



HAL
open science

Transport de l'auxine et développement du nodule actinorhizien chez l'arbre tropical *Casuarina glauca*

Benjamin Péret

► **To cite this version:**

Benjamin Péret. Transport de l'auxine et développement du nodule actinorhizien chez l'arbre tropical *Casuarina glauca*. Biologie végétale. Université Montpellier II - Sciences et Techniques du Languedoc, 2007. Français. NNT: . tel-00163696

HAL Id: tel-00163696

<https://theses.hal.science/tel-00163696>

Submitted on 18 Jul 2007

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE MONTPELLIER II – SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC
UFR DES SCIENCES

T H E S E
pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II

Discipline : Physiologie végétale
Ecole Doctorale : Systèmes Intégrés en Biologie, Agronomie, Géosciences, Hydrosiences
et Environnement

présentée et soutenue publiquement par

Benjamin PERET

Le 29 juin 2007

Transport de l'auxine et développement du nodule actinorhizien chez l'arbre tropical *Casuarina glauca*

Directeur de thèse : **Laurent LAPLAZE**

JURY

**Bruno TOURAINE
Martin CRESPI
Philippe NORMAND
David BARKER
Laurent NOEL
Laurent LAPLAZE**

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur

**“Patience et longueur de temps
Font plus que force ni que rage.”
Jean de la Fontaine (Les Fables, Livre II, Fable 11)**

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer ma plus profonde gratitude, ma plus chaleureuse amitié ainsi que mon plus grand respect au Dr. Laurent LAPLAZE qui a assuré la direction de ma thèse. Ces trois années passées à ses côtés ont été riches en enseignement, en travail efficace et également en franche rigolade. Merci de m'avoir permis de commencer ma carrière de chercheur dans de si bonnes conditions.

Je tiens à assurer le renouvellement de mon plus grand respect à l'égard du Dr. Didier BOGUSZ.

J'adresse à l'ensemble des membres, passés et présents, de l'équipe Rhizogénèse mes remerciements les plus sincères pour l'aide qu'ils ont pu m'apporter et la convivialité dont ils ont fait preuve. Merci donc au Dr. Claudine FRANCHE pour ses conseils en transgénèse végétale, au Dr. Valérie HOCHER pour son aide en QRT-PCR, à l'ingénieur d'études Florence AUGUY pour son aide en biologie moléculaire, au Dr. Sergio SVISTOONOFF pour ses conseils sur le présent manuscrit, au Dr. Patrick DOUMAS pour son soutien pendant la rédaction et ses conseils sur le manuscrit, au Dr. Fabienne CARTIEAUX, au Dr. Hassen GHERBI, au Pr. Christian JAY-ALLEMAND et au doctorant Mikaël LUCAS.

Je remercie tout particulièrement le Pr. Malcolm BENNETT de l'université de Nottingham de m'avoir accueilli dans son laboratoire. Je le remercie également pour ses nombreux conseils scientifiques et sa sympathie légendaire. Mes remerciements s'adressent également aux membres de son équipe et en tout premier lieu au Dr. Ranjan SWARUP.

Je salue mes deux stagiaires Leen JANTSEN et Gaëlle DEVOS qui ont toutes deux participé à ce projet de thèse avec beaucoup de rigueur, d'efficacité et de sympathie.

Je remercie Myriam COLLIN qui m'a apporté une aide des plus précieuses en histologie et qui a formé mes deux stagiaires au maniement du microtome et autres techniques d'histologie.

Je remercie Martine BANGRATZ pour son aide et son soutien au cours de mes longs repiquages de calcs. Je remercie l'ensemble des membres de GeneTrop pour leur aide ponctuelle ou récurrente.

J'adresse au Dr. Laurent NUSSAUME toutes mes excuses et promets de lui offrir une gaufre belge (avec supplément) dès que l'occasion s'en présentera.

Je salue toute l'équipe d'enseignement du module "Bases de la physiologie végétale" de L2 dans lequel j'ai effectué mon monitorat. Merci au Dr. Michel COUPE, au Dr. Pierre CZERNIC, au Dr. Laurence MARQUES, au Dr. Claire CORRATGE, à la doctorante Cécile RANGIN, au doctorant Karl RAVET et à la très efficace Lydia GAMET. J'adresse mes salutations à tous les moniteurs que j'ai rencontrés au cours des passionnantes formations dispensées par le Centre d'Initiation à l'Enseignement Supérieur. Je pense évidemment aux quelques 600 étudiants à qui j'ai tenté d'enseigner les bases de la physiologie végétale en espérant que certains auront suivi le bon chemin.

Je remercie le Pr. Philippe NORMAND, le Pr. Bruno TOURAINÉ, le Dr. David BARKER, le Dr. Martin Crespi et le Dr. Laurent NOEL d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je présente par avance mes excuses aux personnes que j'aurais oublié de remercier.

Je dédie ce travail de thèse à mon épouse Caroline et à l'enfant qu'elle porte.

TABLE DES MATIÈRES

ABRÉVIATIONS	1
TABLE DES FIGURES	2
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	3
I. Introduction générale	3
II. Symbioses <i>Rhizobium</i>–Légumineuses	4
1) Généralités	4
2) Le partenaire bactérien	5
3) La formation du nodule	5
III. Les symbioses actinorhiziennes	9
1) Généralités	9
2) Aspects phylogénétiques et évolutifs	9
3) Le partenaire bactérien	9
4) La formation du nodule actinorhizien	10
IV. Formation de la racine latérale	14
1) Généralités	14
2) Initiation	15
3) Organisation du primordium	17
4) Émergence	17
V. L'hormone végétale auxine	18
1) Introduction	18
2) Perception et signalisation	18
3) Homéostasie	18
4) Transport	20
VI. Objectifs de la thèse	21
1) Isolement et caractérisation fonctionnelle des gènes <i>AUX-LAX</i> chez <i>Casuarina glauca</i>	22
2) Implication au cours du développement du nodule actinorhizien	22
3) Rôle des transporteurs d'influx dans le développement : exemple de <i>LAX3</i>	22
PARTIE I – ISOLEMENT ET CARACTÉRISATION DE GÈNES <i>AUX-LAX</i> CHEZ <i>CASUARINA GLAUCA</i>	23
I. Isolement d'homologues de gènes <i>AUX-LAX</i> chez <i>C. glauca</i>	23
1) Obtention des ADNc et des séquences génomiques	23
2) <i>CgAUX1</i> et <i>CgLAX3</i> appartiennent à une petite famille de gènes	24
3) Structure des gènes <i>CgAUX1</i> et <i>CgLAX3</i>	24
4) Séquences protéiques déduites	25
II. Comparaison de l'expression des gènes <i>AtAUX-LAX</i> et <i>CgAUX-LAX</i>	26
III. Analyse fonctionnelle	27
1) Complémentation fonctionnelle du mutant <i>aux1</i>	28
2) Complémentation fonctionnelle du mutant <i>lax3</i>	29
IV. Discussion	31
1) Une petite famille multigénique <i>AUX-LAX</i> chez <i>C. glauca</i>	31

2) Divergence fonctionnelle dans la famille <i>AUX-LAX</i>	31
3) Bases moléculaires de la divergence	32
PARTIE II – ÉTUDE DU RÔLE DU TRANSPORT D'INFLUX AU COURS DU DÉVELOPPEMENT DU NODULE ACTINORHIZIEN	33
I. Introduction	33
II. Analyse de l'expression de <i>CgAUX1</i> et <i>CgLAX3</i>	33
1) Expression non-symbiotique	33
2) Expression au cours de la symbiose	34
3) <i>CgAUX1</i> et <i>CgLAX3</i> ne sont pas inductibles par l'auxine	35
III. L'inhibition du transport d'influx d'auxine perturbe le processus de nodulation	36
IV. Dosages d'auxine	38
1) Production d'auxine par la bactérie <i>Frankia</i>	38
2) Accumulation d'auxine au cours de la nodulation	39
V. Discussion	39
1) L'influx d'auxine est associé au mécanisme d'infection par <i>Frankia</i>	39
2) <i>CgAUX1</i> pourrait créer un puits d'auxine au site d'infection	40
3) <i>CgAUX1</i> n'est pas impliqué dans l'organisation du primordium nodulaire	40
PARTIE III – CIBLES DE LA SIGNALISATION AUXINIQUE DEPENDANTE DU TRANSPORT D'INFLUX	42
I. Introduction	42
1) <i>AtLAX3</i> est impliqué dans l'émergence de la racine latérale	42
2) <i>AtLAX3</i> est exprimé dans les cellules en face du primordium	42
3) <i>AtLAX3</i> est inductible par l'auxine	43
4) Conclusion	44
II. <i>AtLAX3</i> permet le remodelage de la paroi dans les cellules de l'épiderme et du cortex au cours de l'émergence	44
1) L'induction d' <i>AIR3</i> par l'auxine dépend de <i>LAX3</i>	44
2) Un ensemble de gènes de remodelage de la paroi induits par l'auxine et dépendants de <i>LAX3</i>	45
3) Modèle d'action d' <i>AtLAX3</i> dans l'émergence de la racine latérale	46
III. Influx d'auxine et remodelage de la paroi au cours de l'infection par <i>Frankia</i>	47
1) Régulation de <i>Cg12</i> par un signal auxinique	47
2) Autres gènes de remodelage de la paroi chez <i>Casuarina glauca</i>	48
IV. Discussion	49
1) Amplification du signal auxinique par l'influx d'auxine	49
2) Nature du signal symbiotique	50
CONCLUSION GÉNÉRALE – PERSPECTIVES	51
I. Le signal auxinique permet l'infection de la cellule végétale par des micro-organismes	51
II. Le nodule actinorhizien : une racine latérale modifiée ?	53
MATÉRIEL ET MÉTHODES	55

I. Matériel	55
1) Matériel végétal	55
2) Matériel bactérien	55
3) Matériel nucléaire	55
II. Méthodes	55
1) Milieux de culture (plantes)	55
2) Milieux de culture (bactéries)	57
3) Transformation génétique des plantes	58
4) Transformation génétique des bactéries	59
5) Biologie moléculaire	60
6) Histologie	61
7) Analyses phénotypiques	62
8) Dosages	62
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	63
RÉSUMÉ	71
ABSTRACT	71

ABRÉVIATIONS

- $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP : désoxy cytidine triphosphate marquée au ^{32}P en position α
- 2,4D** : acide 2,4 dichlorophénoxy acétique
- 35S** : promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur
- ABC** : *ATP binding cassette*
- ADN** : acide désoxyribonucléique
- ADNc** : ADN complémentaire
- ADP** : adénosine diphosphate
- ARF** : *auxin response factor*
- ARF/GEF** : *ADP ribosylation factor/GTPase exchange factor*
- ARN** : acide ribonucléique
- ARP** : *auxin repressed protein*
- ATP** : adénosine triphosphate
- Aux/IAA** : *auxin/indole-3-acetic protein*
- AuxRE** : *auxin response element*
- BAP (milieu)** : *Buffered mineral medium Added of Phosphatidylcholine*
- BD (milieu)** : milieu de Broughton et Dilworth
- CDK** : *cyclin dependent kinase*
- EDTA** : acide éthylène diaminotétraacétique
- EST** : *expressed sequence tag*
- GFP** : *green fluorescent protein*
- GUS** : β -glucuronidase
- HPLC** : *high performance liquid chromatography*
- HRGP** : *hydroxyproline rich glycoprotein*
- IAA** : acide indole acétique
- iPA** : isopentényl adénosine
- LB (milieu)** : milieu liquide de Luria et Bertani
- MATAB** : *mixed alkyl trimethyl ammonium bromide*
- MDR/PGP** : *multidrug resistance/P glycoprotein*
- NAA** : acide naphthalène acétique
- NOA** : acide naphthoxy acétique
- ORF** : *open reading frame*
- PAA** : acide phénylacétique
- RACE PCR** : *rapid amplification of cDNA ends by PCR*
- RT-PCR** : *reverse transcription-polymerase chain reaction*
- SDS** : dodécylsulfate de sodium
- SSC** : citrate de sodium, chlorure de sodium
- Tris** : trishydroxyméthylaminométhane
- UTR** : *untranscribed region*
- X-Glc** : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-D-glucuronide
- YFP** : *yellow fluorescent protein*

TABLE DES FIGURES

- Figure 1.** Cycle de l'azote
- Figure 2.** Structure de la nitrogénase
- Figure 3.** Phylogénie des Légumineuses
- Figure 4.** Structure des facteurs Nod
- Figure 5.** Déformation des poils racinaires chez le haricot
- Figure 6.** Modèle de la voie de transduction du signal symbiotique chez le lotier
- Figure 7.** Infection intracellulaire chez les Légumineuses
- Figure 8.** Types nodulaires chez les Légumineuses
- Figure 9.** Infection intracellulaire et différenciation du symbiosome chez les Légumineuses
- Figure 10.** Filaments de *Frankia*
- Figure 11.** Infections intra et extra-cellulaire chez les plantes actinorhiziennes
- Figure 12.** Processus d'infection et organogenèse d'un lobe nodulaire chez les plantes actinorhiziennes
- Figure 13.** Nodule et racines nodulaires de *Casuarina glauca*
- Figure 14.** Différents stades de formation du primordium de racine latérale chez *Arabidopsis thaliana*
- Figure 15.** Anatomie de la racine d'*Arabidopsis thaliana*
- Figure 16.** Régulation du cycle cellulaire dans le péricycle
- Figure 17.** Implication des flux d'auxine dans les processus développementaux
- Figure 18.** Formules chimiques des différents types d'auxine
- Figure 19.** Signalisation auxinique
- Figure 20.** Homéostasie de l'auxine
- Figure 21.** Voies de biosynthèse de l'auxine
- Figure 22.** Transport de l'auxine dans l'apex racinaire
- Figure 23.** La famille *AUX-LAX* de *Casuarina glauca*
- Figure 24.** Comparaison des séquences protéiques déduites de *CgAUX1* et *CgLAX3*
- Figure 25.** Profils d'expression d'*AtAUX1*, *CgAUX1*, *AtLAX3* et *CgLAX3* chez *Arabidopsis thaliana*
- Figure 26.** Relation phylogénique entre Casuarinacées et Brassicacées
- Figure 27.** Phénotype gravitropique des mutants *aux1-22* complémentés avec les gènes de *Casuarina glauca*
- Figure 28.** Détection des ARNm de *CgLAX3* chez les mutants *aux1-22* complémentés par *CgLAX3*
- Figure 29.** Analyse du phénotype de sensibilité/résistance à l'auxine
- Figure 30.** Densité de racines latérales chez le mutant *lax3* complémenté par *CgLAX3*
- Figure 31.** Nombre de racines latérales chez le mutant *aux1lax3* complémenté par *CgLAX3*
- Figure 32.** *AXR4* est nécessaire pour permettre la localisation membranaire d'*AUX1*
- Figure 33.** Détection des ARNm de *CgAUX1* et *CgLAX3*
- Figure 34.** Expression non-symbiotique de *CgAUX1* et *CgLAX3*
- Figure 35.** Expression de *CgAUX1* au cours de l'infection
- Figure 36.** Expression de *CgLAX3* dans le nodule actinorhizien chez *Allocauarina verticillata*
- Figure 37.** Induction de *CgAUX1* et *CgLAX3* par les auxines
- Figure 38.** Le 1-NOA retarde la nodulation en inhibant le transporteur d'influx d'auxine *CgAUX1*
- Figure 39.** Dosage des auxines produites par *Frankia* et *Casuarina glauca*
- Figure 40.** Phénotype du mutant *lax3*
- Figure 41.** Profil d'expression d'*AtLAX3*
- Figure 42.** *AtLAX3* est induit par l'auxine de façon dépendante de *SLR1/IAA14*
- Figure 43.** *PIN2* permet le transport basipète de l'auxine dans le primordium
- Figure 44.** *AtAIR3* est induit par l'auxine de façon dépendante d'*AtLAX3*
- Figure 45.** Gènes de remodelage de la paroi induits par l'auxine de façon dépendante d'*AtLAX3*
- Figure 46.** Modèle du rôle d'*AtLAX3* au cours de l'émergence
- Figure 47.** Effet du NOA sur l'expression de *Cg12*, *CgAUX1* et *CgHb*
- Figure 48.** Induction par l'auxine et expression en réponse à l'infection des gènes de remodelage de la paroi
- Figure 49.** Modèle du rôle de *CgAUX1* au cours de l'infection par *Frankia*
- Figure 50.** Processus de mise en place des symbioses mycorhiziennes
- Figure 51.** Construction des vecteurs binaires *Pro_{CgAUX1}:GUS*, *Pro_{CgLAX3}:GUS* et *Pro_{AtAUX1}:CgAUX1*
- Figure 52.** Construction des vecteurs binaires *Pro_{AtAUX1}:CgLAX3* et *Pro_{AtLAX3}:CgLAX3*

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Introduction générale

L'azote est le premier élément minéral limitant la croissance des plantes car les seules formes assimilables sont présentes en faible quantité dans les sols. La majeure partie de l'azote se trouve sous forme de diazote atmosphérique, mais seules quelques espèces de procaryotes ont la possibilité de l'utiliser pour leur nutrition azotée. On distingue cette fixation biologique de l'azote (environ 10^{14} g d'azote par an) et la fixation industrielle selon le procédé d'Haber-Bosch (environ la moitié de la fixation biologique) pour la production d'engrais azotés (Arp, 2000). Dans un système biologique fixateur d'azote, les conditions optimales de la catalyse biologique correspondent à une pression de 0,2 à 1,0 atm de N_2 et une température de 30–35°C, alors que les conditions de la catalyse chimique sont très sévères : pression de 250 à 1000 atm de N_2 et température de 450°C (Hardy et Knight, 1968).

L'apport de nitrate (NO_3^-) dans les sols, source principale d'azote pour les plantes, est réalisé par oxydation de l'ammonium (NH_4^+) en nitrite (NO_2^-) puis en nitrate par des bactéries chimiolithotrophes

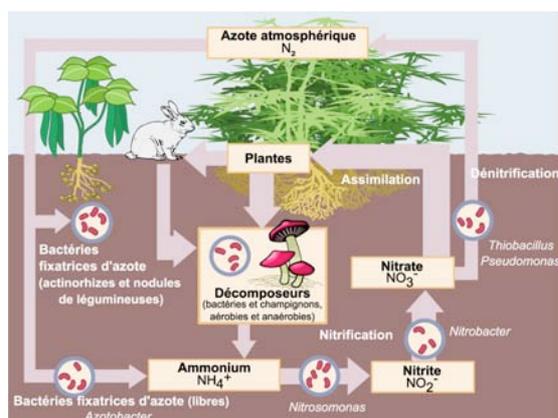


Figure 1. Cycle de l'azote

La grande majorité de l'azote se trouve sous forme de diazote (N_2) non-assimilable par les plantes. La fixation biologique de l'azote par les bactéries en symbiose avec les plantes actinorhiziennes et les Légumineuses permet d'accéder à une source quasi-illimitée d'azote.

(*Nitrosomonas* et *Nitrobacter*) selon un processus nommé nitrification, favorisé

par une température élevée et un sol bien aéré (processus aérobie). La dénitrification qui appauvrit les sols en nitrate est réalisée par d'autres bactéries (*Pseudomonas*, *Thiobacillus*) en conditions anaérobies (Figure 1).

La fixation biologique de l'azote atmosphérique est catalysée par un complexe enzymatique appelé complexe nitrogénase (Rees et Howard, 2000). Cette enzyme a été mise en évidence uniquement chez des procaryotes. Le complexe nitrogénase est très conservé chez les bactéries fixatrices d'azote tant au niveau de sa séquence que de sa structure. Il est constitué de deux métalloprotéines : le site de la réduction

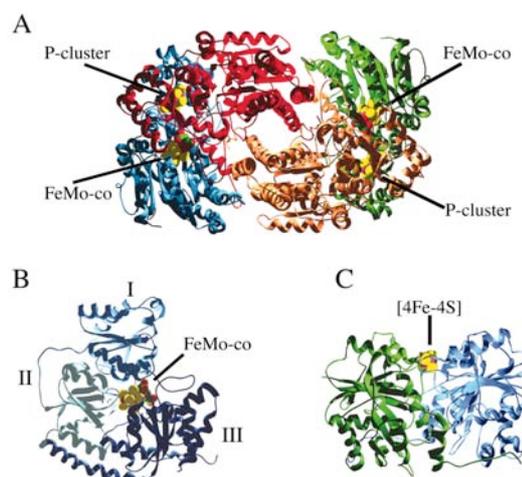


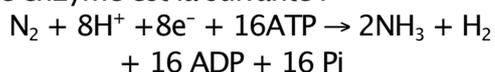
Figure 2. Structure de la nitrogénase

Le complexe nitrogénase catalyse la réaction de fixation de l'azote atmosphérique. Cette enzyme n'existe que chez les organismes procaryotes. Elle est constituée de deux composants : le composant I est un hétérotétramère constitué de deux sous-unités α représentées en bleu et vert et deux sous-unités β représentées en rouge et orange (A), le détail de la sous-unité α est donné (B) et le composant II est un homodimère (C). D'après Rubio et Ludden, 2005.

du substrat est la protéine MoFe (composant I ou dinitrogénase) et le donneur d'électrons est la protéine Fe (composant II ou dinitrogénase réductase). Le composant I est un hétérotétramère de type $\alpha_2\beta_2$ codé par les gènes *nifD* et *nifK* et le composant II est un homodimère codé par le gène *nifH* (Figure 2 ; Howard et Rees, 2000 ; Rangaraj *et al*, 2000).

La régulation de l'expression de la nitrogénase est complexe ; elle fait

intervenir au niveau transcriptionnel d'autres gènes *nif* de l'opéron (*nifA* et *nifL* notamment) et au niveau post-traductionnel un système d'ADP-ribosylation (répression de l'enzyme par NH_4^+ et l'obscurité). Le complexe nitrogénase est extrêmement labile en présence de dioxygène (Halbleib et Ludden, 2000). La réaction catalysée par cette enzyme est la suivante :



La réaction de fixation de l'azote est très coûteuse en énergie (ATP et pouvoir réducteur). De ce fait, la fixation de l'azote par les bactéries diazotrophes à l'état libre est peu efficace : de l'ordre de la dizaine de $\text{kg N}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{an}^{-1}$. L'association symbiotique entre des bactéries fixatrices d'azote et certaines plantes permet d'améliorer considérablement cette valeur pour atteindre une centaine de $\text{kg N}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{an}^{-1}$ (Bohlool *et al.*, 1992). On distingue plusieurs types de symbioses fixatrices d'azote, les principaux types sont les symbioses nodulaires (actinorhiziennes et Légumineuses) et les symbioses avec les cyanobactéries. Les symbioses avec les cyanobactéries ne conduisent pas à proprement parler à la formation de nouveaux organes spécialisés dans la symbiose mais plutôt au détournement d'organes existants : présence d'une cavité chez *Azolla* abritant la bactérie *Anabaena*, infection de glandes symbiotiques par *Nostoc* chez *Gunnera* et racines coralloïdes infectées par *Nostoc* chez le *Cycas*. À l'inverse, les symbioses nodulaires sont des associations très étroites puisqu'elles nécessitent la formation d'un nouvel organe végétal : le nodule, qui héberge la bactérie et au sein duquel ont lieu les échanges entre les deux symbiontes. La symbiose *Rhizobium*-Légumineuses est de loin la plus étudiée car elle concerne beaucoup d'espèces d'intérêt agronomique (alimentation humaine et animale). Les symbioses actinorhiziennes sont moins étudiées mais ont néanmoins une grande importance écologique.

II. Symbioses *Rhizobium*-Légumineuses

1) Généralités

Les Légumineuses représentent une superfamille chez les angiospermes, comprenant plus de 650 genres et 18000 espèces. Elles sont divisées en trois sous-familles : les Mimosoïdées, les Caesalpinioïdées et les Papilionoïdées (Figure 3). De nombreuses Légumineuses constituent une source majeure de

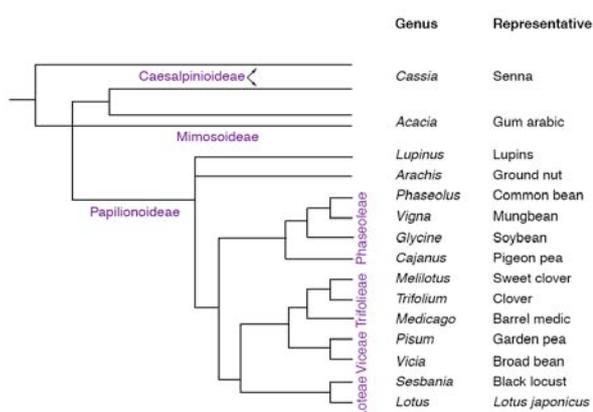


Figure 3. Phylogénie des Légumineuses

Les Légumineuses sont groupées en trois grandes sous-familles : les Mimosoïdées, les Caesalpinioïdées et les Papilionoïdées, comprenant de nombreuses espèces cultivées. D'après Udvardi *et al.* 2005.

protéines et d'huiles végétales (Graham et Vance, 2003) et sont largement cultivées sur l'ensemble de la planète. On peut citer par exemple : le haricot (*Phaseolus vulgaris*), le soja (*Glycine max*), le pois (*Pisum sativum*), le pois chiche (*Cicer arietinum*), la fève (*Vicia faba*), le niébé (*Vigna unguiculata*), la lentille (*Lens esculenta*), la cacahuète (*Arachis hypogea*). La plus grande partie des Légumineuses (88% des espèces étudiées ; de Faria *et al.*, 1989) interagissent avec *Rhizobium* pour former des nodules fixateurs d'azote (Hirsch *et al.*, 2001). De ce fait, les Légumineuses sont parmi les plantes les plus étudiées (Patriarca *et al.*, 2004 ; Gage, 2004 ; Stacey *et al.*, 2006). Notamment, l'émergence de deux plantes modèles : le lotier (*Lotus japonicus* ; Handberg et Stougaard, 1992 ; Udvardi *et al.*, 2005) et la luzerne (*Medicago truncatula* ; Barker *et al.*, 1990) a permis d'accélérer l'étude des mécanismes de mise en place de la symbiose.

2) Le partenaire bactérien

Le terme « rhizobia » regroupe des bactéries appartenant aux quatre différentes branches de la sous-classe α des protéobactéries : la branche *Mesorhizobium-Sinorhizobium-Rhizobium*, la branche des *Bradyrhizobium*, la branche des *Azorhizobium* et la branche des *Methylobacterium* (Moulin *et al*, 2001). Ce sont des bactéries en forme de bâtonnets à l'état libre, non sporulantes et généralement mobiles grâce à la présence d'un ou plusieurs flagelles. Le groupe des rhizobia comprend des bactéries très diverses qui ont en commun leur aptitude à induire la formation de nodules fixateurs d'azote sur les racines ou les tiges des Légumineuses. Elles n'acquièrent en général leur capacité à fixer l'azote atmosphérique qu'au sein des nodules (à l'exception de *Bradyrhizobium* et *Azorhizobium*).

3) La formation du nodule

Les conditions requises avant la mise en place de la symbiose sont une faible teneur en azote du sol et une photosynthèse active pour assurer une source suffisante d'énergie (Kondorosi et Kondorosi, 2000).

a) Préinfection

L'interaction entre la plante et la bactérie débute dans la rhizosphère, la plante permettant la croissance des bactéries de manière sélective (Savka *et al*, 2002). Les rhizobia sont attirés vers les poils racinaires par une large gamme de substances, principalement par les phénylpropanoïdes exsudés par la racine (Kape *et al*, 1991). Une production plus importante de ces composés est observée en condition de carence azotée (Coronado *et al*, 1995). Les flavonoïdes présents dans les exsudats racinaires induisent l'expression des gènes *nod* bactériens qui gouvernent la production des facteurs Nod, des lipochitooligosaccharides dont les décorations variables déterminent la spécificité d'hôte (Figure 4 ; Perret *et al*, 2000). Les facteurs Nod induisent des événements morphologiques,

physiologiques et moléculaires chez la plante hôte.

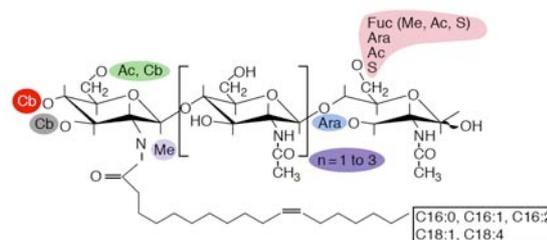


Figure 4. Structure des facteurs Nod

Structure chimique d'un facteur Nod générique avec quelques substitutions observées chez les différentes espèces de rhizobia indiquées en couleur. Les variations les plus courantes de la chaîne d'acides gras sont également représentées. Ac, acétyl ; Ara, arabinosyl ; Cb, carbonyl ; Fuc, fucosyl ; Me, méthyl ; S, sulfuryl. D'après Cullimore *et al.*, 2001.

La déformation du poil racinaire est observée environ 12 à 24 heures après inoculation chez *M. sativa* (Wais *et al*, 2002). Elle fait intervenir des changements dans l'arrangement des microtubules (Timmers *et al*, 2007). Plus précisément, les poils racinaires peuvent adopter différentes formes en fonction de leur stade de développement (Figure 5) : en crosse de berger, courbés, renflés, entrelacés, déformés, branchés ou joints (Wood et Newcomb, 1989).

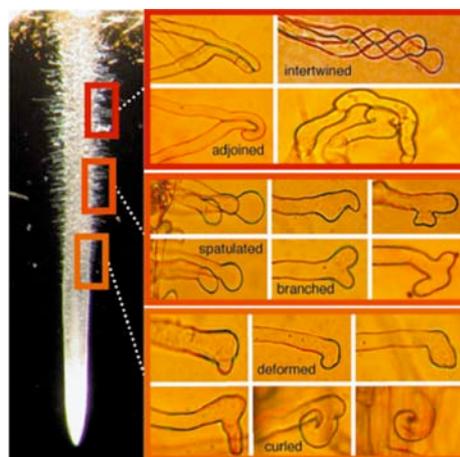


Figure 5. Déformation des poils racinaires chez le haricot
Différents types de déformation des poils racinaires sont observés chez le haricot (*Phaseolus vulgaris*) après contact avec la bactérie *Rhizobium etli*. Gauche : différentes zones correspondant aux différents stades de différenciation des poils racinaires. Droite : types de déformations couramment observées en réponse à la bactérie symbiotique. D'après Patriarca *et al.*, 2004.

La réponse de la plante fait intervenir :
i) des variations de la concentration intracellulaire en calcium (Supanjani *et al*, 2006), ii) la production de composés qui ne sont pas des flavonoïdes et qui

augmentent l'induction des gènes *nod* bactériens (van Brussel *et al*, 1990), iii) l'expression du gène de la chalcone synthase, enzyme clé de la voie de biosynthèse des flavonoïdes (Yang *et al*, 1992), iv) la production de chitinases qui dégradent les facteurs Nod et contrôlent leur concentration (Ovtsyna *et al*, 2005), v) des changements dans la balance hormonale (Mathesius *et al*, 2000a) et vi) la production d'espèces réactives de l'oxygène (Baier *et al*, 1999). Certains gènes impliqués dans la voie de transduction du signal ont été identifiés. Parmi eux, on peut citer un canal cationique (DMI1 ; Ané *et al*, 2004), une kinase de type récepteur (DMI2 ; Endre *et al*, 2002), une kinase dépendante de calmoduline/calcium (DMI3 ; Mitra *et al*, 2004) et des régulateurs de transcription (NSP1 et NSP2 ; Kaló *et al*, 2005 ; Smit *et al*, 2005) chez *M. truncatula* (Figure 6).

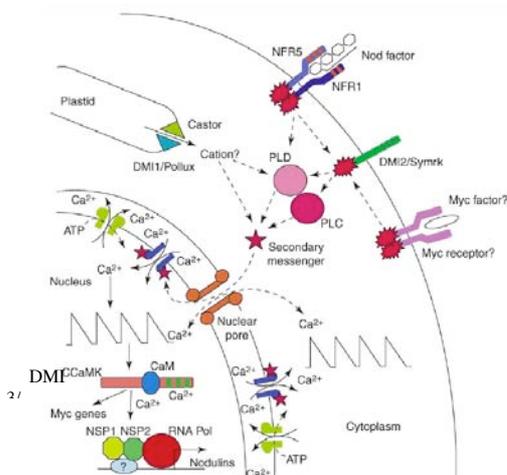


Figure 6. Modèle de la voie de transduction du signal symbiotique chez le lotier

De nombreux composants de la voie de transduction du signal ont été identifiés chez les Légumineuses. Notamment, les deux kinases à domaine récepteur NFR1 et NFR5 sont impliquées dans la reconnaissance spécifique des facteurs Nod. Les messagers secondaires incluent des phospholipases C et D (PLC et PLD) et des changements de la concentration cytosolique et nucléaire en calcium. L'activation d'une kinase via une calmoduline entraîne l'expression des gènes de nodulines par l'intermédiaire des régulateurs transcriptionnels NSP1 et NSP2. D'après Oldroyd et Downie, 2006.

Enfin, le récepteur SymRK du lotier (homologue de *DMI2*) intervient également dans cette voie de transduction puisque les mutants *symrk* sont bloqués au cours de la phase d'infection du poil racinaire (Capoen *et al*, 2005). Les mutants *dmi1*, *dmi2* et *dmi3* de *M. truncatula* sont incapables de former des mycorhizes ce

qui démontre l'existence de voies de signalisation communes entre ces deux types de symbioses.

