol. 22, no. 2, pp. 132–142, 2009.
- [37] K. Bonaldi, H. Gherbi, C. Franche et al., "The Nod factor-independent symbiotic signaling pathway: development of *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation for the legume *Aeschynomene indica*," *Molecular Plant-Microbe Interactions*, vol. 23, no. 12, pp. 1537–1544, 2010.
- [38] M. A. Savka, L. Liu, S. K. Farrand, R. H. Berg, and J. O. Dawson, "Induction of hairy roots or pseudoactinorhizae on *Alnus glutinosa*, *A. acuminata* and *Eleagnus angustifolia* by *Agrobacterium rhizogenes*," *Acta Oecologica*, vol. 13, pp. 423–431, 1992.
- [39] L. Moore, G. Warren, and F. Strobel, "Involvement of a plasmid in the hairy root disease of plants caused by *Agrobacterium rhizogenes*," *Plasmid*, vol. 2, no. 4, pp. 617–626, 1979.
- [40] M. Cardarelli, L. Spanò, A. de Paolis, M. L. Mauro, G. Vitali, and P. Costantino, "Identification of the genetic locus responsible for non-polar root induction by *Agrobacterium rhizogenes* 1855," *Plant Molecular Biology*, vol. 5, no. 6, pp. 385–391, 1985.
- [41] J. Koplów, M. C. Byrne, G. Jen, J. Tempé, and M. D. Chilton, "Physical map of the *Agrobacterium rhizogenes* strain 8196 virulence plasmid," *Plasmid*, vol. 11, pp. 130–140, 1984.
- [42] M. Phelep, A. Petit, L. Martin, E. Duhoux, and J. Tempé, "Transformation and regeneration of a nitrogen-fixing tree, *Allocauarina verticillata* Lam.," *Nature Biotechnology*, vol. 9, no. 5, pp. 461–466, 1991.
- [43] D. Diouf, H. Gherbi, Y. Prin, C. Franche, E. Duhoux, and D. Bogusz, "Hairy root nodulation of *Casuarina glauca*: a system for the study of symbiotic gene expression in an actinorhizal tree," *Molecular Plant-Microbe Interactions*, vol. 8, no. 4, pp. 532–537, 1995.
- [44] H. Gherbi, K. Markmann, S. Svistoonoff et al., "*SymRK* defines a common genetic basis for plant root endosymbioses with arbuscular mycorrhiza fungi, rhizobia, and *Frankia* bacteria," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 105, no. 12, pp. 4928–4932, 2008.
- [45] K. Markmann, G. Giczey, and M. Parniske, "Functional adaptation of a plant receptor-kinase paved the way for the evolution of intracellular root symbioses with bacteria," *PLoS Biology*, vol. 6, no. 3, p. e68, 2008.
- [46] L. Imanishi, A. Vayssière, C. Franche, D. Bogusz, L. Wall, and S. Svistoonoff, "Transformed hairy roots of *Discaria trinervis*: a valuable tool for studying actinorhizal symbiosis in the context of intercellular infection," *Molecular Plant-Microbe Interactions*, vol. 24, no. 11, pp. 1317–1324, 2011.
- [47] E. Davioud, A. Petit, M. E. Tate, M. H. Ryder, and J. Tempé, "Cucumopine—a new T-DNA-encoded opine in hairy root and crown gall," *Phytochemistry*, vol. 27, no. 8, pp. 2429–2433, 1988.
- [48] C. Valverde and L. G. Wall, "Time course of nodule development in the *Discaria trinervis* (Rhamnaceae)—*Frankia* symbiosis," *New Phytologist*, vol. 141, no. 2, pp. 345–354, 1999.
- [49] J. Prell and P. Poole, "Metabolic changes of rhizobia in legume nodules," *Trends in Microbiology*, vol. 14, no. 4, pp. 161–168, 2006.
- [50] B. Péret, R. Swarup, L. Jansen et al., "Auxin influx activity is associated with *Frankia* infection during actinorhizal nodule formation in *Casuarina glauca*," *Plant Physiology*, vol. 144, no. 4, pp. 1852–1862, 2007.
- [51] H. Gherbi, M. Nambiar-Veetil, C. Zhong et al., "Post-transcriptional gene silencing in the root system of the actinorhizal

- tree *Allocauarina verticillata*," *Molecular Plant-Microbe Interactions*, vol. 21, no. 5, pp. 518–524, 2008.
- [52] R. A. Jefferson, T. A. Kavanagh, and M. W. Bevan, "GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants," *EMBO Journal*, vol. 6, no. 13, pp. 3901–3907, 1987.
- [53] M. V. Matz, A. E. Fradkov, Y. A. Labas et al., "Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species," *Nature Biotechnology*, vol. 17, no. 10, pp. 969–973, 1999.
- [54] J. Haselhoff, "GFP variants for multispectral imaging of living cells," in *Methods in Cell Biology*, S. Kay and K. Sullivan, Eds., vol. 58, pp. 139–151, Academic Press, New York, NY, USA, 1999.
- [55] H. Cérémonie, F. Debellé, and M. P. Fernandez, "Structural and functional comparison of *Frankia* root hair deforming factor and rhizobia Nod factor," *Canadian Journal of Botany*, vol. 77, no. 9, pp. 1293–1301, 1999.
- [56] T. V. Bhuvaneshwari and B. Solheim, "Root-hair interactions in actinorhizal symbioses," in *Root Hairs—Cell and Molecular Biology*, R. W. Ridge and A. M. C. Emons, Eds., pp. 311–327, Springer, 2000.
- [57] K. Pawlowski and J. Sprent, "Comparison between actinorhizal and legume symbioses," in *Nitrogen-Fixing Actinorhizal Symbiose*, K. Pawlowski and W. E. Newton, Eds., pp. 261–288, Springer, Dordrecht, The Netherlands, 2008.
- [58] L. G. Wall and A. M. Berry, "Early interactions, infection and nodulation in actinorhizal symbiosis," in *Nitrogen-Fixing Actinorhizal Symbioses*, K. Pawlowski and W. E. Newton, Eds., pp. 147–166, Springer, Dordrecht, The Netherlands, 2008.
- [59] C. Lavire and B. Cournoyer, "Progress on the genetics of the N₂-fixing actinorhizal symbiont *Frankia*," *Plant and Soil*, vol. 254, no. 1, pp. 125–137, 2003.
- [60] K. I. Kucho, K. Kakoi, M. Yamaura, S. Higashi, T. Uchiyumi, and M. Abe, "Transient transformation of *Frankia* by fusion marker genes in liquid culture," *Microbes and Environments*, vol. 24, no. 3, pp. 231–240, 2009.
- [61] L. Laplaze, A. Ribeiro, C. Franche et al., "Characterization of a *Casuarina glauca* nodule-specific subtilisin-like protease gene, a homolog of *Alnus glutinosa ag12*," *Molecular Plant-Microbe Interactions*, vol. 13, no. 1, pp. 113–117, 2000.
- [62] R. Rose, A. Schaller, and C. Ottmann, "Structural features of plant subtilases," *Plant Signaling and Behavior*, vol. 5, no. 2, pp. 180–183, 2010.
- [63] S. Svistoonoff, L. Laplaze, F. Auguy et al., "Cg12 expression is specifically linked to infection of root hairs and cortical cells during *Casuarina glauca* and *Allocauarina verticillata* actinorhizal nodule development," *Molecular Plant-Microbe Interactions*, vol. 16, no. 7, pp. 600–607, 2003.
- [64] E. P. Journet, N. El-Gachtouli, V. Vernoud et al., "*Medicago truncatula* ENOD11: a novel RPRP-encoding early nodulin gene expressed during mycorrhization in arbuscule-containing cells," *Molecular Plant-Microbe Interactions*, vol. 14, no. 6, pp. 737–748, 2001.
- [65] L. H. Madsen, L. Tirichine, A. Jurkiewicz et al., "The molecular network governing nodule organogenesis and infection in the model legume *Lotus japonicus*," *Nature Communications*, vol. 1, no. 1, pp. 1–12, 2010.
- [66] S. Svistoonoff, M. O. Sy, N. Diagne, D. G. Barker, D. Bogusz, and C. Franche, "Infection-specific activation of the *Medicago truncatula* Enod11 early nodulin gene promoter during actinorhizal root nodulation," *Molecular Plant-Microbe Interactions*, vol. 23, no. 6, pp. 740–747, 2010.
- [67] G. E. D. Oldroyd and J. A. Downie, "Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes," *Annual Review of Plant Biology*, vol. 59, pp. 519–546, 2008.
- [68] H. Kouchi, H. Imaizumi-Anraku, M. Hayashi et al., "How many peas in a pod? Legume genes responsible for mutualistic symbioses underground," *Plant and Cell Physiology*, vol. 51, no. 9, pp. 1381–1397, 2010.
- [69] G. Endre, A. Kereszt, Z. Kevei, S. Mihacea, P. Kaló, and G. B. Kiss, "A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development," *Nature*, vol. 417, no. 6892, pp. 962–966, 2002.
- [70] S. Stracke, C. Kistner, S. Yoshida et al., "A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis," *Nature*, vol. 417, no. 6892, pp. 959–962, 2002.
- [71] W. Capoen, S. Goormachtig, R. de Rycke, K. Schroyers, and M. Holsters, "SrSymRK, a plant receptor essential for symbiosome formation," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 102, no. 29, pp. 10369–10374, 2005.
- [72] J. Lévy, C. Bres, R. Geurts et al., "A putative Ca²⁺ and calmodulin-dependent protein kinase required for bacterial and fungal symbioses," *Science*, vol. 303, no. 5662, pp. 1361–1364, 2004.
- [73] R. M. Mitra, C. A. Gleason, A. Edwards et al., "A Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase required for symbiotic nodule development: gene identification by transcript-based cloning," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 101, no. 13, pp. 4701–4705, 2004.



Références bibliographiques

-A-

Abdelguerfi, A. & Ramdane, S. A. (2003). Evaluation des besoins en matière de renforcement des capacités nécessaires à la conservation et l'utilisation durable de la biodiversité importante pour l'agriculture. Bilans des Expertises sur «La Biodiversité Importante pour l'Agriculture en Algérie ». Tome XI.

Abdelguerfi, A., Zeghida, A., Sherwood, K., Poulisse, J., Van Den Berger, T. & Montagne, D. (2005). Utilisation des engrais par culture en Algérie. Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture : Service de la gestion des terres et de la nutrition des plantes. 1 éd., FAO, Rome, 43p.

Abraham, T. K. (2005). Indian Village Beats Tsunami with Tree Power [online]. <http://www.planetark.com/dailynewsstory.cfm?newsid=29275&newsdate=31-Jan-2005> [accessed 10-Sep-2011].

Alloisio, N., Félix, S., Maréchal, J., Pujic, P., Rouy, Z., Vallenet, D., Medigue, C. & Normand, P. (2007). *Frankia alni* proteome under nitrogen-fixing and nitrogen-replete conditions. *Physiol Plant* 13(3): 440-453.

Alloisio, N., Queiroux, C., Fournier, P., Pujic, P., Normand, P., Vallenet, D., Medigue, C., Yamaura, M., Kakoi, K. & Kucho, K. (2010). The *Frankia alni* symbiotic transcriptome. *Mol Plant Microbe Interact* 23(5): 593-607.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403-410.

Andriankaja, A., Boisson-Dernier, A., Frances, L., Sauviac, L., Jauneau, A., Barker, D. G. & de Carvalho-Niebel, F. (2007). AP2-ERF Transcription Factors Mediate Nod Factor-Dependent Mt *ENOD11* Activation in Root Hairs via a Novel *cis*-Regulatory. *Motif plant cell* 19(9): 2866-2885.