Néanmoins, les mécanismes d'action ne sont pas encore tous identifiés. Notamment, le récepteur des facteurs Nod est toujours inconnu (Cullimore *et al*, 2001 ; Geurts *et al*, 2005). Deux kinases LysM à domaine de type récepteur pourraient jouer ce rôle chez le lotier (*NFR1* et *NFR5* ; Madsen *et al*, 2003 ; Radutoiu *et al*, 2003) et chez *M. truncatula* (*NFP* et *LYK3* ; Amor *et al*, 2003 ; Limpens *et al*, 2003). En effet, les premiers événements observés dans le poil racinaire en réponse à l'application de facteurs Nod (influx de calcium et oscillations calciques) sont absents chez les mutants *nfr1* et *nfr5* (Miwa *et al*, 2006).

b) Infection

On distingue deux types d'infection : la voie intracellulaire qui est la plus étudiée et la voie intercellulaire (ou « crack-entry »). Au cours de l'infection intracellulaire, la pénétration de la bactérie est facilitée par la courbure du poil racinaire qui crée une zone confinée dans laquelle la bactérie est entourée par la paroi végétale (Figure 7). Un cordon

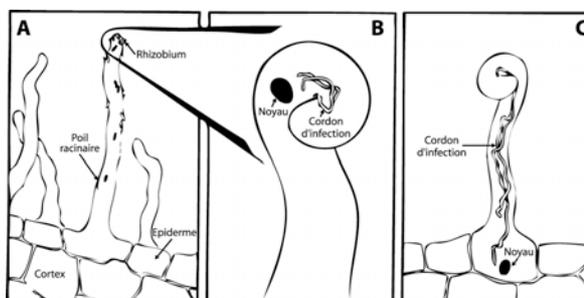


Figure 7. Infection intracellulaire chez les Légumineuses

La bactérie colonise la rhizosphère et entre en contact avec le poil racinaire (A). Les facteurs Nod induisent la courbure du poil racinaire ce qui permet la création d'une zone confinée pour la bactérie qui initie l'infection (B). La mise en place du cordon d'infection suit le déplacement du noyau vers la base du poil (C). D'après Perret *et al*, 2000.

d'infection est initié à partir de ce point par hydrolyse de la paroi (Mateos *et al*, 2001), invagination de la membrane végétale et production de matériel pariétal par la plante (Gage et Margolin, 2000 ; Gage, 2004). Le cordon d'infection est une structure tubulaire qui croît à l'intérieur de la cellule et dans laquelle la bactérie prolifère. L'infection d'une cellule corticale

par le cordon d'infection est précédée d'un réarrangement du cytosquelette, d'un déplacement du noyau vers le centre de la cellule et de la formation d'une structure similaire à un phragmoplaste (van Brussel *et al*, 1992).

L'infection intercellulaire se fait généralement au niveau de passages libérés par l'émergence des racines latérales ou adventives, ou bien parfois directement à travers la lamelle moyenne entre deux cellules du rhizoderme (Pawlowski et Bisseling, 1996). Les rhizobia progressent ensuite vers le primordium nodulaire de manière intercellulaire ou deviennent intracellulaires en formant des cordons d'infection.

c) Développement du nodule

L'infection de la plante par les rhizobia induit la dédifférenciation et la division des cellules du cortex (Foucher et Kondorosi, 2000). Les nodules de type indéterminé (*M. truncatula*, *Pisum sativum*) sont formés à partir du cortex interne alors que les nodules de type déterminé (*L. japonicus*, *Glycine max*, *Phaseolus vulgaris*) sont formés à partir du cortex externe. La persistance du méristème chez les espèces à nodules de type déterminé est très éphémère et la croissance en longueur du nodule est limitée. Une croissance en épaisseur a lieu par hypertrophie des cellules corticales et par des divisions de cellules contenant déjà des *Rhizobia*. Ce processus de formation se traduit par une forme sphérique et un

état de différenciation identique pour toutes les cellules. Dans le cas des espèces à nodules de type indéterminé, la zone méristématique est persistante ce qui se traduit par une forme allongée (Figure 8).

Dans les deux cas, les cellules du cortex se divisent de manière anticline puis péricline (Timmers *et al*, 1999). Toutes les cellules du cortex ne se divisent pas, ce qui semble indiquer que la susceptibilité de ces cellules pourrait être liée à un statut particulier, notamment une modification de la concentration en hormones (Mathesius *et al*, 2000a). De manière concomitante, les cellules voisines développent des cordons de préinfection, constitués de ponts cytoplasmiques alignés de façon radiale (van Brussel *et al*, 1992). Ces structures guident la croissance des cordons d'infection en direction du primordium nodulaire en formation.

L'utilisation d'inhibiteurs du transport d'efflux d'auxine entraîne la formation de « pseudonodules » (Fang et Hirsch, 1998) suggérant un rôle de l'auxine dans la formation du nodule. De plus, les facteurs Nod produits par *Rhizobium* avant l'infection entraînent une modification de la balance hormonale de la plante. Les mécanismes moléculaires responsables de ces changements sont inconnus mais il semble que les facteurs Nod agissent sur les flux d'auxine à deux niveaux : une inhibition du transport de l'auxine (Mathesius *et al*, 1998 ; Boot *et al*, 1999) et l'induction de la synthèse de flavonoïdes (Mathesius *et al*, 2000a). Les flavonoïdes sont susceptibles de provoquer l'accumulation de l'auxine en réduisant son oxydation de manière directe (substrats de l'enzyme) ou indirecte (en réagissant avec H_2O_2 ; Mathesius, 2001). Leur rôle dans l'inhibition du transport de l'auxine est également supposé (Brown *et al*, 2001). Des travaux récents montrent que l'extinction par la technique d'ARN interférent de l'expression du gène de la chalcone synthase (*CHS*) chez *M. truncatula* entraîne une augmentation du transport de l'auxine associée à une inhibition de la nodulation (Wasson *et al*, 2006).

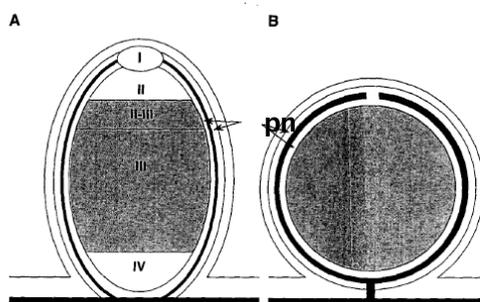


Figure 8. Types nodulaires chez les Légumineuses
Nodule de type indéterminé présentant une zone méristématique (I), une zone de préfixation (II), une zone de fixation (III) et une zone de sénescence (IV) (A). Nodule de type déterminé (B). pn : parenchyme nodulaire. D'après Pawlowski et Bisseling, 1996.

L'utilisation de promoteurs induits par l'auxine (*GH3*) a permis de montrer que l'auxine s'accumule dans les premières cellules du cortex qui vont former le primordium nodulaire (Mathesius *et al*, 2000b). Le transport d'auxine dans le nodule en formation implique les gènes de transport d'influx chez *M. truncatula* lors de la formation du primordium nodulaire et plus tard au cours de la différenciation du système vasculaire (de Billy *et al*, 2001).

Les cytokinines jouent également un rôle dans la formation des nodules. L'utilisation d'un promoteur d'Arabidopsis exprimé en réponse aux cytokinines (*ARR5*; D'Agostino *et al*, 2000) a permis de montrer une accumulation précoce, dans le poil racinaire infecté et plus tard dans le primordium nodulaire chez le lotier (Lohar *et al*, 2004). Le récepteur putatif des cytokinines a été identifié chez *Medicago* par homologie avec le récepteur CRE1 d'Arabidopsis (Gonzalez-Rizzo *et al*, 2006). L'extinction de son expression par la technique d'ARN interférent entraîne une inhibition de la nodulation chez *Medicago* (Gonzalez-Rizzo *et al*, 2006) alors qu'une mutation gain de fonction provoque la formation spontanée de nodules en l'absence de bactéries symbiotiques chez le lotier (Tirichine *et al*,

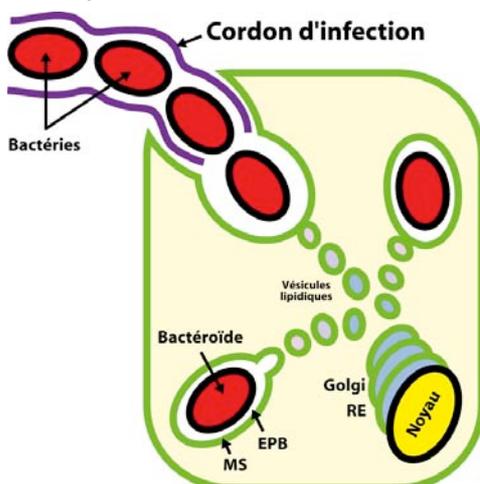


Figure 9. Infection intracellulaire et différenciation du symbiosome chez les Légumineuses

Les bactéries sont déversées dans la cellule végétale par fusion des vésicules lipidiques avec l'extrémité du cordon d'infection. La différenciation en bactéroïdes commence alors. EPB, espace péricellulaire; MS, membrane du symbiosome; RE, réticulum endoplasmique. D'après Patriarca *et al*, 2004.

2007).

L'éthylène joue également un rôle dans la nodulation. En effet le mutant *sickle* de *M. truncatula* qui est insensible à l'éthylène présente un phénotype d'hypernodulation (Prayitno *et al*, 2006). Ce phénotype est associé avec une augmentation du transport de l'auxine, principalement le transport d'efflux. Chez la plupart des légumineuses, l'effet inhibiteur de l'éthylène sur la nodulation a été démontré (Lee et Larue, 1992 ; Schmidt *et al*, 1999 ; Nukui *et al*, 2000). L'éthylène jouerait un rôle dans le positionnement des nodules en face des pôles de xylème (Heidstra *et al*, 1997).

d) Structure du nodule

L'infection du nodule indéterminé se fait par sa base, ce qui établit un gradient de différenciation et définit plusieurs zones :

- la **zone méristématique** (zone I) située à l'apex. Cette zone est toujours dépourvue de bactéries.
- la **zone de préfixation** (zone II) qui contient les cellules corticales nouvellement produites par le méristème et qui sont envahies par des cordons d'infection rhizobiens. Les bactéries sont déversées dans les cellules, entourées par la membrane péricellulaire, et leur différenciation en bactéroïdes commence (Figure 9). À ce stade, elles ne fixent pas encore l'azote.
- l'interzone II-III dans laquelle la différenciation des bactéroïdes se poursuit et la fixation de l'azote commence. Cette zone se caractérise par la présence de nombreux amyloplastes.
- la **zone de fixation** (zone III) où les bactéroïdes pleinement différenciés fixent activement l'azote.
- la **zone de sénescence** (zone IV) qui est présente chez les nodules âgés.

Les nodules de Légumineuses présentent une structure similaire à celle d'une tige avec les tissus vasculaires périphériques qui se raccordent à ceux de la racine et une zone centrale infectée par

les *Rhizobia*. De la périphérie vers l'intérieur du nodule, on trouve :

- le cortex externe constitué en majorité par des cellules parenchymateuses
- le cortex moyen
- les tissus vasculaires constitués surtout de phloème et entourés par un endoderme et un péricycle
- le cortex interne formé de une à trois couches de cellules
- le parenchyme central qui contient les cellules infectées par les *Rhizobia* et des cellules non infectées plus petites.

III. Les symbioses actinorhiziennes

1) Généralités

Les plantes actinorhiziennes, appelées ainsi car elles forment une symbiose fixatrice d'azote avec un actinomycète, *Frankia*, sont pour la plupart des espèces ligneuses. Elles comprennent des plantes distribuées en 8 familles d'angiospermes et 24 genres, parmi lesquelles on trouve le filao (*Casuarina equisetifolia*), l'aulne (*Alnus sp.*), l'olivier de Bohème (*Elaeagnus angustifolia*) et le myrte des marais (*Myrica gale*). Ce sont essentiellement des arbres ou arbustes adaptés aux stress édaphiques comme la salinité élevée, les métaux lourds ou les pH extrêmes (Dawson, 1990). Leur importance résulte surtout du fait qu'elles sont responsables de la moitié de la fixation biologique de l'azote et que ce sont des espèces capables de réhabiliter des sites dégradés ou de protéger les sols contre diverses formes d'érosion (Moiroud, 1996).

2) Aspects phylogénétiques et évolutifs

La répartition phylogénétique des plantes actinorhiziennes semble assez disparate. 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 exemple, *Dryas drumondii* est la seule espèce actinorhizienne de ce genre. Dans la famille des Bétulacées, des genres très

proches comme *Alnus* et *Betula* ne partagent pas la capacité à fixer de l'azote (Huss-Danel, 1997). Une étude phylogénétique des plantes actinorhiziennes basée sur l'analyse du gène *rbcL* a permis de les grouper dans un même clade, Rosid I, qui inclut les Légumineuses et d'autres plantes non symbiotiques. Cela suggère l'existence d'une prédisposition à la symbiose au sein de ce groupe (Soltis *et al.*, 1995). L'association avec *Frankia* se serait produite indépendamment au moins quatre fois au cours de l'évolution (Swensen, 1996).

Les traces les plus anciennes de plantes appartenant à des familles où l'on trouve actuellement des plantes actinorhiziennes sont des grains de pollen de Myricacées et d'*Alnus* datant de la fin du crétacé (87,5–84 millions d'années) ou du début du tertiaire (87,5–66 millions d'années). Du pollen caractéristique des Casuarinacées est abondant pendant le paléocène (66–58 millions d'années). Pour les Datisacées, des mégafossiles correspondent à 55–39 millions d'années et pour les autres familles de plantes actinorhiziennes, les traces fossiles sont plus récentes : 39–23,5 millions d'années pour les Elaeagnacées, les Rhamnacées et les Rosacées, 11–5 millions d'années pour les Coriariacées. Il n'y a pas de preuve que ces plantes aient établi des symbioses actinorhiziennes dès le début, mais comme les fossiles retrouvés correspondent dans la plupart des cas à des milieux aux conditions nutritionnelles difficiles comme ceux colonisés par les plantes actinorhiziennes actuelles, cette hypothèse semble probable (Benson et Clawson, 2000). Après les glaciations, les plantes actinorhiziennes ont pu jouer un rôle écologique considérable en colonisant les moraines et les terres récemment mises à nu par la fonte des glaciers (Benson et Clawson, 2000).

3) Le partenaire bactérien

Frankia est une bactérie filamenteuse Gram positive (Benson et Silvester, 1993). Il s'agit plus particulièrement d'un actinomycète en raison de ses

caractéristiques morphologiques et biochimiques. Les colonies de *Frankia* cultivées *in vitro* se développent sous la forme de filaments et de manière radiale (Figure 10). On distingue des structures spécialisées (hyphes végétatives septées, sporanges et vésicules). Au plan

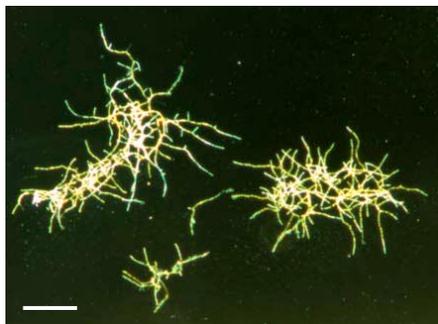


Figure 10. Filaments de *Frankia*
Frankia est une bactérie filamenteuse Gram positive. Les hyphes se développent de manière radiale sous forme de filaments. Barre : 50µm.

biochimique, *Frankia* s'apparente aux autres actinomycètes en raison de la teneur élevée en guanine et cytosine de son ADN. Le genre *Frankia* constitue un groupe homogène et se distingue par un faisceau de caractères des autres genres d'actinomycètes. Parmi ces caractères, il faut noter un pouvoir infectif vis-à-vis des plantes actinorhiziennes. Il existe une spécificité pour l'infectivité (aptitude à noduler) des souches de *Frankia* (Mullin et Dobritsa, 1996).

L'interaction entre *Frankia* et les plantes actinorhiziennes conduit à la formation d'un nouvel organe racinaire appelé nodule actinorhizien ou actinorhize dans lequel la bactérie est hébergée et fournit de l'azote réduit à la plante.

4) La formation du nodule actinorhizien

L'émergence de deux espèces modèles chez les Légumineuses, *M. truncatula* et *L. japonicus*, a contribué à accélérer la caractérisation génétique de la symbiose *Rhizobium*-Légumineuse. Dans le cas des symbioses actinorhiziennes, aucune plante modèle n'a encore émergé. Toutes les plantes actinorhiziennes, à l'exception de *Datisca glomerata*, sont des plantes pérennes ligneuses ce qui rend les approches génétiques difficiles pour ne

pas dire impossibles. De plus, la transformation génétique de *Frankia* n'est pas maîtrisée ce qui limite les analyses des gènes symbiotiques bactériens. Pour toutes ces raisons, les mécanismes moléculaires de la formation du nodule actinorhizien sont encore largement méconnus.

Les gènes de plantes exprimés de manière spécifique en réponse à l'infection par *Frankia* sont appelés gènes de nodulines actinorhiziennes par homologie aux nodulines des Légumineuses. On distingue les nodulines précoces, exprimées pendant les premières phases de l'infection, et les nodulines tardives impliquées dans le fonctionnement du nodule. Le récent séquençage du génome de trois souches de *Frankia* (Normand *et al*, 2006) associé au développement d'approches d'ARN interférent pour des plantes actinorhiziennes comme *Allocasuarina verticillata* et *Casuarina glauca* (C. Franche, notre laboratoire) ouvrent de nouvelles perspectives pour identifier des gènes bactériens et végétaux impliqués dans l'interaction symbiotique.

a) Préinfection

Le développement du nodule actinorhizien ne se produit qu'en situation de carence azotée. Les racines émettent des signaux de nature inconnue qui sont perçus par *Frankia*. Les phénylpropanoïdes sont suspectés jouer ce rôle par analogie avec les Légumineuses. 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).

En réponse à ces signaux végétaux, *Frankia* produit un signal symbiotique qui est perçu par la racine. Chez les plantes à voie d'infection intracellulaire, cela conduit à la courbure du poil racinaire. La nature biochimique des facteurs actinorhiziens est toujours inconnue cependant il semble qu'elle diffère de celle des facteurs Nod de *Rhizobium*. En effet, l'application de facteurs Nod n'a aucun effet sur les racines d'aulne (Cérémonie *et al*, 1999). De plus, une fraction contenant le facteur de déformation du poil racinaire a été

caractérisée biochimiquement démontrant la différence de nature avec les facteurs Nod (Cérémonie *et al*, 1999). L'analyse du génôme de *Frankia* indique l'absence des gènes requis pour la production des facteurs Nod (Normand *et al*, 2006). Enfin, l'utilisation d'ADN génomique de *Frankia* n'a jamais permis de compléter des mutants *nod*⁻ de *Rhizobium* ce qui suggère que les gènes impliqués dans la production des facteurs actinorhiziens et des facteurs Nod sont différents (Cérémonie *et al*, 1998). À ce jour, aucun gène exprimé spécifiquement en réponse à ces facteurs n'a été identifié chez les plantes actinorhiziennes. Un tel gène marqueur permettrait de faire progresser l'identification des facteurs actinorhiziens.

La bactérie *Frankia* produit des phytohormones qui pourraient jouer un rôle dans la signalisation symbiotique. Des auxines naturelles comme l'acide 3-indole acétique (IAA) ou l'acide phénylacétique (PAA) sont présentes dans le milieu de culture de certaines souches de *Frankia* à des concentrations assez élevées pour être perçues par la plante (10^{-5} à 10^{-6} M ; Wheeler *et al*, 1984 ; Hammad *et al*, 2003). La cytokinine isopentényl adénosine (iPA) a également été détectée à des concentrations de l'ordre de 10^{-6} M (Gordons *et al*, 1988). Cependant, le rôle exact de ces hormones dans le processus de nodulation est toujours inconnu.

b) Infection

Il existe deux modes d'infection des plantes actinorhiziennes par *Frankia* : la voie intracellulaire et la voie intercellulaire (Figure 11). Le type d'infection est dépendant de la plante hôte (Berry et Sunnel, 1990).

L'infection intracellulaire commence avec la déformation des poils racinaires environ 24 à 48 heures après inoculation (Figure 12A). Suivant les espèces, tous les poils racinaires (par ex. *Casuarina* ; Torrey, 1976) ou seulement quelques-uns (par ex. *Comptonia* ; Callaham *et al*, 1979) se déforment. Seuls les jeunes poils racinaires en croissance et pas encore complètement différenciés sont compétents pour l'infection (Callaham et

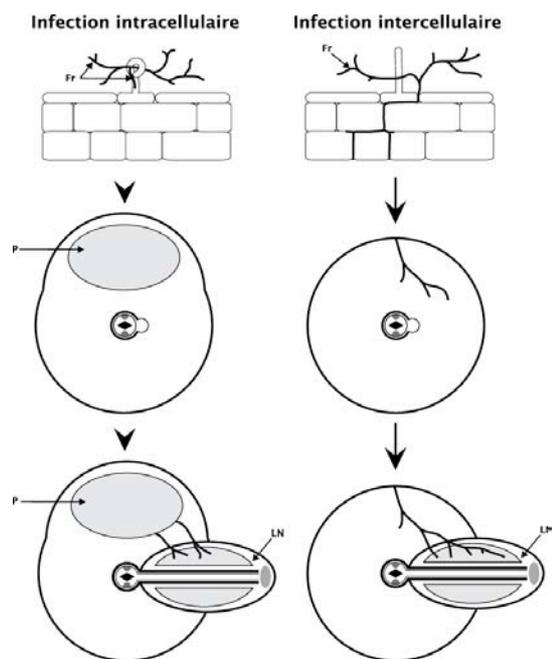


Figure 11. Infections intra et inter-cellulaire chez les plantes actinorhiziennes

Infection intracellulaire (*Myrica*, *Comptonia*, *Alnus* et *Casuarina*)

La voie de pénétration de *Frankia* (Fr) est un poil absorbant. De manière concomitante à la progression de *Frankia* dans le poil absorbant, a lieu une activité mitotique dans le cortex de la racine. Les divisions cellulaires et l'hypertrophie de ces cellules infectées par *Frankia* donnent naissance à une légère protubérance de la racine, visible à l'œil nu, le prénodule (P). Le lobe nodulaire (LN) est initié dans des cellules du pérycyle qui sont opposées à l'un des pôles du xylème primaire. L'invasion du lobe nodulaire par *Frankia* se réalise par des hyphes issus du prénodule.

Infection intercellulaire (*Elaeagnus*, *Ceanothus* et *Cercocarpus*)

La pénétration des hyphes de *Frankia* a lieu dans la lamelle moyenne de deux cellules du rhizoderme. L'infection de la racine se poursuit par la progression intercellulaire des hyphes vers le lobe nodulaire qui est issu de cellules du pérycyle opposées au pôle du protoxylème. L'invasion du lobe nodulaire par *Frankia* est intracellulaire et reste localisée au parenchyme cortical du lobe nodulaire. Dans ce type d'infection, on n'observe pas de stade prénodule. D'après Franche *et al*, 1998.

Torrey, 1977 ; Callaham *et al*, 1979). Les hyphes de *Frankia* sont piégés dans des polysaccharides d'origine végétale à l'extrémité du poil racinaire et commencent à former un cordon d'infection (Berry *et al*, 1986 ; Berg, 1999a).

Une désorganisation locale de la paroi est observée au site de pénétration des hyphes (Berry *et al*, 1986). Tout au long de l'infection, les hyphes restent entourées par la membrane plasmique de l'hôte. Un gène de *Casuarina glauca*, nommé *Cg12*, codant pour une protéase de type subtilisine est exprimé de manière spécifique dans les cellules infectées et

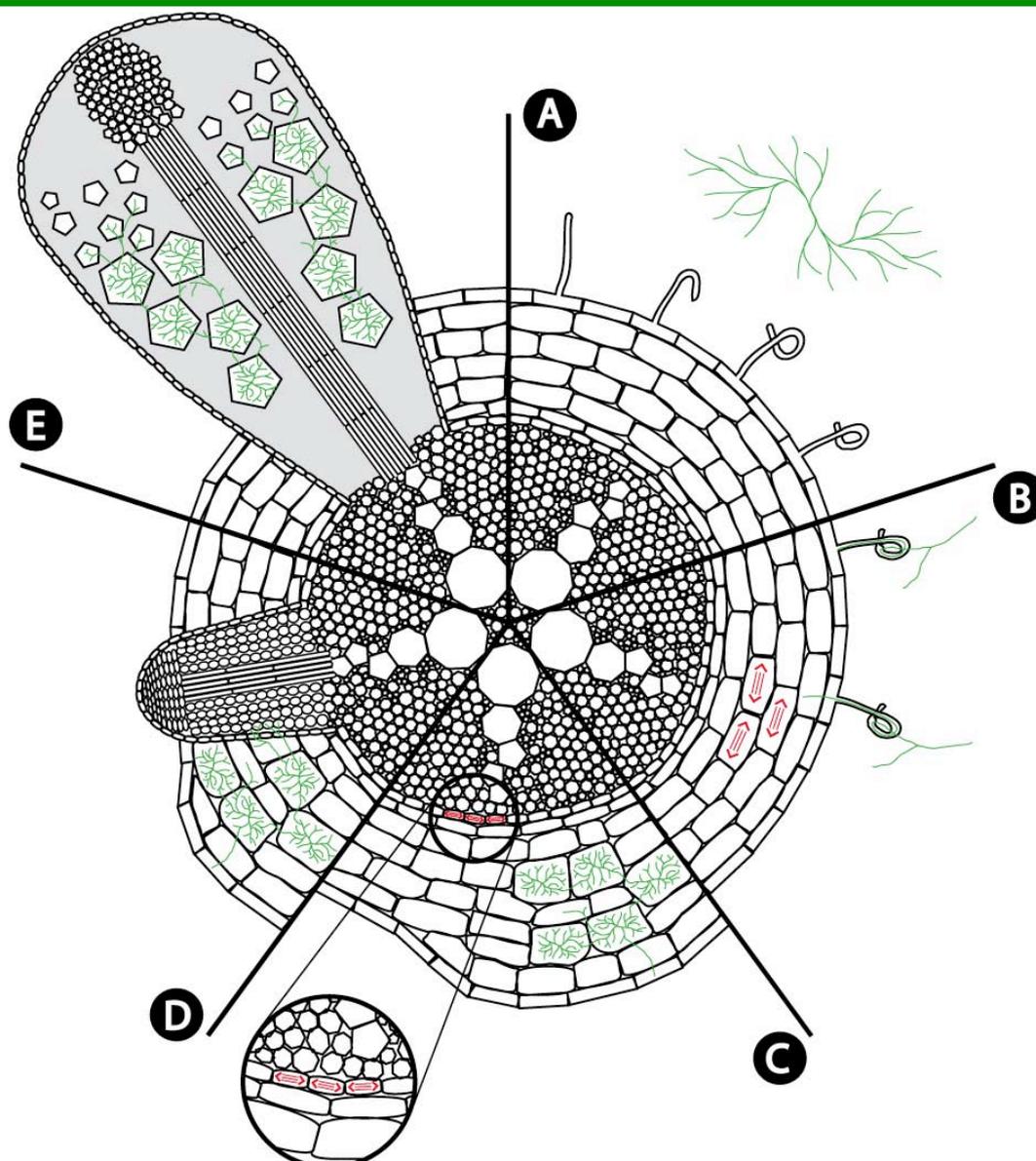


Figure 12. Processus d'infection intracellulaire et organogenèse d'un lobe nodulaire chez les plantes actinorhiziennes

L'échange de signaux entre *Frankia* et la plante actinorhizienne aboutit à la déformation du poil racinaire (A). La bactérie pénètre dans un poil déformé et provoque des divisions des cellules corticales (B). Les cellules corticales en division sont infectées par les hyphes de *Frankia* et s'hypertrophient ce qui provoque l'apparition du pré-nodule. En même temps, quelques cellules du péricycle situées en face du pôle de xylème se divisent pour donner naissance au primordium nodulaire (C). Les hyphes de *Frankia* en provenance du pré-nodule envahissent les cellules corticales du nodule en formation (D). Dans le nodule mature, quatre zones sont décrites : la **zone méristématique** toujours dépourvue de *Frankia*, la **zone d'infection** qui contient les cellules corticales nouvellement produites en cours d'infection, la **zone de fixation** où les cellules infectées fixent activement l'azote atmosphérique et la **zone de sénescence** chez les nodules âgés (non représentée) où *Frankia* et les cellules végétales dégèrent.

notamment les poils racinaires (Laplaze *et al*, 2000b ; Svistoonoff *et al*, 2003). Il s'agit d'une protéine sécrétée qui pourrait être impliquée dans le remodelage de la paroi au cours de l'infection par *Frankia*. Les poils racinaires infectés ont une forte activité métabolique alors que les poils non infectés dégèrent rapidement (Berry *et al*, 1986 ; Berg, 1999a). L'infection intracellulaire provoque la division de

quelques cellules corticales situées à proximité ce qui entraîne l'apparition d'une protubérance à la surface de la racine que l'on appelle le « pré-nodule » (Figure 12B ; Callaham et Torrey, 1977). La formation du pré-nodule est une étape obligatoire avant la formation du nodule mais le pré-nodule n'est pas directement impliqué dans la formation du nodule (Laplaze *et al*, 2000a). Les hyphes de

Frankia progressent de manière intracellulaire du site d'infection en direction du prénodule au travers de ponts cytoplasmiques appelés cordons de préinfection (Berg, 1999b) et qui sont formés avant infection par *Frankia* par un signal de nature inconnue. Les cellules du prénodule sont infectées par *Frankia* et se différencient pour fixer l'azote atmosphérique (Angulo Carmona, 1974 ; Laplaze *et al*, 2000a).

L'infection intercellulaire débute par la pénétration de *Frankia* entre les cellules de l'épiderme (Figure 12). Aucune déformation des poils racinaires n'est associée à ce type d'infection. Un matériau dense est sécrété par les cellules végétales au site d'infection (Miller et Baker, 1985). *Frankia* progresse dans les tissus corticaux au travers de la lamelle moyenne.

c) Développement du nodule

Au cours des deux types d'infection (voie intracellulaire ou intercellulaire), *Frankia* induit la division de certaines cellules du péri-cycle situées en face du pôle de xylème pour donner naissance à un primordium nodulaire (Figure 12C et D). Chez *Comptonia*, certaines cellules corticales subissent des divisions et participent à la formation du primordium (Callahan et Torrey, 1977). Chaque lobe nodulaire présente un méristème apical, un système vasculaire central et un péri-derme à sa périphérie. Les hyphes de *Frankia* soit en provenance du prénodule (infection intracellulaire) soit en progression intercellulaire à travers le cortex (infection intercellulaire) envahissent les cellules corticales situées à la base du primordium nodulaire. La progression de *Frankia* à l'intérieur du nodule se fait en direction de l'apex ce qui crée un gradient de développement centrifuge de *Frankia* et des cellules infectées (Figure 12E).

d) Structure du nodule

Quatre zones sont habituellement décrites :

- la **zone méristématique** située à l'apex. Elle est responsable de la croissance indéterminée du nodule.

Cette zone est toujours dépourvue de *Frankia*.

- la **zone d'infection** adjacente au méristème apical. Les hyphes infectent les cellules corticales nouvellement formées.
- la **zone de fixation** qui contient à la fois des cellules infectées et des cellules non infectées. Les cellules infectées présentent une hypertrophie caractéristique et sont remplies d'hyphes. Les cellules bactériennes et végétales se différencient pour permettre la fixation de l'azote.
- la **zone de sénescence** qui est présente chez les nodules âgés. Les cellules bactériennes et végétales dégènèrent, *Frankia* produit des sporanges.

Chez certaines espèces comme *Casuarina* ou *Myrica*, une « racine nodulaire » dépourvue de *Frankia* est présente à l'apex de chaque lobe nodulaire (Figure 13). C'est une racine



Figure 13. Nodule et racines nodulaires de *Casuarina glauca*

Photographie d'un nodule âgé de 5 semaines, présentant plusieurs lobes qui comportent une racine nodulaire à l'apex. Barre : 500 µm. D'après Laplaze, 1999.

modifiée qui présente un gravitropisme négatif (elle pousse vers la surface). Elle comporte un aérénchyme développé ce qui laisse supposer qu'elle jouerait un rôle dans la circulation des gaz (Pawłowski et Bisseling, 1996). Dans ce cas, le méristème nodulaire est reprogrammé pour devenir un méristème de racine nodulaire mais les mécanismes moléculaires responsables de ce changement sont inconnus.

La croissance du nodule se fait par ramification des lobes nodulaires. Un nouveau primordium est formé à partir des cellules du péricycle du lobe préexistant puis il est infecté par les hyphes de *Frankia* en provenance du nodule. Ce mode de croissance détermine la structure coralloïde des nodules actinorhiziens (Figure 13).

e) *Le nodule actinorhizien : une racine latérale modifiée ?*

Du fait de son origine développementale identique à celle d'une racine latérale (division des cellules du péricycle situées en face du pôle de xylème) et de son anatomie similaire à celle d'une racine latérale, le nodule actinorhizien est souvent considéré comme une racine latérale modifiée (Pawlowski et Bisseling, 1996). La présence de la racine nodulaire à l'apex du nodule chez certaines espèces de plantes actinorhiziennes est en accord avec cette théorie. Cependant, une étude approfondie menée chez *Alnus glutinosa* suggère que les nodules ne sont pas formés à partir de racines latérales préexistantes (Angulo Carmona, 1974). De plus, les cellules corticales peuvent être impliquées dans la formation du primordium nodulaire chez certaines espèces comme *Comptonia* alors que le primordium de racine latérale provient uniquement des cellules du péricycle (Callahan et Torrey, 1977). Enfin, bien que le nodule présente les caractéristiques développementales et morphologiques d'une racine latérale, l'existence de voies de développement communes entre ces deux organes n'a jamais été démontrée.

L'infection par *Frankia* ne modifie pas le développement du système racinaire même si les plantes nodulées ont une meilleure croissance que les plantes non inoculées. L'étroite ressemblance entre les nodules actinorhiziens et les racines latérales aurait pu laisser penser que l'infection a un impact sur l'architecture racinaire. Une étude fine de la nodulation d'*Alnus glutinosa* a permis de montrer que la nodulation n'a aucun impact sur la distribution des racines latérales (Angulo

Carmona, 1974). Les nodules actinorhiziens sont donc des organes supplémentaires qui ne se forment pas à partir de primordia de racines latérales préexistantes. De plus, il n'y a pas d'augmentation du nombre de racines latérales en réponse à l'infection (Angulo Carmona, 1974). Ces résultats suggèrent que la formation du nodule actinorhizien et de la racine latérale sont régulés de manière indépendante. Néanmoins, le développement de la racine latérale est un bon modèle pour l'analyse du développement du nodule actinorhizien du fait de la grande ressemblance anatomique entre ces deux organes.