Ané, J. M., Kiss, G. B., Riely, B. K., Penmetsa, R. V., Oldroyd, G. E., Ayax, C., Lévy, J., Debelle, F., Baek, J. M., Kaló, P., Rosenberg, C., Roe, B. A., Long, S. R., Dénarié, J. & Cook, D. R. (2004). *Medicago truncatula DMII* required for bacterial and fungal symbioses in legumes. *Science* 303(5662): 1364-1367.

Arrighi, J. F., Barre, A., Ben Amor, B., Bersoult, A., Soriano, L. C., Mirabella, R., de Carvalho-Niebel, F., Journet, E. P., Gherardi, M., Huguet, T., Geurts, R., Dénarié, J., Rouge, P. & Gough, C. (2006). The *Medicago truncatula* lysin motif-receptor-like kinase gene family includes *NFP* and new nodule-expressed genes. *Plant Physiol* 142(1): 265-279.

Auguy, F., Abdel-Lateif, K., Doumas, P., Badin, P., Guerin, P., Bogusz, D. & Hocher, V. (2011). Isoflavonoids pathway activation in actinorhizal symbioses. *Funct Plant Biol* 38(9): 690-696.

-B-

Banba, M., Gutjahr, C., Miyao, A., Hirochika, H., Paszkowski, U., Kouchi, H. & Imaizumi-Anraku, H. (2008). Divergence of Evolutionary Ways Among Common *sym* Genes: CASTOR and CCaMK Show Functional Conservation Between Two Symbiosis Systems and Constitute the Root of a Common Signaling Pathway. *Plant Cell Physiol* 49(11): 1659-1671.

Bargali, K. (2011). Actinorhizal plants of Kumaun Himalaya and their ecological significance. *Afr J Plant Sci* 5(7): 401-406.

Bateman, A. & Bycroft, M. (2000). The structure of a LysM domain from *E. coli* membrane-bound lytic murein transglycosylase D (MltD). *J Mol Biol* 299(4): 1113-1119.

Beatty, P. H. & Good, A. G. (2011). Future prospects for cereals that fix nitrogen. *Science* 333(6041): 416-417.

Benabdoun, F. M., Nambiar-Veetil, M., Imanishi, L., Svistoonoff, S., Ykhlef, N., Gherbi, H. & Franche, C. (2011). Composite Actinorhizal Plants with Transgenic Roots for the Study of Symbiotic Associations

with *Frankia*. *J Bot* 2011: 1-8.

Ben Amor, B. B., Shaw, S. L., Oldroyd, G. E., Maillet, F., Penmetsa, R. V., Cook, D., Long, S. R., Dénarié, J. & Gough, C. (2003). The *NFP* locus of *Medicago truncatula* controls an early step of Nod factor signal transduction upstream of a rapid calcium flux and root hair deformation. *Plant J* 34(4): 495-506.

Benoit, L. F. & Berry, A. M. (1997). Flavonoid-like compounds from red alder (*Alnus rubra*) influence nodulation by *Frankia* (Actinomycetales). *Physiol Plant* 99(4): 588- 593.

Bensaïd, S. (1995). Bilan critique du barrage vert en Algérie. *Sécheresse* 6(3): 247-255.

Benson, D. R. & Silvester, W. B. (1993). Biology of *Frankia* strains, actinomycete symbionts of actinorhizal plants. *Microbiol Rev* 57(2): 293-319.

Berg, R. H. (1999). *Frankia* forms infection threads. *Can J Bot* 77(9): 1327-1333.

Berg, R. H., & McDowell, L. (1987). Endophyte differentiation in *Casuarina* actinorhizae. *Protoplasma* 136(2-3): 104-117.

Berman-Frank, I., Rosenberg, G., Levitan, O., Haramaty, L. & Mari, X. (2007). Coupling between autocatalytic cell death and transparent exopolymeric particle production in the marine *Cyanobacterium trichodesmium*. *Environ Microbiol* 9(6): 1415-1422.

Berry, A. L. & Sunnel, L. A. (1990). The infection process and nodule development. In: *The Biology of Frankia and Actinorhizal Plants* (eds. Schwintzer, C. R. & TieDkema, D. J.), Academic Press, New York, pp. 83-106.

Bersoult, A., Camut, S., Perhald, A., Kereszt, A., Kiss, G. B. & Cullimore, J. V. (2005). Expression of the *Medicago truncatula DM12* gene suggests roles of the symbiotic nodulation receptor kinase in nodules and during early nodule development. *Mol Plant Microbe Interact* 18(8): 869-876.

Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis. I. the mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 62: 293-300.

Bevan, M., Barnes, W. M. & Chilton, M. D. (1983). Structure and transcription of the nopaline synthase gene region of T-DNA. *Nucleic Acids Res* 11(2): 369-85.

Bhattacharya, A., Sood, P. & Citovsky, V. (2010). The roles of plant phenolics in defence and communication during *Agrobacterium* and *Rhizobium* infection. *Mol Plant Pathol* 11(5): 705-19.

Biabani, A., Carpenter Boggs, L., Natasha, K. & Morad, U. (2012). Microscopic morphology of nitrogen fixing paranodules on wheat roots. *Afr J Biotechnol* 11(12): 2971-2976.

Bianciotto, V., Bandi, C., Minerdi, D., Sironi, M., Tichy, H. V. & Bonfante, P. (1996). An obligatory endosymbiotic mycorrhizal fungus itself harbors obligatory intracellular bacteria. *Appl Environ Microbiol* 62: 3005-3010.

Boisson-Dernier, A., Andriankaja, A., Chabaud, M., Niebel, A., Journet, E. P., Barker, D. G., & de Carvalho-Niebel, F. (2005). *MtENOD11* gene activation during rhizobial infection and mycorrhizal arbuscule development requires a common AT-rich-containing regulatory sequence. *Mol Plant Microbe Interact* 18(12): 1269-1276.

Boonburapong, B. & Buaboocha, T. (2007). Genome-wide identification and analyses of the rice calmodulin and related potential calcium sensor proteins. *BMC Plant Biol* 7: 1-17.

Braatz, S., Fortuna, S., Broadhead, J., & Leslie, R. (2006). Coastal protection in the aftermath of the Indian Ocean tsunami: What role for forests and trees?. In: *Proceedings of the Regional Technical Workshop, Khao*

Lak-Thailand, 28-31 August 2006, pp. 1-217.

Broughton, W. J. & Dilworth, M. J. (1971). Control of leghaemoglobin synthesis in snake beans. *Biochem J* 125: 1075-1080.

Busk, P. K. & Pages, M. (1998). Regulation of abscisic acid-induced transcription. *Plant Mol Biol* 37: 425-435.

Buvana, R. & Kannaiyan, S. (2002). Influence of cell wall degrading enzymes on colonization of N₂ fixing bacterium, *Azorhizobium caulinodans* in rice. *Indian J Exp Biol* 40(3): 369-372.

-C-

Callaham, D. & Torrey, J. G. (1977). Prenodule formation and primary nodule development in roots of *Comptonia* (Myricaceae). *Can J Bot* 51: 2306-2318.

Callaham, D., Deltredici, P. & Torrey, J. G. (1978). Isolation and Cultivation *in vitro* of the Actinomycete Causing Root Nodulation in *Comptonia*. *Science* 199(4331): 899-902.

Callaham, D., Newcomb, W., Torrey, J. G. & Peterson, R. L. (1979). Root hair infection in actinomycete-induced root nodule initiation in *Casuarina*, *Myrica*, and *Comptonia*. *Bot Gaz* 140: 1-9.

Capoen, W., Goormachtig, S., De Rycke, R., Schroeyers, K. & Holsters, M. (2005). SrSymRK, a plant receptor essential for symbiosome formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(29): 10369-10374.

Capoen, W., Den Herder, J., Sun, J., Verplancke, C., De Keyser, A., De Rycke, R., Goormachtig, S., Oldroyd, G. & Holsters, M. (2009). Calcium spiking patterns and the role of the calcium/calmodulin-dependent kinase CCaMK in lateral root base nodulation of *Sesbania rostrata*. *Plant Cell* 21(5): 1526-1540.

Catoira, R., Galera, C., de Billy, F., Penmetsa, R. V., Journet, E. P., Maillet, F., Rosenberg, C., Cook, D., Gough, C. & Dénarié, J. (2000). Four genes of *Medicago truncatula* controlling components of a nod factor transduction pathway. *Plant Cell* 12(9): 1647-1666.

Cérémonie, H., Debelle, F. & Fernandez, M. P. (1999). Structural and functional comparison of *Frankia* root hair deforming factor and *rhizobia* Nod factor. *Can J Bot* 77(9): 1293-1301.

Cesari, S. (2009). Étude des étapes précoces de la symbiose actinorhizienne *Casuarina-Frankia* : caractérisation fonctionnelle du gène *CgDMI3*. Mémoire Master 2, Biologie Fonctionnelle des Plantes, Université Montpellier II, 65p.

Chaia, E., Dawson, J. & Wall, L. G. (2010). Life in soil by the actinorhizal root nodule endophyte *Frankia*. *Symbiosis* 51(3): 201-226.

Charpentier, M. & Oldroyd, G. (2010). How close are we to nitrogen-fixing cereals?. *Curr Opin Plant Biol* 13: 556-564.

Charpentier, M., Bredemeier, R., Wanner, G., Takeda, N., Schleiff, E. & Parniske, M. (2008). *Lotus japonicus* CASTOR and POLLUX are ion channels essential for perinuclear calcium spiking in legume root endosymbiosis. *Plant Cell* 20(12): 3467-3479.

Chase, M. W., Soltis, D. E., Olmstead, R. G., Morgan, D., Les, D. H., Mishler, B. D., Duvall, M. R., Price, R., Hills, H. G., Qiu, Y., Kron, K. A., Rettig, J. H., Conti, E., Palmer, J. D., Manhart, J. R., Sytsma, K. J., Michaels, H. J., Kress, W. J., Karol, K. G., Clark, W. D., Hedren, M., Gaut, B. S., Jansen, R. K., Kim, K. J., Wimpee, C. F., Smith, J. F., Furnier, G. R., Straus, S. H., Xiang, Q., Plunkett, G. M., Soltis, P. S., Swenson, S. M., Williams, S. E., Gladek, P. A., Quinn, C. J., Eguiarte, L. E., Golenberg, E., Jr Learn, G. H., Graham, S., Barrett, S. C., Dayanandan, S. & Albert, A. (1993). Phylogenetics of seed plants: An analysis of nucleotide sequences from the plastid gene *rbcL*. *Ann Missouri Bot Gard* 80(3): 528-580.

Chen, C., Gao, M., Liu, J. & Zhu, H. (2007). Fungal symbiosis in rice requires an ortholog of a legume common symbiosis gene encoding a Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase. *Plant Physiol* 145(4): 1619-28.

Chen, C., Ané, J. M. & Zhu, H. (2008). OsIPD3, an ortholog of the *Medicago truncatula* DMI3 interacting protein IPD3, is required for mycorrhizal symbiosis in rice. *New Phytol* 180(2): 311-315.

Cohan, J. P., Pierson, P., & Messmer, Y. (2010). Blé tendre d'hiver : Des couverts de légumineuses pour limiter la dépendance aux engrais minéraux azotés?. *Perspectives Agricoles*, 370, pp. 55-58.

Costa, J. L. & Lindblad, P. (2003). Cyanobacteria in Symbiosis with Cycads. In: Cyanobacteria in symbiosis (eds. Rai, A. N., Bergman, B. & Rasmussen, U.), Kluwer academic publishers, Dordrecht, pp. 153-178.