IV. Formation de la racine latérale

1) Généralités

Après germination, les parties aériennes produisent des méristèmes aux aisselles de chaque primordium foliaire. Ces méristèmes secondaires sont constitués de cellules indifférenciées qui peuvent être activées pour permettre la ramification du système aérien. À l'inverse, aucun méristème secondaire n'est généré par le méristème apical racinaire. De ce fait, la ramification du système racinaire implique la formation *de novo* de méristèmes à partir de cellules différenciées (Dolan et Scheres, 1998). Cependant, la détermination des cellules à l'origine des primordia de racine latérale pourrait se faire très tôt au cours de la mise en place de la racine primaire (De

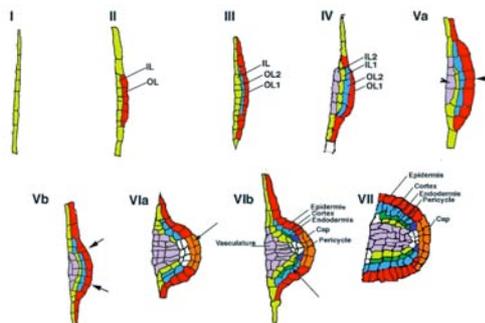


Figure 14. Différents stades de formation du primordium de racine latérale chez *Arabidopsis thaliana*

Les cellules du péricycle donnent naissance au primordium de racine latérale. La mise en place du primordium est un mécanisme très régulé et bien décrit. IL, inner layer; OL, outer layer. D'après Malamy et Benfey, 1997.

Smet *et al*, 2007).

L'organisation très simple de la racine d'*Arabidopsis* a permis une caractérisation histologique fine des mécanismes de mise en place du méristème de racine latérale (Figure 14 ; Malamy et Benfey, 1997). La disponibilité de nombreux mutants a conduit à l'identification de nombreux gènes impliqués dans la formation de la racine latérale (Casimiro *et al*, 2003). La mise en place de la racine se découpe en trois étapes majeures : initiation, organisation du primordium et émergence.

2) Initiation

La racine d'*Arabidopsis* a une anatomie assez simple puisqu'elle est composée d'une série de couches monocellulaires autour des tissus vasculaires (xylème et phloème) : le péricycle, l'endoderme, le cortex et l'épiderme (Figure 15 ; Dolan et

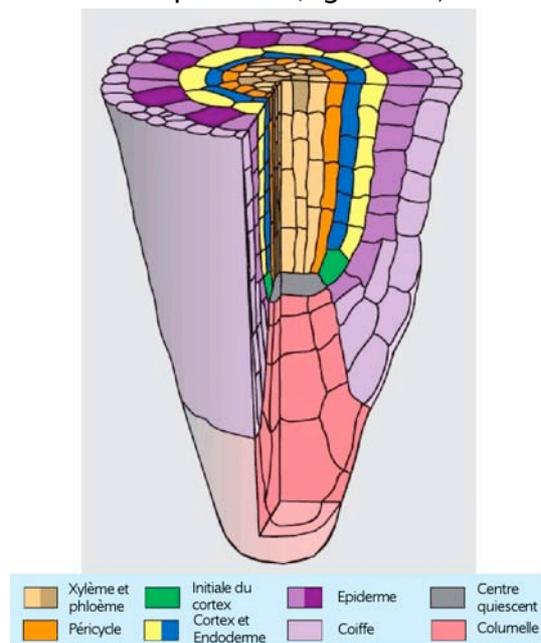


Figure 15. Anatomie de la racine d'*Arabidopsis thaliana*
La racine d'*A. thaliana* possède une organisation très simple, le tissu vasculaire est entouré de quatre couches monocellulaires : le péricycle, l'endoderme, le cortex et l'épiderme. D'après Benfey et Scheres, 2000.

al, 1993). Les racines latérales proviennent des cellules du péricycle situées en face des deux pôles de xylème (Dubrovsky *et al*, 2001). La plupart des cellules du péricycle sont bloquées en phase G1 et seules les cellules compétentes, situées en face des pôles de xylème, progressent

vers la phase S puis G2 (Figure 16 ; Beeckman *et al*, 2001).

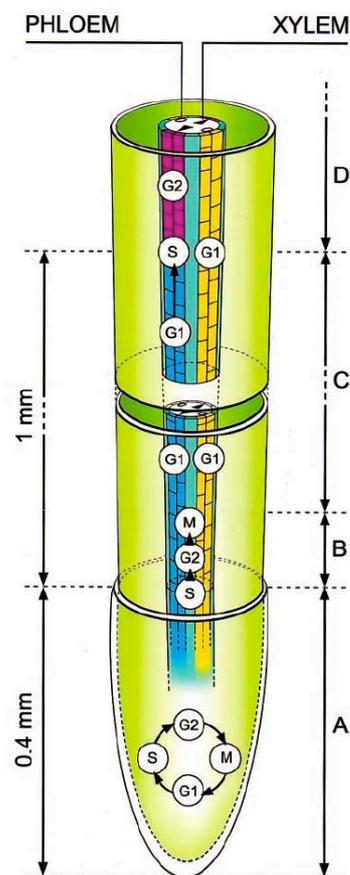


Figure 16. Régulation du cycle cellulaire dans le péricycle

Dans le méristème racinaire, les divisions cellulaires sont très actives (A). En amont de cette zone, les tissus externes sortent du cycle cellulaire et se différencient alors que les tissus internes continuent leurs divisions (B). Puis les cellules du péricycle stoppent leurs divisions et restent bloquées en phase G1 (C). Les cellules du péricycle situées en face d'un des pôles de xylème progressent vers la phase S puis G2 et deviennent alors compétentes pour l'initiation de la racine latérale (D). D'après Beeckman *et al*, 2001.

Parmi les cellules compétentes, les cellules « fondatrices » sont définies comme des cellules qui acquièrent un destin développemental différent des autres cellules du péricycle et qui, par conséquent, jouent un rôle primordial dans l'initiation de la racine latérale (Dubrovsky *et al*, 2001). Les premiers événements morphologiques associés à l'initiation d'une racine latérale ont lieu dans deux cellules fondatrices adjacentes (De Smet *et al*, 2006). Ces cellules se divisent de manière anticlinale et asymétrique pour créer deux cellules courtes flanquées de deux cellules longues (De Smet *et al*, 2006). Cette

première division détermine la naissance d'un primordium de stade I (Malamy et Benfey, 1997).

L'auxine est considérée comme le signal induisant l'initiation. En effet, l'apport d'auxine exogène induit la formation de racines latérales. De plus, la perturbation du transport polarisé de l'auxine inhibe le développement des racines latérales (Reed *et al*, 1998). Les analyses génétiques ont permis d'identifier de nombreux mutants affectés dans la réponse à l'auxine (*axr*, *tir1*, *shy2*), son transport (*aux1*) et son homéostasie (*alf1*, *ydk1*, *dfl1*) et présentant un phénotype au niveau des racines latérales (De Smet *et al*, 2006). Notamment, le transport d'influx d'auxine est impliqué dans l'étape d'initiation puisque le mutant *aux1* présente une réduction de 50% de primordia initiés (Marchant *et al*, 2002). Chez le mutant *aux1*, les niveaux d'auxine sont suboptimaux pour permettre l'initiation du primordium mais les étapes suivantes de mise en place du méristème ne semblent pas affectées.

Les racines latérales sont produites à distance du méristème apical et de la zone d'élongation (Dubrovsky *et al*, 2000). Cependant, des études récentes montrent que les cellules fondatrices pourraient être déterminées dans le méristème basal sous l'action de l'auxine (De Smet *et al*, 2007). Le méristème basal correspond à la région située entre le méristème apical et la zone d'élongation (Beemster *et al*, 2003) et présente une sensibilité élevée à l'auxine. Dans cette zone, les pics de perception de l'auxine correspondent aux futurs sites d'initiation de la racine latérale. Un signal auxinique récurrent perçu par le méristème basal permettrait donc de déterminer la distribution des racines latérales sur l'axe racinaire (De Smet *et al*, 2007).

L'utilisation du marqueur de perception de l'auxine *DR5:GUS* montre que l'auxine s'accumule dans les cellules du péri-cycle avant et pendant les premières divisions asymétriques (Benková *et al*, 2003). Le mutant *slr1* (*solitary root*) est incapable d'initier des racines latérales (Fukaki *et al*, 2002). Chez ce mutant, la protéine IAA14

(Aux/IAA) est stabilisée et inhibe la voie de signalisation auxinique qui mène normalement à l'initiation. L'interaction inhibitrice implique les protéines ARF7 et ARF19 et a pour effet d'empêcher l'activation des cellules du péri-cycle et les premières divisions anticlinales (Fukaki *et al*, 2005 ; Okushima *et al*, 2007).

Les cibles de la signalisation auxinique dans les cellules du péri-cycle ne sont pas toutes identifiées. Cependant, il est clair que l'auxine est le signal qui permet l'activation des cellules du péri-cycle en leur faisant passer la transition G1-S d'entrée dans le cycle cellulaire (Himanen *et al*, 2002 ; Vanneste *et al*, 2005b). Le gène *KRP2*, un inhibiteur des kinases dépendantes de cycline (CDK) et donc de la transition G1-S, est exprimé dans les cellules du péri-cycle qui ne sont pas à l'origine des racines latérales (Himanen *et al*, 2002). La surexpression de *KRP2* entraîne une diminution de l'ordre de 60% du nombre de racines latérales. L'activation des cellules du péri-cycle pour la formation des racines latérales pourrait donc passer par une levée d'inhibition de *KRP2*. En effet, l'expression du gène *KRP2* est inhibée par l'auxine (Himanen *et al*, 2002) ce qui suggère que l'auxine agit directement sur le cycle cellulaire. Pour autant, l'activation du cycle cellulaire n'est pas la seule cible de la signalétique auxinique car elle n'est pas suffisante pour permettre la formation d'une racine latérale. En effet, la surexpression du gène *CYCD3;1* codant une cycline de type D chez le mutant *slr* entraîne des divisions cellulaires dans le péri-cycle mais ne permet pas la formation de racines latérales (Vanneste *et al*, 2005a). Des analyses transcriptomiques ont été réalisées afin d'identifier de nouvelles cibles de la signalisation auxinique (Vanneste *et al*, 2005b). L'étape d'initiation de la racine latérale nécessite donc que l'activation du cycle cellulaire soit accompagnée d'une détermination des cellules fondatrices. Les recherches en cours devraient permettre de préciser quels sont les événements qui conduisent à cette détermination.

3) Organisation du primordium

Les cellules filles issues des cellules du péricycle poursuivent leurs divisions symétriques et asymétriques pour donner un groupe de 8 à 10 cellules courtes de taille identique. Les cellules entament ensuite une série de divisions périclinales pour donner naissance à un primordium comportant deux (stade II), puis trois (stade III) et enfin quatre couches cellulaires (stade IV). À partir du stade II, le primordium progresse à travers la première couche externe : l'endoderme (Malamy et Benfey, 1997). L'organisation du primordium aboutit à une structure méristématique identique à celle du méristème primaire à partir du stade VI. L'utilisation d'un certain nombre de marqueurs spécifiques de l'endoderme, du cortex ou de l'épiderme a permis de mettre en évidence la différenciation de ces types cellulaires indiquant une organisation du primordium de racine latérale similaire à celle de la racine primaire (Malamy et Benfey, 1997).

L'utilisation du marqueur DR5:*GUS* a permis de montrer qu'un gradient d'auxine est formé dans le primordium, avec le maximum d'auxine formé à l'apex. Ce gradient est nécessaire à la formation du méristème racinaire latéral (Benková et al, 2003 ; Swarup et Bennett, 2003) et sa mise en place requiert l'action coordonnée de transporteurs d'influx et de manière prépondérante d'efflux d'auxine (Wisniewska et al, 2006). La mutation des gènes de transport d'efflux d'auxine (*PIN*) n'a qu'un effet limité sur l'organisation du méristème (Gälweiler et al, 1998). Néanmoins, l'utilisation de mutants multiples permet de contourner la redondance fonctionnelle de ces gènes et fait apparaître un rôle important dans la mise en place de ce gradient. Par exemple, chez les triples mutants *pin1pin4pin7* ou *pin1pin3pin7*, l'auxine induit la formation de primordia de racine latérale ressemblant à des massifs cellulaires peu organisés (Benková et al, 2003). Un phénotype identique est obtenu par inhibition du transport d'auxine (Benková et al, 2003). La régulation de la localisation cellulaire des protéines PIN est également

importante pour l'organisation du primordium. Le gène *GNOM* code un facteur d'échange pour les GTPases de la famille des facteurs de ribosylation de l'ADP (ARF-GEF) qui régule le trafic vésiculaire et est requis pour la localisation de PIN1 (Geldner et al, 2003). Un allèle faible du mutant *gnom* présente les mêmes défauts d'organisation du primordium de racine latérale que les triples mutants *pin* en réponse à l'auxine (Geldner et al, 2004).

4) Émergence

L'étape finale (stade VIII ou émergence) correspond à la sortie du primordium de la racine principale. L'émergence n'est pas associée avec des divisions cellulaires mais à un allongement des cellules qui permet un accroissement de la taille du primordium. Les cellules des tissus externes s'écartent pour laisser passer le primordium en croissance. Après émergence, les divisions cellulaires reprennent à l'apex de la racine latérale nouvellement formée (Malamy et Benfey, 1997).

Les mécanismes de régulation de l'étape d'émergence de la racine latérale ont été peu étudiés. Différentes approches ont permis d'identifier des gènes impliqués dans ce processus (Neuteboom et al, 1999a ; Laskowski et al, 2006). Il semblerait que l'induction par l'auxine de gènes de remodelage de la paroi permette le passage du primordium à travers les tissus externes. Parmi ces gènes, on retrouve notamment *AtAIR3* qui est exprimé spécifiquement dans les cellules situées en face du primordium en formation (Neuteboom et al, 1999b). Le gène *AIR3* code une protéase à sérine de type subtilisine qui est excrétée et permettrait de modifier les propriétés de la paroi végétale.

En conclusion, l'auxine apparaît comme le signal clé de la mise en place des racines latérales (Casimiro et al, 2001 ; Bhalerao et al, 2002). L'auxine intervient au cours des trois étapes majeures de la formation des racines latérales : l'initiation, l'organisation du méristème et

très probablement aussi au cours de l'émergence.

V. L'hormone végétale auxine

1) Introduction

L'auxine joue un rôle crucial dans de nombreux mécanismes physiologiques et développementaux : développement de l'embryon et du fruit, organogénèse, différenciation du système vasculaire, mise en place de l'architecture racinaire, élongation cellulaire, tropismes et dominance apicale (Figure 17 ; Kepinski et Leyser, 2005a). De nombreuses molécules

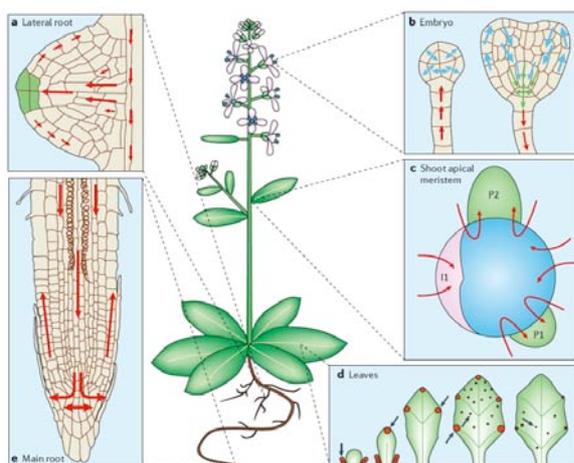


Figure 17. Implication des flux d'auxine dans les processus développementaux

Le transport d'auxine est impliqué dans de nombreux mécanismes développementaux chez les plantes : rhizogénèse latérale (a), organisation de l'embryon (b), phyllotaxie (c), différenciation du tissu vasculaire foliaire (d) et organisation du méristème apical racinaire (e). D'après Teale *et al.*, 2006.

possèdent un pouvoir auxinique mais la plus abondante chez les plantes est l'acide 3-indole acétique (IAA), les différentes formes naturelles et synthétiques utilisées au cours de cette thèse sont présentées dans la figure 18.

2) Perception et signalisation

La perception et la transduction du signal auxinique ont fait l'objet de recherches intensives et de nombreuses revues récentes sont disponibles (Leyser, 2006 ; Paciorek et Friml, 2006 ; Quint et Gray, 2006). Des récepteurs de l'auxine ont récemment été identifiés, il s'agit de la protéine TIR1 (Dharmasiri *et al.*, 2005a ;

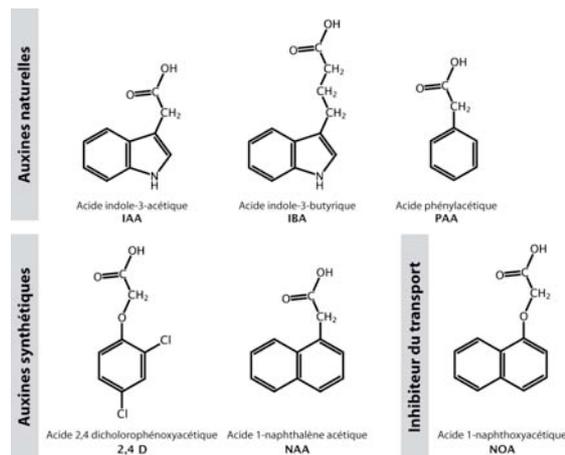


Figure 18. Formules chimiques des différents types d'auxine

La formule chimique des principaux types d'auxine naturels (IAA, IBA et PAA) et synthétiques (2,4D et NAA) est présentée ainsi que l'inhibiteur compétitif du transport d'influx (NOA).

Kepinski et Leyser, 2005b) et des membres de la famille AFB (Dharmasiri *et al.*, 2005b) même si l'existence d'autres récepteurs reste envisagée (Badescu et Napier, 2006). La figure 19 synthétise la signalisation auxinique qui fait intervenir le complexe de polyubiquitinylation SCF^{TIR} qui programme la dégradation des protéines Aux/IAA. Les Aux/IAA interagissent avec les facteurs de transcription ARF et empêchent la transcription des gènes contenant des éléments AuxRE dans leur promoteur. La destruction des Aux/IAA par le protéasome permet aux ARF de se fixer sur les AuxRE et d'initier la transcription des gènes induits par l'auxine. Cette voie de signalisation par levée d'inhibition peut sembler complexe mais elle présente certains avantages, notamment la présence de nombreux Aux/IAA et ARF assure la spécificité de la réponse auxinique en fonction des types cellulaires (Teale *et al.*, 2006).

3) Homéostasie

L'homéostasie de l'auxine est complexe puisqu'elle intègre la biosynthèse, la dégradation, la conjugaison, la compartimentation et le transport (Figure 20 ; Ljung *et al.*, 2002 ; Woodward et Bartel, 2005).

Les détails de la biosynthèse de l'auxine ne sont pas totalement connus (Woodward et Bartel, 2005). Les approches de

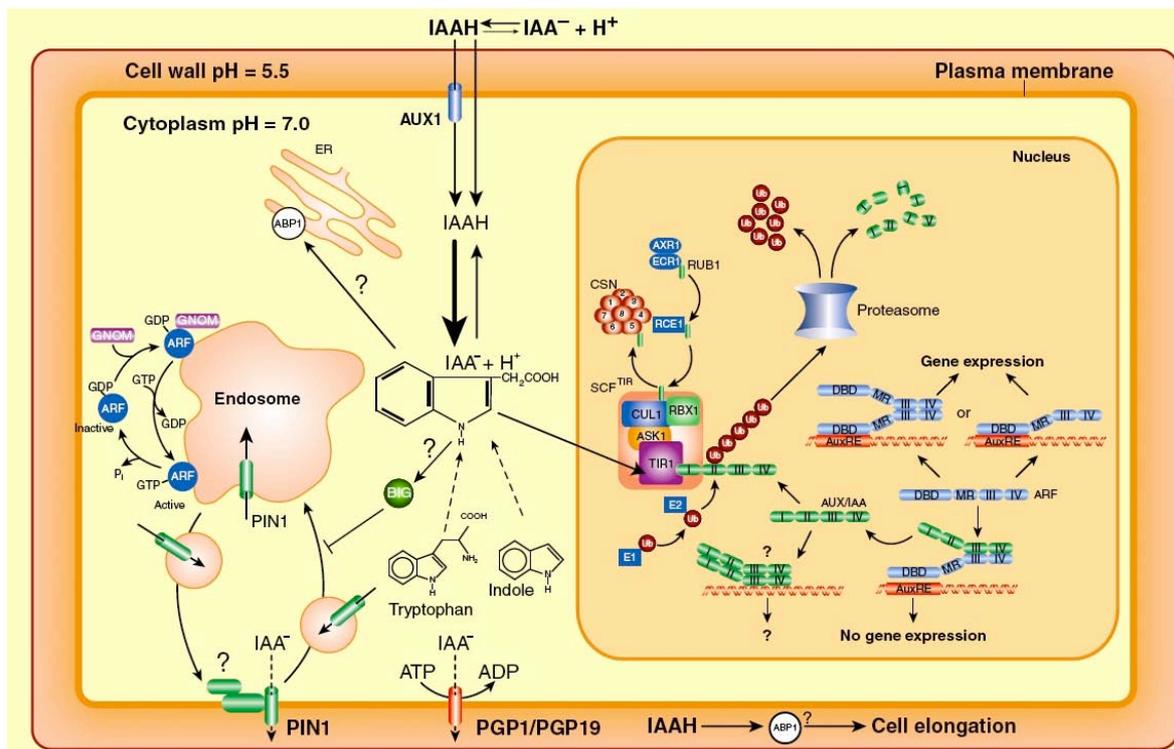


Figure 19. Signalisation auxinique

Le complexe de polyubiquitinylation SCF^{TIR} programme la dégradation des protéines nucléaires Aux/IAA. Les Aux/IAA interagissent avec les 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. D'après Paciorek et Friml, 2006

génétique classique (recherche de mutants dépourvus d'auxine) n'ont pas été fructueuses. Cela s'explique par la létalité potentielle de telles mutations ou par l'existence de voies de biosynthèse multiples et redondantes. En effet, deux voies de biosynthèse seraient impliquées dans la synthèse d'auxine : une voie majoritaire dépendante du tryptophane et une voie indépendante (Figure 21 ; Cohen *et al*, 2003). L'auxine est essentiellement synthétisée au niveau des jeunes feuilles, cotylédons et racines (Ljung *et al*, 2001). Plus précisément, au niveau racinaire, l'auxine est synthétisée dans les régions méristématiques de la racine principale et des racines secondaires (Ljung *et al*, 2005).

La dégradation de l'auxine se fait par décarboxylation oxydative, catalysée par une série de peroxydases (groupées sous le terme de « IAA oxydases ») ou plus majoritairement par oxydation non-décarboxylative (Ljung *et al*, 2002). Le catabolisme de l'auxine permet essentiellement de prévenir des niveaux

trop élevés d'auxine en dégradant aussi bien l'auxine libre que les formes conjuguées.

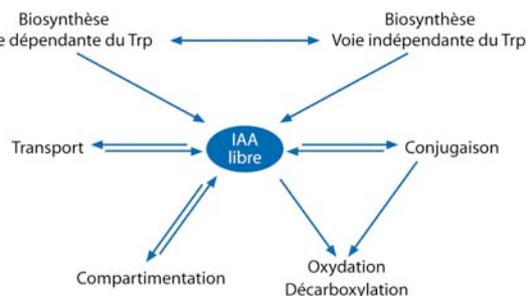


Figure 20. Homéostasie de l'auxine

L'homéostasie de l'auxine intègre la biosynthèse, la dégradation, la conjugaison, la compartimentation et le transport.

La plupart de l'auxine est sous forme conjuguée chez les plantes supérieures. L'IAA peut être conjugué avec des sucres par liaison ester, des acides aminés ou des peptides par liaison amide. Ces formes peuvent constituer des formes de stockage, de transport, de protection contre les dégradations ou de détoxification d'excès d'auxine (Bartel *et al*, 2001). Certaines formes sont donc susceptibles

d'être hydrolysées pour libérer l'auxine (Figure 20).

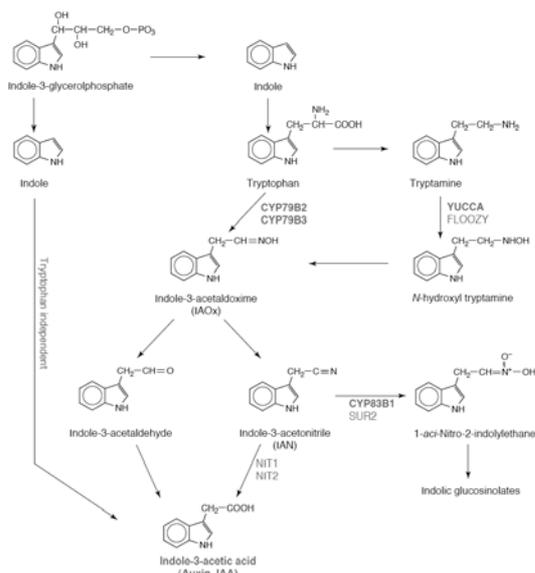


Figure 21. Voies de biosynthèse de l'auxine

Il existe au moins deux voies de biosynthèse de l'acide indole-3-acétique : une voie dépendante du tryptophane et une voie indépendante. NIT, nitrilase ; SUR2, superroot2. D'après Cohen *et al.*, 2003.

La compartimentation de l'auxine est relativement complexe et assez peu étudiée. La synthèse d'auxine semble cytoplasmique mais la libération d'auxine par hydrolyse de formes conjuguées peut avoir lieu dans le péroxyssome ou le réticulum endoplasmique. Le mode de transport de l'auxine entre les différents compartiments cellulaires est encore largement méconnu (Bartel *et al.*, 2001).

4) Transport

L'auxine est transportée à travers la plante par deux systèmes : un transport rapide (5–10 cm.h⁻¹) non-polarisé assuré par le système vasculaire et un transport de cellule à cellule, lent (5–10 mm.h⁻¹) et polarisé (Friml et Palme, 2002). Le transport non-polarisé assure essentiellement le transport longue distance de l'auxine. Au contraire, le transport polarisé d'auxine joue un rôle important dans les mécanismes développementaux en permettant l'établissement de gradients d'auxine (Friml, 2003). Ce transport est assuré par des transporteurs membranaires de deux types : les transporteurs d'influx et les transporteurs d'efflux (Blakeslee *et al.*, 2005 ; Kramer et Bennett, 2006).

Les transporteurs d'influx sont codés par les gènes de la famille *AUX-LAX* (*auxin permease/like AUX*) chez *Arabidopsis* (Bennett *et al.*, 1996 ; Parry *et al.*, 2001b). Cette famille comprend quatre gènes (*AtAUX1* et *AtLAX1-3*) chez *Arabidopsis* (Parry *et al.*, 2001b) et cinq chez *M. truncatula* (Schnabel et Frugoli, 2004). Les transporteurs d'influx d'auxine appartiennent à la famille des perméases à acides aminés et auxine (AAP ; Young *et al.*, 1999). Ce sont des protéines transmembranaires (TM) dont le mécanisme d'action précis n'est pas encore déterminé mais qui sembleraient agir comme des symports IAA/protons (Kerr et Bennett, 2007). La prédiction informatique de la topologie transmembranaire suggère l'existence de 11 domaines transmembranaires (Möller *et al.*, 2001). Ces prédictions sont confirmées par des analyses de fusions traductionnelles avec une protéine fluorescente (YFP) qui indiquent un nombre impair de domaines TM et un domaine N-terminal cytoplasmique (Swarup *et al.*, 2004). La protéine *AUX1* est impliquée dans le transport basipète puis acropète de l'auxine au niveau de l'apex

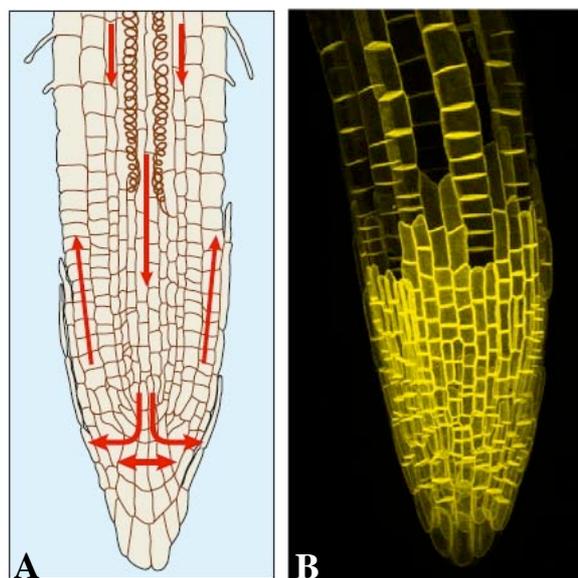


Figure 22. Transport de l'auxine dans l'apex racinaire

Au sein de la racine, l'auxine suit un transport acropète dans le cylindre central jusqu'au méristème puis le flux devient basipète et emprunte les cellules de la coiffe puis de l'épiderme (A - d'après Teale *et al.*, 2006). Ce transport est assuré par les transporteurs d'efflux et d'influx, notamment la protéine *AUX1* est présente dans le protoplasme, la columelle et les cellules latérales de la coiffe (Swarup *et al.*, 2001). La localisation de la protéine *AUX1* est montrée à l'aide d'une fusion YFP qui montre la localisation membranaire du transporteur (B - R. Swarup, communication personnelle).

racinaire (Figure 22 ; Swarup *et al*, 2001).

Plusieurs gènes pourraient coder les transporteurs d'efflux. Les gènes de la famille PIN (*pin-formed*) sont au nombre de huit chez *Arabidopsis* (*AtPIN1-8*; Boutté *et al*, 2006) et au moins cinq chez *M. truncatula* (Paponov *et al*, 2005). Il s'agit de protéines transmembranaires qui pourraient assumer le rôle de transporteurs d'efflux (Petrasek *et al*, 2006) au sein d'un complexe multiprotéique. La polarisation cellulaire des protéines PIN est responsable du transport polarisé de l'auxine (Wisniewska *et al*, 2006). Il existe une forte redondance fonctionnelle des protéines PIN associée à une régulation croisée de leurs profils d'expression (Vieta *et al*, 2005). L'auxine peut réguler l'expression des PIN à différents niveaux : par exemple l'expression du gène *PIN7* est induite par l'auxine alors que la stabilité de la protéine *PIN7* est réduite par de fortes concentrations en auxine mais augmentée par de faibles concentrations (Vieta *et al*, 2005). Cette régulation complexe des protéines PIN permet une canalisation du flux d'auxine au cours des différents processus développementaux (Sauer *et al*, 2006).

Certaines protéines codées par les gènes de la famille MDR/PGP (*multidrug resistance/P-glycoproteins*) ont également prouvé leur capacité à transporter l'auxine hors des cellules. Les protéines MDR/PGP appartiennent à la classe des transporteurs ABC (*ATB binding cassette*). La famille MDR/PGP comprend 21 gènes chez *Arabidopsis* (Martinoia *et al*, 2002 ; Jasinski *et al*, 2003) dont seulement certains ont été identifiés comme des transporteurs d'efflux d'auxine : *AtPGP1* (Geisler *et al*, 2005), *AtPGP4* (Terasaka *et al*, 2005) et *AtPGP19* (Noh *et al*, 2001).

VI. Objectifs de la thèse

La famille des *Casuarinacées* comprend 90 espèces groupées en 4 genres : *Casuarina*, *Allocasuarina*, *Gymnostoma* et *Ceuthostoma*. Plus des deux tiers de ces espèces sont originaires d'Australie, de diverses îles du Pacifique et de différentes régions du sud-est de l'Asie

(Dommergues *et al*, 1999). Le nom *Casuarina* fait allusion aux rameaux très fins et tombants qui ressemblent au plumage du casoar (*Casuarus casuarus*). Leur système racinaire présente une grande plasticité de développement. En effet, ces plantes peuvent former des symbioses avec des champignons (ecto- ou endomycorhizes, voire les deux chez certaines espèces comme *Casuarina glauca*). En l'absence de champignons mycorhiziens et en conditions de carence en fer et en phosphate, des racines protéoïdes (*cluster roots*) peuvent apparaître. Ce sont des touffes de racines à croissance déterminée. Il a été montré que ces structures augmentent l'acquisition de fer et de phosphate (Neumann et Martinoia, 2002). Enfin, en conditions de carence azotée, les Casuarinacées peuvent former des nodules fixateurs d'azote (actinorhizes) en symbiose avec l'actinomycète *Frankia* (Obertello *et al*, 2003). Ces plantes sont considérées comme des plantes pionnières car elles colonisent les sols pauvres ou dégradés permettant une revégétalisation de ces zones (Dommergues *et al*, 1999).

Ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre d'un programme de recherche visant à étudier les mécanismes d'adaptation des Casuarinacées en se focalisant sur la formation du nodule actinorhizien. La similitude entre le développement et l'anatomie du nodule et de la racine latérale nous a naturellement conduits à nous intéresser au rôle de l'auxine. Plus précisément, nous avons décidé de nous focaliser sur les transporteurs d'influx qui présentent plusieurs avantages :

- ils sont codés par une petite famille multigénique chez *Arabidopsis*.
- il n'y a pas de redondance fonctionnelle de ces gènes chez *Arabidopsis*.
- leur fonction dans la formation de la racine est relativement bien décrite.
- la production d'auxine par *Frankia* suggère que l'influx d'auxine pourrait être impliqué dans le processus d'infection.

Ce travail de thèse s'articule en trois parties :

1) Isolement et caractérisation fonctionnelle des gènes *AUX-LAX* chez *Casuarina glauca*

L'identification d'homologues des gènes *AUX-LAX* a été menée par amplification d'ADN génomique à l'aide d'amorces dégénérées. L'objectif était de cloner tous les membres de la famille *AUX-LAX* chez *C. glauca* pour permettre une comparaison des séquences et ensuite de se focaliser sur les meilleurs candidats. L'utilisation de la plante modèle *Arabidopsis* a permis de vérifier que les gènes identifiés chez *Casuarina* codent des transporteurs d'influx d'auxine ayant une fonction équivalente. Cette analyse s'est basée sur la complémentation fonctionnelle de mutants de transporteurs d'influx par expression des gènes de *Casuarina*. L'analyse de l'expression a été menée chez *Arabidopsis* afin de comparer les profils d'expression avec ceux des gènes endogènes.