Costa, J. L., Paulsrud, P. & Lindblad, P. (1999). Cyanobiont diversity within coralloid roots of selected cycad species. *FEMS Microbiol Ecol* 28(1): 85-91.

Cournoyer, B. & Lavire, C. (1999). Analysis of *Frankia* evolutionary radiation using *glnII* sequences. *FEMS Microbiol Lett* 177(1): 29-34.

Cournoyer, B. & Normand, P. (1992). Relationship between electroporation conditions, electropermeability and respiratory activity for *Frankia* strain ACN14a. *FEMS Microbiol Lett* 73(1-2): 95-99.

-D-

D'Haese, W. & Holsters, M. (2002). Nod factor structures, responses, perception during initiation of nodule development. *Glycobiology* 12(6): 79-105.

Dawson, J. O. (2008). Ecology of actinorhizal plants. In: Nitrogen-Fixing Actinorhizal Symbioses- Nitrogen Fixation Research: Origins and Progress (eds. Pawlowski, P. & Newton, W. E.), Springer, New York, pp. 199-234.

De Koninck, P & Schulman, H. (1998). Sensitivity of CaM kinase II to the frequency of Ca²⁺ oscillations. *Science* 279(5348): 227-230.

Dénarié, J., Debelle, F. & Prome, J. C. (1996). *Rhizobium* lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annu Rev Biochem* 65(1): 503-535.

Diem, H. G. (1996). Les mycorhizes des plantes actinorhiziennes. *Acta bot. Gallica* 143(7): 581-592.

Diem, H. G. & Dommergues, R. Y. (1990). First report on isolation and culture of effective *Casuarina*-compatible strains of *Frankia* from Egypt. In: Advances in *Casuarina* research and utilization (eds. El-Lakany, M. H., Turnbull, J. W., & Brewbaker, J. L.), Desert Development Center American University, Cairo, pp. 156-164.

Diem, H. G., Gauthier, D. & Dommergues, Y. R. (1982). Isolation of *Frankia* from nodules of *Casuarina equisetifolia*. *Cari J Microbiol* 28(5): 526-530.

Diouf, D., Gherbi, H., Prin, Y., Franche, C., Duhoux, E. & Bogusz, D. (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(4): 532-537.

Diouf, D., Sy, M. O., Gherbi, H., Bogusz, D. & Franche, C. (2008). *Casuarinaceae*. In: Compendium of Transgenic Crop Plants: Transgenic Forest Tree Species (eds. Kole, C. R., Scorza, R. & Hall, T. C.), Blackwell Publishing, Oxford, pp. 279-292.

Dommergues, Y., Duhoux, E., & Hoang, G. D. (1999). Les arbres fixateurs d'azote : Caractéristiques fondamentales et rôle dans l'aménagement des écosystèmes méditerranéens et tropicaux (ed. Dommergues, Y.), pp. 475. Editions Espace.

- Downie, J. A.** (2005). Legume haemoglobins: symbiotic nitrogen fixation needs bloody nodules. *Curr Biol* 15(6): 196-198.
- Downie, J. A. & Walker, S. A.** (1999). Plant responses to nodulation factors. *Curr Opin Plant Biol* 2(6): 483-489.
- Doyle, J. J. & Luckow, M. A.** (2003). The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiol* 131(3): 900-910.
- Dreyfus, B., Garcia, J. L. & Gills, M.** (1988). *Characterization of Azorhizobium caudodans* gen. nov., sp. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. *Int J Syst Bacteriol* 38(1): 89-98.
- Duhoux, E. & Nicole, M.** (2004). Atlas de Biologie végétale : associations et interactions chez les plantes. 1 éd., Beaume-les-Dames, Dunod, 166p.
- Duhoux, E., Franche, C., & Bogusz, D.** (2000). Diversité fonctionnelle de la racine : mise en évidence et fondements moléculaires. *Cah Agric* 9(4): 293-356.
- Duhoux, E., Franche, C., Bogusz, D., Diouf, D., Le, Q. V., Gherbi, H., Sougoufara, B., Le Roux, C., & Dommergues, Y.** (1996). *Casuarina* and *Allocauarina* Species. *Biotechnol Agr Forest* 35: 76-94.
- E-**
- Endre, G., Kereszt, A., Kevei, Z., Mihacea, S., Kaló, P. & Kiss, G. B.** (2002). A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature* 417(6892): 962-966.
- F-**
- Fisher, R. F., Egelhoff, T. T., Mulligan, J. T. & Long, S. R.** (1988). Specific binding of proteins from *Rhizobium meliloti* cell-free extracts containing NodD to DNA sequences upstream of inducible nodulation genes. *Genes Dev* 2(3): 282-293.
- Fontaine, M. S., Young, P. H. & Torrey, J. G.** (1986). Effects of long-term preservation of *Frankia* strains on infectivity, effectivity, and in vitro nitrogenase activity. *Appl Environ Microbiol* 51: 694-698.
- Franche, C. & Bogusz, D.** (2012). Signaling and communication in the actinorhizal symbiosis. In: Signaling and communication in plant symbioses (eds. S. Perotto, S. & Baluska, F.), Springer, Berlin et Heidelberg, pp. 73-92.
- Franche, C., Diouf, F., Le, Q. V., Bogusz, D., N'Diaye, A., Gherbi, H., Gobé, C. & Duhoux, E.** (1997). Genetic transformation of the actinorhizal tree *Allocauarina verticillata* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant J* 11(4): 897-904.
- Franche, C., Laplaze, L., Duhoux, E., & Bogusz, D.** (1998). Actinorhizal symbioses: Recent advances in plant molecular and genetic transformation studies. *Crit Rev Plant Sci* 17(1): 1-28.
- Franche, C., Lindström, K. & Elmerich, C.** (2009). Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant Soil* 321(1): 35-59.
- Frugier, F., Kosuta, S., Murray, J. D., Crespri, M. & Szczyglowski, K.** (2008). Cytokinin: secret agent of symbiosis. *Trends Plant Sci* 13(3): 115-120.
- G-**
- Garrity, G. M., Bell, J. A. & Lilburn, T. G.** (2003). Taxonomic Outline of Prokaryotes-Bergey's manual of systematic bacteriology. 2 éd., Springer-Verlag, New York, 395p.

- Geurts, R. & Bisseling, T. (2002). *Rhizobium* nod factor perception and signalling. *Plant Cell* 14: 239-249.
- Gherbi, H., Duhoux, E., Franche, C., Pawlowski, K., Nassar, A., Berry, A. & Bogusz, D. (1997). Cloning of a full-length symbiotic hemoglobin cDNA and *in situ* localization of the corresponding mRNA in *Casuarina glauca* root nodule. *Physiol Plant* 99(4): 608-616.
- Gherbi, H., Markmann, K., Svistoonoff, S., Estevan, J., Autran, D., Giczey, G., Auguy, F., Peret, B., Laplaze, L., Franche, C., Parniske, M. & Bogusz, D. (2008a). SymRK defines a common genetic basis for plant root endosymbioses with arbuscular mycorrhiza fungi, rhizobia, and *Frankia* bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(12): 4928-4932.
- Gherbi, H., Nambiar-Veetil, M., Zhong, C., Felix, J., Autran, D., Girardin, R., Vaissayre, V., Auguy, F., Bogusz, D. & Franche, C. (2008b). Post-transcriptional gene silencing in the root system of the actinorhizal tree *Allocauarina verticillata*. *Mol Plant Microbe Interact* 21(5): 518-524.
- Ghodhbane-Gtari, F., Essoussi, I., Chattaoui, M., Chouaia, B., Jaouani, A., Daffonchio, D., Boudabous, A., & Gtari, M. (2010). Isolation and characterization of non-*Frankia* actinobacteria from root nodules of *Alnus glutinosa*, *Casuarina glauca* and *Elaeagnus angustifolia*. *Symbiosis* 50(1-2): 51-57.
- Giraud, E., Moulin, L., Vallenet, D., Barbe, V., Cytryn, E., Avarre, J. C., Jaubert, M., Simon, D., Cartieaux, F., Prin, Y., Bena, G., Hannibal, L., Fardoux, J., Kojadinovic, M., Vuillet, L., Lajus, A., Cruveiller, S., Rouy, Z., Mangenot, S., Segurens, B., Dossat, C., Franck, W. L., Chang, W. S., Saunders, E., Bruce, D., Richardson, P., Normand, P., Dreyfus, B., Pignol, D., Stacey, G., Emerich, D., Verméglio, A., Médigue, C. & Sadowsky, M. (2007). Legumes Symbioses: Absence of *Nod* Genes in Photosynthetic Bradyrhizobia. *Science* 316(5829): 1307-1312.
- Gleason, C., Chaudhuri, S., Yang, T., Muñoz, A., Poovaiah, B. W. & Oldroyd, G. E. D. (2006). Nodulation independent of rhizobia induced by a calcium-activated kinase lacking autoinhibition. *Nature* 441(7097): 1149-1152.
- Gleason, C., Mitra, R., Kaló, P., Galera, C., Gough, C., Dénarié, J., Long, S. R. & Oldroyd, G. E. D. (2005). Activation and Perception of Calcium Oscillations During Nod Factor Signalling. In: Biological Nitrogen Fixation, Sustainable Agriculture and the Environment (eds. Wang, Y. P., Lin, M., Tian, Z. X., Elmerich, C. & Newton, W. E.), Springer, Netherlands, pp. 169-172.
- Godfroy, O. (2008). Étude génétique et moléculaire de deux gènes de *Medicago truncatula*, DMI3 et RPG, contrôlant l'établissement de symbioses racinaires. Doctorat Biosciences Végétales, Université Toulouse III - Paul Sabatier, Toulouse, 142p.
- Godfroy, O., Debelle, F., Timmers, T. & Rosenberg, C. (2006). A rice calcium- and calmodulin-dependent protein kinase restores nodulation to a legume mutant. *Mol Plant Microbe Interact* 19(5): 495-501.
- Gonzalez-Rizzo, S., Crespi, M. & Frugier, F. (2006). The *Medicago truncatula* CRE1 cytokinin receptor regulates lateral root development and early symbiotic interaction with *Sinorhizobium meliloti*. *Plant Cell* 18(10): 2680-2693.
- Gordon, A., Stevens, J. R. & Berry, A. M. (1988) Cytokinin secretion by *Frankia* sp. HFP ArI3 in defined medium. *Plant Physiol* 87(1): 15-16.
- Graham, P. H. & Vance, C. P. (2003). Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiol* 131(3): 872-877.
- Groth, M., Takeda, N., Perry, J., Uchida, H., Draxl, S., Brachmann, A., Sato, S., Tabata, S., Kawaguchi, M., Wang, T. L. & Parniske, M. (2010). *NENA*, a *Lotus japonicus* homolog of *Sec13*, is required for rhizodermal infection by arbuscular mycorrhiza fungi and rhizobia but dispensable for cortical endosymbiotic development. *Plant Cell* 22(7): 2509-2526.

Gtari, M. & Dawson, J. D. (2011). An overview of actinorhizal plants in Africa. *Funct Plant Biol* 38(9): 653-661.

Guan, C., Wolters, D. J., van Dijk, C., Akkermans, A. D. L., van Kammen, A., Bisseling, T. & Pawlowski, K. (1996). Gene expression in ineffective actinorhizal nodules of *Alnus glutinosa*. *Act Bot Gall* 143(7): 613-620.

Gutjahr, C., Banba, M., Croset, V., Kyungsook, A., Miyao, A., An, G., Hirochika, H., Imaizumi-Anraku, H. & Paszkowski, U. (2008). Arbuscular mycorrhiza-specific signaling in rice transcends the common symbiosis signaling pathway. *Plant Cell* 20: 2989-3005.