2) Implication au cours du développement du nodule actinorhizien

L'analyse de l'expression des gènes *AUX-LAX* a été réalisée au cours de la nodulation et en réponse à différents traitements auxiniques. Afin de confirmer le rôle du transport d'influx d'auxine et plus globalement de l'auxine au cours de l'infection, l'effet d'inhibiteurs du transport de l'auxine sur l'infection a été déterminé. En parallèle, des dosages d'auxine ont également été entrepris.

3) Rôle des transporteurs d'influx dans le développement : exemple de *LAX3*

Afin de préciser le rôle du transporteur *AtLAX3* dans la mise en place de la racine, l'expression de gènes impliqués dans le remodelage de la paroi a été analysée. L'objectif était de déterminer les mécanismes situés en aval du gène *AtLAX3* potentiellement impliqués dans les étapes tardives de la mise en place de la racine latérale. Les résultats attendus devaient permettre d'ouvrir des nouvelles pistes de recherche sur la mise en place du nodule actinorhizien.

PARTIE I – ISOLEMENT ET CARACTÉRISATION DE GÈNES *AUX-LAX* CHEZ *CASUARINA GLAUCA*

I. Isolement d'homologues de gènes *AUX-LAX* chez *C. glauca*

1) Obtention des ADNc et des séquences génomiques

Pour isoler les membres de la famille *AUX-LAX* de *C. glauca*, une amplification PCR sur ADN génomique a été réalisée à l'aide d'amorces dégénérées. L'amplification d'ADN génomique constitue une approche sans *a priori* de profil d'expression. Les amorces utilisées ont été dessinées par R. Swarup (Université de Nottingham, Royaume-Uni).

Le couple d'amorces (AF2 et AF3) a permis d'amplifier trois fragments d'ADN qui ont été clonés et séquencés. Le premier fragment de 576 pb présente une forte homologie avec les gènes *LAX3* de *Medicago truncatula* (88% d'identité au niveau nucléique sur la partie codante de la séquence) et d'*Arabidopsis thaliana* (85% d'identité sur la partie codante de la séquence). La portion d'ADNc correspondant à ce fragment génomique a été obtenue par PCR sur ADNc issus de racines, mettant en évidence un intron de 128 pb dans la séquence génomique. Le clone a été nommé *CgLAX3*. Le deuxième fragment de 769 pb présente une forte homologie avec la plupart des membres de la famille *AUX-LAX* de différentes espèces (86% d'identité avec *MtLAX4*, 85% avec *MtLAX2*, 81% avec *MtLAX1*). La portion d'ADNc correspondant à ce fragment génomique a été obtenue, mettant en évidence un intron de 84 pb dans la séquence génomique. Le clone a été nommé *CgAUX1*. Le troisième fragment de 1200 pb ne présente aucune homologie avec les gènes de la famille *AUX-LAX*.

Les séquences de gènes *AUX-LAX* des espèces suivantes ont été alignées à l'aide du logiciel CLUSTAL-W : *A. thaliana*, *M. truncatula*, *Populus tremuloides*, *Oryza sativa*, *Zea mays*, *Cucumis sativus*. De nouvelles amorces dégénérées (AD_01, AD_02, AD_03 et AD_04) ont été dessinées à partir de ces alignements de séquences afin de tenter d'obtenir de nouveaux membres de la famille *AUX-LAX* de *C. glauca*. Quatre fragments ont été obtenus par PCR sur ADN génomique et ont été séquencés. Les deux premiers correspondent au clone *CgLAX3*, le troisième au clone *CgAUX1* et le dernier ne présente aucune homologie avec les gènes de la famille *AUX-LAX*.

Pour obtenir la séquence complète des ADNc correspondant à *CgAUX1* et *CgLAX3* la technique de la RACE-PCR a été utilisée. Les amorces pour la RACE-PCR 5' et 3' ont été dessinées dans les exons des fragments génomiques de *CgAUX1* et *CgLAX3*. Seul un fragment 3' de 1236 pb a été obtenu pour *CgAUX1* malgré de nombreuses tentatives pour obtenir le fragment 5'. L'incapacité à obtenir ce fragment 5' par RACE-PCR nous a conduit à utiliser la technique de marche sur l'ADN génomique. Deux amplifications successives ont été nécessaires pour obtenir la séquence codante complète : un premier fragment de 832 pb puis un deuxième de 2418 pb ont été obtenus. Un ADNc de 1652 pb contenant la séquence codante complète de *CgAUX1* a été obtenu par amplification PCR sur ADNc à l'aide des amorces AUX1F et AUX1R dessinées en 5' à une cinquantaine de pb en amont de l'ATG et à l'extrémité 3' du fragment RACE 3'. Un fragment de 3166 pb correspondant au gène *CgAUX1* a été obtenu par amplification sur ADN génomique à l'aide des mêmes amorces.

Deux fragments ont pu être amplifiés pour *CgLAX3* : un fragment 5' de 713 pnb et un fragment 3' de 982 pnb. Ces deux fragments ont été séquencés et ont permis de réaliser un contig *in silico* avec la région centrale. Les amorces LAX3F et LAX3R ont été dessinées respectivement aux extrémités 5' et 3' de ce contig. Un ADNc de 1668 pnb contenant la séquence codante complète de *CgLAX3* a été obtenu par amplification PCR sur ADNc à l'aide de ces amorces. Cette séquence comporte 3 pnb en amont de l'ATG. Le gène correspondant (2494 pnb) a été obtenu par amplification PCR sur ADN génomique à l'aide des mêmes amorces LAX3F et LAX3R.

2) *CgAUX1* et *CgLAX3* appartiennent à une petite famille de gènes

Le nombre de gènes *AUX-LAX* chez *C. glauca* a été estimé par la technique du Southern blot. Trois sondes différentes ont été utilisées pour les hybridations : une sonde aspécifique dessinée dans une des régions les plus conservées des gènes *AUX-LAX* (exon VII) et deux sondes spécifiques dessinées dans les régions UTR 3' de *CgAUX1* et *CgLAX3* respectivement. La sonde aspécifique, utilisée en conditions non-stringentes, a accroché un nombre limité de bandes qui ont toutes pu être identifiées grâce à l'utilisation des sondes spécifiques, utilisées en conditions stringentes (Figure 23A). Pour chaque hybridation, au minimum deux répétitions ont été

effectuées. L'absence de bande non-identifiée et le fait que la base de données EST (2700 étiquettes exprimées dans les racines et les nodules ; Hocher *et al*, 2006) générée dans notre équipe ne contient aucune nouvelle séquence *AUX-LAX* suggèrent que la famille multigénique ne contient que ces deux gènes.

3) Structure des gènes *CgAUX1* et *CgLAX3*

L'alignement des séquences génomiques et des ADNc a permis de mettre en évidence la présence de 8 exons et 7 introns pour chacun des deux gènes de l'ATG au codon stop. La taille et la position des exons est très conservée entre *CgLAX3* et *CgAUX1* (Figure 23B) ; par contre la taille des introns n'est pas conservée. Chez *A. thaliana*, le nombre des introns varie dans la famille *AUX-LAX* : 7 introns pour *AtAUX1* et *AtLAX1*, 5 introns pour *AtLAX2* et 6 introns pour *AtLAX3*. Pour la famille *AUX-LAX* d'*A. thaliana*, la taille des 5 premiers exons est conservée puis les tailles divergent pour les derniers exons. Les gènes *AUX-LAX* de *Medicago truncatula* présentent la même structure que ceux de *C. glauca* ce qui suggère une origine évolutive commune (Schnabel et Frugoli, 2004). Chez le riz, le nombre d'exons est légèrement différent : 3 gènes présentent 7 exons et deux autres gènes en possèdent 5 ou 2. Néanmoins, la position des introns est très conservée entre *Arabidopsis*, *M. truncatula*, *C. glauca* et le riz ce qui suggère que la structure de

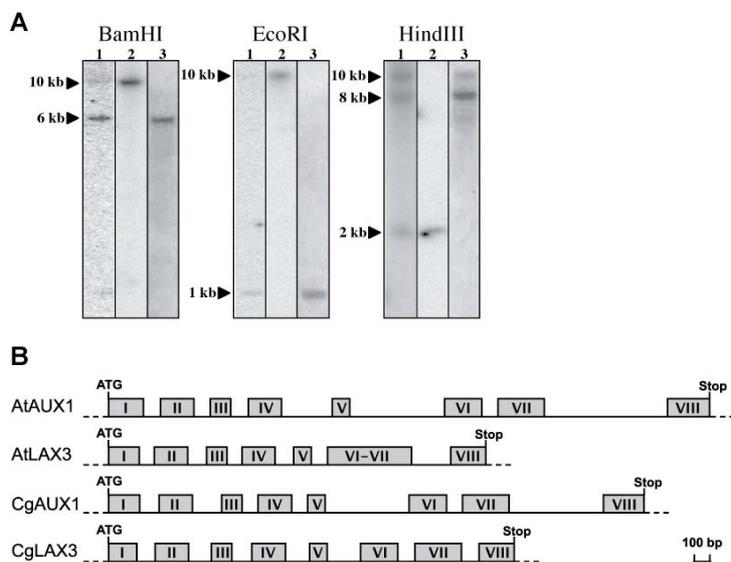


Figure 23. La famille *AUX-LAX* de *Casuarina glauca*

La famille *AUX-LAX* de *C. glauca* a été identifiée en amplifiant de l'ADN génomique à l'aide de couples d'amorces dégénérées. L'hybridation en Southern blot a été réalisée en utilisant une sonde conservée (1), une sonde spécifique de *CgAUX1* (2) ou une sonde spécifique de *CgLAX3* (3). La sonde conservée n'a pas permis de mettre en évidence de nouvelles bandes non identifiées comme appartenant à *CgAUX1* ou *CgLAX3* (A). Structure des gènes *CgAUX1* et *CgLAX3* par comparaison avec les gènes *AtAUX1* et *AtLAX3*. Exons : boîtes grises ; introns : lignes noires (B).

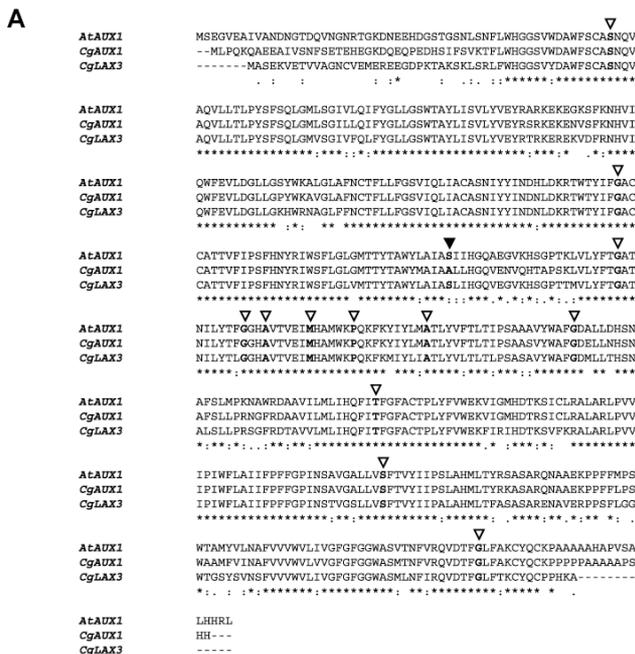
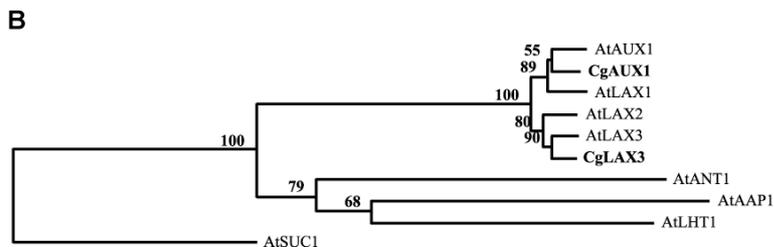


Figure 24. Comparaison des séquences protéiques déduites de *CgAUX1* et *CgLAX3*
 Alignement des protéines AtAUX1, CgAUX1 et CgLAX3, les acides aminés importants pour la fonction de transporteur d'influx d'auxine (Swarup et al., 2004) sont indiqués par une flèche. La flèche noire indique la position de l'acide aminé non conservé chez CgAUX1 (A).
 Arbre phylogénétique contenant les protéines AUX-LAX de *Casuarina glauca* et *Arabidopsis* ainsi que les transporteurs d'acides aminés AtANT1, AtAAP1 et AtLHT1. L'arbre a été enraciné avec le transporteur de saccharose AtSUC1 (B). Les nombres indiquent le résultat de l'analyse Bootstrap (n = 100).



ces gènes est apparue très tôt au cours de l'évolution, probablement avant la divergence des mono- et des dicotylédones.

4) Séquences protéiques déduites

Les phases ouvertes de lecture (ORF) des ADnc de *CgLAX3* et *CgAUX1* ont une taille respective de 1395 pdb et 1440 pdb. Les séquences protéiques déduites ont une taille de 465 acides aminés pour LAX3 (ce qui correspond à une protéine de 52,4 kDa) et 480 acides aminés pour AUX1 (54,0 kDa). L'identité entre les deux séquences est de 76,2%. Les différences s'observent principalement dans les 40 premiers acides aminés (Figure 24A). Les deux protéines sont riches en acides aminés hydrophobes (principalement alanine et leucine qui représentent 20% en nombre des acides aminés). Les acides aminés dont la mutation entraîne une perte de fonction de la protéine AtAUX1 (Swarup et al, 2004) sont tous conservés

chez CgLAX3 et tous sauf un sont conservés chez CgAUX1 (Figure 24A).

Un arbre phylogénétique (Figure 24B) a été réalisé sur la base d'alignement de séquences protéiques. Les séquences protéiques déduites CgLAX3 et CgAUX1 ont été comparées aux séquences protéiques d'un représentant des différentes classes de la famille des perméases à auxine et acides aminés (AAP pour *auxin and amino acid permeases*) dont font partie les gènes *AUX-LAX*. Cette famille contient également les perméases à acides aminés (AAP pour *amino acid permeases*), les transporteurs de lysine et histidine (LHT pour *lysine histidine transporters*) et les transporteurs d'acides aminés aromatiques et d'acides aminés neutres (ANT pour *aromatic and neutral amino acid transporter class*). La séquence du transporteur de saccharose (AtSUC1) a été utilisée comme séquence de référence pour la construction de l'arbre. L'analyse

confirme que CgLAX3 et CgAUX1 font partie de la famille AUX-LAX et que CgAUX1 et CgLAX3 sont respectivement proches d'AtAUX1 et AtLAX3. De plus, la famille AUX-LAX d'*Arabidopsis* est séparée en deux sous-groupes : AUX1/LAX1 et LAX2/LAX3. Cette séparation est retrouvée chez *Casuarina* et chez *Medicago truncatula* (Schnabel et Frugoli, 2004).

L'analyse des structures secondaires par le logiciel de prédiction Pred-TMR2 indique que la protéine CgAUX1 posséderait 11 domaines transmembranaires à l'instar de la protéine AUX1 d'*A. thaliana* (Swarup *et al*, 2004) et que la protéine CgLAX3 en posséderait 10 (aucune donnée expérimentale n'existe pour AtLAX3).

II. Comparaison de l'expression des gènes *AtAUX-LAX* et *CgAUX-LAX*

La séquence promotrice d'un gène (région située en 5' de la région codante) comporte le promoteur minimal (site de fixation du complexe de transcription) et des éléments de régulation (activateur et inhibiteur de transcription). Certains éléments de régulation peuvent se trouver à une grande distance du promoteur minimal, soit en 5', soit en 3' du gène et même dans les introns. Toutefois, les 1000 à 2000 pdb situés en 5' de la séquence codante sont souvent considérées comme contenant la majorité de ces séquences régulatrices. Nous avons décidé de cloner un fragment d'ADN d'environ 1600 pdb en amont du codon

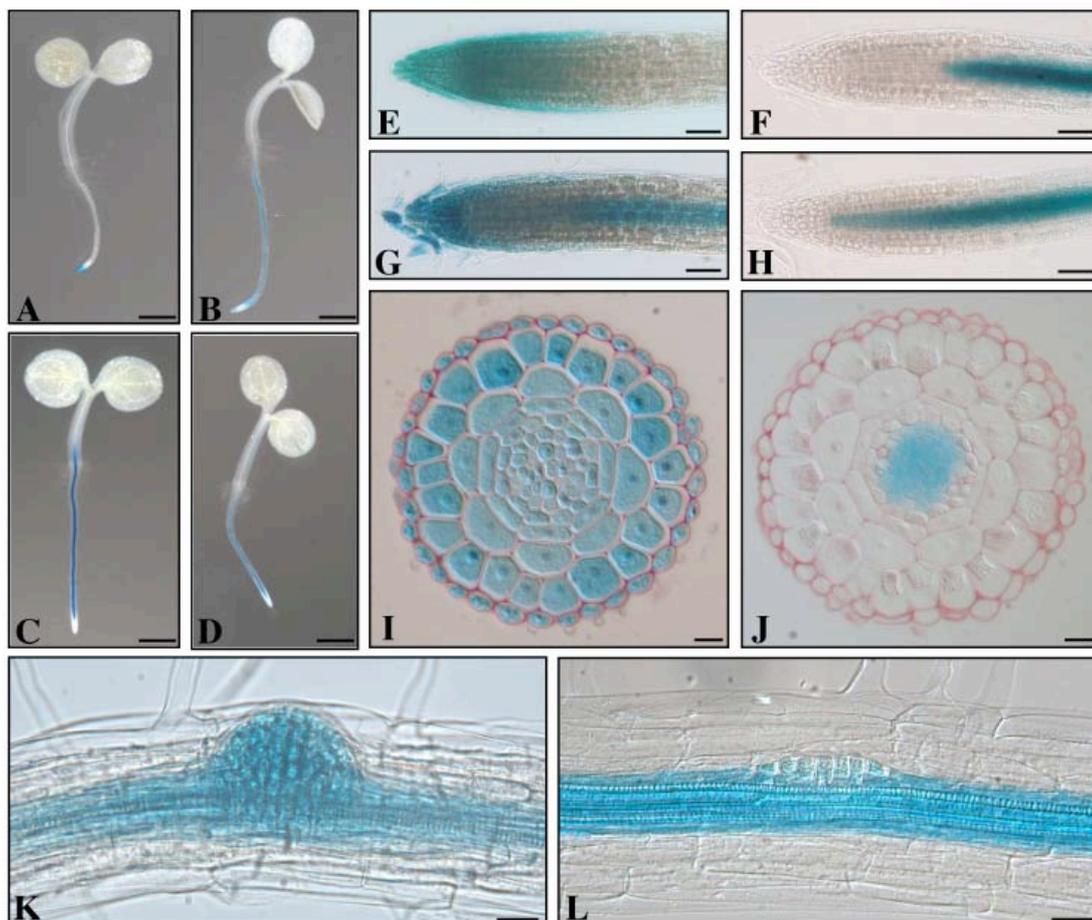


Figure 25. Profils d'expression d'AtAUX1, CgAUX1, AtLAX3 et CgLAX3 chez *Arabidopsis thaliana*

Expression d'AtAUX1 (A et E), de CgAUX1 (B, G, I et K), d'AtLAX3 (C et F) et CgLAX3 (D, H, J et L) déterminée par analyse de fusions promoteurs:*GUS*. Les profils d'expression ont été observés chez des plantules de 2 jours (A à D), des apex racinaires de plantes de 7 jours (E à H) et des sections de racines de plantes de 7 jours (I et J) ainsi qu'aux sites de formation de racines latérales (K et L).

d'initiation de la traduction (ATG) des gènes *CgLAX3* et *CgAUX1* respectivement. Cette séquence sera nommée « promoteur » par la suite.

Les séquences situées en amont de l'ATG ont été clonées par la technique de la marche sur ADN génomique. Cette technique a permis de déterminer la séquence des promoteurs sur une longueur de 2229 pdb et 1675 pdb en amont de l'ATG pour *CgAUX1* et *CgLAX3* respectivement. Les études de promoteur ont par la suite été réalisées en utilisant des séquences de 1685 pdb et 1650 pdb pour *CgAUX1* et *CgLAX3* respectivement.

Les promoteurs de *CgAUX1* et *CgLAX3* ont été clonés dans le vecteur pBI101.3 en amont du gène rapporteur *GUS* (β -glucuronidase) et dans le pBI101.mGFP5ER (Svistonoff, 2003) en amont du gène rapporteur *GFP* (green fluorescent protein). Les études d'expression ont tout d'abord été réalisées en système hétérologue chez *A. thaliana*. Pour cela, les vecteurs binaires ont été introduits chez *Agrobacterium tumefaciens* afin de transformer des plants d'*A. thaliana* écotype Col0. Le niveau de fluorescence de la GFP dans les plantes T1 étant très faible pour *CgLAX3* et non-détectable pour *CgAUX1*, le gène rapporteur *GUS* a été utilisé pour les études d'expression. L'analyse des lignées T3 homozygotes (environ 5 lignées pour chaque construction) a révélé des profils d'expression similaires entre les gènes d'*Arabidopsis* et de *C. glauca*.

L'expression de *CgAUX1* a été détectée dans les apex racinaires, les primordias de racine latérale et le système vasculaire (Figure 25B, G, I et K). *AtAUX1* est exprimé dans les apex racinaires et les primordias de racines latérales (Figure 25A et E; Marchant *et al.*, 2002). Les profils d'expression de *CgAUX1* et *AtAUX1* sont relativement similaires chez *A. thaliana*. L'expression de *CgLAX3* a été détectée uniquement dans le système vasculaire de la racine (Figure 25D, H, J et L). *AtLAX3* est exprimé dans le système vasculaire (Figure 25C et F) et dans les cellules du cortex et de l'épiderme situées en face du primordium de racine latérale (donnée non montrée - voir partie III). Là encore, une

grande similarité est observée entre les profils d'expression de *CgLAX3* et *AtLAX3* chez *A. thaliana*.

La relative conservation des profils d'expression entre *CgAUX1* et *AtAUX1* et entre *CgLAX3* et *AtLAX3* tend à montrer que les gènes de *C. glauca* et d'*Arabidopsis* sont bien homologues. Cela suggère qu'ils pourraient être impliqués dans les mêmes mécanismes développementaux chez ces deux espèces. De plus ces résultats montrent que les mécanismes de régulation transcriptionnelle sont conservés entre les Brassicacées et les Casuarinacées. En effet, les Brassicacées appartiennent au clade des Rosid II et les Casuarinacées au clade des Rosid I (Figure 26).

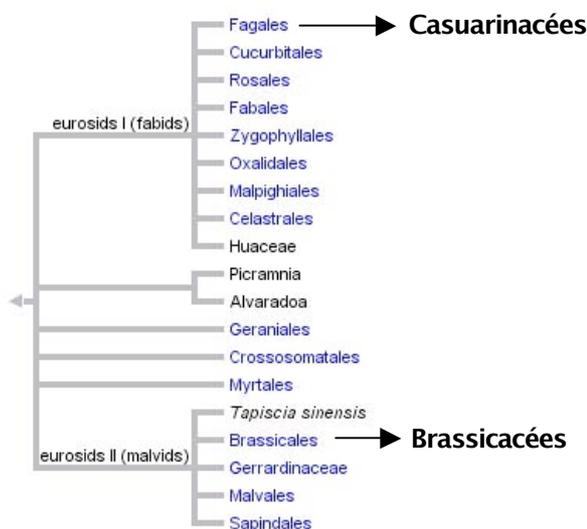


Figure 26. Relation phylogénique entre Casuarinacées et Brassicacées

Casuarina glauca et *Arabidopsis thaliana* sont des plantes relativement éloignées phylogénétiquement, appartenant à deux sous-clades différents.

III. Analyse fonctionnelle

Les gènes *CgAUX1* et *CgLAX3* présentent un fort pourcentage d'identité avec les gènes *AtAUX1* et *AtLAX3* respectivement. De plus, l'expression de ces gènes en système hétérologue chez *Arabidopsis* montre que leurs profils d'expression sont très conservés. Ces résultats suggèrent que les protéines *CgAUX1* et *CgLAX3* ont la même fonction que leurs homologues chez *Arabidopsis*. Afin de déterminer une éventuelle

conservation de leur fonction, les gènes *CgAUX-LAX* de *C. glauca* ont été introduits chez les mutants *aux1* et *lax3* d'*A. thaliana* afin de tenter de compléter leur phénotype.

1) Complémentation fonctionnelle du mutant *aux1*

Les séquences ADNc de *CgAUX1* et *CgLAX3* ont été clonées dans le vecteur pMOG AUX1 ORFL entre les séquences promotrices (1,7kb) et terminatrices (0,3kb) de *AtAUX1*. L'objectif était de produire les protéines CgAUX1 et CgLAX3 dans les tissus d'*A. thaliana* où est normalement produite la protéine AtAUX1. Ces constructions ont été introduites dans des plantes mutantes *aux1* d'*Arabidopsis* par transformation génétique. Le mutant *aux1* présente normalement une croissance agravitropique de la racine (Marchant *et al.*, 1999). L'analyse du phénotype a été réalisée sur les plantes T1. Deux témoins ont été réalisés pour cette expérience. Tout d'abord la phase codante d'*AtAUX1* a été placée sous dépendance de son propre promoteur et terminateur afin de constituer un témoin positif de l'expérience. Ensuite, un vecteur vide ne contenant que le promoteur et le terminateur d'*AtAUX1* a été utilisé comme témoin négatif.

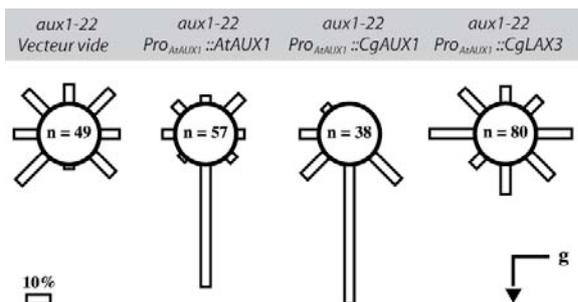


Figure 27. Phénotype gravitropique des mutants *aux1-22* complétés avec les gènes de *Casuarina glauca*

Le phénotype gravitropique de *n* plantes T1 a été déterminé en exerçant un stimulus gravitropique (rotation des boîtes à 90°). Les plantes ont été groupées en 8 classes en fonction de la réorientation des apex racinaires 24 heures après stimulus. Le pourcentage de plantes dans chaque groupe est indiqué par une barre orientée.

L'introduction de la construction ne contenant que le promoteur et le terminateur d'*AtAUX1* dans le mutant *aux1* ne permet pas de restaurer le phénotype sauvage, les plantes présentent toujours un phénotype agravitropique de

la racine (Figure 27). L'expression d'*AtAUX1* dans un fond génétique mutant *aux1* permet de restaurer un phénotype sauvage gravitropique de la racine (Figure 27). Dans les mêmes conditions d'expérimentation, l'expression de *CgAUX1* sous dépendance du promoteur et du terminateur d'*AtAUX1* permet de restaurer un phénotype sauvage gravitropique (Figure 27). À l'inverse, l'expression de *CgLAX3* sous dépendance des séquences régulatrices d'*AtAUX1* ne restaure pas de phénotype sauvage aux mutants *aux1* (Figure 27).

La réponse gravitropique nécessite une rapide relocalisation des flux d'auxine dans la coiffe et les cellules de l'épiderme (Swarup *et al.*, 2005) et seul un transporteur fonctionnel d'auxine peut assurer cette fonction. La protéine CgAUX1 est donc un transporteur d'auxine de fonction équivalente à celle d'*AtAUX1*. En revanche, l'expression de *CgLAX3* ne restaure pas le phénotype sauvage des mutants *aux1* ce qui peut suggérer que : i) la construction contient une erreur qui peut empêcher la production de l'ARNm ou ii) la protéine CgLAX3 n'est pas fonctionnellement équivalente à *AtAUX1*. Le séquençage des constructions au niveau des jonctions promoteur-séquence codante et séquence codante-terminateur n'a mis en évidence aucune erreur. De plus, des analyses de RT-PCR démontrent l'accumulation de transcrits correspondants à *CgLAX3* ce qui indique que la construction ne contient pas d'erreur empêchant la production d'ARNm (Figure 28). Il semble donc que la protéine CgLAX3 n'est pas fonctionnellement équivalente à *AtAUX1*.

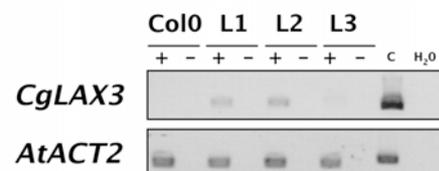


Figure 28. Détection des ARNm de *CgLAX3* chez les mutants *aux1-22* complétés par *CgLAX3*

Les ARNm ont été détectés par RT-PCR chez des plantes sauvages (Col0) et trois lignées (L1 à L3) de mutants *aux1* contenant la construction *Pro_{AUAUX1}::CgLAX3*. L'amplification des cDNA (+) et les témoins ARN (-) sont présentés ainsi que les témoins (vecteur utilisé pour la transformation - C) ou eau. Le gène codant l'actine (*AtACT2*) a été utilisé comme témoin positif.

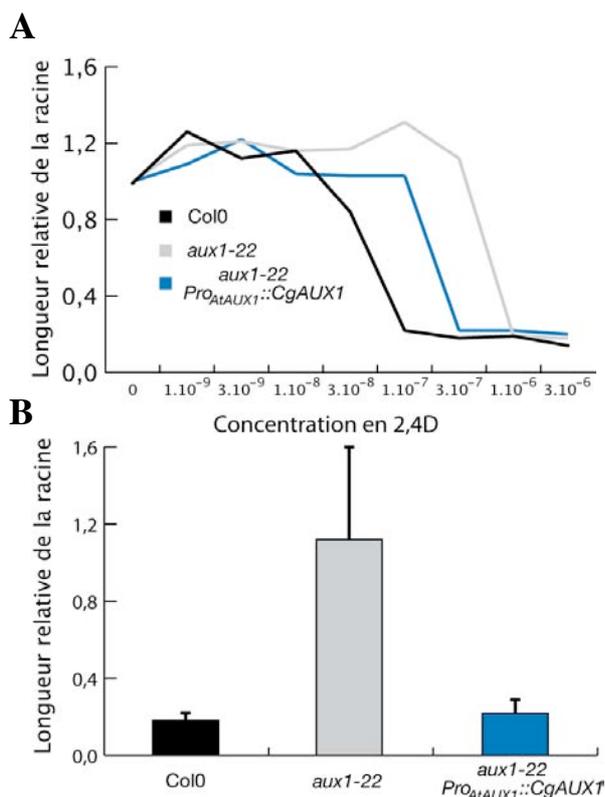


Figure 29. Analyse du phénotype de sensibilité/résistance à l'auxine

La longueur de la racine a été mesurée à l'aide du logiciel ImageJ sur des plantes 7 jours après transfert sur milieu contenant différentes concentrations en 2,4D. Les longueurs de racines rapportées au témoin (transfert sur milieu sans auxine) sont indiquées en ordonnées. Gamme de concentrations en 2,4D (A). Longueurs relatives des racines pour une concentration en 2,4D de 3.10^{-7} M (B). La plante sauvage (Col0) est plus sensible à l'auxine que le mutant *aux1-22*. L'expression de *CgAUX1* sous dépendance du promoteur et du terminateur d'*AtAUX1* permet de restaurer la sensibilité à l'auxine.

L'analyse des plantes a été poursuivie sur deux lignées homozygotes en T3. L'expression de *CgAUX1* dans un fond génétique mutant *aux1* restaure le phénotype sauvage de sensibilité au 2,4D (Figure 29A et B). Cependant, la restauration du phénotype n'est pas totale (Figure 29A) ce qui suggère que la protéine *CgAUX1* n'est probablement pas aussi efficace que la protéine *AtAUX1* en contexte hétérologue. De nombreuses hypothèses peuvent expliquer cette plus faible efficacité : moindre stabilité de la protéine, interactions plus faibles avec certaines protéines notamment AXR4 (Dharmasiri *et al*, 2006) qui est nécessaire pour l'adressage d'*AtAUX1* vers la membrane plasmique dans les cellules du protophloème et la localisation

asymétrique d'*AtAUX1* dans l'épiderme et donc probablement de *CgAUX1*. Néanmoins, la restauration, même partielle, du phénotype sauvage prouve que *CgAUX1* est bien un transporteur d'influx d'auxine.

L'incapacité de la protéine *CgLAX3* à compléter le mutant *aux1* d'*Arabidopsis* est en accord avec des résultats identiques obtenus en exprimant la protéine *AtLAX3* chez le mutant *aux1* dans les mêmes conditions expérimentales (R. Swarup, communication personnelle). Il semble donc que les protéines *AtAUX1* et *AtLAX3* ont soit des fonctions différentes, soit des mécanismes différents de régulation. Cela pourrait s'expliquer par une perturbation de la localisation cellulaire lorsqu'*AtLAX3* est exprimé dans les cellules qui expriment normalement *AtAUX1*. Afin de déterminer si la protéine *AtLAX3* est produite et, le cas échéant, de déterminer sa localisation cellulaire, nous avons introduit une version fonctionnelle (capable de compléter le mutant *lax3*) de la protéine *AtLAX3* fusionnée avec une YFP dans le mutant *aux1* sous dépendance du promoteur et du terminateur d'*AtAUX1*. Cette construction ne permet pas la complémentation du mutant *aux1*. Par ailleurs, aucune fluorescence n'a été détectée dans les plantes transgéniques en T1 (10 plantes) ce qui semble indiquer que la protéine n'est pas correctement produite ou adressée vers la membrane plasmique. Des analyses de RT-PCR sont en cours pour déterminer si les ARNm sont bien synthétisés.

2) Complémentation fonctionnelle du mutant *lax3*

L'incapacité de la protéine *CgLAX3* à compléter le mutant *aux1* suggère : soit que cette protéine est non-fonctionnelle, soit que, à l'instar de la protéine *AtLAX3*, sa fonction ou son mode de régulation sont différents ou bien encore que la protéine *CgLAX3* a une fonction différente à la fois de celle d'*AtAUX1* et *AtLAX3*. Afin de répondre à cette question, nous avons décidé de

tenter la complémentation fonctionnelle de mutants *lax3* en exprimant l'ADNc de *CgLAX3* sous dépendance des séquences régulatrices d'*AtLAX3*.

La séquence ADNc de *CgLAX3* a été clonée dans le vecteur pMOG LAX3 ORFL entre les séquences promotrices (1,7kb) et terminatrices (0,3kb) d'*AtLAX3*. L'objectif était de produire la protéine CgLAX3 dans les tissus où est normalement produite la protéine AtLAX3. Cette construction a été introduite dans des plantes mutantes *lax3* d'*Arabidopsis* par transformation génétique. Le mutant *lax3* présente une réduction d'environ 50% du nombre de racines latérales (donnée non montrée – voir partie III et Annexes). Deux témoins ont été réalisés pour cette expérience. Tout d'abord la phase codante d'*AtLAX3* a été placée sous dépendance de son propre promoteur et terminateur afin de constituer un témoin positif de l'expérience. Ensuite, un vecteur vide ne contenant que le promoteur d'*AtLAX3* a été utilisé comme témoin négatif. Le nombre de racines latérales a été déterminé sur des lignées homozygotes en T3. L'analyse des plantes n'a pas permis de conclure sur la capacité de CgLAX3 à restaurer un phénotype sauvage. En effet, le nombre de racines latérales n'est pas significativement différent entre les témoins positifs et négatifs dans nos conditions expérimentales car les écart-types sont très importants (Figure 30). C'est la raison pour laquelle des doubles mutants

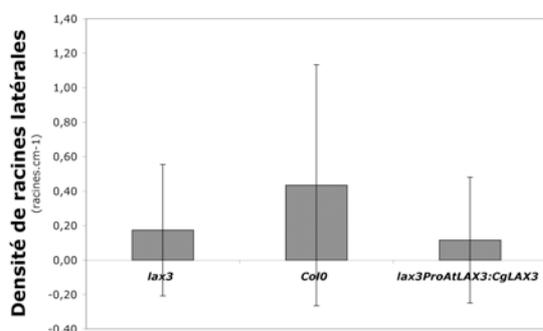


Figure 30. Densité de racines latérales chez le mutant *lax3* complétement par *CgLAX3*

La densité de racine latérale a été déterminée 12 jours après germination chez le mutant *lax3*, la plante sauvage (Col0) et le mutant *lax3* exprimant *CgLAX3* sous contrôle du promoteur et du terminateur d'*AtLAX3*. Les valeurs très élevées des écart-types n'ont pas permis de conclure à une différence entre les contrôles.

aux1lax3 ont ensuite été utilisés pour les analyses fonctionnelles car ils ne produisent aucune racine latérale pendant les 14 premiers jours. La restauration vers un phénotype simple mutant *aux1* par

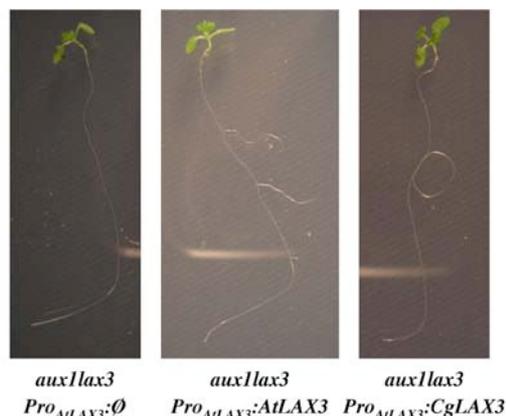


Figure 31. Nombre de racines latérales chez le mutant *aux1lax3* complétement par *CgLAX3*

Le nombre de racines latérales a été estimé 12 jours après germination chez le mutant *aux1lax3* transformé avec un vecteur vide, le mutant *aux1lax3* exprimant *AtLAX3* et le mutant *lax3* exprimant *CgLAX3* sous contrôle du promoteur et du terminateur d'*AtLAX3*. Les résultats obtenus indiquent que *CgLAX3* ne complémente pas le mutant *aux1lax3*.

expression d'*AtLAX3* est donc plus facile à mettre en évidence. En effet, les doubles mutants *aux1lax3* transformés avec le vecteur vide ne présentent pas de racines latérales (8 lignées T2 indépendantes) alors que la production de la protéine AtLAX3 permet de restaurer un phénotype simple mutant *aux1* soit environ 50% de racine latérale par rapport à une plante sauvage (6 lignées T2 indépendantes – Figure 31). Dans ces conditions expérimentales, l'expression de *CgLAX3* sous dépendance du promoteur et du terminateur d'*AtLAX3* ne permet pas non plus de restaurer le phénotype simple mutant *aux1* (10 lignées T2 indépendantes – Figure 31). Toutes les plantes T2 présentent une ségrégation de type 3:1 pour la résistance à la kanamycine ce qui montre qu'elles sont bien transformées. L'absence de complémentation ne nous permet pas de conclure sur la fonction de CgLAX3 car soit la protéine n'est pas fonctionnelle, soit elle a une fonction différente d'*AtLAX3*.

IV. Discussion

1) Une petite famille multigénique *AUX-LAX* chez *C. glauca*

Nous avons isolé des homologues des gènes *AUX-LAX* chez *C. glauca*. Différentes approches ont été menées pour tenter de déterminer le nombre de gènes de la famille *AUX-LAX* de *C. glauca*. Tout d'abord, une approche par amplification PCR sur ADN génomique à l'aide d'amorces dégénérées dessinées dans des régions très conservées nous a permis d'identifier deux gènes. Les séquences correspondant aux amorces se trouvent dans les exons 3 (AD1 et AF2), 4 (AD2), 5 (AF3) et 6 (AD3 et AD4) et couvrent donc une grande partie des séquences conservées du gène. Ensuite, une sonde correspondant à une séquence très conservée de la famille (située dans la quasi-totalité de l'exon 7) a été utilisée pour l'hybridation en Southern blot. Pas plus de deux bandes n'ont été obtenues pour chaque digestion de l'ADN. Toutes ces expériences ainsi que l'absence de nouvelles séquences *AUX-LAX* dans les banques EST de *C. glauca* suggèrent que la famille multigénique de *C. glauca* ne contient que deux membres.

La famille *AUX-LAX* de *C. glauca* ne comporte donc que deux gènes comparée à celle d'*Arabidopsis* (4 gènes ; Parry *et al*, 2001b), de *Medicago truncatula* (5 gènes ; Schnabel et Frugoli, 2004) ou encore du riz (*Oryza sativa* ssp japonica cv. Nipponbare – 5 gènes ; Tyagi *et al*, 2004). Néanmoins, le génome de *C. glauca* est relativement petit (estimé à environ 290 Mpb ; Schwencke *et al*, 1998) comparé au riz (430 Mpb ; Tyagi *et al*, 2004) ou à *M. truncatula* (470 Mpb ; Cannon *et al*, 2006) mais plus grand que celui d'*Arabidopsis* (125 Mbp ; Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Chez *Arabidopsis*, les gènes *AUX-LAX* ne sont pas situés dans les régions dupliquées du génome ce qui indique qu'ils proviennent de duplications spécifiques de gènes plutôt que de larges duplications chromosomiques.

Les deux homologues des gènes *AUX-LAX* ont été nommés *CgAUX1* et *CgLAX3* par homologie avec les gènes *AtAUX1* et

AtLAX3 respectivement. Des ADNc correspondant aux deux gènes et contenant la séquence codante complète ont été obtenus par RACE PCR. La très forte identité de séquence (au niveau nucléique et au niveau protéique) de ces gènes avec les gènes connus chez d'autres espèces suggère qu'ils appartiennent effectivement à la famille des transporteurs d'influx d'auxine. Par ailleurs, la structure des gènes *CgLAX3* et *CgAUX1* est identique à celle du gène *AtAUX1* (taille et position des exons) ce qui indique qu'il existe une origine évolutive commune de ces séquences. De plus, les acides aminés dont la mutation entraîne une perte de fonction de la protéine *AtAUX1* chez *A. thaliana* (Swarup *et al*, 2004) sont conservés à l'exception d'un dans la séquence de *CgAUX1*.

2) Divergence fonctionnelle dans la famille *AUX-LAX*

Les analyses phylogénétiques des protéines *AUX-LAX* suggèrent qu'il existe deux groupes fonctionnels distincts chez *Arabidopsis* ainsi que chez *M. truncatula* (Schnabel et Frugoli, 2004). Les deux protéines identifiées chez *C. glauca* appartiennent à chacun de ces deux groupes potentiellement distincts. Cette différence fonctionnelle est également observée lors des expériences de complémentation des mutants *aux1* par les protéines *CgAUX1* et *CgLAX3/AtLAX3*. En effet, les protéines *AtLAX3/CgLAX3* sont incapables de restaurer le phénotype de ce mutant. Pourtant, la protéine *AtLAX3* est un transporteur d'influx d'auxine à haute affinité comme *AtAUX1* (M. Bennett, communication personnelle). Par ailleurs, ces deux groupes de gènes sont exprimés dans des tissus différents. En effet, *AtAUX1* est exprimé dans l'apex racinaire et les primordia de racine latérale alors qu'*AtLAX3* est exprimé dans le système vasculaire et les cellules situées en face des primordia. Cela indique que ces deux gènes sont impliqués dans des mécanismes développementaux distincts : gravitropisme, initiation et organisation du primordium de racine latérale pour *AtAUX1* et émergence pour *AtLAX3*. Il est

fort probable que la spécialisation des profils d'expression d'*AtAUX1* et *AtLAX3* s'est associée à la divergence fonctionnelle de ces protéines au cours de l'évolution. En tout cas, cette divergence a eu lieu avant la séparation entre les Casuarinacées et les Brassicacées.

3) Bases moléculaires de la divergence

La régulation de ces protéines a probablement divergé au cours de la spécialisation fonctionnelle. Afin de préciser les mécanismes moléculaires responsables de ces différences, nous avons essayé de déterminer pourquoi la protéine *AtLAX3* est incapable de compléter le mutant *aux1*. Pour cela, nous avons introduit une fusion fonctionnelle *AtLAX3:YFP* dans le mutant *aux1*. L'absence de fluorescence observée semble indiquer une absence de production de la protéine, une dégradation rapide ou une mauvaise localisation. La séquence codante d'*AtLAX3* a été placée entre les séquences UTR 5' et 3' du gène *AtAUX1* ce qui permet de conserver une partie des mécanismes de régulation transcriptionnelle et traductionnelle. Néanmoins, il n'est pas possible d'écarter une régulation de type post-transcriptionnelle par les microARN (Zhang *et al*, 2007). Il peut également s'agir d'un problème d'adressage subcellulaire de la protéine *AtLAX3*. Des études récentes ont montré que la protéine *AtAUX1* nécessite d'interagir avec la protéine *AXR4* pour être correctement localisée dans la membrane plasmique (Figure 32 ; Dharmasiri *et al*, 2006). La mutation *axr4* affecte spécifiquement la localisation d'*AtAUX1*, la protéine *AtLAX3* n'est pas affectée (M. Bennett, communication personnelle). Cela indique qu'*AtLAX3* n'interagit probablement pas avec *AXR4*. À ce jour, initiée. Le clonage d'une version fonctionnelle de la protéine *AUX1:YFP* entre les séquences régulatrices (promoteur et terminateur) d'*AtLAX3* est en cours. L'introduction de cette construction chez des mutants *lax3* (ou

aucun partenaire d'*AtLAX3* nécessaire pour sa localisation sur la membrane n'a été identifié. Cependant, un tel partenaire ne serait *a priori* pas exprimé dans les mêmes tissus qu'*AtAUX1*. Cela pourrait suffire à expliquer le mauvais adressage d'*AtLAX3* sous dépendance du promoteur d'*AtAUX1*. L'absence de fluorescence indique que la protéine ne s'accumule pas

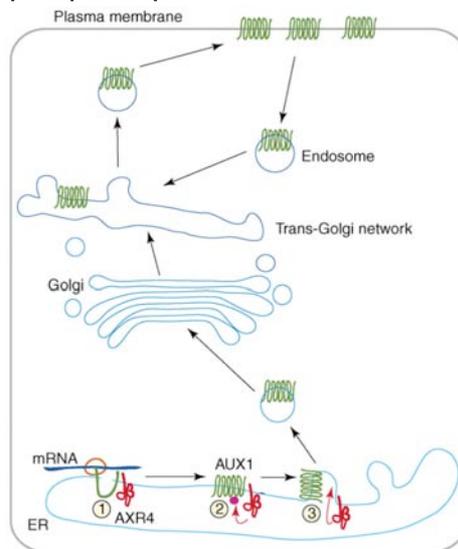


Figure 32. AXR4 est nécessaire pour permettre la localisation membranaire d'AUX1

Trois modèles pour le rôle d'*AXR4* dans l'adressage d'*AUX1* : *AXR4* joue le rôle de chaperone pour éviter l'aggrégation des segments hydrophobes d'*AUX1* (1), *AXR4* catalyse une modification post-traductionnelle d'*AUX1* pour permettre l'adressage (2) ou *AXR4* modifie la composition lipidique de la membrane pour réguler la localisation d'*AUX1* (3). ER : réticulum endoplasmique. D'après Hobbie, 2006.

dans le réticulum endoplasmique, ce qui pourrait se produire en l'absence d'adressage vers la membrane. La protéine *AtLAX3* pourrait donc être dégradée par la cellule lorsque sa localisation n'est pas correcte. L'analyse en cours des plantes *aux1 Pro_{AtAUX1}::AtLAX3-YFP* devrait permettre de répondre à ces interrogations.

Afin de préciser la différence fonctionnelle entre *AtAUX1* et *AtLAX3*, la complémentation du mutant *lax3* par l'expression de la protéine *AtAUX1* a été double mutants *aux1lax3* pour faciliter l'analyse phénotypique) nous permettra de déterminer si *AtAUX1* peut remplacer *AtLAX3* et de déterminer la localisation cellulaire de la protéine.

PARTIE II – ÉTUDE DU RÔLE DU TRANSPORT D'INFLUX AU COURS DU DÉVELOPPEMENT DU NODULE ACTINORHIZIEN

I. Introduction

Un rôle de l'auxine au cours de la symbiose actinorhizienne a longtemps été suggéré car la bactérie *Frankia* produit de l'auxine (Wheeler *et al*, 1984 ; Hammad *et al*, 2003). De plus, les nodules contiennent des quantités importantes d'auxine par rapport aux racines non infectées (Wheeler *et al*, 1979). Nous avons isolé deux gènes de la famille *AUX-LAX* chez *Casuarina glauca*. L'un d'entre eux, nommé *CgAUX1*, est fonctionnellement équivalent à *AtAUX1*. Nous nous sommes intéressés au rôle que pouvaient jouer ces transporteurs au cours de la symbiose actinorhizienne. Pour cela, nous avons analysé le profil d'expression des gènes *CgAUX1* et *CgLAX3* au cours de la symbiose *C. glauca*-*Frankia* et déterminé l'impact de l'inhibition du transport d'influx d'auxine sur la nodulation.

II. Analyse de l'expression de *CgAUX1* et *CgLAX3*

Le profil d'expression de *CgAUX1* et *CgLAX3* a été analysé par différentes techniques afin de déterminer si ces gènes sont exprimés au cours de l'infection par la bactérie *Frankia* et du développement du nodule actinorhizien. Les constructions promoteur-*GUS* utilisées pour l'analyse de l'expression en système hétérologue chez *Arabidopsis* ont été utilisées pour transformer *C. glauca* et *Allocasuarina verticillata*. Le protocole de transformation génétique de *C. glauca* est plus long que celui d'*A. verticillata* et n'aboutit pas forcément à l'obtention de plantes transgéniques. Par contre, la nodulation des plants d'*A. verticillata* est beaucoup plus longue à obtenir et les étapes précoces de la nodulation sont difficiles à observer. Une lignée transgénique

contenant le promoteur de *CgAUX1* a été obtenue chez *C. glauca* et deux lignées chez *A. verticillata*. Quatre lignées transgéniques contenant le promoteur de *CgLAX3* ont été obtenues chez *A. verticillata*, par contre aucune lignée n'a pu être régénérée chez *C. glauca*. En parallèle, des analyses du niveau d'expression des gènes ont été réalisées par RT-PCR quantitative en réponse à des traitements auxiniques et à l'infection.

1) Expression non-symbiotique

Dans un premier temps, l'expression des gènes *CgAUX1* et *CgLAX3* a été analysée par RT-PCR non-quantitative afin de vérifier dans quels organes ces gènes sont exprimés. Les transcrits des deux gènes ont été détectés dans les parties aériennes et les racines non-infectées (Figure 33). L'analyse des lignées promoteur:*GUS* montre que *CgAUX1* est

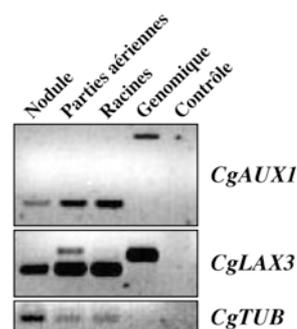


Figure 33. Détection des ARNm de *CgAUX1* et *CgLAX3*
Les ARNm de *CgAUX1* et *CgLAX3* ont été détectés dans les différents organes testés : nodules, parties aériennes et racines.

exprimé dans les apex racinaires, les primordia de racine latérale et le système vasculaire de la racine et de la feuille (Figure 34). *CgLAX3* est exprimé uniquement dans le système vasculaire de la racine. Aucune expression de *CgLAX3* n'est observée en face des primordia de racine latérale (Figure 34). Les profils

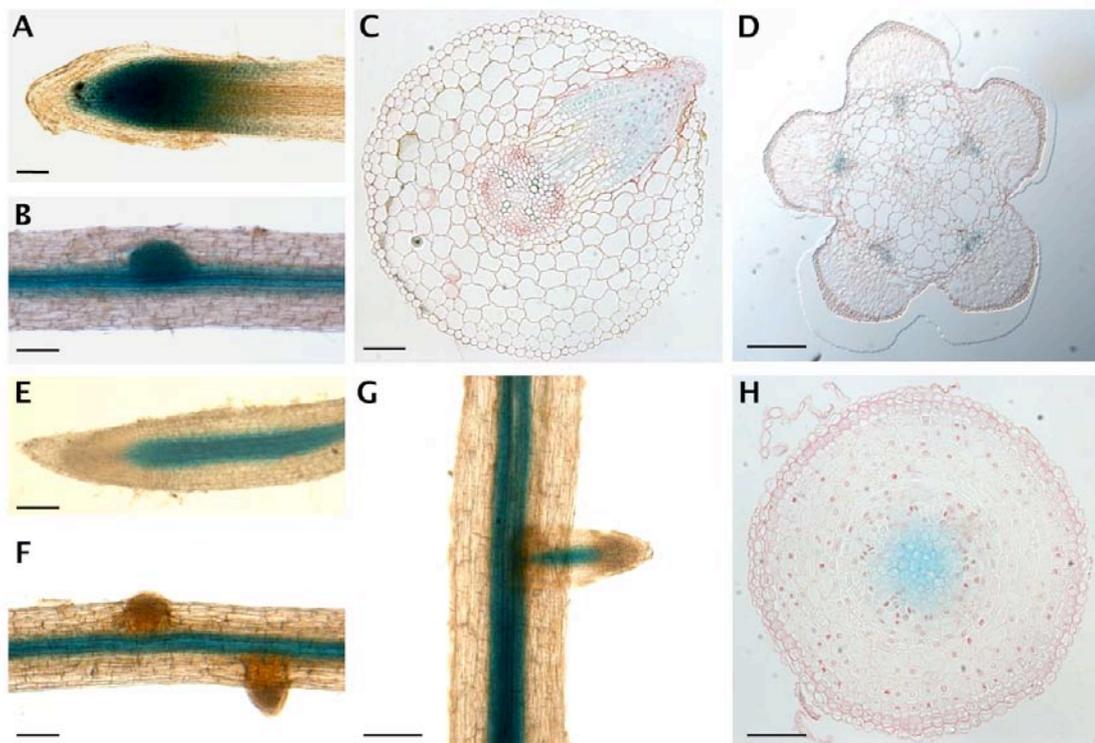


Figure 34. Expression non-symbiotique de *CgAUX1* et *CgLAX3*

L'expression de *CgAUX1* (A à D) et de *CgLAX3* (E à H) a été déterminée par analyse de fusions promoteurs:*GUS* chez *Allocasuarina verticillata*. Les profils d'expression ont été observés au niveau des apex racinaires (A et E), aux sites de formation des racines latérales (B, C, F et G) et au niveau de la zone d'élongation (H). L'expression de *CgAUX1* est également détectée dans les parties aériennes (D). Barres : 15 μ m (C et H), 50 μ m (A, B, E, F, G), 100 μ m(D).

d'expression observés sont très similaires des profils d'expression de *CgAUX1* et *CgLAX3* en système hétérologue chez *A. thaliana* (Figure 25). Cela indique que les systèmes de régulation de l'expression des gènes sont très conservés entre *C. glauca* et *A. thaliana* car les séquences promotrices de *C. glauca* sont reconnues par les facteurs de transcription d'*A. thaliana*. Les profils d'expression observés sont également proches de ceux d'*AtAUX1* et *AtLAX3* respectivement.

2) Expression au cours de la symbiose

Les gènes *CgAUX1* et *CgLAX3* sont exprimés dans les nodules (Figure 33). Leurs niveaux d'expression ont été déterminés au cours du processus d'infection. Les plants de *C. glauca* ont été inoculés par *Frankia* en culture

hydroponique après une semaine de sevrage en azote. Le système racinaire a été prélevé à différents temps au cours de la cinétique jusqu'à l'apparition des nodules au bout d'environ 3 semaines. Les extractions d'ARN ont été réalisées sur le système racinaire entier afin de réaliser les analyses par RT-PCR quantitative. Aucun changement significatif du niveau d'expression de *CgLAX3* et *CgAUX1* n'a pu être mis en évidence au cours de l'infection par *Frankia* par RT-PCR quantitative (donnée non montrée). Néanmoins, l'obligation d'utiliser tout le système racinaire pour l'extraction des ARN entraîne probablement une dilution du signal à détecter. Une analyse du profil d'expression a donc été réalisée en utilisant les lignées contenant la construction *Pro_{CgAUX1}:GUS*.

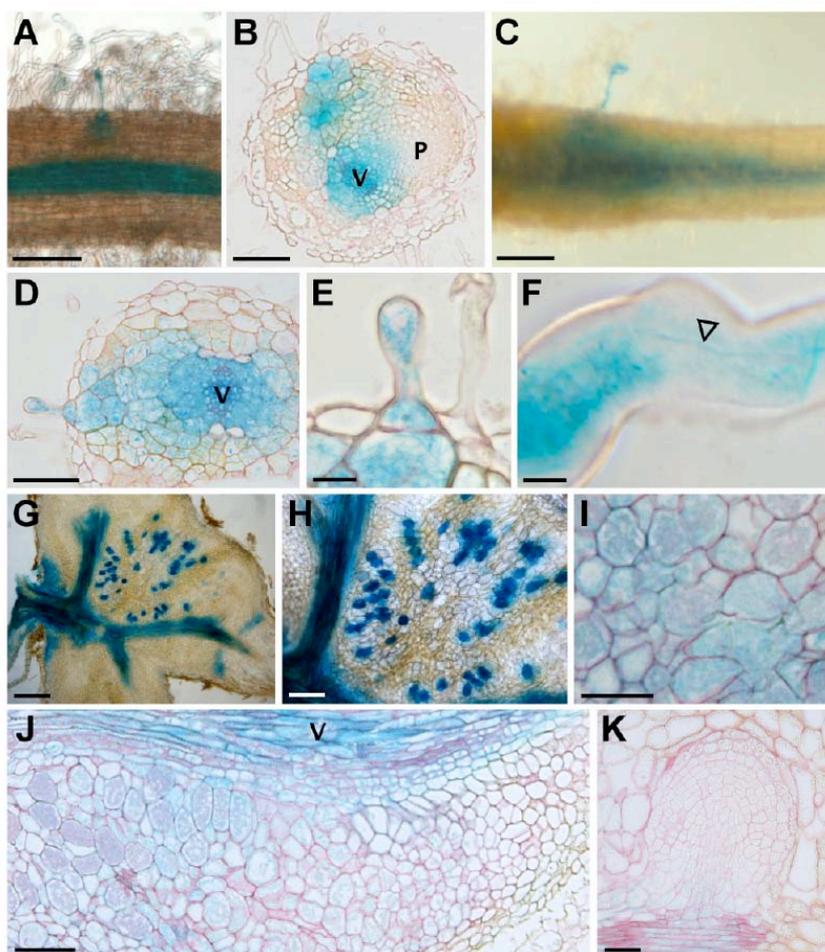


Figure 35. Expression de *CgAUX1* au cours de l'infection

L'expression de *CgAUX1* a été déterminée au cours de l'infection par *Frankia* dans les poils racinaires 10 jours après inoculation (A et B), 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). V : système vasculaire ; P : primordium nodulaire. Barres : 5 μ m (F), 10 μ m (E), 25 μ m (B et D), 50 μ m (A, C, I, J et K), 125 μ m (H) ou 250 μ m (G).

L'expression de *CgAUX1* a été suivie au cours du processus d'infection par *Frankia* dans les conditions décrites ci-dessus. *CgAUX1* est exprimé très tôt dans quelques poils absorbants déformés 10 jours après inoculation (Figure 35A) et dans quelques cellules corticales infectées sous-jacentes (Figure 35B). 14 jours après infection, une sur-expression est visible dans le système vasculaire au niveau du site d'infection (Figure 35C et D). Des hyphes de *Frankia* sont visibles dans les poils absorbants qui expriment *CgAUX1* (Figure 35E et F). L'expression de *CgAUX1* est visible dans les cellules infectées du prénodule (Figure 35D). Dans les stades suivants, l'expression de *CgAUX1* est toujours associée au processus d'infection. Des coupes de nodules montrant une forte coloration des cellules infectées et une absence de coloration dans les cellules non-infectées confirment ce profil d'expression (Figure 35G à J). De manière surprenante, aucune expression de *CgAUX1* n'est détectée dans le primordium de lobe nodulaire (Figure

35B). Cette absence d'expression est également observée dans les primordias de nodules en cours de ramification (Figure 35K). L'expression de *CgAUX1* est détectée de manière similaire dans le système vasculaire de la racine et du nodule (Figure 35G et H).

L'expression de *CgLAX3* a également été déterminée en réponse à l'infection. Néanmoins, l'impossibilité de régénérer des plants de *C. glauca* contenant la construction *Pro_{CgLAX3}:GUS* nous a contraint à utiliser *A. verticillata*. Cette espèce se transforme plus facilement, mais les conditions de nodulation sont plus délicates. Les stades précoces de l'infection n'ont donc pas pu être observés. L'expression de *CgLAX3* a été détectée dans le système vasculaire du nodule mature (Figure 36).

3) *CgAUX1* et *CgLAX3* ne sont pas inductibles par l'auxine

La quantification de l'expression de *CgAUX1* et *CgLAX3* a été réalisée par RT-

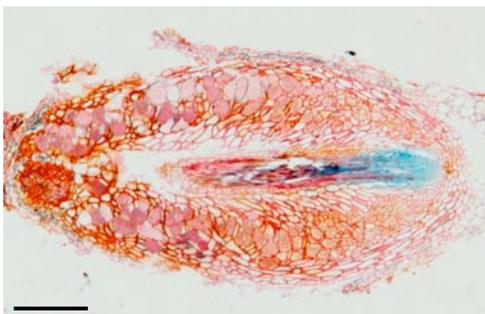


Figure 36. Expression de *CgLAX3* dans le nodule actinorhizien chez *Allocasuarina verticillata*
L'expression de *CgLAX3* est détectée dans le jeune système vasculaire du nodule. Barre : 100 μ m.

PCR quantitative en réponse à différents traitements auxiniques. Le gène *CgAUX1* n'est pas induit par les auxines utilisées (IAA, NAA et PAA) à 1 μ M (Figure 37) et 10 μ M (données non montrées) et le gène *CgLAX3* montre une sous-expression en réponse à certains traitements. Cette absence d'induction est observée quel que soit le statut minéral de la plante (10mM de nitrate, carence en azote d'une semaine et carence en phosphate d'une semaine). Des traitements avec 1 ou 10 μ M de NAA pendant 16 heures n'ont pas modifié le profil d'expression déterminé par la construction *Pro_{CgAUX1}:GUS* (donnée non montrée). L'utilisation de surnageant de *Frankia* (dilué au 1/4) n'a pas non plus modifié le profil d'expression de *CgAUX1*. Ces différents traitements ont été réalisés en condition de carence en azote (une semaine). En conclusion, l'auxine n'est pas

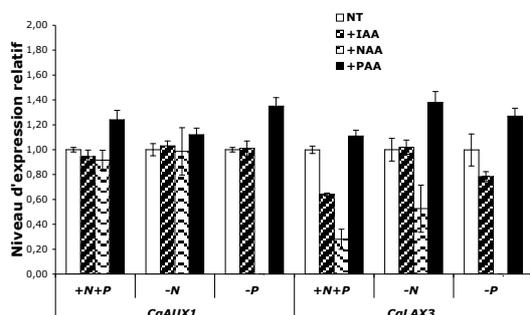


Figure 37. Induction de *CgAUX1* et *CgLAX3* par les auxines

Détermination du niveau d'expression de *CgAUX1* et *CgLAX3* dans le système racinaire par RT-PCR quantitative en réponse à des traitements de 1 μ M en auxines (IAA, NAA ou PAA) pendant 24 heures. Les analyses ont été réalisées en hydroponie sur milieu BD contenant de l'azote et du phosphate (+N+P) ou après sevrage d'une semaine en azote (-N) ou en phosphate (-P). L'expression des gènes est exprimée par rapport aux plantes non-traitées par l'auxine après normalisation par le gène de l'ubiquitine (*CgUBI*). nd : non déterminé.

un signal suffisant pour induire l'expression de *CgAUX1* au cours de l'infection et le signal inducteur de *CgAUX1* reste à déterminer.

III. L'inhibition du transport d'influx d'auxine perturbe le processus de nodulation

Le profil d'expression de *CgAUX1* suggère que le transport d'influx d'auxine est impliqué dans le processus d'infection au cours de la mise en place du nodule actinorhizien (Figure 35). Afin de tester cette hypothèse, nous avons utilisé l'acide 1-naphtoxy acétique (1-NOA) qui est un inhibiteur du transport d'influx d'auxine (Parry *et al*, 2001a) qui agit par compétition avec l'auxine (Yang *et al*, 2006). Dans un premier temps, nous avons déterminé l'impact du 1-NOA sur la protéine *CgAUX1* puis l'effet de cette molécule a été étudié au cours de l'infection.

Afin de déterminer si la protéine *CgAUX1* est sensible au 1-NOA, nous avons utilisé les mutants *aux1-22* complétés par l'expression de *CgAUX1* sous dépendance du promoteur et du terminateur d'*AtAUX1*. Le traitement des plantes sauvages avec 25 μ M de 1-NOA pendant 24 heures avant le test gravitropique entraîne une perte du phénotype gravitropique. Les plantes mutantes sont déjà agravitropiques et ne sont donc pas affectées par ce traitement (Figure 38A). L'effet du 1-NOA sur les mutants *aux1-22* complétés par l'expression de *CgAUX1* est identique à celui observé chez les plantes sauvages (Figure 38A). La perte du phénotype gravitropique signifie donc que le transporteur d'influx d'auxine *CgAUX1* est sensible au 1-NOA.