Gyaneshwar, P., Hirsch, A. M., Moulin, L., Chen, W. M., Elliott, G. N., Bontemps, C., Estrada-de Los Santos, P., Gross, E., Dos Reis, F. B., Sprent, J. I., Young, J. P. & James, E. K. (2011). Legume-Nodulating Betaproteobacteria: Diversity, Host Range, and Future Prospects. *Mol Plant Microbe Interact* 24(11): 1276-88.

-H-

Hahn, D. (2008). Polyphasic taxonomy of the genus *Frankia*. In: Nitrogen-Fixing Actinorhizal Symbioses-Nitrogen Fixation Research: Origins and Progress (eds. Pawlowski, K. & Newton, W. E.), Springer, Heidelberg, pp. 25-47.

Hammad, Y., Nalin, R., Marechal, J., Fiasson, K., Pepin, R., Berry, A. M., Normand, P. & Domenach, A. M. (2003). A possible role for phenyl acetic acid (PAA) on *Alnus glutinosa* nodulation by *Frankia*. *Plant Soil* 254(1): 193-205.

Haseloff, J. & Amos, B. (1995). GFP in plants. *Trends Genet* 11: 328-329.

Haseloff, J. & Siemering, K. R. (1998). The uses of GFP in plants. In: Green fluorescent protein: strategies, applications, and protocols (eds. Chalfie, M. & Kain, S), Wiley, New York, pp. 191-220.

Hayashi, T., Banba, M., Shimoda, Y., Kouchi, H., Hayashi, M. & Imaizumi-Anraku, H. (2010). A dominant function of *CCaMK* in intracellular accommodation of bacterial and fungal endosymbionts. *Plant J* 63(1): 141-154.

Hazledine, S., Sun, J., Wysham, D., Downie, J. A., Oldroyd, G. E. D. & Morris, R. J. (2009). Nonlinear Time Series Analysis of Nodulation Factor Induced Calcium Oscillations: Evidence for Deterministic Chaos?. *PLoS ONE* 4(8): 1-10.

He, B., Kanae, S., Oki, T., Hirabayashi, Y., Yamashiki, Y. & Takara, K. (2011). Assessment of global nitrogen pollution in rivers using an integrated biogeochemical modeling framework. *Water Res* 45(8): 2573-2586.

Hoagland, D. R. & Arnon, D. I. (1938). The water culture medium method for growing plants without soil. *California Agr Expt Stn*, 347, University of California, College of Agriculture, Berkeley, CA, USA.

Hocher, V., Alloisio, N., Auguy, F., Fournier, P., Doumas, P., Pujic, P., Gherbi, H., Queiroux, C., Da Silva, C., Wincker, P., Normand, P. & Bogusz, D. (2011a). Transcriptomics of actinorhizal symbioses reveals homologs of the whole common symbiotic signaling cascade. *Plant Physiol* 156(2): 700-711.

Hocher, V., Alloisio, N., Bogusz, D. & Normand, P. (2011b). Early signaling in actinorhizal symbioses. *Plant Signal Behav* 6(9): 1377-1379.

Hocher, V., Auguy, F., Argout, X., Laplaze, L., Franche, C. & Bogusz, D. (2006). Expressed sequence-tag analysis in *Casuarina glauca* actinorhizal nodule and root. *New Phytol* 169(4): 681-688.

Horváth, B., Yeun, L. H., Domonkos, A., Halász, G., Gobbato, E., Ayaydin, F., Miró, K., Hirsch, S., Sun, J., Tadege, M., Ratet, P., Mysore, K. S., Ané, J. M., Oldroyd, G. E. & Kaló, P. (2011). *Medicago truncatula* IPD3 is a member of the common symbiotic signaling pathway required for rhizobial and mycorrhizal

symbioses *Mol Plant Microbe Interact* 24(11): 1345-58.

Hughes, M., Donnelly, C., Crozier, A., & Wheeler, C. T. (1999). Effects of the exposure of roots of *Alnus glutinosa* to light on flavonoids and nodulation. *Can J Bot* 77(9): 1311-1315.

Huss-Danel, K. (1997). Actinorhizal symbiosis and their N₂ fixation. *New Phytol* 136(3): 375-405.

-I-

Ikeda, S., Okubo, T., Takeda, N., Banba, M., Sasaki, K., Imaizumi-Anraku, H., Fujihara, S., Ohwaki, Y., Ohshima, K., Fukuta, Y., Eda, S., Mitsui, H., Hattori, M., Sato, T., Shinano, T. & Minamisawa, K. (2011). The genotype of the calcium/calmodulin-dependent protein kinase gene (*CCaMK*) determines bacterial community diversity in rice roots under paddy and upland field conditions. *Appl Environ Microbiol* 77(13): 4399-4405.

Imaizumi-Anraku, H., Takeda, N., Charpentier, M., Perry, J., Miwa, H., Umehara, Y., Kouchi, H., Murakami, Y., Mulder, L., Vickers, K., Pike, J., Downie, J. A., Wang, T., Sato, S., Asamizu, E., Tabata, S., Yoshikawa, M., Murooka, Y., Wu, G. J., Kawaguchi, M., Kawasaki, S., Parniske, M. & Hayashi, M. (2005). Plastid proteins crucial for symbiotic fungal and bacterial entry into plant roots. *Nature* 433(7025): 527-531.

Imanishi, L., Vyssieres, A., Franche, C., Bogusz, D., Wall, L. & Svistoonoff, S. (2011). Transformed hairy roots of *Discaria trinervis*: a valuable tool for studying actinorhizal symbiosis in the context of intercellular infection. *Mol Plant Microbe Interact* 24(11): 1317-1324.

-J-

Jaffré, T., McCoy, S., Frédéric, R., Gilles, & Agastini, D. (1997). Quelle méthode de végétalisation pour la réhabilitation des anciens sites miniers de Nouvelle-Calédonie. In: *Ecologie des milieux sur roches ultramafiques et sur sols métallifères* (eds. Jaffré, T., Reeves, R. D. & Becquer, T.), Acte de la deuxième conférence internationale sur l'écologie des milieux serpentiniques, Nouméa, pp. 285-288.

Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A. & Bevan, M. W. (1987). GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* 6: 3901-3907.

Jouanin, L., Tourneur, J., Tourneur, C. & Cassedelbart, F. (1986). Restriction maps and homologies of the three plasmids of *Agrobacterium rhizogenes* strain A4. *Plasmid* 16: 124-134.

Journet, E. P., El-Gachtouli, N., Vernoud, V., de Billy, F., Pichon, M., Dedieu, A., Arnould, C., Morandi, D., Barker, D. G. & Gianinazzi-Pearson, V. (2001). *Medicago truncatula* *ENOD11*: a novel RPRP-encoding early nodulin gene expressed during mycorrhization in arbuscule-containing cells. *Mol Plant Microbe Interact* 14(6): 737-748.

-K-

Kaló, P., Gleason, C., Edwards, A., Marsh, J., Mitra, R. M., Hirsch, S., Jakab, J., Sims, S., Long, S. R., Rogers, J., Kiss, G. B., Downie, J. A. & Oldroyd, G. E. (2005). Nodulation signaling in legumes requires NSP2, a member of the GRAS family of transcriptional regulators. *Science* 308(5729): 1786-1789.

Kanamori, N., Madsen, L. H., Radutoiu, S., Frantescu, M., Quistgaard, E. M., Miwa, H., Downie, J. A., James, E. K., Felle, H. H., Haaning, L. L., Jensen, T. H., Sato, S., Nakamura, Y., Tabata, S., Sandal, N. & Stougaard, J. (2006). A nucleoporin is required for induction of Ca²⁺ spiking in legume nodule development and essential for rhizobial and fungal symbiosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(2): 359-364.

Kang, H., Zhu, H., Chu, X., Yang, Z., Yuan, S., Yu, D., Wang, C., Hong, Z. & Zhang, Z. (2011). A novel interaction between CCaMK and a protein containing the Scythe_N ubiquitin-like domain in *Lotus japonicus*. *Plant Physiol* 155(3):1312-1324.

Karimi, M., Inzé, D. & Depicker, A. (2002). GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant

transformation. *Trends Plant Sci* 7: 193-195.

Kevei, Z., Lougnon, G., Mergaert, P., Horvath, G. V., Kereszt, A., Jayaraman, D., Zaman, N., Marcel, F., Regulski, K., Kiss, G. B., Kondorosi, A., Endre, G., Kondorosi, E. & Ané, J. M. (2007). 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase 1 interacts with NORK and is crucial for nodulation in *Medicago truncatula*. *Plant Cell* 19(12): 3974-3989.

Kiss, E., Olah, B., Kaló, P., Morales, M., Heckmann, A. B., Borbola, A., Loza, A., Kontar, K., Middleton, P., Downie, J. A., Oldroyd, G. E. & Endre, G. (2009). LIN, a novel type of U-box/WD40 protein, controls early infection by rhizobia in legumes. *Plant Physiol* 151(3): 1239-1249.

Kistner, C. & Parniske, M. (2002). Evolution of signal transduction in intracellular symbiosis. *Trends Plant Sci* 7(11): 511-518.

Kosuta, S., Hazledine, S., Sun, J., Miwa, H., Morris, R. J., Downie, J. A. & Oldroyd, G. E. D. (2008). Differential and chaotic calcium signatures in the symbiosis signaling pathway of legumes. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(28): 9823-9828.

Kouchi, H., Imaizumi-Anraki, H., Hayashi, M., Hakoyama, T., Nakagawa, T., Umehara, Y., Suganuma, N. & Kawaguchi, M. (2010). How Many Peas in a Pod? Legume Genes Responsible for Mutualistic Symbioses Underground. *Plant Cell Physiol* 51(9): 1381-1397.

Kretsinger, R. H. & Nockolds, C. E. (1973). Carp muscle calcium-binding protein. II. Structure determination and general description. *J Biol Chem* 248(9): 3313-3326.

Kucho, K., Hay, A. E. & Normand, P. (2010). The determinants of the actinorhizal symbiosis. *Microbes Environ* 25(4): 241-252.

Kumagai, H. & Kouchi, H. (2003). Gene silencing by expression of hairpin RNA in *Lotus japonicus* roots and root nodules. *Mol. Plant Microbe Interact* 16: 663-668.

Kumazawa, S. & Mitsui, A. (1992). Photosynthetic activities of a synchronously grown aerobic N₂-fixing unicellular cyanobacterium, *Synechococcus* sp. Miami BG 043511. *J Gen Microbiol* 138: 467-472.

Kuppusamy, K. T., Endre, G., Prabhu, R., Penmetsa, R. V., Veereshlingam, H., Cook, D. R., Dickstein, R., & Vandenbosch, K. A. (2004). LIN, a *Medicago truncatula* gene required for nodule differentiation and persistence of rhizobial infections. *Plant Physiol* 136(3): 3682-91.

-L-

Lachapelle, J. (2004). Microscopie, méthodes d'examen, colorations. *Revue du Cercle de Mycologie de Bruxelles*, 4, pp. 35-71.

Ladha, J. K. & Reddy, P. M. (2000). The quest for nitrogen fixation in rice. In: Proceedings of the Third Working group Meeting on Assessing Opportunities for Nitrogen Fixation in Rice, Los Banos-Philippines, 9-12 August 1999, pp.1-354.

Lafay, B., Bullier, E. & Burdon, J. J. (2006). Bradyrhizobia isolated from root nodules of *Parasponia (Ulmaceae)* do not constitute a separate coherent lineage. *Int J Syst Evol Microbiol* 56(5): 1013-1018.