L'effet du 1-NOA sur la nodulation a été déterminé en ajoutant 25 μ M de 1-NOA au moment de l'inoculation par *Frankia* puis en suivant l'apparition des prénodules et nodules à l'œil nu tous les jours jusqu'à ce que toutes les plantes soient nodulées (trois répétitions biologiques). Le traitement a entraîné un

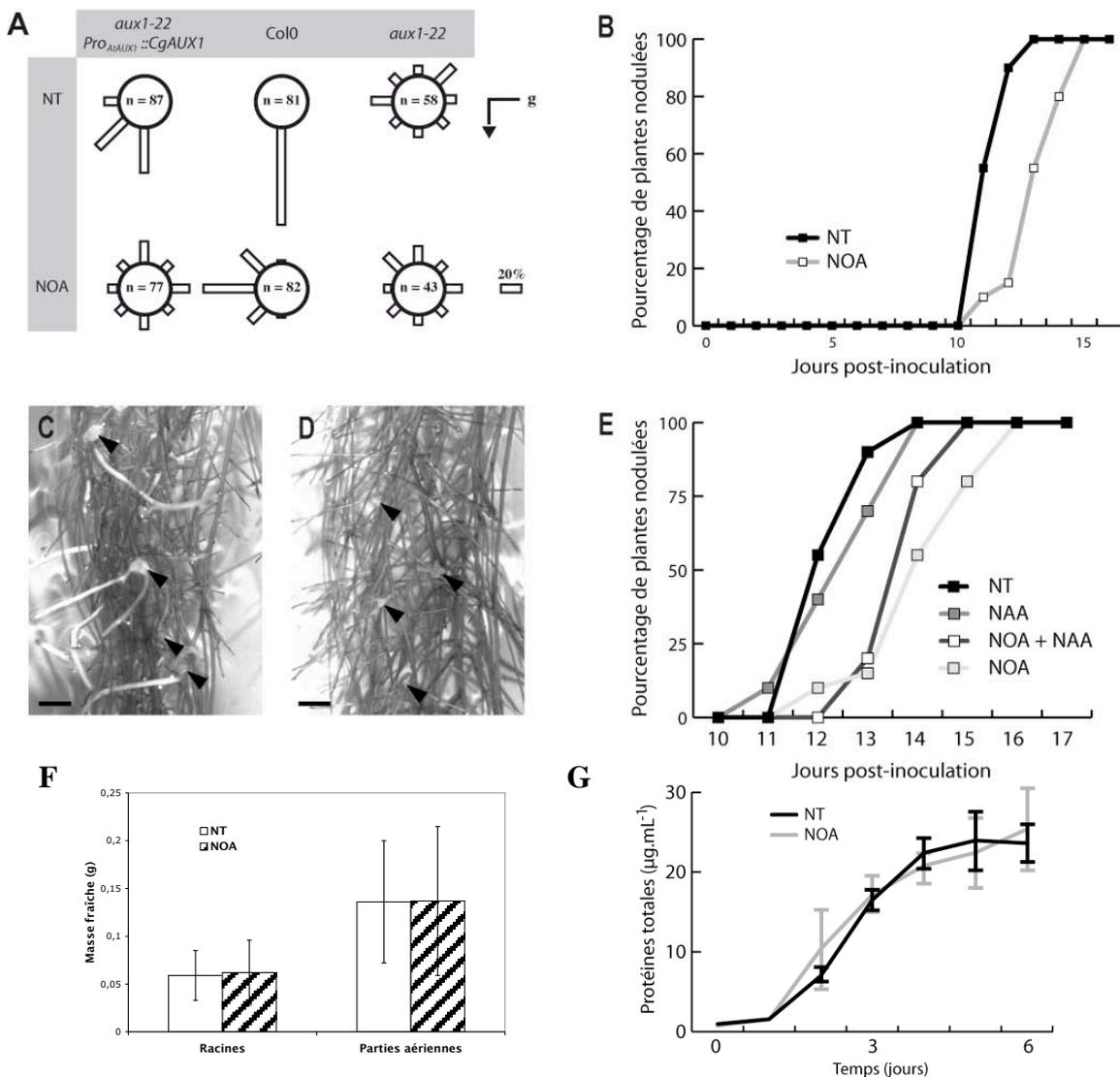


Figure 38. Le 1-NOA retarde la nodulation en inhibant le transporteur d'influx d'auxine CgAUX1

CgAUX1 est sensible au 1-NOA : l'apport de 25µM de 1-NOA provoque une perte du phénotype gravitropique chez la plante sauvage d'*Arabidopsis* ou chez le mutant *aux1-22* complémenté par *CgAUX1* (A). L'ajout de 25 µM de 1-NOA au moment de l'inoculation par *Frankia* entraîne un retard de deux jours dans l'apparition des nodules chez *Casuarina glauca* (B). 24 jours après inoculation, les plantes témoins présentent des nodules (C) alors que les plantes traitées avec le 1-NOA présentent de gros prénodules (D). Barres : 1 cm (C et D). L'ajout de 1µM de NAA permet de limiter les effets de 25µM de 1-NOA sur l'apparition des nodules (E). La masse fraîche des racines et des parties aériennes a été déterminée 25 jours après inoculation (F). Un test de Student ($p < 0,01$) ne montre aucune différence significative entre les plantes témoins et les plantes traitées avec 25µM de 1-NOA. La croissance de *Frankia* n'est pas affectée par l'ajout de 25 µM de 1-NOA (G).

retard moyen de deux jours dans l'apparition des structures symbiotiques (Figure 38B). Une quatrième répétition biologique a été réalisée en changeant la solution de 1-NOA tous les trois jours afin de contourner une dégradation éventuelle du 1-NOA au cours du temps. L'utilisation de 25 µM et 50 µM de 1-NOA dans ces conditions expérimentales a produit le même retard de deux jours dans l'apparition des structures symbiotiques. 24 jours après inoculation, les plantes non-traitées présentent des nodules avec

des racines nodulaires alors que les plantes traitées au 1-NOA présentent des structures qui s'apparentent à des prénodules de grande taille ou à des nodules dépourvus de racine nodulaire (Figure 38C et D).

La même expérience a été réalisée en présence de 1 µM NAA. Le NAA est une auxine très lipophile qui peut pénétrer dans la cellule végétale par diffusion et ne nécessite pas de transporteur d'influx d'auxine. L'utilisation de NAA seul entraîne un délai d'un jour dans

l'apparition des nodules alors que l'utilisation de NAA combinée avec du 1-NOA limite le retard d'apparition des nodules d'environ un jour (Figure 38E). Il semble donc que l'ajout d'auxine lipophile permette de compléter partiellement l'inhibition du transport d'influx d'auxine au cours de la nodulation. Cela confirme que le 1-NOA inhibe le processus de nodulation en agissant spécifiquement sur le transport d'influx d'auxine.

Nous avons déterminé l'effet du 1-NOA sur la croissance globale de la plante en déterminant la masse du système racinaire et des parties aériennes à la fin de l'expérience. Aucune différence significative n'a été observée entre les plantes non-traitées et le traitement 1-NOA (Figure 38F). Nous avons également déterminé l'effet du 1-NOA sur la croissance de *Frankia*, aucune différence n'est observée sur la phase exponentielle de croissance de la bactérie en présence ou en absence de 25 μ M de 1-NOA (Figure 38G). Il semble donc que l'effet du 1-NOA sur la nodulation s'explique par une inhibition directe du transport d'influx plutôt que d'un effet plus globale sur la

croissance de la plante ou d'un effet délétère pour la bactérie. Il n'est cependant pas possible d'exclure un effet potentiel du 1-NOA sur l'expression des gènes bactériens nécessaires au cours de la symbiose.

IV. Dosages d'auxine

L'expression d'un transporteur d'influx d'auxine au cours de l'infection des cellules végétales par *Frankia* suggère que soit la bactérie *Frankia* produit de l'auxine qui est impliquée dans le mécanisme d'infection, soit la plante elle-même produit de l'auxine qui doit être apportée aux cellules lors de l'infection. La surexpression de *CgAUX1* dans le système vasculaire au site d'infection suggère un apport d'auxine dans cette zone. Afin de préciser si la bactérie produit de l'auxine et si la nodulation s'accompagne d'une augmentation de la concentration en auxine, nous avons réalisé des dosages d'auxine en collaboration avec le Dr. H Fernandez (Université d'Oviedo, Espagne). En première approche, nous avons décidé de déterminer la concentration en IAA car c'est l'hormone naturelle majoritaire et en PAA car c'est une hormone naturelle minoritaire qui est produite par certaines souches de *Frankia* (Hammad *et al*, 2003).

1) Production d'auxine par la bactérie *Frankia*

Certaines souches de *Frankia* sont capables de produire différents types d'auxines (Hammad *et al*, 2003 ; Wheeler *et al*, 1984). Cependant, aucune information n'est disponible sur la production d'auxine par la souche Ccl3 qui est utilisée pour l'inoculation de *C. glauca*. Nous avons donc récolté un litre de surnageant d'une culture de *Frankia* par centrifugation à 6000g pendant 15 minutes. Le surnageant a été filtré à 0,2 μ m pour éliminer toute trace de bactérie puis a été congelé à -80°C . Les analyses par HPLC couplée à la spectrométrie de masse ont permis de montrer la production d'IAA et de PAA par la bactérie *Frankia* (Figure 39A).

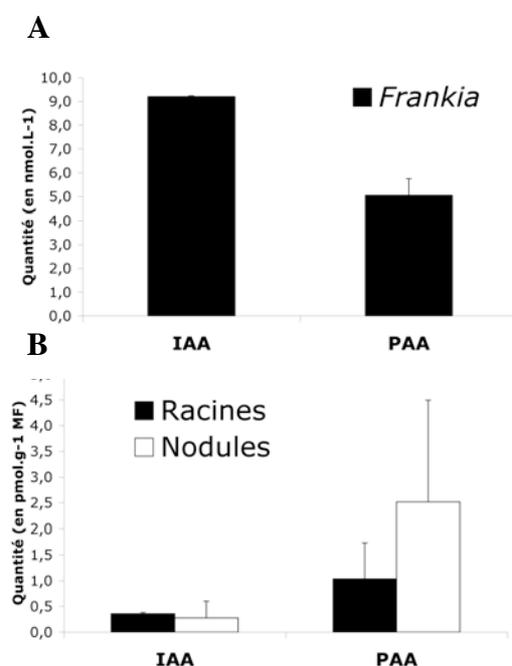


Figure 39. Dosages des auxines produites par *Frankia* et *Casuarina glauca*

La concentration en acide indole acétique (IAA) et en acide phénylacétique (PAA) a été déterminée dans le surnageant de la bactérie *Frankia* (A) et dans les racines et les nodules de la plante *C. glauca* (B).

2) Accumulation d'auxine au cours de la nodulation

La nodulation du système racinaire de certaines plantes actinorhiziennes comme *Alnus glutinosa*, *A. serrulata* et *Myrica cerifera* est associée avec une augmentation de la teneur en auxines (Wheeler *et al*, 1979). Cependant, il n'a jamais été prouvé si cette auxine est d'origine végétale ou bactérienne. De plus, aucune information n'est connue dans le cas de la symbiose entre *C. glauca* et *Frankia*. Nous avons donc récolté le système racinaire de plants de *C. glauca* (conditions non sevrées en azote) et des nodules âgés de deux à trois semaines. Les échantillons ont été placés dans l'azote et envoyés pour des analyses par HPLC couplée à la spectrométrie de masse. Les résultats des dosages montrent une accumulation similaire d'IAA dans les deux organes. Le PAA est présent en plus grande quantité que l'IAA dans les racines et semble être accumulé dans les nodules (Figure 39B). Néanmoins, de nouveaux dosages devront être réalisés afin de confirmer ces résultats préliminaires.

V. Discussion

1) L'influx d'auxine est associé au mécanisme d'infection par *Frankia*

Les résultats obtenus suggèrent que l'influx d'auxine est impliqué dans l'interaction symbiotique entre *C. glauca* et *Frankia*. En effet, l'expression de *CgAUX1* est toujours observée dans les cellules infectées par la bactérie symbiotique. Ce profil d'expression nécessite qu'un signal de *Frankia* produit au cours de l'infection entraîne une réponse spécifique de la plante. *A priori*, il ne s'agit pas de l'auxine elle-même car l'application d'auxine ou de surnageant de *Frankia* n'a pas d'effet sur l'expression de *CgAUX1*.

La production d'un transport d'influx d'auxine suggère que la cellule infectée prélève de l'auxine dans son environnement immédiat. Plusieurs hypothèses sont possibles pour expliquer l'origine de l'auxine perçue par la cellule infectée. Tout d'abord, l'auxine pourrait

provenir des tissus végétaux adjacents. Dans ce cas, l'expression de *CgAUX1* permettrait de recruter l'auxine présente dans les tissus végétaux afin de permettre la mise en place du programme symbiotique. Une autre hypothèse est que la plante prend en charge l'auxine produite par la bactérie. L'utilisation d'une protéine *CgAUX1* fusionnée avec une protéine fluorescente (GFP ou YFP) permettrait de déterminer la localisation cellulaire de *CgAUX1* dans les cellules infectées. La détection de la protéine dans la membrane plasmique en périphérie des cellules ou dans la membrane plasmique qui entoure les bactéries permettrait de préciser quelle hypothèse est la plus vraisemblable.

Des dosages ont permis de démontrer que la souche Ccl3 de *Frankia* produit de l'auxine. Néanmoins, nous n'avons pas déterminé si la bactérie produit des auxines au cours de l'infection. Le récent séquençage du génome de *Frankia*, et notamment de la souche Ccl3, a permis d'identifier les gènes potentiellement impliqués dans la voie de biosynthèse de l'auxine (IAA et PAA ; Normand *et al*, 2006). Le suivi de l'expression de ces gènes au cours de l'infection par hybridation *in situ* permettrait de mettre en évidence la production d'auxine par *Frankia* au cours de la symbiose. D'autres souches de *Frankia* ainsi que de nombreuses bactéries de la rhizosphère ont la capacité de produire de l'auxine (Wheeler *et al*, 1984 ; Lambrecht *et al*, 2000). Cependant, le rôle de l'auxine bactérienne dans les relations plantes-microorganismes n'a jamais été clairement établi. La production d'auxine par de nombreuses rhizobactéries montre que l'auxine seule n'est pas un signal suffisamment spécifique et doit nécessairement être accompagné d'un signal spécifique comme les facteurs Nod chez *Rhizobium*. Dans ce cas, l'auxine pourrait alors agir en synergie avec un signal symbiotique plus spécifique. En effet, la surproduction d'auxine par une souche mutante de *Bradyrhizobium japonicum* correspond à une augmentation de l'efficacité de la

nodulation chez les Légumineuses (Kaneshiro et Kwolek, 1985).

Il a été montré qu'AtAUX1 et AtLAX3 sont des transporteurs d'auxine à haute affinité (Yang *et al*, 2006; M. Bennett, communication personnelle) cependant leur niveau de spécificité n'est pas connu. Il se pourrait donc qu'un transporteur d'auxine prenne en charge des composés indoliques produits par la bactérie *Frankia* (Wheeler *et al*, 1984). Ces composés pourraient soit avoir une activité auxinique, soit présenter une activité différente ainsi qu'un niveau de spécificité plus élevé que celui de l'auxine.

En accord avec l'implication de *CgAUX1* dans le mécanisme d'infection, l'utilisation de l'inhibiteur spécifique du transport d'influx d'auxine 1-NOA entraîne un retard dans l'apparition des prénodules et des nodules. Ce retard dans la nodulation est diminué par l'ajout de l'auxine lipophile NAA ce qui montre qu'il s'agit d'un effet spécifique sur l'influx d'auxine. Cependant, l'utilisation du 1-NOA présente certaines limites : la pénétration du 1-NOA dans les tissus internes de la racine de *C. glauca* est probablement assez limitée. De plus, le 1-NOA est un inhibiteur compétitif, il y a donc de fortes chances que sa concentration ne soit pas suffisamment élevée pour inhiber le transport d'influx d'auxine dans les tissus les plus internes de la racine. De la même manière, la forte production d'auxine par *Frankia* dans un site confiné, comme la zone de courbure du poil racinaire, pourrait limiter l'effet du 1-NOA. Autrement dit, son action ne permet probablement que de réduire l'efficacité du processus d'infection. Cela peut suffire à expliquer que le traitement avec du 1-NOA ne permet pas d'empêcher l'infection mais entraîne juste un retard de la mise en place de la symbiose. La technique d'ARN interférent a récemment été développée chez *C. glauca* dans notre laboratoire. L'extinction spécifique de *CgAUX1* permettra de préciser dans quelle mesure le transport d'influx d'auxine est impliqué dans le mécanisme d'infection par *Frankia* au cours de la symbiose actinorhizienne.

2) *CgAUX1* pourrait créer un puits d'auxine au site d'infection

L'infection par la bactérie *Frankia* est associée à une sur-expression dans le système vasculaire en regard du site d'infection (Figure 35). La production d'un transporteur d'influx d'auxine peut permettre de modifier les flux d'auxine au site d'infection. Chez *Arabidopsis*, l'expression d'AtAUX1 permet d'initier le transport post-phloèmien de l'auxine vers l'apex de la racine (Swarup *et al*, 2001). De façon similaire, la sur-expression de *CgAUX1* dans le tissu vasculaire pourrait permettre de créer un puits d'auxine et d'augmenter localement sa concentration. Une augmentation de la concentration en auxine est d'ailleurs observée au site d'infection chez les Légumineuses (Pacios-Bras *et al*, 2003). Cependant, cette accumulation est liée à une inhibition du transport d'efflux (Mathesius *et al*, 1998). Aucune information sur le transport d'efflux d'auxine au cours de la symbiose actinorhizienne n'est disponible. Des études par hybridation *in situ* sur l'ensemble des gènes *LAX* de *M. truncatula* ont montré que le transport d'influx d'auxine n'est pas augmenté dans les tissus vasculaires au site d'infection (de Billy *et al*, 2001). Néanmoins, l'utilisation d'une sonde unique pour détecter les ARNm de cinq gènes par hybridation *in situ* ne permet peut-être pas d'obtenir un niveau de détection suffisamment élevé. Quoi qu'il en soit, l'augmentation de la concentration en auxine pourrait être responsable des divisions cellulaires dans le cortex pour former le pré-nodule et dans le péricycle pour former le nodule chez *C. glauca*. En effet, l'expression de *CgAUX1* est clairement visible dans ces deux tissus.

3) *CgAUX1* n'est pas impliqué dans l'organisation du primordium nodulaire

Le nodule actinorhizien est considéré comme une racine latérale modifiée (Pawlowski et Bisseling, 1996). Le profil d'expression de *CgLAX3* très semblable entre ces deux organes semble confirmer ce postulat (Figures 34 et 36). Néanmoins, *CgAUX1* est exprimé dans le primordium

racinaire mais pas dans le primordium nodulaire (Figure 35). Ces résultats indiquent que ces deux organes ont des divergences dans leurs programmes développementaux. Ceci est en accord avec d'autres observations qui montrent que l'expression hétérologue de promoteurs comme le *35S* ou *AtUBQ1* ont des profils d'expression différents dans le primordium de racine et de nodule chez les Casuarinacées (Obertello *et al*, 2005).

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer la différence de profil d'expression de *CgAUX1*. Soit le primordium nodulaire ne nécessite pas de transporteur d'influx d'auxine pour son organisation, soit un autre gène que *CgAUX1* remplit cette fonction. Le transport d'auxine dans le primordium de racine latérale est associé à la création d'un gradient d'auxine dont le maximum se trouve à l'apex (Benková *et al*, 2003). Néanmoins, ce sont essentiellement les transporteurs d'efflux qui assument ce rôle. L'absence de transporteur d'influx dans le primordium pourrait donc ne pas perturber les flux d'auxine nécessaires à son organisation. D'ailleurs, le mutant *aux1* d'*A. thaliana* est perturbé dans l'initiation de la racine latérale mais pas dans l'organisation du clonage et la caractérisation de ce gène seraient initiés afin d'obtenir des

primordium (Marchant *et al*, 2002). Malheureusement, l'analyse du profil d'expression de *CgLAX3* ne nous a pas permis de déterminer s'il est exprimé ou non dans le primordium nodulaire. Il est donc possible qu'un autre gène *AUX-LAX* que *CgAUX1* soit exprimé dans le primordium de nodule.

L'utilisation d'une technique de transformation génétique plus rapide basée sur la production de chevelus racinaires (*hairy root*) par *Agrobacterium rhizogenes* permettra dans un avenir proche de générer des racines de *C. glauca* contenant la construction *Pro_{CgLAX3}:GUS*. Cette technique est désormais maîtrisée dans notre laboratoire. L'analyse de l'expression de *CgLAX3* révélera si ce gène est exprimé dans le primordium de nodule. Afin de préciser le rôle de ce gène, l'extinction de son expression par ARN interférent pourra être envisagée. De plus, le séquençage en cours d'un grand nombre d'EST par notre équipe dans le cadre d'un projet Génoscope permettra éventuellement d'identifier un nouveau gène de la famille *AUX-LAX* qui aurait pu échapper à nos différentes approches pour identifier tous les gènes de la famille. Le cas échéant, les informations similaires à celles qui ont été obtenues pour *CgAUX1* et *CgLAX3*.

PARTIE III – CIBLES DE LA SIGNALISATION AUXINIQUE DEPENDANTE DU TRANSPORT D'INFLUX

I. Introduction

Les résultats que nous avons obtenus suggèrent que le transport d'influx d'auxine est impliqué dans le mécanisme d'infection par *Frankia* au cours de la symbiose actinorhizienne. Néanmoins, il n'existe aucune information sur les cibles de la signalisation auxinique au cours de l'infection des plantes actinorhiziennes. Chez *Arabidopsis thaliana*, aucune cible de la signalisation auxinique dépendante du gène *AtAUX1* n'est connue. Afin d'identifier ces cibles au cours de la symbiose actinorhizienne, nous avons décidé de collaborer à l'identification de ces mécanismes chez la plante modèle. L'identification récente du mutant *lax3* par le laboratoire du professeur Malcolm Bennett (Université de Nottingham, Royaume-Uni) a permis de mettre en évidence de nouveaux mécanismes impliqués dans l'émergence de la racine latérale. Nous nous sommes impliqués dans l'identification des mécanismes situés en aval de l'action du gène *AtLAX3* au cours de ce processus. Dans cette introduction, nous présenterons donc les résultats obtenus par le laboratoire de M. Bennett sur la caractérisation du mutant *lax3* puis dans une seconde partie les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse sur l'identification des cibles de la signalisation auxinique dépendante d'*AtLAX3*.

1) *AtLAX3* est impliqué dans l'émergence de la racine latérale

Trois homologues du gène *AtAUX1* ont été identifiés chez *A. thaliana* : *AtLAX1*, *AtLAX2* et *AtLAX3*. L'identification de lignées d'insertion pour chacun de ces gènes a permis de mettre en évidence un phénotype de réduction du nombre de

racines latérales pour le mutant *lax3* alors que les mutants *lax1* et *lax2* n'ont pas de phénotype racinaire. Le mutant *lax3* présente une réduction d'environ 40% du nombre de racines latérales émergées par comparaison avec le type sauvage (Figure 40a–e). Ce phénotype est comparable à celui du mutant *aux1* (Marchant *et al*, 2002). Contrairement au mutant *aux1* qui présente environ moitié moins de primordia que le sauvage, le mutant *lax3* possède trois fois plus de primordia que le sauvage. Le phénotype du mutant *lax3* ne peut donc pas s'expliquer par un défaut d'initiation comme c'est le cas pour *aux1*. À l'inverse, la mutation *lax3* arrête la progression du primordium car la majorité des primordia sont bloqués au stade I (Figure 40f).

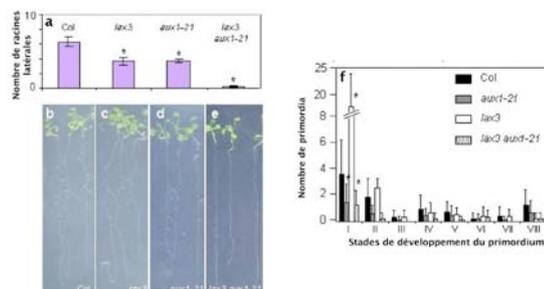


Figure 40. Phénotype du mutant *lax3*

Nombre de racines latérales chez le mutant *lax3*, *aux1-21*, le double mutant *lax3aux1-21* comparé au sauvage Col0 12 jours après germination (a). Jeunes plants sauvages Col0 (b), mutants *lax3* (c), mutants *aux1-21* (d) et double mutants *lax3aux1-21* (e) 12 jours après germination. Nombre de primordia pour chaque stade de développement 8 jours après germination (f). Les valeurs statistiquement différentes du témoin (test de Student $P < 0,05$) sont indiquées par un astérisque.

2) *AtLAX3* est exprimé dans les cellules en face du primordium

La protéine LAX3 est présente dans la stèle et les quelques cellules du cortex et de l'épiderme situées en face du primordium de racine latérale (Figure 41). Ce profil d'expression est distinct de celui d'*AtAUX1* (Marchant *et al*, 2002) et

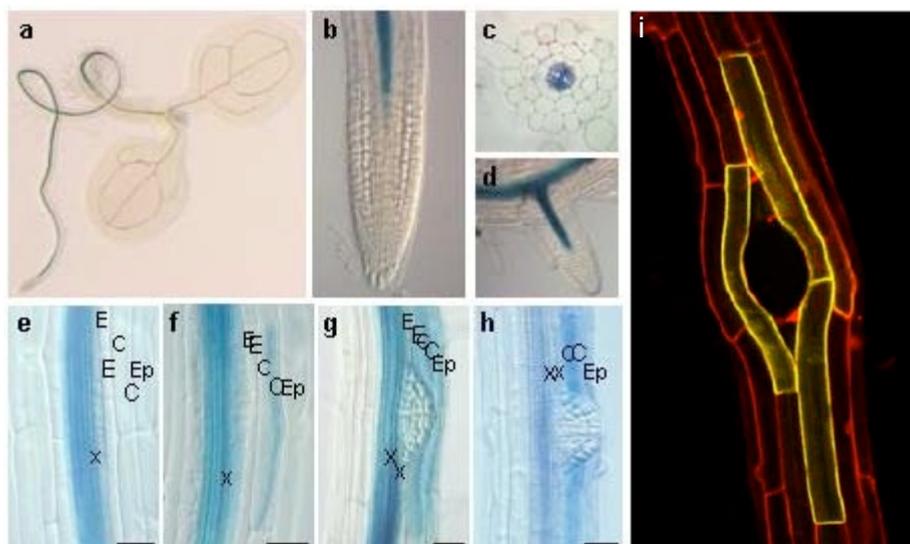


Figure 41. Profil d'expression d'AtLAX3

Expression d'AtLAX3 déterminée par l'utilisation de la construction $Pro_{AtLAX3}::GUS$. AtLAX3 est exprimé dans le système vasculaire (a) jusqu'à la zone d'élongation (b). Expression d'AtLAX3 au niveau d'une coupe transversale de racine (c) et d'une jeune racine latérale (d). AtLAX3 n'est pas exprimé dans le primordium de racine latérale mais dans les tissus adjacents : stade I (e), stade II (f), stade V (g), stade VII (h) et après émergence (fusion LAX3:YFP - i). Barres : 25µm.

explique l'additivité des phénotypes *aux1* et *lax3*. En effet le double mutant *aux1lax3* ne produit pas de racines latérales pendant les 14 premiers jours après germination (Figure 40e). De plus, ce profil d'expression indique que LAX3 permet le développement du primordium de manière indirecte à partir de la stèle et des cellules corticales et épidermiques.

La production de la protéine LAX3 uniquement dans la stèle en utilisant le promoteur du gène *SHORTROOT* (Helariutta *et al*, 2000) ne permet pas de restaurer le phénotype sauvage des mutants *lax3* (donnée non montrée - voir Annexes). Par contre, l'expression de LAX3 sous contrôle de son propre promoteur restaure le phénotype sauvage. De plus, l'utilisation d'une fusion fonctionnelle LAX3:YFP montre que la protéine LAX3 n'est pas localisée à la surface des cellules de la stèle alors que la localisation de LAX3 est bien membranaire dans les cellules corticales et épidermiques.

Cela montre que l'expression de LAX3 dans les cellules du cortex et de l'épiderme est nécessaire pour permettre de restaurer un phénotype racinaire sauvage.

3) AtLAX3 est inductible par l'auxine

Des analyses par RT-PCR quantitative ont montré que LAX3 est inductible par l'auxine (Figure 42E). Ces données ont été précisées par l'utilisation d'une fusion LAX3:YFP sous dépendance du promoteur de LAX3 (Figure 42A et B). En effet,

l'induction par l'auxine est spécifique du cortex et, dans une moindre mesure, de l'épiderme. Cette inductibilité par l'auxine est dépendante du gène *SOLITARY ROOT* (*SLR1/IAA14*; Figure 42C à E) qui est également exprimé dans le cortex et l'épiderme de manière assez faible (Fukaki *et al*, 2002). En effet, la mutation de gain de fonction *slr1* bloque l'inductibilité de LAX3 par l'auxine.

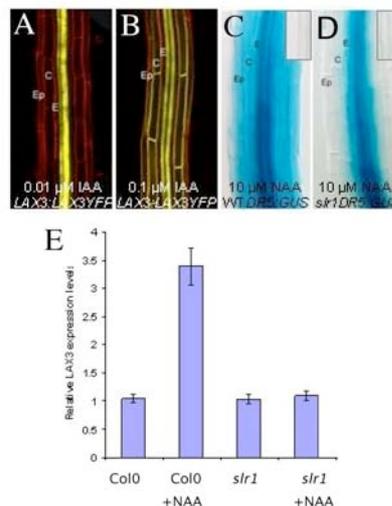


Figure 42. AtLAX3 est induit par l'auxine de façon dépendante de SLR1/IAA14

Expression d'AtLAX3 déterminée par fusion LAX3:YFP après traitement avec 10^{-8} M d'IAA (A) ou 10^{-7} M d'IAA (B). Expression du marqueur *DR5:GUS* dans le cortex et l'épiderme après traitement avec 10^{-5} M de NAA chez le sauvage Col0 (C) et chez le mutant *slr1* (D). Induction d'AtLAX3 par l'auxine (10^{-5} M de NAA) déterminé par RT-PCR quantitative chez Col0 ou chez le mutant *slr1* (E).

L'auxine s'accumule dans l'apex du primordium de racine latérale au cours de son développement (Benková *et al*, 2003). L'utilisation du gène rapporteur DR5 a permis de mettre en évidence une réponse

dans les tissus situés en face du primordium, suggérant un passage de l'auxine contenue dans le primordium vers les tissus adjacents. Ce signal est exclusivement observé dans les cellules de l'endoderme, du cortex et de l'épiderme situées en regard du primordium.

L'émergence des primordia de racine latérale est augmentée chez le mutant *pin2*. La mutation du gène *PIN2* perturbe le transport basipète d'auxine dans la racine primaire (Rashotte *et al*, 2000). L'analyse du profil d'expression de *PIN2* suggère que *PIN2* permet le transport basipète dans le méristème apical et de racine latéral (Figure 43a). En accord avec ces observations, le marqueur *DR5* montre une plus forte accumulation d'auxine dans l'apex des primordia de racines latérales chez le mutant *pin2* (Figure 43b à e). Cette plus forte accumulation d'auxine est associée à une augmentation de l'émergence chez le mutant *pin2*.

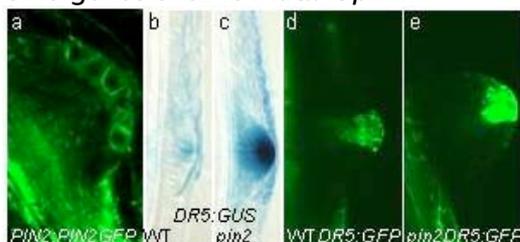


Figure 43. PIN2 permet le transport basipète de l'auxine dans le primordium

Expression de *PIN2* dans le primordium de racine latérale déterminée par fusion *PIN2::GFP* (a). Maximum d'auxine à l'apex du primordium démontré par l'utilisation du marqueur *DR5::GUS* (b) ou *DR5::GFP* (d). Ce maximum est plus élevé chez le mutant *pin2* (c et e).

4) Conclusion

Le profil d'expression de *LAX3* semble donc résulter d'une induction par l'auxine en provenance des primordia, ce qui explique la spécificité d'expression de *LAX3* dans les quelques cellules en regard du primordium. Nous avons cherché à identifier les gènes cibles de la signalisation auxinique dans ces cellules du cortex et de l'épiderme impliquées dans l'émergence de la racine latérale. Les gènes impliqués dans le remodelage de la paroi sont des candidats potentiels car certains d'entre eux sont exprimés lors de l'émergence. Par la suite, des homologues de ces gènes seront identifiés chez *C.*

glauca. L'objectif est de découvrir les gènes induits en réponse à un signal auxinique sous dépendance d'un transporteur d'influx dans le cas de l'infection par *Frankia* au cours de la symbiose actinorhizienne.

II. *AtLAX3* permet le remodelage de la paroi dans les cellules de l'épiderme et du cortex au cours de l'émergence

Pour identifier les cibles de la signalisation auxinique dans les cellules qui expriment *LAX3*, nous avons utilisé deux approches. Tout d'abord une approche gène candidat a été menée en identifiant un gène ayant le même profil d'expression que *LAX3*. Ensuite, des analyses transcriptomiques nous ont fourni une liste de gènes induits par l'auxine et exprimés dans le cortex et l'épiderme.

1) L'induction d'*AIR3* par l'auxine dépend de *LAX3*

L'émergence de la racine latérale implique la séparation des cellules situées en face du primordium au cours de sa progression à travers ces tissus. Ces cellules restent intactes et se séparent entre elles au niveau de leur lamelle moyenne (Laskowski *et al*, 2006). Le gène *AIR3* code une protéase de type subtilisine et est exprimé dans les cellules du cortex et de l'endoderme situées en face du primordium de racine latérale (Neuteboom *et al*, 1999b). De plus, l'expression d'*AIR3* est induite par l'auxine (Neuteboom *et al*, 1999b). Ce gène présente donc le même profil d'expression qu'*AtLAX3* et constitue un candidat idéal car il pourrait être impliqué dans le remodelage de la paroi au cours du processus d'émergence. Nous avons donc testé si cette induction par l'auxine est dépendante de *LAX3*. Pour cela, la construction *Pro_{AIR3}::GUS* a été introduite chez le mutant *lax3* et chez le sauvage (Col0). Les analyses ont été réalisées sur 3 lignées T2 pour *lax3* et 5 lignées T2 pour Col0. De manière intéressante, la mutation *lax3* entraîne une

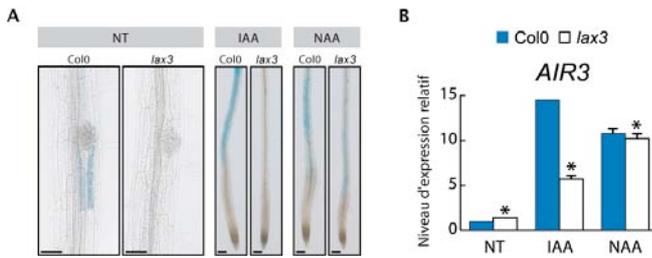


Figure 44. *AtAIR3* est induit par l'auxine de façon dépendante d'*AtLAX3*

Expression d'*AtAIR3* déterminée par fusion *Pro_{AtAIR3}-GUS* chez le sauvage Col0 ou chez le mutant *lax3* sans traitement (NT), après traitement avec 1 μ M d'IAA ou 1 μ M de NAA pendant 16 heures (A). Détermination du niveau d'expression d'*AtAIR3* par RT-PCR quantitative chez le sauvage Col0 ou chez le mutant *lax3* sans traitement (NT), après traitement avec 1 μ M d'IAA ou 1 μ M de NAA pendant 16 heures (B). Les données statistiquement différentes du contrôle sauvage (test de Student $P < 0,05$) sont indiquées par un astérisque.

diminution de l'expression d'*AIR3* en regard des primordia de racine latérale (Figure 44A). De plus, l'application d'IAA ne permet pas d'induire l'expression d'*AIR3* alors que l'utilisation de l'auxine lipophile NAA permet de restaurer l'induction d'*AIR3* (Figure 44A). Ces résultats ont été confirmés en déterminant le niveau d'expression d'*AIR3* dans les racines par RT-PCR quantitative. En effet, la mutation *lax3* provoque une perte de l'inductibilité d'*AIR3* par l'auxine IAA alors que l'ajout de l'auxine lipophile NAA permet de restaurer cette inductibilité (Figure 44B).

Cela montre que le gène *AIR3* est induit par l'auxine de manière dépendante de *LAX3* dans les cellules du cortex et de l'épiderme situées en face du primordium de racine latérale.

2) Un ensemble de gènes de remodelage de la paroi induits par l'auxine et dépendants de *LAX3*

Des analyses transcriptomiques menées dans le laboratoire du Dr. T. Beeckman (VIB, Gand, Belgique) nous ont permis d'identifier de nouveaux gènes potentiellement régulés par *LAX3*. Une liste de 500 gènes a été obtenue par soustraction de deux jeux de données de transcriptomique. Le premier jeu correspond à une soustraction entre des plantes sauvages et des mutants *slr* en réponse à l'induction des racines latérales par l'auxine. Il s'agit donc de gènes induits

par l'auxine dans les différents tissus de la racine de façon dépendante de *SLR1/IAA14*. *SLR1/IAA14* est exprimé dans le tissu vasculaire, le péricycle, le cortex et l'épiderme (Fukaki *et al*, 2002). Le deuxième jeu correspond aux gènes induits par l'auxine dans les cellules du péricycle obtenues par tri cellulaire (lignée « *enhancer trap* » J121 spécifique des cellules du péricycle situées en face du pôle de xylème ; Laplaze *et al*, 2005). La soustraction de ces deux jeux de données permet donc d'obtenir des gènes potentiellement induits par l'auxine dans le tissu vasculaire, le cortex et l'épiderme sous dépendance de *SLR1/IAA14*.

Les gènes *AIR3* et *LAX3* sont présents dans cette liste de 500 gènes. Cinq gènes impliqués dans le remodelage de la paroi ont été identifiés : il s'agit d'une xyloglucan:xyloglucosyl transférase (*XTR6* – Vissenberg *et al*, 2005), une polygalacturonase (*PG* – Wen *et al*, 2006), une pectate lyase (*PLA2* – Laskowski *et al*, 2006), une expansine (*EXP17* – Cosgrove, 2000) et une glycosyl hydrolase (*GLH17* – Henrissat et Davies, 1997). L'inductibilité par l'auxine de ces gènes de remodelage de la paroi a été testée chez les plantes sauvages (Col0) et chez le mutant *lax3* (Figure 45) par RT-PCR quantitative. La mutation du gène *LAX3* entraîne une diminution de l'inductibilité des gènes testés par l'IAA à l'exception de *GHL17*. À l'inverse, l'utilisation de l'auxine lipophile NAA permet de restaurer l'inductibilité de

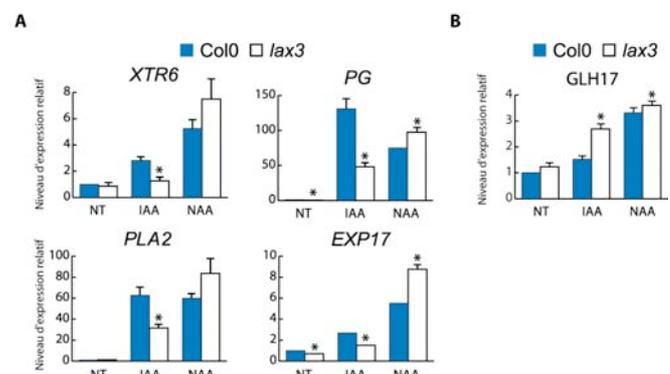


Figure 45. Gènes de remodelage de la paroi induits par l'auxine de façon dépendante d'*AtLAX3*

Expression d'*AtXTR6*, *AtPG*, *AtPLA2*, *AtEXP17* et *AtGLH17* déterminées par RT-PCR quantitative chez le sauvage Col0 ou chez le mutant *lax3* sans traitement (NT), après traitement avec 1 μ M d'IAA ou 1 μ M de NAA. Certains gènes sont induits par l'auxine de façon dépendante d'*AtLAX3* (A) alors que ce n'est pas le cas d'*AtGLH17* (B). Les données statistiquement différentes du contrôle sauvage (test de Student $P < 0,05$) sont indiquées par un astérisque.

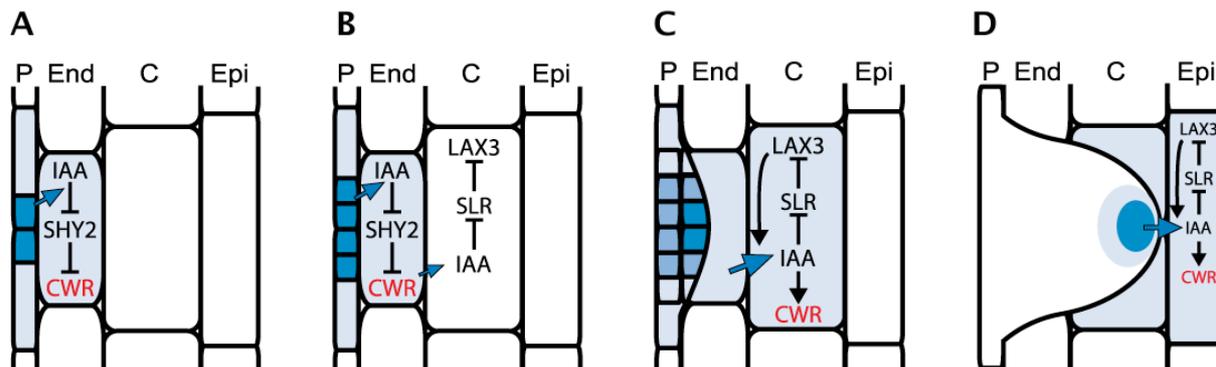


Figure 46. Modèle du rôle d'*AtLAX3* au cours de l'émergence

L'auxine qui proviendrait des cellules du primordium induit l'expression d'un jeu de gènes de remodelage de la paroi (CWR) dans l'endoderme en levant l'inhibition exercée par *SHY2/IAA3* (A). Une faible quantité d'auxine parvient jusqu'aux cellules du cortex par diffusion et induit l'expression d'*AtLAX3* en levant l'inhibition exercée par *SLR/IAA14* (B). *AtLAX3* permet l'entrée de plus d'auxine dans la cellule ce qui initie une boucle de rétrocontrôle positif et permet l'induction d'un jeu de gènes de remodelage de la paroi (C). La progression du primordium est facilitée par le remodelage de la paroi et la production d'enzymes de remodelage de la paroi dans l'épiderme est permise par une nouvelle amplification du signal auxinique (D). Couleur bleue : niveau d'expression du marqueur *DR5:GUS*, P : péricycle, End : endoderme, C : cortex, Epi : épiderme.

ces gènes de remodelage de la paroi. Afin de confirmer ces résultats, des constructions promoteur:*GUS* ont été réalisées pour ces gènes (à l'exception de *GLH17*). Pour les quatre gènes (*XTR6*, *PG*, *PLA2* et *EXP17*), une séquence de 1000 pb située en amont de l'ATG a été amplifiée par PCR et clonée dans le vecteur pBI101.3 en amont du gène rapporteur *GUS*. La transformation génétique de plantes sauvages (Col0) et mutantes (*lax3*) d'*A. thaliana* est en cours. L'objectif est de vérifier que ces gènes sont bien exprimés dans les mêmes tissus que *LAX3* au cours de l'émergence de la racine latérale et de confirmer que ce profil d'expression est dépendant de *LAX3*.

3) Modèle d'action d'*AtLAX3* dans l'émergence de la racine latérale

La libération d'auxine par le primordium racinaire permet l'induction d'*AtLAX3* dans le cortex juste en face du primordium (Figure 46). L'expression de *LAX3* dans ce tissu permet la production d'un certain nombre de gènes de remodelage de la paroi. La simple diffusion de l'auxine à partir du primordium entraînerait un gradient d'expression des gènes de remodelage de la paroi à partir de la zone de production d'auxine (apex du primordium). Or ce n'est pas ce que l'on observe car seules les cellules directement en contact avec le primordium expriment ces gènes. Au contraire, l'induction de *LAX3* par l'auxine

provoque la mise en place d'une boucle de rétrocontrôle positif car la production de plus de transporteurs en réponse à l'auxine augmente l'influx d'auxine dans la cellule. Cela explique la réponse de type « tout ou rien » observée dans les cellules corticales et épidermiques adjacentes du primordium qui expriment *AtLAX3* et les gènes de remodelage de la paroi (Figure 41i et 44A). Cette boucle d'amplification permet de créer localement un puits d'auxine dans les quelques cellules qui se situent à proximité immédiate du primordium et de ce fait limite la diffusion de l'auxine dans les cellules adjacentes. Un certain nombre de gènes facilitant le remodelage de la paroi sont induits et permettent le passage du primordium à travers les cellules du cortex puis de l'épiderme (Figure 46). La séparation des cellules est facilitée par la production d'enzymes telles que les pectate lyases (Marín-Rodríguez *et al*, 2002) et les polygalacturonases (Wen *et al*, 2006). Ces enzymes sont particulièrement importantes au cours de l'émergence car les cellules qui entourent le primordium sont riches en pectines non-méthylées (Laskowski *et al*, 2006) qui sont le substrat des pectate lyases et des polygalacturonases.

Le mécanisme présenté ici permet donc à la fois d'amplifier le faible signal auxinique provenant du primordium et de le restreindre aux cellules qui sont directement en contact avec celui-ci. En effet, une large diffusion de l'auxine

provoquerait le remodelage de la paroi dans une zone plus large autour du primordium et pourrait par exemple faciliter l'infection par des bactéries pathogènes. Cela expliquerait également pourquoi l'expression de *LAX3* dans l'épiderme est moins facilement induite par l'auxine que dans le cortex.

III. Influx d'auxine et remodelage de la paroi au cours de l'infection par *Frankia*

Les résultats obtenus sur le rôle d'*AtLAX3* chez *Arabidopsis* suggèrent que *CgAUX1* pourrait être impliqué dans l'amplification du signal symbiotique actinorhizien et la restriction de ce signal dans les cellules infectées. De plus, cette amplification pourrait permettre l'expression de gènes de remodelage de la paroi. En effet, le processus d'infection par *Frankia* au cours de la symbiose actinorhizienne est associé au remodelage de la paroi pour la création du cordon d'infection (Berg, 1999a ; Berry *et al*, 1986) et des ponts cytoplasmiques (Berg, 1999b). De la même manière, le remodelage de la paroi est impliqué dans la mise en place de la symbiose *Rhizobium*-Légumineuses (Brewin, 2004). La production des facteurs Nod par la bactérie provoque la courbure du poil racinaire qui nécessite une modification de la croissance de la paroi et le cordon d'infection est une structure tubulaire formée de matériel pariétal qui pénètre dans la cellule (Brewin, 2004). Néanmoins, les mécanismes moléculaires associés à ces modifications sont inconnus chez les plantes actinorhiziennes. Chez les Légumineuses, de nombreuses nodulines précoces sont des glycoprotéines riches en hydroxyproline (HRGP) dont le rôle dans la modification de la paroi est suspecté (Cassab, 1998). Mais dans ce cas, le transport d'influx d'auxine ne semble pas être impliqué dans l'expression de ces gènes car le transport d'influx d'auxine n'est pas associé avec l'infection par *Rhizobium* (de Billy *et al*, 2001).

Nous avons donc cherché à identifier des cibles potentielles de la signalisation auxinique au cours de l'infection de la cellule végétale par *Frankia* par homologie avec les gènes cibles de la signalisation dépendante d'*AtLAX3*. Un gène nommé *Cg12* et codant une protéase de type subtilisine appartenant à la même famille qu'*AtAIR3* est exprimé de manière spécifique dans les cellules infectées par *Frankia* au cours de la symbiose actinorhizienne chez *C. glauca* (Svistonoff *et al*, 2003 ; Svistonoff, 2003). Selon notre modèle, il serait donc possible que *Cg12* soit induit par l'auxine qui entre dans la cellule grâce au transporteur *CgAUX1*. Afin d'élargir cette analyse, nous avons également identifié d'autres gènes de remodelage de la paroi dans nos banques EST et nous avons déterminé par RT-PCR quantitative i) s'ils étaient induits par l'auxine et ii) s'ils étaient associés au processus d'infection.

1) Régulation de *Cg12* par un signal auxinique

Nous avons déterminé si l'auxine induit l'expression du gène *Cg12* en utilisant la RT-PCR quantitative. Aucune induction du gène n'a pu être observée après un traitement de 24 heures avec 1 μ M ou 10 μ M d'IAA, NAA ou PAA (données non montrées). Ces résultats confirment des études précédentes de l'expression conférée par la construction *Pro_{Cg12}:GUS* chez *C. glauca* (Svistonoff, 2003). L'auxine seule n'est donc pas responsable du profil d'expression de *Cg12* au cours de l'infection.

Afin de déterminer si une diminution de l'entrée d'auxine dans la cellule a un effet sur l'expression de *Cg12*, des plants de *C. glauca* ont été inoculés par la bactérie *Frankia* en présence de 50 μ M de l'inhibiteur de transport d'influx 1-NOA. Nous avons ensuite déterminé le niveau d'expression de *Cg12* dans les nodules matures âgés de 24 jours chez les plantes traitées avec du 1-NOA par comparaison aux nodules du même âge chez des plantes non traitées. Les résultats montrent que l'expression de *Cg12* est largement diminuée par le traitement au

1-NOA (Figure 47). De manière surprenante, l'expression de *CgAUX1* et de l'hémoglobine (*CgHb*), marqueur de différenciation des cellules fixant l'azote, n'est pas affectée par le traitement au 1-NOA. Ces résultats semblent indiquer que l'expression de *Cg12* est bien dépendante de l'auxine mais que l'auxine seule n'est pas suffisante pour induire l'expression de *Cg12*.

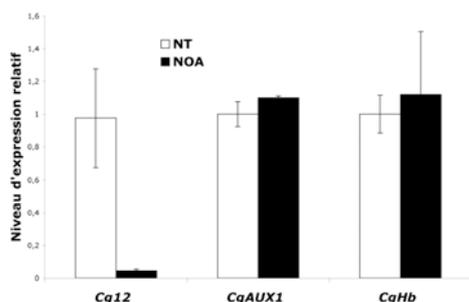


Figure 47. Effet du NOA sur l'expression de *Cg12*, *CgAUX1* et *CgHb*

Le niveau d'expression de *Cg12*, *CgAUX1* et *CgHb* a été déterminé par RT-PCR quantitative dans des nodules prélevés 24 jours après inoculation en présence ou en l'absence de 50 μ M de NOA. Les niveaux d'expression ont été normalisés par le gène de l'ubiquitine (*CgUBI*).

2) Autres gènes de remodelage de la paroi chez *Casuarina glauca*

Trois gènes de remodelage de la paroi ont été identifiés dans les banques EST de *Casuarina glauca* (Hoher et al, 2006).

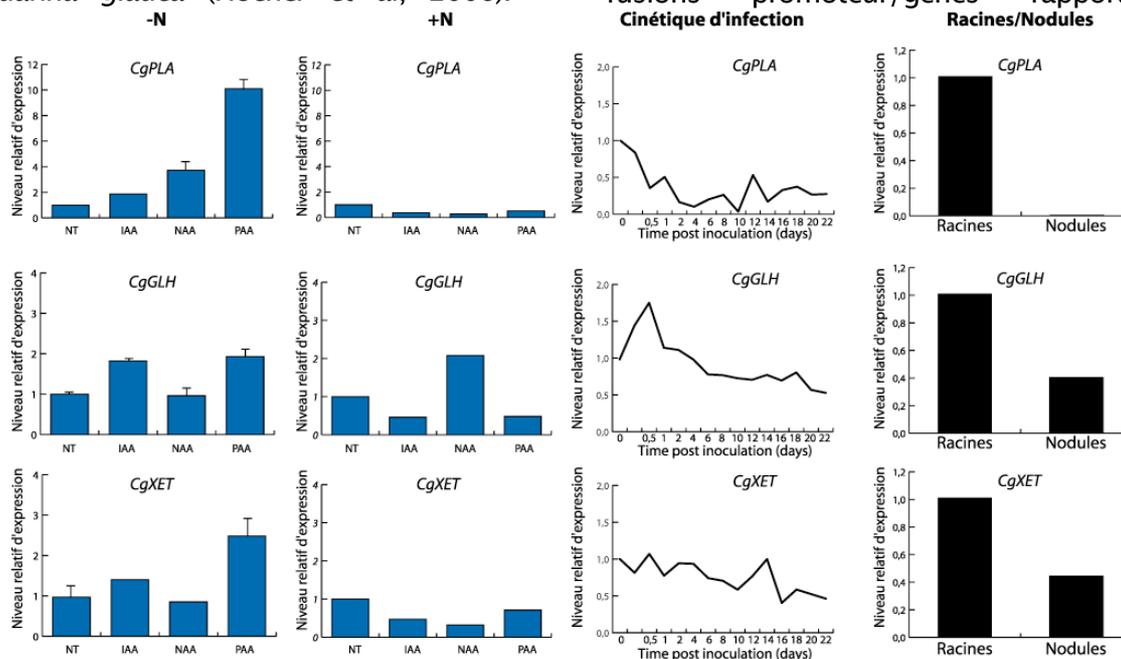


Figure 48. Induction par l'auxine et expression en réponse à l'infection des gènes de remodelage de la paroi

Le niveau d'expression de *CgPLA*, *CgGLH* et *CgXET* a été déterminé par RT-PCR quantitative en réponse à l'induction par l'auxine (NT, 10 μ M IAA, 10 μ M NAA et 10 μ M PAA) en présence (+N) ou en l'absence d'azote (-N), au cours d'une cinétique d'infection par *Frankia* et dans les nodules en comparaison avec les racines. Les niveaux d'expression ont été normalisés par le gène de l'ubiquitine (*CgUBI*).

Deux d'entre eux sont issus de la banque de racine : une pectate lyase (*CgPLA* - fragment de 365 pdb) et une glycosyl hydrolase (*CgGLH* - fragment de 435 pdb). Un seul gène a été identifié dans la banque de nodules : une xyloglucane endo-transglycosylase (*CgXET* - fragment de 554 pdb). Des amorces pour la RT-PCR quantitative ont été dessinées à partir de ces séquences.

Les plants de *C. glauca* ont été mis en contact avec différents types d'auxine : IAA, NAA et PAA (10 μ M) pendant 24 heures après sevrage en azote d'une semaine ou sans sevrage. Les analyses par RT-PCR quantitative montrent que les trois gènes *CgPLA*, *CgGLH* et *CgXET* sont inductibles par l'auxine de façon dépendante de la nutrition azotée (Figure 48). L'expression de ces gènes a ensuite été analysée au cours d'une cinétique d'infection par *Frankia* et a été comparée entre racines non-infectées et nodules. Au cours de la cinétique, l'expression de ces trois gènes est globalement diminuée (Figure 48). De la même manière, ces gènes sont sous-exprimés dans les nodules par rapport aux racines. Les résultats obtenus suggèrent qu'aucun de ces gènes n'est impliqué dans la symbiose actinorhizienne même si l'utilisation de fusions promoteur/gènes rapporteur

permettrait de confirmer cette approche.

Seuls trois gènes impliqués dans le remodelage de la paroi ont été identifiés dans les banques EST. À l'heure actuelle, ces banques contiennent environ 1 000 séquences de gènes exprimés dans les nodules et autant dans les racines, ainsi qu'environ 400 correspondant à une banque soustractive entre des ADNc issus de racines non infectées et des racines sept jours après infection. Le séquençage de 10 000 EST supplémentaires exprimés dans les nodules et autant dans les racines ainsi que 2 000 EST de banques soustractives (correspondant à deux et quatre jours après infection) devrait permettre d'identifier de nombreux nouveaux candidats.

IV. Discussion

L'analyse du rôle d'*AtLAX3* au cours de l'émergence a permis d'identifier des cibles de la signalisation auxinique liée à l'influx d'auxine au cours de l'émergence. L'infection de la cellule végétale par *Frankia* entraîne un remodelage de la paroi nécessaire pour la mise en place du cordon d'infection (Berg, 1999a ; Berry et al, 1986) et des ponts cytoplasmiques (Berg, 1999b). Or nos résultats montrent que l'influx d'auxine est étroitement lié à l'infection. Sur la base du modèle proposé pour l'émergence de la racine latérale, nous avons donc émis l'hypothèse que l'influx d'auxine, probablement d'origine bactérienne, permet l'expression de gènes de remodelage de la paroi au cours de l'infection par un mécanisme d'amplification du signal symbiotique.

1) Amplification du signal auxinique par l'influx d'auxine

Sur la base des résultats obtenus, nous proposons un modèle de l'action du transport d'influx d'auxine au cours de l'infection par *Frankia* (Figure 49). Il est couramment admis qu'un signal symbiotique de nature inconnue est produit par *Frankia* (Pawlowski et Sirrenberg, 2003). Ce signal permet d'initier les premières étapes de l'infection et probablement d'induire l'expression de *CgAUX1*. Le transporteur *CgAUX1*, en

favorisant l'influx d'auxine bactérienne, améliore le processus d'infection et met en place une boucle de rétrocontrôle positif. Ce mécanisme permettrait au signal auxinique d'atteindre un niveau suffisant pour induire les gènes cibles, dont le gène *Cg12* impliqué dans le remodelage de la paroi. Par homologie avec l'émergence de la racine latérale, il est probable qu'une amplification du signal symbiotique dans la cellule infectée permet d'obtenir une réponse de type « tout ou rien » uniquement dans ces cellules. En effet, dans un tel système, le niveau d'auxine suffisant pour entraîner une réponse n'est atteint que dans les cellules qui expriment le transporteur d'influx *CgAUX1*.

Si notre modèle est correct, l'expression des gènes de remodelage de la paroi nécessite à la fois un signal symbiotique et un apport d'auxine au-delà d'un certain seuil (Figure 49). En effet, même si l'auxine seule ne peut induire l'expression de *Cg12*, l'inhibition du transport d'influx d'auxine par le 1-NOA a pour conséquence de réduire son niveau d'expression d'un facteur 20 environ sans affecter l'expression de *CgAUX1*. Cela montre que l'induction de *Cg12* au cours de l'infection est bien, du moins en partie, dépendante de l'auxine. L'amplification du signal spécifique par l'entrée d'auxine dans la cellule correspond donc à une augmentation de l'expression de *Cg12*

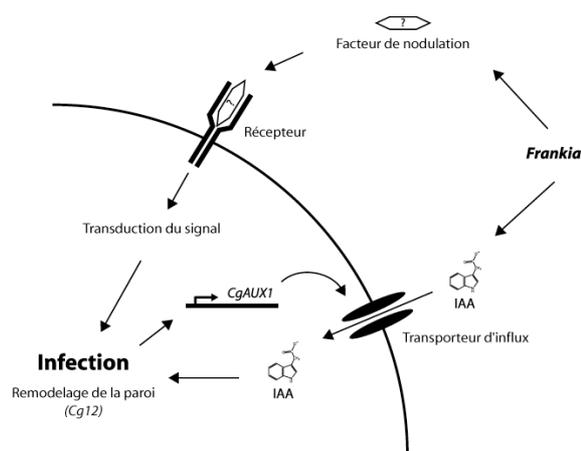


Figure 49. Modèle du rôle de *CgAUX1* au cours de l'infection par *Frankia*

La perception d'un facteur de nodulation par *Frankia* permet d'initier l'infection et d'induire le gène *CgAUX1*. La production du transporteur d'influx d'auxine permet l'entrée d'auxine (d'origine bactérienne?) qui amplifie le signal symbiotique et permet d'augmenter l'expression de gènes de remodelage de la paroi comme *Cg12*.

d'un facteur 20. La valeur réelle pourrait s'avérer encore plus élevée que cette valeur théorique car l'utilisation de 1-NOA ne permet probablement pas d'inhiber totalement le transport d'influx. La technique d'ARN interférent permettrait de déterminer la diminution d'expression de *Cg12* en l'absence totale de transport d'influx et donc de quantifier l'amplification liée à l'entrée d'auxine.

inoculation) devrait permettre d'identifier de nouveaux candidats. Parmi ceux-ci, les gènes qui ne sont pas induits par l'auxine seule mais sont exprimés en réponse à l'infection et dont l'expression est réduite en réponse au traitement par le 1-NOA pourront être identifiés par RT-PCR. Le clonage des séquences promotrices de ces gènes et l'analyse de leur profil d'expression par fusion promoteur:*GUS* permettra de déterminer si ces gènes sont bien liés à l'infection de la cellule végétale par *Frankia*. L'insertion de ces constructions dans les plantes où l'expression de *CgAUX1* a été éteinte par ARN interférent permettra de déterminer si ce profil d'expression est lié à l'action de *CgAUX1*. Sur la base des résultats obtenus chez *A. thaliana*, il est probable que le remodelage de la paroi au cours de l'infection implique également plusieurs gènes.

2) Nature du signal symbiotique

Le mécanisme d'amplification serait d'autant plus efficace si le signal symbiotique était un composé indolique car il jouerait alors à la fois le rôle d'amplificateur et de signal spécifique. En effet, il n'est pas improbable que *CgAUX1* puisse prendre en charge des composés ayant une structure proche de l'auxine IAA. Dans ce cas, la présence de motifs sur un noyau indolique pourrait conférer à ces molécules une capacité à se lier avec un récepteur spécifique. Bien que purement spéculatif, ce modèle est toutefois envisageable car la nature chimique des signaux symbiotiques actinorhiziens et

Par ailleurs, l'identification d'autres gènes de remodelage de la paroi présentant un profil d'expression identique à celui de *Cg12* s'avère indispensable pour confirmer ces observations. Le séquençage en cours de nombreuses EST issues de nodules et racines (deux jours et quatre jours après

des facteurs Nod est différente (Cérémonie *et al*, 1999). Les tentatives d'induction des gènes *Cg12* et *CgAUX1* avec du surnageant de *Frankia* n'ont donné aucun résultat. Néanmoins, toutes ces expériences ont été réalisées avec du surnageant de bactéries qui n'avaient pas été mises en contact avec la plante hôte. Il a été montré que le facteur de déformation des poils absorbants de l'aulne est produit avec ou sans induction de la bactérie par des exsudats racinaires (van Ghelue *et al*, 1997). Néanmoins, il est probable que le facteur de déformation des poils racinaires ne soit pas le signal symbiotique car la déformation du poil est un processus moins spécifique chez les plantes actinorhiziennes que chez les Légumineuses. Les facteurs Nod de *Rhizobium* ne sont pas produits de manière constitutive mais en réponse aux flavonoïdes excrétés par la plante (Mulder *et al*, 2005). Si le mode de dialogue est identique au cours des symbioses actinorhiziennes alors il est nécessaire d'activer les bactéries en les mettant au contact de la plante pour qu'elles produisent le facteur symbiotique. Ces expériences d'activation associées à des tentatives de concentration du surnageant de *Frankia* par lyophilisation sont en cours dans notre laboratoire. L'obtention de surnageant activé et concentré permettra de répéter les tests d'induction des gènes *Cg12* et *CgAUX1*. Dans le cas où ces tests s'avéreraient positifs, ils ouvriraient la voie à l'identification du signal symbiotique en utilisant ces gènes comme marqueurs.

CONCLUSION GÉNÉRALE – PERSPECTIVES

Nous avons étudié le rôle du transport de l'auxine au cours de la mise en place de la symbiose actinorhizienne chez *Casuarina glauca*. Deux homologues des gènes *AUX-LAX* impliqués dans le transport d'influx d'auxine ont été identifiés. L'analyse des séquences a montré une forte homologie de ces gènes avec *AtAUX1* et *AtLAX3* ce qui a permis de les nommer *CgAUX1* et *CgLAX3*. Les profils d'expression de ces gènes sont également très conservés chez *Arabidopsis thaliana* et *C. glauca*. La similarité entre *CgAUX1* et *AtAUX1* a été confirmée par la capacité de *CgAUX1* à compléter le mutant *aux1*. L'analyse des profils d'expression a révélé une association étroite entre l'expression de *CgAUX1* et l'infection par *Frankia* ainsi qu'une différence d'expression de *CgAUX1* entre le primordium de racine et de nodule. Afin d'identifier les gènes induits en aval du transport d'influx d'auxine, nous avons participé à l'identification de ces cibles chez *A. thaliana* en analysant le mutant *lax3*. Ces études ont révélé que le remodelage de la paroi au cours de l'émergence était induit par un signal auxinique sous dépendance du gène *AtLAX3*. Par homologie, nous avons choisi comme candidat le gène *Cg12* potentiellement impliqué dans le remodelage de la paroi et exprimé au cours de l'infection par la bactérie *Frankia*. L'expression de ce gène dans les cellules infectées semble dépendre en partie d'un signal auxinique.

I. Le signal auxinique permet l'infection de la cellule végétale par des micro-organismes

Nos résultats ont mis en évidence un lien entre le transport d'influx d'auxine et l'infection par la bactérie *Frankia*. Ces

résultats suggèrent un rôle important de l'auxine dans la mise en place d'un programme symbiotique par la plante. Chez la plante actinorhizienne *Elaeagnus umbellata*, une protéine de type ARP est surexprimée dans les nodules, en particulier au niveau de la zone de fixation de l'azote (Kim *et al*, 2007). L'expression de ce gène est induite par l'auxine ce qui confirme la présence d'une signalisation auxinique dans ces cellules. En effet, un mutant de *Bradyrhizobium japonicum* surproducteur d'auxine présente une efficacité de nodulation plus élevée chez les Légumineuses (Kaneshiro et Kwolek, 1985). Afin de confirmer cette hypothèse, il serait intéressant de déterminer si l'inhibition de la signalisation auxinique par surexpression d'une version dominante négative d'une protéine *Aux/IAA* (par exemple *shy2/iaa3* ; Tian *et al*, 2002) perturbe l'infection.

L'auxine joue aussi un rôle important dans la mise en place des symbioses mycorhiziennes (Barker et Tagu, 2000). En effet, chez le maïs, les racines endomycorhizées présentent des teneurs importantes en auxine (Jentschel *et al*, 2006). De plus, un mutant surproducteur d'auxine d'*Hebeloma cylindrosporum* forme trois à cinq fois plus d'ectomycorhizes chez *Pinus pinaster* que le sauvage (Gay *et al*, 1994). Néanmoins, le rôle du transport d'influx d'auxine n'a jamais été étudié au cours de ces symbioses. La protéine *CgAUX1* pourrait être impliquée dans la prise en charge de l'auxine fongique au cours de l'infection. La plante tropicale *C. glauca* est capable d'interagir avec différents champignons pour aboutir aux deux types de symbioses (Figure 50 ; Duponnois *et al*, 2003) ce qui permet une adaptation importante aux différents type de sols. Des analyses sont en cours dans notre laboratoire pour déterminer le profil d'expression de *CgAUX1* au cours de l'infection de *C.*

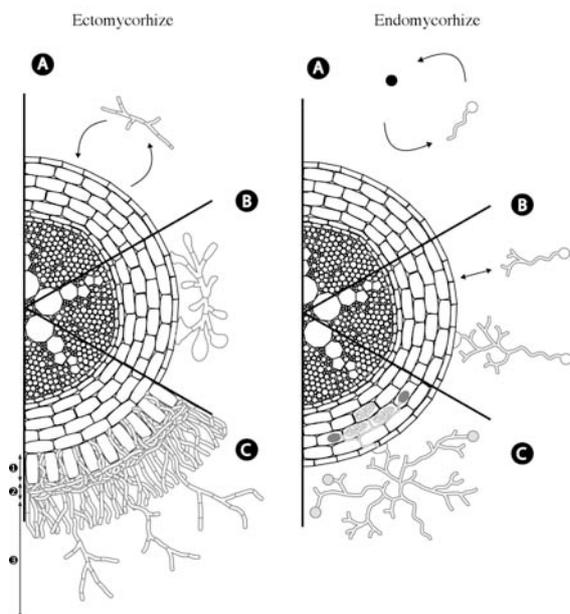


Figure 50. Processus de mise en place des symbioses mycorhiziennes

Ectomycorhize. L'interaction débute par un échange de signaux entre les deux partenaires (A). Les hyphes s'accrochent à la surface racinaire et commencent à se ramifier et à se renfler (B). L'ectomycorhize mature (C) présente trois structures typiques : le réseau de Hartig où ont lieu les échanges de nutriments (1), un manteau dense qui couvre la racine (2) et un mycélium extraradical qui explore le sol (3).

Endomycorhize. Stade asymbiotique : la germination de la spore est suivie d'une croissance limitée de l'hyphes (A). Stade présymbiotique : des signaux racinaires induisent la croissance et la ramification de l'hyphes (B). Stade symbiotique : colonisation intercellulaire et formation de vésicules et arbuscules intracellulaires (C).

La plante actinorhizienne *Casuarina glauca* peut réaliser ces deux types de symbioses en interagissant avec différents champignons du sol.

glauca par *Pisolithus alba* (ectomycorhizes) et *Glomus intraradices* (endomycorhizes). De plus, l'extinction de l'expression de *CgAUX1* par la technique d'ARN interférent permettra de préciser le rôle du transport d'influx d'auxine dans les symbioses mycorhiziennes.

De façon plus générale, l'auxine est impliquée dans les mécanismes d'infection par les bactéries pathogènes. En effet, de nombreuses bactéries du sol produisent des auxines (Lambrecht *et al*, 2000). Parmi elles, certaines bactéries phytopathogènes utilisent cette auxine pour produire des tumeurs comme *Pseudomonas savastanoi* ou *Erwinia herbicola* (Hutcheson et Kosuge, 1985 ; Manulis *et al*, 1998) ou au cours de l'infection des tissus végétaux sans que le rôle précis de l'auxine ne soit connu.