Lambers, H., Shane, M. W., Cramer, M. D, Pearse, S. T. & Veneklaa, E. J. (2006). Root Structure and Functioning for Efficient Acquisition of Phosphorus: Matching Morphological and Physiological Traits. *Ann Bot* 98(4): 693-713.

Laplaze, L., Duhoux, E., Franche, C., Frutz, T., Svistoonoff, S., Bisseling, T., Bogusz, D. & Pawlowski, K. (2000a). *Casuarina glauca* pre-nodule cells display the same differentiation as the corresponding nodule cells. *Mol Plant Microbe Interact* 13(1): 107-112.

- Laplaze, L., Gherbi, H., Duhoux, E., Pawlowski, K., Auguy, F., Guermache, F., Franche, C. & Bogusz, D.** (2002). Symbiotic and non-symbiotic expression of *cgMT1*, a metallothionein-like gene from the actinorhizal tree *Casuarina glauca*. *Plant Mol Biol* 49(1): 81-92.
- Laplaze, L., Ribeiro, A., Franche, C., Duhoux, E., Auguy, F., Bogusz, D. & Pawlowski, K.** (2000b). Characterization of a *Casuarina glauca* nodule-specific subtilisin-like protease gene, a homolog of *Alnus glutinosa ag12*. *Mol Plant Microbe Interact* 13(1): 113-117.
- Laplaze, L., Svistoonoff, S., Santi, C., Auguy, F., Franche, C., & Bogusz, D.** (2008). Molecular biology of actinorhizal symbioses. In: Nitrogen-Fixing Actinorhizal Symbioses-Nitrogen Fixation Research: Origins and Progress (eds. Pawlowski, K. & Newton, W. E.), Springer, New York, pp. 235-259.
- Lavire, C. & Cournoyer, B.** (2003). Progress on the genetics of the N₂-fixing actinorhizal symbiont *Frankia*. *Plant Soil* 254(1): 125-137.
- Le Jeune Indépendant.** (2009). Le niveau d'utilisation des engrais en Algérie est le plus faible tant au niveau du bassin méditerranéen qu'au Maghreb [online]. <http://www.algerie-dz.com/article17946.html> [accessed 02-Oct-2011].
- Lechevalier, M. P.** (1994). Taxonomy of the Genus *Frankia* (Actinomycetales). *Int J Syst Evol Microbiol* 44(1): 1-8.
- Lechno-Yossef, S. & Nierzwicki-Bauer, S. A.** (2002). *Azolla-Anabaena* symbiosis. In: Cyanobacteria in symbiosis (eds. Rai, A. N., Bergman, B. & Rasmussen, U.), Kluwer academic publishers, Dordrecht, pp. 153-178.
- Leigh, J. A.** (2000). Nitrogen fixation in methanogens: the archaeal perspective. *Curr Issues Mol Biol* 2(4): 125-131.
- Lerouge, P., Roche, P., Faucher, C., Maillet, F., Truchet, G., Prome, J. C. & Dénarié, J.** (1990). Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature* 344(6268): 781-784.
- Lévy, J., Bres, C., Geurts, R., Chalhoub, B., Kulikova, O., Duc, G., Journet, E. P., Ané, J. M., Lauber, E., Bisseling, T., Dénarié, J., Rosenberg, C. & Debelle, F.** (2004). A putative Ca²⁺ and calmodulin-dependent protein kinase required for bacterial and fungal symbioses. *Science* 303(5662): 1361-1364.
- Limpens, E., Franken, C., Smit, P., Willemsse, J., Bisseling, T. & Geurts, R.** (2003). LysM domain receptor kinases regulating rhizobial Nod factor-induced infection. *Science* 302(5645): 630-633.
- Limpens, E., Mirabella, R., Fedorova, E., Franken, C., Franssen, H., Bisseling, T., & Geurts, R.** (2005). Formation of organelle-like N₂-fixing symbiosomes in legume root nodules is controlled by *DMI2*. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(29): 10375-10380.
- M-
- Madsen, E. B., Antolín-Llovera, M., Grossmann, C., Ye, J., Vieweg, S., Broghammer, A., Krusell, L., Radutoiu, S., Jensen, O. N., Stougaard, J. & Parniske, M.** (2011). Autophosphorylation is essential for the *in vivo* function of the *Lotus japonicus* Nod factor receptor 1 and receptor-mediated signaling in cooperation with Nod factor receptor 5. *Plant J* 65(3): 404-417.
- Madsen, E. B., Madsen, L. H., Radutoiu, S., Olbryt, M., Rakwalska, M., Szczyglowski, K., Sato, S., Kaneko, T., Tabata, S., Sandal, N. & Stougaard, J.** (2003). A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. *Nature* 425(6958): 637-640.
- Madsen, L. H., Tirichine, L., Jurkiewicz, A., Sullivan, J. T., Heckmann, A. B., Bek, A. S., Ronson, C. W., James, E. K. & Stougaard, J.** (2010). The molecular network governing nodule organogenesis and infection in the model legume *Lotus japonicus*. *Nat Commun* 1: 1-12.

- Maillet, F., Pionsot, V., André, O., Puech-Pagès, V., Haou, A., Greunier, M., Cromer, L., Giraudet, D., Formey, D., Niebel ; A., Martinez, E.A., Driguez, H., Bécard, G. & Dénarié, J. (2011). Fungal lipochitoooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. *Nature* 469: 58-63
- Maily, D., Ndiaye, P., Margolis, H. A. & Pineau, M. (1994). Fixation des dunes et reboisement avec le filao (*Casuarina equisetifolia*) dans la zone du littoral nord du Sénégal. *For Chron* 70(3): 282-290.
- Markmann, K., Giczey, G. & Parniske, M. (2008). Functional adaptation of a plant receptor-kinase paved the way for the evolution of intracellular root symbioses with bacteria. *PLoS Biol* 6(3): 497-506
- Marsh, J. F., Rakocevic, A., Mitra, R. M., Brocard, L., Sun, J., Eschstruth, A., Long, S. R., Schultze, M., Ratet, P. & Oldroyd, G. E. (2007). *Medicago truncatula* NIN is essential for rhizobial-independent nodule organogenesis induced by autoactive calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *Plant Physiol* 144(1): 324-335.
- Mastrorunzio, J. E., Huang, Y. & Benson, D. R. (2009). Diminished exoproteome of *Frankia* spp. in culture and symbiosis. *Appl Environ Microbiol* 75(21): 6721-6728.
- McEwan, N.R. & Wheeler, C.T. (1997). An improved method for screening *Frankia* viability in strain CcI3. *Exp Biol Online* 2(13): 1-4.
- Messinese, E., Mun, J. H., Yeun, L. H., Jayaraman, D., Rouge, P., Barre, A., Lougnon, G., Schornack, S., Bono, J. J., Cook, D. R. & Ané, J. M. (2007). A novel nuclear protein interacts with the symbiotic DMI3 calcium- and calmodulin-dependent protein kinase of *Medicago truncatula*. *Mol Plant Microbe Interact* 20(8): 912-921.
- Middleton, P. H., Jakab, J., Penmetsa, R. V., Starker, C. G., Doll, J., Kaló, P., Prabhu, R., Marsh, J. F., Mitra, R. M., Kereszt, A., Dudas, B., VandenBosch, K., Long, S. R., Cook, D. R., Kiss, G. B. & Oldroyd, G. E. (2007). An ERF transcription factor in *Medicago truncatula* that is essential for Nod factor signal transduction. *Plant Cell* 19(4): 1221-1234.
- Miller, I. M. & Baker, D. D. (1986). Nodulation of Actinorhizal Plants by *Frankia* Strains Capable of Both Root Hair Infection and Intercellular Penetration. *Protoplasma* 131(1): 82-91.
- Mitra, R. M., Gleason, C. A., Edwards, A., Hadfield, J., Downie, J. A., Oldroyd, G. E. & Long, S. R. (2004). A Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase required for symbiotic nodule development: Gene identification by transcript-based cloning. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(13): 4701-4705.
- Miwa, H., Sun, J., Oldroyd, G. E. & Downie, J. A. (2006). Analysis of calcium spiking using a cameleon calcium sensor reveals that nodulation gene expression is regulated by calcium spike number and the developmental status of the cell. *Plant J* 48(6): 883-94.
- Moiroud, A. (1996). Diversité et écologie des plantes actinorhiziennes. *Acta Bot Gall* 143(7): 651-661.
- Moreau, S., Verdenaud, M., Ott, T., Letort, S., de Billy, F., Niebel, A., Gouzy, J., de Carvalho-Niebel, F. & Gamas P. (2011). Transcription reprogramming during root nodule development in *Medicago truncatula*. *PLoS One* 6(1): e16463.
- Mortier, V., Holsters, H. & Goormachtig, S. (2012). Never too many? How legumes control nodule numbers. *Plant Cell Environ* 35(2): 245-58.
- Moulin, L., Munive, A., Dreyfus, B. & Boivin-Masson, C. (2001). Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteobacteria. *Nature* 411(6840): 948-950.
- Muraki, N., Nomata, J., Ebata, K., Mizoguchi, T., Shiba, T., Tamiaki, H., Kurisu, G. & Fujita, Y. (2010). X-ray crystal structure of the light-independent protochlorophyllide reductase. *Nature* 465(7294): 110-4.
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco

tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497.

Murray, J. D., Karas, B. J., Sato, S., Tabata, S., Amyot, L. & Szczyglowski, K. (2007). A cytokinin perception mutant colonized by *Rhizobium* in the absence of nodule organogenesis. *Science* 315(5808): 101-104.

Myers, A. K., & Tisa, L. S. (2003). Effect of electroporation conditions on cell viability of *Frankia* Eu11c. *Plant Soil* 254(1): 83-88.

-N-

Naqvi, S., Farré, G., Sanahuja, G., Capell, T., Zhu, C. & Christou, P. (2010). When more is better: multigene engineering in plants. *Trends Plant Sci* 15(1): 48-56.

Narula, N., Deubel, A., Gans, W., Behl, R. K. & Merbach, W. (2006). Paranodules and colonization of wheat roots by phytohormone producing bacteria in soil. *Plant Soil* 52(3): 119-129.

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

Ndoye, A. L., Sadio, O. & Diouf, D. (2011). Genetic variation of *Casuarina equisetifolia* subsp *equisetifolia* and *C. equisetifolia* subsp *incana* populations on the northern coast of Senegal. *Genet Mol Res* 10(1): 36-46.

Normand, P. & Mullin, B. C. (2008). Prospects for the study of the ubiquitous actinomycete, *Frankia*, and its host plants. In: Nitrogen-Fixing Actinorhizal Symbioses-Nitrogen Fixation Research: Origins and Progress (eds. Pawlowski, P. & Newton, W. E.), Springer, Dordrecht, pp. 289-303.

Normand, P., Orso, S., Cournoyer, B., Jeannin, P., Chapelon, C., Dawson, J., Evtushenko, L. & Misra, A. K. (1996). Molecular phylogeny of the genus *Frankia* and related genera and emendation of the family *Frankiaceae*. *Int J Syst Bacteriol* 46(1): 1-9.

Normand, P., Queiroux, C., Tisa, L. S., Benson, D. R., Rouy, Z., Cruveiller, S. & Médigue, C. (2007). Exploring the genomes of *Frankia*. *Physiol Plant* 130(3): 331-343.

Nouioui, I., Ghodhbane-Gtari, F., Beauchemin, N. J., Tisa, L. S. & Gtari, M. (2011). Phylogeny of members of the *Frankia* genus based on *gyrB*, *nifH* and *glnII* sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek* 100(4): 579-587.

-O-

Obertello, M., Sy, M. O., Laplaze, L., Santi, C., Svistoonoff, S., Auguy, F., Bogusz, D. & Franche, C. (2003). Actinorhizal nitrogen fixing nodules: infection process, molecular biology and genomics. *Afr J Biotechnol* 2(12): 528-538.

Oldroyd, G. E. & Downie, J. A. (2004). Calcium, kinases and nodulation signalling in legumes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(7): 566-576.

Oldroyd, G. E. & Downie, J. A. (2006). Nuclear calcium changes at the core of symbiosis signalling. *Curr Opin Plant Biol* 9:351-357.

Oldroyd, G. E. & Downie, J. A. (2008). Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu Rev Plant Biol* 59: 519-546.

Oldroyd, G. E., Harrison, M. J & Paszkowski, U. (2009). Reprogramming plant cells for endosymbiosis. *Science* 324(5928): 753-754.

Oldroyd, G. E., Murray, J. D., Poole, P. S. & Downie, J. A. (2011). The rules of engagement in the

legume-rhizobial symbiosis. *Annu Rev Genet* 45: 119-44.

Op den Camp, R. H. M., De Mita, S., Lillo, A., Cao, Q., Limpens, E., Bisseling, T. & Geurts, R. (2011). A Phylogenetic Strategy Based on a Legume-Specific Whole Genome Duplication Yields Symbiotic Cytokinin Type-A Response Regulators. *Plant Physiol* 157: 2013-2022.

-P-

Paciorek, T. & Friml, J. (2006). Auxin signaling. *J Cell Sci* 119: 1199-1202.

Park, H. C., Kim, M. L., Kang, Y. H., Jeon, J. M., Yoo, J. H., Kim, M. C., Park, C. Y., Jeong, J. C., Moon, B. C., Lee, J. H., Yoon, H. W., Lee, S. H., Chung, W. S., Lim, C. O., Lee, S. Y., Hong, J. C. & Cho, M. J. (2004). Pathogen- and NaCl-induced expression of the SCaM-4 promoter is mediated in part by a GT-1 box that interacts with a GT-1-like transcription factor. *Plant Physiol* 135(4): 2150-61.

Parniske, M. (2008). Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nat Rev Microbiol* 6(10): 763-775.

Patil, S., Takezawa, D. & Poovaiah, B. W. (1995). Chimeric plant calcium/calmodulin-dependent protein kinase gene with a neural visinin-like calcium-binding domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 92(11): 4897-901.

Pawlowski, K. (2009). Induction of actinorhizal nodules by *Frankia*. In: Prokaryotic Symbionts in Plants-Microbiol Monographs (ed. Pawlowski, K), Springer, Berlin, pp. 127-154.

Pawlowski, K. & Bisseling, T. (1996). Rhizobial and Actinorhizal Symbioses: What Are the Shared Features?. *Plant Cell* 8(10): 1899-1913.

Pawlowski, K. & Sprent, J. (2008). Comparison between actinorhizal and legume symbioses. In: Nitrogen-Fixing Actinorhizal Symbioses-Nitrogen Fixation Research: Origins and Progress (eds. Pawlowski, K. & Newton, W. E.), Springer, New York, pp. 261-288.

Peiter, E., Sun, J., Heckmann, A. B., Venkateshwaran, M., Riely, B. K., Otegui, M. S., Edwards, A., Freshour, G., Hahn, M. G., Cook, D. R., Sanders, D., Oldroyd, G. E., Downie, J. A. & Ané, J. M. (2007). The *Medicago truncatula* DMII protein modulates cytosolic calcium signaling. *Plant Physiol* 145(1): 192-203.

Péret, B., Svistoonoff, S., Lahouze, B., Auguy, F., Santi, C., Dumas, P. & Laplaze, L. (2008). A Role for auxin during actinorhizal symbioses formation?. *Plant Signal Behav* 3(1): 34-35.

Péret, B., Swarup, R., Jansen, L., Devos, G., Auguy, F., Collin, M., Santi, C., Hocher, V., Franche, C., Bogusz, D., Bennett, M. & Laplaze, L. (2007). Auxin influx activity is associated with *Frankia* infection during actinorhizal nodule formation in *Casuarina glauca*. *Plant Physiol* 144(4): 1852-1862.

Perret, X., Staehelin, C. & Broughton, W. (2000). Molecular Basis of Symbiotic Promiscuity. *Microbiol Mol Biol Rev* 64(1): 180-201.

Perrine-Walker, F., Dumas, P., Lucas, M., Vaissayre, V., Beauchemin, N. J., Band, L. R., Chopard, J., Crabos, A., Conejero, G., Peret, B., King, J. R., Verdeil, J. L., Hocher, V., Franche, C., Bennett, M. J., Tisa, L. S. & Laplaze, L. (2010). Auxin carriers localization drives auxin accumulation in plant cells infected by *Frankia* in *Casuarina glauca* actinorhizal nodules. *Plant Physiol* 154(3): 1372-1380.

Perrine-Walker, F., Gherbi, H., Imanishi, L., Hocher, V., Ghodhbane-Gtari, F., Lavenus, J., Benabdoun, F. M., Nambiar-Veeti, M., Svistoonoff, S. & Laplaze, L. (2011). Symbiotic signaling in actinorhizal symbioses. *Curr Protein Pept Sci* 12(2): 156-164.

Persson, T. & Huss-Danell, K. (2009). Physiology of actinorhizal nodules. In: Prokaryotic Symbionts in Plants-Microbiology Monographs (ed. Pawlowski, K.), Springer, New York, pp. 155-178.

Persson T, Benson DR, Normand P, et al. (2011). Genome sequence of "Candidatus Frankia datiscae" Dg1, the uncultured microsymbiont from nitrogen-fixing root nodules of the dicot *Datisca glomerata*. *J Bacteriol* 193(24):7017-7018.

Poovaliah, B. W., Xia, M., Liu, Z., Wang, W., Yang, T., Sathyanarayanan, P. V. & Franceschi, V. R. (1999). Developmental regulation of the gene for chimeric calcium/calmodulin-dependent protein kinase in anthers. *Planta* 209(2): 161-71.

Prin, Y. & Duhoux, E. (1996). Les plantes actinorhiziennes. Une journée d'étude organisée par le laboratoire commun CIRAD-Forêt/ORSTOM. *Bois et Forêts des Tropiques*, 249, pp. 72-73.

Prin, Y., Duhoux, E., Diem, H. G., Roederer, Y. & Dommergu, Y. R. (1991). Aerial Nodules in *Casuarina cunninghamiana*. *Appl Environ Microbiol* 57(3): 871-874.

Pujic, N. & Normand, P. (2009). La symbiose racinaire entre la bactérie *Frankia* et les plantes actinorhiziennes. *Biofutur* 28(298): 26-29.

-Q-

Quandt, H. J., Puhler, A. & Broer, I. (1993). Transgenic root-nodules of *Vicia hirsute*: A fast and efficient system for the study of gene-expression in indeterminate-type nodules. *Mol Plant Microbe Interact* 6: 699-706.

-R-

Radutoiu, S., Madsen, L. H., Madsen, E. B., Felle, H. H., Umehara, Y., Gronlund, M., Sato, S., Nakamura, Y., Tabata, S., Sandal, N. & Stougaard, J. (2003). Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature* 425(6958): 585-592.

Radutoiu, S., Madsen, L. H., Madsen, E. B., Jurkiewicz, A., Fukai, E., Quistgaard, E. M., Albrektsen, A. S., James, E. K., Thirup, S. & Stougaard, J. (2007). LysM domains mediate lipochitin-oligosaccharide recognition and *Nfr* genes extend the symbiotic host range. *EMBO J* 26(17): 3923-3935.

Rai, A. N., Bergman, B. & Rasmussen. (2002). Cyanobacteria in symbiosis. 1 éd., Kluwer Academic, Dordrecht, Netherlands, 368p.

Ramachandiran, S., Takezawa, D., Wang, W. & Poovaliah, B. W. (1997). Functional domains of plant chimeric calcium/calmodulin-dependent protein kinase: Regulation by autoinhibitory and visinin-like domains. *J Biochem* 121: 984-990.

Ramirez-Saad, H., Janse, J. D. & Akkermans, A. D. L. (1998). Root nodules of *Ceanothus caeruleus* contain both the N₂-fixing *Frankia* endophyte and a phylogenetically related Nod-/Fix- actinomycete. *Can J Microbiol* 44(2):140-148.

Ribeiro, A., Graça, I., Pawlowski, K., & Santos, P. (2011). Actinorhizal plant. *Funct Plant Biol* 38: 639-644.

Ridge, R. W., Ridge, K. M. & Rolfe, B. G. (1993). Nodule-like structures induced on the roots of rice seedlings by addition of the synthetic auxin 2,4 dichloro-phenoxy-acetic acid. *Aust J Plant Physiol* 20: 705-717.

Riely, B. K., Lougnon, G., Ané, J. M. & Cook, D. R. (2007). The symbiotic ion channel homolog DMI1 is localized in the nuclear membrane of *Medicago truncatula* roots. *Plant J* 49(2): 208-216.

-S-

Saharan, B. S. & Nehra, V. (2011). Plant growth promoting rhizobacteria : a critical review. *Life Sci Med Res* 2011: 1-30.

- Saito, K., Yoshikawa, M., Yano, K., Miwa, H., Uchida, H., Azamizu, E., Sato, S., Tabata, S., Imaizumi-Anraku, H., Umehara, Y., Kouchi, H., Murooka, Y., Murooka, K., Downie, J. A., Parniske, M., Hayashi, M. & Kawaguchi, M. (2007).** NUCLEOPORIN85 is required for calcium spiking, fungal and bacterial symbiosis and seed production in *Lotus japonicus*. *Plant Cell* 19(2): 610-624.
- Sambrook, J., Frisch, E. F. & Maniatis, T. (1989).** Molecular cloning: A laboratory manual. 2 éd., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sathyanarayanan, P. V., Cremonesi, C. R. & Poovaiah, B. W. (2000).** Plant chimeric Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase. Role of the neural visinin-like domain in regulating autophosphorylation and calmodulin affinity. *J Biol Chem* 275(39): 30417-30422.
- Sayed, W. F. (2011).** Improving *Casuarina* growth and symbiosis with *Frankia* under different soil and environmental conditions. *Folia Microbiol* 56(1): 1-9.
- Schauser, L., Wioletta, W. & Stougaard, J. (2005).** Evolution of NIN-Like Proteins in *Arabidopsis*, Rice, and *Lotus japonicus*. *J Mol Evol* 60(2): 229-237.
- Schwencke, J. (1991).** Rapid exponential growth and increased biomass yield for some *Frankia* strains. *Plant Soil* 137: 37-41.
- Schwintzer, C. R. (1990).** Spore-positive and spore-negative nodules. In: The biology of *Frankia* and actinorhizal plants (eds. Schwintzer, C. R. & Tjepkema, J. D.), Academic Press, New York, pp. 177-193.
- Shimoda, Y., Han, L., Yamazaki, T., Suzuki, R., Hayashi, M. & Imaizumi-Anraku, H. (2012).** Rhizobial and Fungal Symbioses Show Different Requirements for Calmodulin Binding to Calcium Calmodulin-Dependent Protein Kinase in *Lotus japonicus*. *Plant Cell* 24: 304-321.
- Sieberer, B. J., Chabaud, M., Fournier, J., Timmers, A. C. & Barker, D. G. (2012).** A switch in Ca²⁺ spiking signature is concomitant with endosymbiotic microbe entry into cortical root cells of *Medicago truncatula*. *Plant J* 69(5):822-30.
- Sieberer, B. J., Chabaud, M., Timmers, A. C., Monin, A., Fournier, J. & Barker, D. G. (2009).** A Nuclear-Targeted Cameleon Demonstrates Intranuclear Ca²⁺ Spiking in *Medicago truncatula* Root Hairs in Response to Rhizobial Nodulation Factors. *Plant Physiol* 151: 1197-1206.
- Silvester, W. B. (1977).** Dinitrogen fixation by plant associations excluding legumes. In: A Treatise on dinitrogen fixation (eds. Hardy, R. W. F. & Gibson, A. H.), John Wiley and Sons, New York, pp. 141-190.
- Silvester, W. B., Berg, R., Schwintzer, C. & Tjepkema, J. (2008).** Oxygen responses, haemoglobin, and the structure and function of vesicles. In: Nitrogen-Fixing Actinorhizal Symbioses-Nitrogen Fixation Research: Origins and Progress (eds. Pawlowski, K. & Newton, W. E.), Springer, pp. 105-146.
- Singh, S. & Parniske, M. (2012).** Activation of calcium- and calmodulin-dependent protein kinase (CCaMK), the central regulator of plant root endosymbiosis. *Curr Opin Plant Biol* 15(4): 444-53.
- Sinharoy, S. & DasGupta, M. (2009).** RNA interference highlights the role of CCaMK in dissemination of endosymbionts in the Aeschynomeneae legume *Arachis*. *Mol Plant Microbe Interact* 22(11): 1466-75.
- Smit, P., Limpens, E., Geurts, R., Fedorova, E., Dolgikh, E., Gough, C. & Bisseling, T. (2007).** *Medicago* LYK3, an entry receptor in rhizobial nodulation factor signaling. *Plant Physiol* 145(1): 183-191.
- Smit, P., Raedts, J., Portyanko, V., Debelle, F., Gough, C., Bisseling, T. & Geurts, R. (2005).** NSP1 of the GRAS protein family is essential for rhizobial Nod factor-induced transcription. *Science* 308(5729): 1789-1791.
- Smouni, A., Laplaze, L., Bogusz, D., Guermache, F., Auguy, F., Duhoux, E. & Franche, C. (2002).**

The 35S promoter is not constitutively expressed in the transgenic tropical actinorhizal tree *Casuarina glauca*. *Funct Plant Biol* 29(5): 649-656.

Solans, M. & Vobis, G. (2003). Saprophytic actinomycetes associated to the rhizosphere and rhizoplane of *Discaria trinervis*. *Ecol austral* 13(1): 97-107.

Soltis, D. E., Soltis, P. S., Morgan, D. R., Swensen, S. M., Mullin, B. C., Dowd, J. M. & Martin, P. G. (1995). Chloroplast gene sequence data suggest a single origin of the predisposition for symbiotic nitrogen fixation in angiosperms. *Proc Natl Acad Sci USA* 92(7): 2647-2651.

Soltis, E. D. & Soltis, P. S. (2000). Contributions of plant molecular systematics to studies of molecular evolution. *Plant Mol Biol* 42(1): 45-75.

Stougaard, J., Jørgensen, J. E., Christensen, T., Kühle, A. & Marcker, K. A. (1990). Interdependence and nodule specificity of cis-acting regulatory elements in the soybean leghemoglobin *lbc3* and *N23* gene promoters. *Mol Gen Genet* 220(3): 353-60.

Stracke, S., Kistner, C., Yoshida, S., Mulder, L., Sato, S., Kaneko, T., Tabata, S., Sandal, N., Stougaard, J., Szczygłowski, K. & Parniske, M. (2002). A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. *Nature* 417(6892): 959-962.

Suzuki, A., Akune, M., Kogiso, M., Imagama, Y., Osuki, K., Uchiumi, T., Higashi, S., Han, S. Y., Yoshida, S., Asami, T. & Abe, M. (2004). Control of nodule number by the phytohormone abscisic acid in the roots of two leguminous species. *Plant Cell Physiol* 45(7): 914-922.

Svistonoff, S. (2003). Implication d'une subtilase dans les étapes précoces des symbioses actinorhiziennes. Doctorat Physiologie Végétale, Université Montpellier II, Montpellier, 67p.

Svistonoff, S., Gherbi, H., Nambiar-Veetil, M., Zhong, C., Michalak, Z., Laplaze, L., Vaissayre, V., Auguy, F., Hoher, V., Dumas, P., Bonneau, J., Bogusz, D. & Franche, C. (2010b). Contribution of transgenic *Casuarinaceae* to our knowledge of the actinorhizal symbioses. *Symbiosis* 50(1-2): 3-11.

Svistonoff, S., Laplaze, L., Auguy, F., Runions, J., Duponnois, R., Haseloff, J., Franche, C. & Bogusz, D. (2003). *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* 16(7): 600-607.

Svistonoff, S., Sy, M. O., Diagne, N., Barker, D. G., Bogusz, D. & Franche, C. (2010a). Infection-specific activation of the *Medicago truncatula* *Enod11* early nodulin gene promoter during actinorhizal root nodulation. *Mol Plant Microbe Interact* 23(6): 740-747.

Swensen, S. M. (1996). The evolution of actinorhizal symbioses: Evidence for multiple origins of the symbiotic association. *Am J Bot* 83(11): 1503-1512.

-T-

Takeda, N., Kistner, C., Kosuta, S., Winzer, T., Pitzschke, A., Groth, M., Sato, S., Kaneko, T., Tabata, S. & Parniske, M. (2009). Proteases in plant root symbiosis. *Phytochemistry* 68(1): 111-121.

Tirichine, L., Imaizumi-Anraku, H., Yoshida, S., Murakami, Y., Madsen, L. H., Miwa, H., Nakagawa, T., Sandal, N., Albrechtsen, A. S., Kawaguchi, M., Downie, A., Sato, S., Tabata, S., Kouchi, H., Parniske, M., Kawasaki, S. & Stougaard, J. (2006a). Dereglulation of a Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase leads to spontaneous nodule development. *Nature* 441(7097): 1153-1156.

Tirichine, L., James, E. K., Sandal, N. & Stougaard, J. (2006b). Spontaneous root-nodule formation in the model legume *Lotus japonicus*: a novel class of mutants nodulates in the absence of rhizobia. *Mol Plant Microbe Interact* 19(4): 373-82.

Tirichine, L., Sandal, N., Madsen, L. H., Radutoiu, S., Albrektsen, A. S., Sato, S., Asamizu, E., Tabata, S. & Stougaard, J. (2007). A gain-of-function mutation in a cytokinin receptor triggers spontaneous root nodule organogenesis. *Science* 315(5808): 104-107.

Tisa, L. S. & Ensign, J. C. (1987). Isolation and nitrogenase activity of vesicles from *Frankia* sp. strain EAN1pec. *J Bacteriol* 169(11): 5054-5059.

Tominaga, A., Nagata, M., Futsuki, K., Abe, H., Uchiumi, T., Abe, M., Kucho, K., Hashiguchi, M., Akashi, R., Hirsch, A. M., Arima, S. & Suzuki, A. (2009). Enhanced nodulation and nitrogen fixation in the abscisic acid low-sensitive mutant *enhanced nitrogen fixation1* of *Lotus japonicus*. *Plant Physiology* 151(4): 1965-1976.

Torrey, J.G. (1976). Initiation and development of root nodules of *Casuarina* (*Casuarinaceae*). *Amer J Bot* 63(3): 335-344.

Torrey, J. G. & Racette, S. (1989). Specificity among the *Casuarinaceae* in root nodulation by *Frankia*. *Plant Soil* 118(1-2): 157-164.

Trujillo, M. E., Kroppenstedt, R. M., Schumann, P., Carro, L. & Martinez-Molina, E. (2006). *Micromonospora coriariae* sp. nov., isolated from root nodules of *Coriaria myrtifolia*. *Int J Syst Evol Microbiol* 56(10): 2381-2385.

-V-

Valdés, M., Perez, N. O., Estrada-de Los Santos, P., Caballero-Mellado, J., Pena-Cabriales, J. J., Normand, P. & Hirsch, A. M. (2005). Non-*Frankia* actinomycetes isolated from surface-sterilized roots of *Casuarina equisetifolia* fix nitrogen. *Appl Environ Microbiol* 71(1): 460-466.

Valverde, C. & Wall, L. G. (1999). Regulation of nodulation in *Discaria trinervis* (*Rhamnaceae*)-*Frankia* symbiosis. *Can J Bot* 77(9): 1302-1310.

Van Ghelue, M., Lovaas, E., Ringo, E. & Solheim, B. (1997). Early interaction between *Alnus glutinosa* and *Frankia* strain ArI3. Production and specificity of root hair deformation factor(s). *Physiol Plant* 99(4): 579-587.

Vancanneyt, G., Schmidt, R., O'Connor-Sanchez, A., Willmitzer, L. & Rocha-Sosa, M. (1990). Construction of an intron-containing marker gene: splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Mol Gen Genet* 220(2): 245-250.

Vance, C. P. (2001). Symbiotic Nitrogen Fixation and Phosphorus Acquisition. Plant Nutrition in a World of Declining Renewable Resources. *Plant Physiol.* 127(2): 390-397.

Vessey, J. K., Pawlowski, K. & Bergman, B. (2005). Root-based N₂-fixing symbioses: Legumes, actinorhizal plants, *Parasponia* sp. and cycads. *Plant Soil* 274(1-2): 51-78.

Vikram Reddy, M. & Subramanean, J. (2010). Effect of *Casuarina* (*Casuarina equisetifolia*) plantation on the sand skink (*Eutropis bibronii* Gray 1939) population. *Curr Sci* 98(5): 604-605.

Vitousek, P. M., Porder, S., Houlton, B. Z. & Chadwick, O. A. (2010). Terrestrial phosphorus limitation: mechanisms, implications, and nitrogen-phosphorus interactions. *Ecol Appl* 20(1): 5-15.

-W-

Wais, R. J., Galera, C., Oldroyd, G., Catoira, R., Penmetza, R. V., Cook, D., Gough, C., Denarié, J. & Long, S. R. (2000). Genetic analysis of calcium spiking responses in nodulation mutants of *Medicago truncatula*. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(24): 13407-13412.

Wais, R. J., Wells, D. H. & Long, S. R. (2002). Analysis of Differences Between *Sinorhizobium meliloti* 1021 and 2011 Strains Using the Host Calcium Spiking Response. *Mol Plant Microbe Interact* 15(12): 1245-1252.

Wall, L. G. (2000). The Actinorhizal Symbiosis. *J Plant Growth Regul* 19(2): 167-182.

Wang, H. H., Yin, W. B. & Hu, Z. M. (2009). Advances in chloroplast engineering. *J Genet Genomics* 36: 387-398.

Wheeler, C. T., Akkermans, A. D. L. & Berry, A. M. (2008). *Frankia* and actinorhizal plants: a historical perspective. In: Nitrogen-Fixing Actinorhizal Symbioses-Nitrogen Fixation Research: Origins and Progress (eds. Pawlowski, P. & Newton, W. E.), Springer, Dordrecht, pp. 1-24.

Wheeler, C. T., Henson, I. E. & Mc Laughlin, M. E. (1979). Hormones in plants bearing actinomycete nodules. *Bot Gaz* 140: 52-57.

Wu, H., Kanatous, S. B., Thurmond, F. A., Gallardo, T., Isotani, E., Bassel-Duby, R., & Williams, R. S. (2002). Regulation of mitochondrial biogenesis in skeletal muscle by CaMK. *Science* 296(5566): 349-352.

-X-

Xu, N., Hagen, G. & Guilfoyle, T. (1997). Multiple auxin response modules in the soybean SAUR 15A promoter. *Plant Sci* 126(2): 193-201.

-Y-

Yang, T. & Poovaiah, B. W. (2003). Calcium/calmodulin-mediated signal network in plants. *Trends Plant Sci* 8(10): 505-512.

Yano, K., Shibata, S., Chen, W. L., Sato, S., Kaneko, T., Jurkiewicz, A., Sandal, N., Banba, M., Imaizumi-Anraku, H., Kojima, T., Ohtomo, R., Szczyglowski, K., Stougaard, J., Tabata, S., Hayashi, M., Kouchi, H. & Umehara, Y. (2009). CERBERUS, a novel U-box protein containing WD-40 repeats, is required for formation of the infection thread and nodule development in the legume-*Rhizobium* symbiosis. *Plant J* 60(1): 168-180.

Yano, K., Yoshida, S., Muller, J., Singh, S., Banba, M., Vickers, K., Markmann, K., White, C., Schuller, B., Sato, S., Asamizu, E., Tabata, S., Murooka, Y., Perry, J., Wang, T. L., Kawaguchi, M., Imaizumi-Anraku, H., Hayashi, M. & Parniske, M. (2008). CYCLOPS, a mediator of symbiotic intracellular accommodation. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(51): 20540-20545.

Yokota, K. & Hayashi, M. (2011). Function and evolution of nodulation genes in legumes. *Cell Mol Life Sci* 68(8): 1341-1350.

-Z-

Zavitovski, J. & Newton, M. (1968). Ecological importance of snowbrush, *Ceanothus velutinus* in the oregon cascades. *Ecology* 49(6): 1134-1145.

Zdyb, A., Demchenko, K., Heumann, J., Mrosk, C., Grzeganeck, P., Gobel, C., Feussner, I., Pawlowski, K. & Hause, B. (2011). Jasmonate biosynthesis in legume and actinorhizal nodules. *New Phytol* 189(2): 568-579.

Zhong, C., Zhang, Y., Chen, Y., Jiang, Q., Chen, Z., Liang, J., Pinyopusarerk, K., Franche, C. & Bogusz, D. (2010). *Casuarina* research and applications in China. *Symbiosis* 50(1-2): 107-114.



Annexes

Annexe 1 : Détail de la partie ADN-T du vecteur binaire pHKN29 (Kumagai et Kouchi, 2003).



Annexe 2 : Liste des plasmides utilisés pour réaliser les constructions géniques.

Nom du plasmide	Résistance	Cassette	Référence ou fournisseur
pCR2.1-TOPO	Ampicilline et Kanamycine	<i>PromCgCCaMK</i> (2,17 kb)	Invitrogen
pCR2.1	Ampicilline et Kanamycine	<i>TermNos</i> (293pb)	Invitrogen
pGEM-T Easy	Ampicilline	ADNc- <i>CgCCaMK</i> (2,11 kb)	Promega
pGEM-T Easy	Ampicilline	<i>PromCgCCaMK::CDS-CgCCamK-dérégulé::TermNos</i> (2,7 et 3,4 kb)	Promega
		<i>PromCgCCaMK::CDS-CgCCamK::TermNos</i> (6,1 kb)	
pHKN29	Kanamycine	<i>PromCgCCaMK::CDS-CgCCamK-dérégulé::TermNos</i> (2,7 et 3,4 kb)	Kumagai et Kouchi (2003)
		<i>PromCgCCaMK::CDS-CgCCamK::TermNos</i> (6,1 kb)	

Annexe 3 : Liste des amorces utilisées pour le clonage.

Amplification	Nom du primer	Séquences
<i>PromCgCCaMK</i>	<i>CgCCaMKPEcoR5F</i>	5'-GATGATATCTTGGGT GCATGCTTTCCACG-3'
	<i>CgCCaMKPXbaR</i>	5'-CGTTCTAGAATACAAA TTCTTGAACGACTGCA-3'
<i>TermNos</i>	<i>NosTFor</i>	5'-CGATGTCGACAAGC TTCTGCAGATCGTTC-3'
	<i>NosTRev</i>	5'-GATGAGCTCCCCGGG GATATCTCATGTTTG-3'
<i>CDS-CgCCaMK</i>	<i>CgCCaMK-322-XbaF</i>	5'-CATTCTAGATGAGGCA GGAAACAAAAAGACTC-3'
	<i>CgCCaMK-CDSHindR3</i>	5'-CGATAAGCTTCTATGAG GGGCGAAGAGAGGAG-3'
<i>CDS-CgCCaMK- dérégulé 1-322</i>	<i>CgCCaMK-322-XbaF</i>	5'-CATTCTAGATGAGGCAG GAAACAAAAAGACTC-3'
	<i>CgCCaMK-322-HindR1</i>	5'-CGATAAGCTTCTAGCTCT GCAGTCGTGAAACGATC-3'
<i>CDS-CgCCaMK- dérégulé 1-307</i>	<i>CgCCaMK-322-XbaF</i>	5'-CATTCTAGATGAGGCAG GAAACAAAAAGACTC-3'
	<i>CgCCaMK-307-HindR2</i>	5'-CGATAAGCTTCTAGGCTGA ATAACCTATGACCCATGG-3'

Annexe 4 : Composition du milieu H de Hoagland et Arnon (1938).

Produits	Pour 1 litre
Macroéléments	
K ₂ SO ₄	0,109 g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,123 g
Ca(H ₂ PO ₄) ₂	0,029 g
CaSO ₄ , 2H ₂ O	0,086 g
Na ₂ FeEDTA (0,2%)	0,063 g
Oligoéléments	
H ₃ BO ₃	0,715 mg
MnCl ₂ , 4 H ₂ O	0,452 mg
ZnSO ₄ , 7 H ₂ O	0,55 mg
CuSO ₄ , 5 H ₂ O	0,02 mg
Na ₂ MoO ₄ , 2 H ₂ O	0,006 mg
Plant-agar	8 g

Le pH est ajusté à 6,8.

Annexe 5 : Composition du milieu BD modifié (Broughton et Dilworth, 1971) pour la culture hydroponique de *Casuarina glauca*.

Produits	Molarité
Macroéléments	
CaCl ₂ , H ₂ O	1 mM
KH ₂ PO ₄	0,5 mM
MgSO ₄	0,25 mM
K ₂ SO ₄	0,25 mM
MnSO ₄ , H ₂ O	1 µM
Chélate de Fer (FeEDTA)	
Na ₂ EDTA	9,3 mg.L ⁻¹
FeSO ₄	6,9 mg.L ⁻¹
Oligoéléments	
H ₃ BO ₃	2 µM
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	0,5 µM
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,2 µM
CoSO ₄ , 7H ₂ O	0,1 µM
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	0,1 µM

Pour le milieu azoté 0,5 g.L⁻¹ de KNO₃ sont ajoutés.

Annexe 6 : Composition du milieu Luria et Bertani (LB) pour *Escherichia coli* (Bertani, 1951).

Produits	Pour 1 litre
Bacto-Tryptone	10 g
Extrait de levure	5 g
NaCl	10 g
Bacto-agar	14 g

Annexe 7 : Composition du milieu Ag pour *Agrobacterium*.

Produits	Pour 1 litre
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,1 g
Mannitol	5 g
Extrait de levure	1 g
Casamino acides	1 g
Bacto-agar	14 g

Le pH est ajusté à 7,2.

Annexe 8 : Composition du milieu BAP-PCM pour la culture de *Frankia* (Schwencke, 1991).

Produits	Pour un litre
Macroéléments	
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,05 g
CaCl ₂ , 2H ₂ O	0,01 g
NH ₄ Cl	0,267 g
Propionate de Na	0,48 g
FeNa ₂ EDTA	0,01 g
Oligoéléments	
H ₃ BO ₃	2,86 mg
MnCl ₂ , 4H ₂ O	1,81 mg
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	0,22 mg
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,08 mg
Na ₂ O ₄ Mo, 2H ₂ O	0,025 mg
CoSO ₄ , 7H ₂ O	0,001 mg
Vitamines	
Thiamine-HCl	10 mg
Acide nicotinique	50 µg
Pyridoxine-HCl	50 µg
Acide folique	10 µg
Panathénate de calcium	10 µg
Riboflavine	10 µg
Biotine	22,5 µg

Le pH est ajusté à 6,7, puis 20 mL de MES-TRIS (0,5 mM, pH 6,8) ainsi que 0,86 mg.L⁻¹ de phosphatidylcholine sont ajoutés.

Annexe 9 : Liste des plasmides utilisés pour la transformation génétique de *Casuarina glauca* par *Agrobacterium*.

Nom de la construction génique	Résistance plasmidique aux antibiotiques	Référence	Souche d' <i>Agrobacterium</i> utilisée	Marqueurs de sélection des plantes transformées
PBI1013 (<i>PromCgCCaMK::GUS::TermNos</i>)	Kanamycine	Jefferson <i>et al.</i> (1987)	<i>A. tumefaciens</i> C58C1 (pGV2260)	Kanamycine (50 mg.mL ⁻¹)
pHKN29 (<i>Prom35S::GFP::TermNos</i>)	Kanamycine	Kumagai et Kouchi (2003)	<i>A. rhizogenes</i> ARqua1	Marqueur fluorescent GFP
pHKN29 (<i>PromCgCCaMK::CDS-CgCCamK-dérégulé::TermNos</i>)	Kanamycine	Kumagai et Kouchi (2003)	<i>A. rhizogenes</i> ARqua1	Marqueur fluorescent GFP
pHKN29 (<i>PromCgCCaMK::CDS-CgCCamK::TermNos</i>)				
pHKN29 (<i>PromCgCCaMK::CDS-CgCCamK-dérégulé::TermNos</i>)	Kanamycine	Kumagai et Kouchi (2003)	<i>A. rhizogenes</i> A4RS	Marqueur fluorescent GFP
pK7WGF2 (<i>PromMtDMI3::CDS-MtDMI3-dérégulé::Term35S</i>)	Streptomycine	Gleason <i>et al.</i> (2006)	<i>A. rhizogenes</i> ARqua1	Kanamycine (12,5 mg.mL ⁻¹)
pK7WG2D (<i>Prom35S::CDS-MtDMI3-dérégulé::Term35S</i>)	Kanamycine	Gleason <i>et al.</i> (2006)	<i>A. rhizogenes</i> ARqua1	Marqueur fluorescent GFP

Annexe 10 : Composition du milieu MSC adapté du milieu de Murashige et Skoog (1962) pour les *Casuarinaceae*.

Produits	Pour 1 litre
½ Macro et microéléments MS medium (Duchefa Biochemie)	2,18 g
Sucrose	30 g
Vitamines de Nitsh et Nitsh (Sigma Ref. NO390)	
Thiamine	0,5 mg
Pyridoxine	0,5 mg
Glycine	2 mg
Acide nicotinique	5 mg
Mésoinositol	100 mg
Acide folique	0,5 mg
Plant-agar	8 g

Le pH est ajusté à 5,6.

Annexe 11 : Composition du tampon X-Gluc de Jefferson *et al.* (1987).

Produits	Quantité
X-Gluc	1 mM
DMF	5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$
EDTA pH8	50 mM
Triton X-100 pur	0,5%
NaHPO ₄ pH 7	50 mM

Annexe 12 : Composition du tampon de fixation des tissus.

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

Annexe 13 : Composition du tampon phosphate (50 mM).

Le tampon phosphate 50 mM pH 7 est obtenu en mélangeant 39 volumes de NaH_2PO_4 à 0,2 M, 61 volumes de Na_2HPO_4 à 0,2 M et 400 volumes d'eau.