Récemment, des études ont montré que l'activation de la signalisation auxinique augmente la susceptibilité d'*A. thaliana* à l'infection par *P. syringae* (Navarro *et al*, 2006). Les mécanismes de résistance de la plante passent par une diminution de la réponse auxinique. La perception d'un peptide bactérien dérivé de la flagelline de *P. syringae* induit un micro-ARN qui réprime l'expression des récepteurs à l'auxine *TIR1*, *AFB2* et *AFB3* et permet de limiter l'infection par la bactérie. Il semble donc que l'absence de perception auxinique constitue un verrou permettant à la cellule de bloquer l'infection. Un facteur de transcription de type bZIP nommé *BZI-1* est impliqué dans la réponse à l'auxine et se lie spécifiquement sur des éléments ACGT situés dans le promoteur du gène *GH3* induit par l'auxine (Heinekamp *et al*, 2004). Lors de l'infection par *P. syringae*, l'expression de *BZI-1* est augmentée ce qui suggère que l'activation de la signalisation auxinique ouvre la voie à l'infection (Heinekamp *et al*, 2002).

L'activation de la cellule par l'auxine semble être un prérequis pour permettre l'infection que ce soit dans le cadre d'une symbiose ou d'une infection pathogène. Cependant, l'auxine ne peut pas être considérée comme un signal spécifique. En effet, cette hormone intervient dans la plupart des mécanismes développementaux chez les plantes. Il semblerait plutôt que l'auxine constitue un signal d'activation des cellules végétales. La spécificité de l'activation est déterminée par le type cellulaire, par exemple l'apport d'auxine à une cellule du péricycle située en face d'un pôle de xylème aboutit à l'initiation du primordium. Nous avons vu que dans les cellules du cortex et de l'épiderme, cette activation aboutit au remodelage de la paroi pour permettre l'émergence. Ce mécanisme d'émergence est probablement détourné par les bactéries phytopathogènes du sol afin de forcer leur passage entre ces cellules. C'est certainement la raison pour laquelle l'induction d'*AtLAX3* et des gènes de remodelage de la paroi dans l'épiderme nécessite un signal plus fort que dans le

cortex. En effet, l'épiderme constitue la première barrière face aux agressions de la rhizosphère.

L'évolution des interactions pathogènes vers des interactions de type symbiotique a pu conserver ce mécanisme d'infection. Un moyen pour la plante de limiter la progression de la bactérie symbiotique pourrait être de réguler sa sensibilité à l'auxine comme dans le cas des interactions phytopathogènes. La nécessité d'un signal symbiotique spécifique d'une espèce est apparue au cours de l'évolution pour éviter aux bactéries non-symbiotiques de profiter de la situation. La présence d'un signal symbiotique permet donc probablement à la cellule de l'épiderme ou du cortex de s'engager vers un programme symbiotique en réponse à l'activation auxinique. En l'absence de ce signal spécifique, l'activation par l'auxine engendrerait une réponse non-symbiotique telle que celle observée lors de l'émergence de la racine latérale. Il est intéressant de constater que la bactérie *Frankia* n'infecte que les cellules de l'épiderme puis du cortex (que ce soit de la racine ou plus tard du nodule) or ce sont ces cellules qui chez *Arabidopsis* (et donc probablement chez *C. glauca* si le mécanisme d'émergence est conservé) expriment des gènes de remodelage de la paroi en réponse à une activation auxinique. Ce mécanisme pourrait expliquer pourquoi l'infection des cellules du péricycle n'est jamais observée, car ces cellules ne sont pas programmées pour exprimer des gènes de remodelage de la paroi en réponse à l'auxine. Une autre hypothèse est que le signal symbiotique est perçu également dans ces cellules mais bloque toute possibilité de réponse auxinique afin d'arrêter la progression de la bactérie vers les tissus vasculaires.

II. Le nodule actinorhizien : une racine latérale modifiée ?

Le nodule actinorhizien est considéré comme une racine latérale modifiée (Pawlowski et Bisseling, 1996). En effet, le primordium nodulaire est formé par

division des cellules du péricycle situées en face du pôle de xylème et le nodule mature présente un méristème apical et un système vasculaire central. Néanmoins, nos résultats suggèrent qu'il existe des différences entre ces deux organes. En effet, le gène *CgAUX1* est exprimé dans le primordium de racine latérale mais est exclu du primordium nodulaire. Chez les Légumineuses, il existe certaines ressemblances entre le nodule et la racine latérale. En effet, les gènes *AUX/LAX* présentent des profils d'expression similaires au cours de la formation de ces deux organes (de Billy *et al*, 2001). Néanmoins, les cytokinines jouent un rôle opposé dans la formation de ces deux organes : inhibition de la formation des racines latérales et activation de la formation des nodules (Lohar *et al*, 2004 ; Eckardt, 2006 ; Gonzalez-Rizzo *et al*, 2006). De plus, les nodules de Légumineuses qu'ils soient de type déterminé ou indéterminé présentent un système vasculaire périphérique qui les apparente d'avantage aux tiges qu'aux racines. Il est donc possible que différents programmes de développement aient été recrutés au cours de l'évolution pour la mise en place des symbioses actinorhiziennes et *Rhizobium*-Légumineuses. Dans les deux cas, l'évolution de la symbiose s'est probablement accompagnée d'une dérive du programme génétique initial. Cela explique pourquoi des différences existent entre nodule actinorhizien et racine latérale.

Le recrutement d'un programme génétique de racine peut également permettre la formation d'un nouvel organe non-symbiotique. Les racines protéoïdes sont des touffes de racines latérales modifiées présentant une croissance limitée. Elles sont caractéristiques des plantes de la famille des Protéacées même si elles existent chez d'autres espèces (Neumann et Martinoia, 2002). Elles permettent de mobiliser activement les nutriments du sol comme le fer, le phosphate, le zinc et le manganèse en provoquant des changements dans la rhizosphère (pH, production d'exsudats et potentiel redox). La capacité à former ces

racines protéoïdes n'est cependant pas limitée aux Protéacées, en effet dans le clade des Rosids cette propriété est retrouvée chez les Fagales (Betulacées, Casuarinacées et Myricacées), chez les Rosales (Elaeagnacées et Moracées) et chez les Fabales (Fabacées). La plante tropicale *C. glauca* est capable de former ces structures en cas de carence en fer et en phosphate. De façon surprenante, les plantes actinorhiziennes ont toutes la capacité de former ces racines protéoïdes (Lambers *et al*, 2006). Il semble donc exister un lien évolutif entre la capacité de former ces racines et l'association avec la bactérie *Frankia*. Cependant, aucune base moléculaire de cette association n'a été

CgAUX1 par ARN interférent permettra également de préciser l'implication de ce

identifiée à ce jour. Il se pourrait que la capacité à « dupliquer » le programme développemental de racine latérale ait été un prérequis pour la mise en place du nodule actinorhizien et des racines protéoïdes au cours de l'évolution.

Il serait intéressant de déterminer si le transport d'influx d'auxine est impliqué dans la production des racines protéoïdes notamment en analysant le profil d'expression de *CgAUX1* dans leurs primordia. En effet, la présence ou l'absence d'expression de *CgAUX1* dans ces structures permettra de déterminer si leur programme de développement se rapproche ou non de celui de la racine latérale. L'extinction de l'expression de gène dans la mise en place de la racine protéoïde.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. Matériel

1) Matériel végétal

Les graines de *Casuarina glauca* proviennent des Etats-Unis (Réf. 06003, Société Carter Seeds, Californie, USA). Les graines d'*Allocasuarina verticillata* sont d'origine australienne (Société Versepuy, Le Puy-en-Velay, France).

Les graines d'*Arabidopsis thaliana* écotype Columbia-0 (Col0), écotype Landsberg erecta (*Le^r*) et mutants (*aux1-22*, *lax3*, *aux1lax3* et *shy2-2*) ont été fournies par le NASC (*Nottingham Arabidopsis Stock Center*).

2) Matériel bactérien

La souche de *Frankia* utilisée pour inoculer *C. glauca* et *A. verticillata* est la souche Ccl3 qui est maintenue au laboratoire.

Les souches d'*Escherichia coli* utilisées sont soit JM109 (Promega) dont le génotype est : e14⁻(McrA⁻) recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 (r_K⁻ m_K⁺) supE44 relA1 Δ(lac-proAB) [F' traD36 proAB lacI^qZΔM15], soit XL1-blue dont le génotype est recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^r)].

Les souches d'*Agrobacterium tumefaciens* utilisées sont de génotype C58C1. Elles portent le plasmide désarmé pGV3101 pour la transformation génétique d'*A. thaliana* ou pGV2260 pour la transformation génétique de *C. glauca* et *A. verticillata*. Elles sont résistantes à la rifampicine (10 mg.L⁻¹).

3) Matériel nucléique

a) Plasmides

Les stratégies de clonage utilisées pour les constructions principales sont données dans les figures 51 et 52.

Le plasmide binaire utilisé pour réaliser les fusions promoteur-GUS est pBI101.3 (Clontech).

Le plasmide binaire utilisé pour réaliser les fusions promoteur-GFP est pBI101.mGFP5ER dérivé du pBI101.3 (Svistonoff *et al*, 2003).

Le plasmide binaire utilisé pour réaliser les constructions pour la complémentation fonctionnelle de mutants d'*A. thaliana* est pMOG402 ou son dérivé pMOG AUX1 ORFL contenant le promoteur (1,6kb) et le terminateur (0,3 kb) d'*AtAUX1*.

Ces trois vecteurs binaires portent un gène de résistance à la kanamycine (50 mg.L⁻¹) à expression procaryotique et un gène de résistance à la kanamycine (*NptII*) sous dépendance du promoteur viral 35S à expression eucaryotique.

Les clonages en routine de produit PCR sont réalisés à l'aide de pGEM-T easy (Promega) qui confère la résistance à l'ampicilline (100 mg.L⁻¹) ou de pCR2.1-TOPO (Invitrogen) qui confère la résistance à l'ampicilline (100 mg.L⁻¹) et à la kanamycine (50 mg.L⁻¹).

b) Amorces pour la PCR

Les séquences des amorces utilisées sont rassemblées dans le tableau I. Les séquences sont données de 5' vers 3'. Les amorces ont été dessinées à l'aide du logiciel Beacon Designer (Premier Biosoft International) et synthétisées par Eurogentec.

II. Méthodes

1) Milieux de culture (plantes)

a) *Casuarina glauca*

Les graines de *C. glauca* sont mises à germer en serres sur un mélange terreau/vermiculite (1/1, v/v). Un mois environ après germination, les plantules sont transférées pour culture

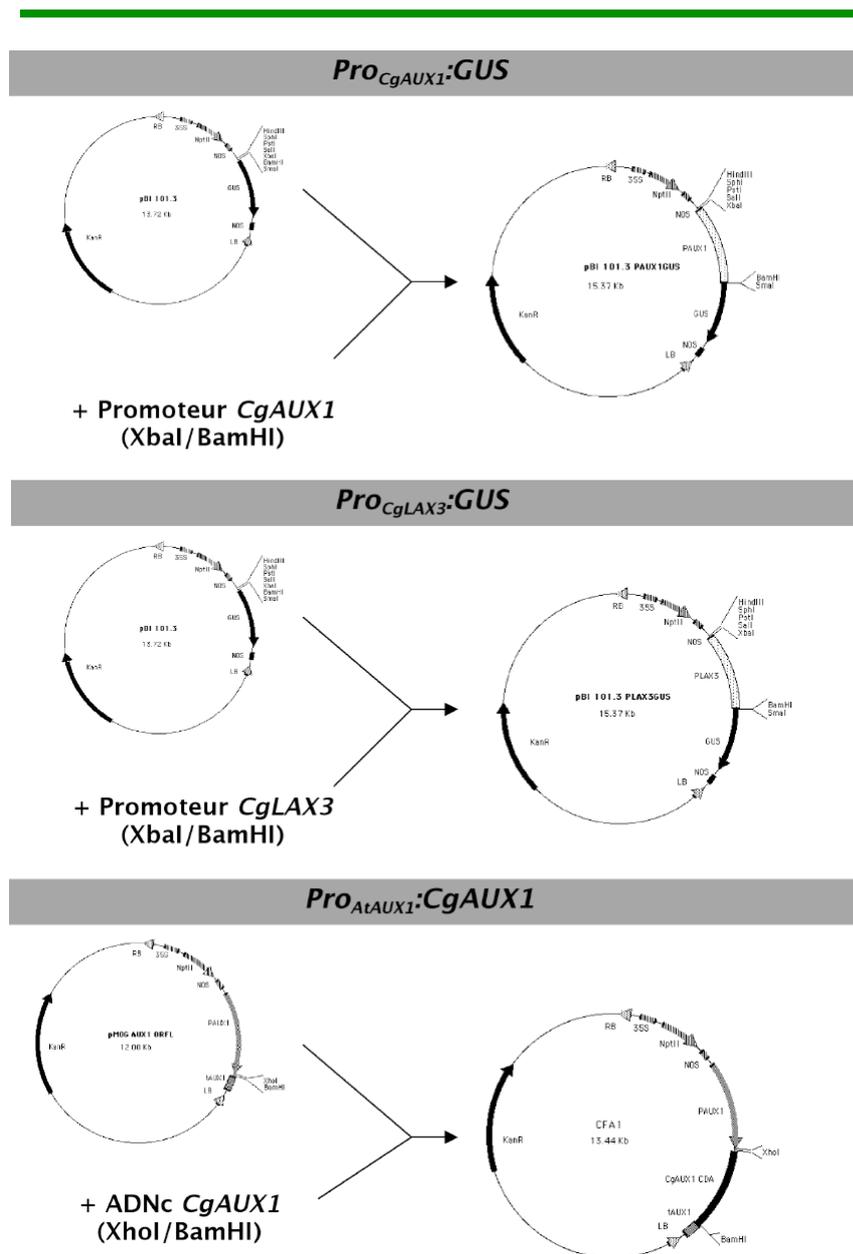


Figure 51. Construction des vecteurs binaires *Pro*_{CgAUX1}:*GUS*, *Pro*_{CgLAX3}:*GUS* et *Pro*_{AtAUX1}:*CgAUX1*

hydroponique sur solution nutritive BD (Broughton et Dilworth, 1971) avec ajout d'azote (KNO_3 5 mM). Trois semaines après transfert, les plantes sont sevrées en azote pendant une semaine puis sont inoculées par *Frankia* toujours sur milieu sans azote.

b) *Arabidopsis thaliana*

Les graines d'*A. thaliana* sont mises à germer en serres ou en salle de culture (60% d'humidité, cycles 16h jour/8h nuit, intensité lumineuse 45 μE) sur mélange terreau/vermiculite (1/1, v/v) éventuellement additionné d'engrais à diffusion lente. Pour la culture stérile, les

graines sont traitées avec du Domestos 20% pendant 10 minutes puis rincées trois fois avec de l'eau stérile. Elles sont déposées sur boîtes horizontales avec milieu 1/2MS (Murashige et Skoog, 1962) additionné des vitamines B5 de Gamborg (Duchefa), plant agar 0,8% (m/v; Kalys) ajusté à pH 5,6 ou bien sur boîtes verticales avec milieu 1/2MS additionné des vitamines B5 de Gamborg, agar HP 1,2% (m/v; Kalys) ajusté à pH 5,6. Les boîtes sont placées à 4°C pendant deux jours pour synchroniser la germination et ensuite transférées en salle de culture (60% d'humidité, cycles 16h jour/8h nuit, intensité lumineuse 45 μE).

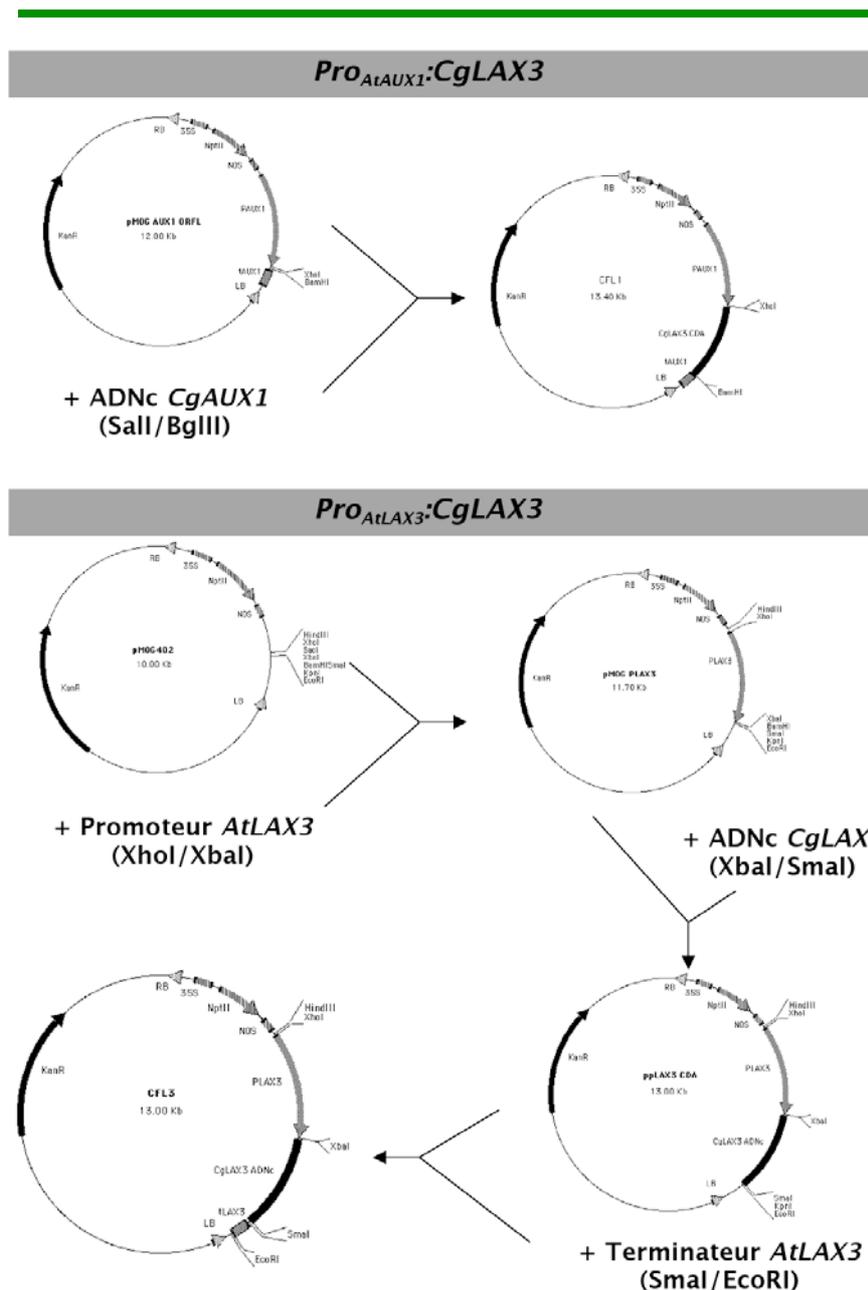


Figure 52. Construction des vecteurs binaires *Pro*_{AtAUX1}:*CgLAX3* et *Pro*_{AtLAX3}:*CgLAX3*

2) Milieux de culture (bactéries)

Les souches d'*E. coli* et d'*A. tumefaciens* sont cultivées sur milieu LB liquide ou solide (agar 1,5% m/v) à 37°C et 28°C respectivement (composition du milieu LB en tableau II). Elles sont conservées à -80°C dans une solution de glycérol 15%.

La bactérie *Frankia* souche Ccl3 est

Bactopeptone	10 g
Extrait de levure	5 g
NaCl	5 g
	Pour un litre.

cultivée sur milieu BAP-PCM à 28°C et à l'obscurité sous agitation (composition du milieu BAP-PCM en tableau III). Au moment du repiquage, les bactéries sont

Tableau III. Composition du milieu BAP-PCM pour la culture de *Frankia*

Macroéléments		Vitamines	
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,05 g	Thiamine	10 mg
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,01 g	Pyridoxine monochloride	50 µg
NH ₄ Cl	0,27 g	Penthoténate de calcium	10 µg
Propionate de Na	0,48 g	Biotine	22,5 µg
FeNaEDTA	0,01 g	Acide nicotinique	50 µg
		Acide folique	10 µg
		Riboflavine	10 µg
Microéléments		Extemporanément	
H ₃ BO ₃	2,86 mg	MES-Tris 0,5M	20mL
MnCl ₂ · 4H ₂ O	1,81 mg	Phosphatidylcholine	15mmol
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,22 mg		
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,48 g		
Na ₂ O ₇ Mo ₂ · 2H ₂ O	0,025 mg		
			Pour un litre.

Amorces dégénérées		Clonage CgLAX3	
AF2	CCACAT6GCRITGCATDATYTC	PLAX3Xhol	CCGCTCGAGCGTTTCTGTGCTTCATG
AF3	TGAC63YAYATHHTYGG6G6TGY	PLAX3Xbal	GCTCTAGACGCCATTITTTCTCTCTT
AD_01	ATYCARCTHATWGCYTYGC	tLAX35mal	TCCCCGGGCCATGATATACAAATTTGC
AD_02	GACAARAGRACWTGGACWTA	tLAX3EcoRI	GGAATTCAGGGTTGGCCTAAGATAGCC
AD_03	CACAT6GCRITGCATDATYTC	CgLAX3Xbal	GCTCTAGACGCTCCGAGAAGGTCGAGCT
AD_04	CCRAA6GCCARTADAS6GC	CgLAX35mal	TCCCCGGGAGCCTTGTGTGGGGACAC
RACE-PCR		RT-PCR Casuarina	
AUX13	CAACCCACAGACAAAATAATGCTAT	RTAUX1F	GTTCTTCGGGCCATAAACT
LAX35	TCACTGGGGCTACCAACATTCTCTA	RTAUX1R	TGCTTGGAAAGCAAGGAAT
2LAX3	TAGAGAATGTTGGTAGCCCCAGTGA	RTLAX3F	ATTCTGCCCTAGCACACAT
2AUX5	ATAGCATTATTTTGTCTGTGGGTTG	RTLAX3R	CCCACCGTAAAGAGATACCC
3AUX5	CCCATTTCACCTTTCACCTTACCCATCC	RT-PCR quantitative Casuarina	
4AUX5	GGCGTGCAATAATTCCTGAAACGTA	qCgAUX1F	ACCAGGAGCAACCGGAAGAC
Clones pleine longueur		qCgAUX1R	AGCACTTGGCAACTTGATTG
AUX1F	GCAGATCAGCCGGAATTTAG	qCgLAX3F	GGAACCTGCGTGGAAATGGA
AUX1R	TGCTTTGGAAGCAAGGAAT	qCgLAX3R	CACCTGCGGACCTGGTTAG
LAX3F	ACAATGGCTTCCGAGAAGGT	qCg12F	ATGCCACGCTTGATACCAC
LAX3R	GGCTAAATTCATCCACCCTGA	qCg12R	CCGACTTGACAAATTCCTTTCC
Marche sur ADN génomique		qCgPCLF	GAGAGTCACAATAGCTCAACAC
AUX1GSP1	GATGTAGTATATGTTACTGCTCGCATC	qCgPCLR	TTGGCTGGAGAAATGTTAG
AUX1GSP2	CAGATCCGAAATAGGAAAGTACAG	qCgGLHF	ATTCTGGGTTGGTCACTTCG
AUX1GSP3	CGCAACCTGTAGTTAGAGAAGAAAGGAA	qCgGLHR	ACACTCATCTACCTCCTACCTATC
AUX1GSP4	GGGTTTTAGTGGGTTTACTTGATTGGA	qCgXETF	CATCTGCCTCCTCGTCTG
LAX3GSP1	GAAGCACAGCTAAACCACGATCCTGA	qCgXETR	TAAGTGTGTGCTCTCTATTGG
LAX3GSP2	CTTGAAAGTTGCTTCCGCGCTCTT	RT-PCR quantitative Arabidopsis	
Obtention promoteurs et terminateurs		qAtACT2F	TTGACTACGAGCAGAGATGG
pLAX3F	ACTCATCACCAGTGCCTCAAAACA	qAtACT2R	ACAACGAGGGCTGGAACAAG
pAUX1	TGTTGAGATTAACCCCAAAAA	qAtAIR3F	CTAGGACTTTCTTGGTCTTCTCAC
tAUX1-1	GTAGTAATACTCCCTCAGCTGATGTGT	qAtAIR3R	AGGGTGTTTGGAGATTTCAATAAGC
tAUX1-2	ATAGTGTGTTGTGATGATTCTTTGCTTCC	qAtEXP17F	TCCACCGAACTTTGCTCAG
tLAX3-1	GCCTCTTAAAGACTATCGTTGATCGAT	qAtEXP17R	CCTCCGCTTCTTCTACATCC
tLAX3-2	TATGGCAACTCACTCGGTATCTCTTTAC	qAtGLH17F	CGTCCGCTCTTATATCTTCTCAAC
Sondes Southern		qAtGLH17R	ATAGACATAGGGCTGGAGACTTTG
AUX1ProbeF	AGCTAACACACCCCATAGTTTG	qAtPLA2F	TGCTCTCTCTTGTCTCTTTT
AUX1ProbeR	AATAATAAGCCTTATGCTTTGGAAG	qAtPLA2R	TCCGATCTCCAACAGTCC
LAX3ProbeF	CCGCTGTAAGAGAGATTGGCATT	qAtPGF	CCATACAGAACAGCCCTCAAAC
LAX3ProbeR	TGAGCAAACTACTCAACGGCTAA	qAtPGR	GATATACAGTCTATCTCCACAAGCC
AUXLAXProbeF	CGTTGGATTCCGCTGCACTCC	qAtXTR6F	AAGAACCAGCCATGAGAATG
AUXLAXProbeR	GAGATCCAACAGTTGATTTGA	qAtXTR6R	CGGTAGGAAGCAGTGAAGG
Clonage promoteurs-GUS/GFP		Divers	
pAUX1Xba	GCTCTAGATGGTGAGATTAACCCCAAAAA	M13F	GTAACACGACGGCCAGT
pAUX1Bam	GCGGGATCCCAAGCACTAAATCCGGCTGA	M13R	GGAAACAGCTATGACCATG
pLAX3Hind	CCCAGCTTATCACCCAAAGTCCCTCAAAC	GUS1	GAATGGTGATTCAGCAGCAAAA
pLAX3Bam	GCGGGATCCCAAGCAATGAAGTACTAGCGTCT	GUS2	CCAGTCGAGCATCTCTCAGC
Clonage CgAUX1		GUSout	TCCCACCAACCGTGATCAAT
AUX1Xho	CCGCTCGAGTTGCCTCAGAAGCAAGCAG	GFP1	ATGGGCAAGGGGAGGAACT
AUX1Bam	GCGGGATCCGCTGATGGATGGCGCCGCC	GFP2	GAAATTCACTTGTATGCCGTTCT
Clonage CgLAX3		GFPout	CACCTTCAACCTCTCCAC
LAX3Sall	GTCGACGCTTCCGAGAAGTCCGAGACT	VirD1-F	ATGTCCGAAGCCAGTAAGCCCA
LAX3BglII	AGATCTAGCCTTGTGTGGGGACAC	VirD1-R	GGAGTCTTTCAGCATGGAGCAA

Tableau I. Séquences des amorces utilisées pour la PCR

Les séquences sont données dans le sens 5' vers 3'.

centrifugées 15 minutes à 8000g puis reprises dans de l'eau stérile et les hyphes sont brisés par une dizaine de passages dans une seringue munie d'une aiguille stérile Terumo (0,7 x 30mm). La solution contenant les bactéries est utilisée pour ensemencer le nouveau milieu de culture ou pour inoculer les plantes une semaine après sevrage.

3) Transformation génétique des plantes

a) *Casuarina glauca* et *Allocasuarina verticillata*

Les graines de *C. glauca* et *A. verticillata* sont scarifiées par trempage dans H₂SO₄ 96% pendant 2 minutes, rincées à l'eau courante 30 minutes, rincées dans du Tween 80 (quelques gouttes dans environ 50mL H₂O), rincées rapidement dans de

l'éthanol 75%, désinfectées à l'hypochlorite de calcium 5% pendant 35 minutes, rincées à l'eau stérile deux fois puis laissées dans l'eau stérile toute la nuit. Les graines sont ensuite mises à germer sur milieu H (Hoagland et Arnon, 1938) dilué au 1/4. Les fragments d'épicotyles sont placés en contact des agrobactéries sur milieu MSC liquide (la composition des différents milieux MSC est présentée dans le tableau IV) puis la coculture est réalisée pendant trois jours sur milieu MSC solide. Les explants sont rincés trois fois avec du MSC liquide pendant une heure puis placés sur MSC avec régulateurs et antibiotiques : céfotaxime (250 mg.L⁻¹) et kanamycine (25 mg.L⁻¹ pour *C. glauca* et 50 mg.L⁻¹ pour *A. verticillata*). Après quinze jours, les concentrations en kanamycine sont doublées et le milieu est renouvelé toutes les trois semaines. Les

cals apparaissent après un à deux mois. La céfotaxime est progressivement retirée au bout de six mois. Lorsque les cals atteignent 5 mm environ, ils sont transférés en tube en verre. Les rameaux de *C. glauca* sont enracinés par choc auxinique sur milieu MSC-IBA pendant deux jours puis transférés sur milieu MSC avec charbon actif. Les rameaux d'*A. verticillata* sont enracinés par choc auxinique sur milieu MSC-NAA pendant deux jours puis transférés sur milieu MSC-enracinement liquide. Dans les deux cas, les premières racines apparaissent au bout d'environ une semaine. Pour l'inoculation par *Frankia*, les plants de *C. glauca* sont transférés en hydroponie non stérile (voir Milieux de culture) et traités comme des plantes non transformées. Les plants d'*A. verticillata* sont transférés en tube en verre contenant une gélose inclinée (milieu MSC pour tube) et du milieu H liquide avec azote. Le sevrage en azote est effectué une semaine avant inoculation par *Frankia*.

La multiplication végétative des rameaux de *C. glauca* est réalisée par bouturage. Les rameaux (environ 3 à 5 cm) sont placés 24 heures dans une solution de NAA 0,1 g.L⁻¹ puis transférés directement en pot pour culture hydroponique sur milieu BD. Les premières racines apparaissent au bout d'une semaine environ.

b) *Arabidopsis thaliana*

La transformation génétique d'*A. thaliana* est réalisée par la technique d'imprégnation des boutons floraux (Clough et Bent, 1998). Une première culture de bactérie (LB 5 mL, kanamycine 50 mg.L⁻¹, rifampicine 10 mg.L⁻¹) est lancée à partir de la solution stock pendant 16 heures à 28°C sous agitation. Une deuxième culture (LB 500 mL kanamycine 50 mg.L⁻¹) est inoculée avec 500 µL de la première, elle est laissée pendant 16 heures à 28°C sous agitation. Les bactéries sont culotées par centrifugation (6000 g, 15 minutes à température ambiante) et reprises dans une solution de saccharose 5% (m/v) et silwet L-77 0,05% (v/v). Les boutons floraux (plantes âgées d'un mois environ)

sont trempés dans la solution pendant 5 secondes environ. Les plantes sont placées à l'obscurité sous mini-serres pendant 16 heures puis replacées dans le phytotron. Deux imprégnations sont réalisées à sept jours d'intervalle afin d'augmenter l'efficacité de la transformation.

4) Transformation génétique des bactéries

a) *Escherichia coli*

Les bactéries XL1-blue sont rendues compétentes à la transformation par choc thermique (Hanahan, 1983). Une culture de 100 mL de bactéries (densité optique à 600 nm entre 0,3 et 0,4) est centrifugée 10 minutes à 4000 g à 4°C. Le culot est repris dans 30 mL de la première solution (RbCl 100 mM, MnCl₂ 50 mM, Acétate de potassium 30 mM, CaCl₂ 10 mM, glycérol 15 %, pH 5,8). Après centrifugation 10 minutes à 4000 g à 4°C, le culot est repris dans 7 mL de la deuxième solution (MOPS 10 mM, RbCl 10 mM, CaCl₂ 75 mM, glycérol 15 %, pH 6,8). Les bactéries laissées 15 minutes sur glace sont aliquotées par 150 µL dans des tubes de 1,5 mL et immédiatement plongées dans l'azote liquide (-180°C). Les bactéries compétentes sont conservées à -80°C jusqu'à utilisation. Les bactéries commerciales JM109 (Promega) sont prêtes à l'emploi.

Les plasmides sont intégrés dans les bactéries compétentes par choc thermique. Un volume de 50 µL de bactéries est mélangé avec environ 10 µL de plasmide et laissé sur glace une minute puis à 42°C pendant 50 secondes puis retour sur glace deux minutes. Un volume de 950 µL de LB est ajouté et les bactéries sont placées à 37°C sous agitation pendant une heure. Les bactéries transformées sont sélectionnées sur boîtes de LB agar contenant l'antibiotique approprié.

b) *Agrobacterium tumefaciens*

Les agrobactéries sont rendues compétentes à l'électroporation. Une culture d'un litre de bactéries (densité optique à 600 nm entre 0,6 et 0,9) est

laissée sur glace pendant 15 minutes puis centrifugée 10 minutes à 3000 g à 4°C. Le culot est repris successivement dans un litre d'eau stérile froide, 500 mL d'eau stérile froide, deux fois dans 20 mL de glycérol 10% froid après centrifugations successives de 10 minutes à 3000 g à 4°C. Les bactéries sont aliquotées par 50 µL dans des tubes de 1,5 mL et immédiatement plongées dans l'azote liquide (-180°C). Les bactéries compétentes sont conservées à -80°C jusqu'à utilisation.

Les bactéries compétentes sont transformées par électroporation. Un volume de 50 µL de bactéries est mélangé avec environ 10 µL de plasmide dilué et placé dans la cuve de l'électroporateur. Les bactéries sont soumises à un choc électrique de 2,5 kV, 192 W et 40 µF puis un volume de 950 µL de LB est ajouté et les bactéries sont placées à 28°C sous agitation pendant deux heures. Les bactéries transformées sont sélectionnées sur boîtes de LB agar contenant l'antibiotique approprié.

5) Biologie moléculaire

a) Extraction des acides nucléiques

Les ARN totaux de *C. glauca* sont extraits selon la méthode d'ultracentrifugation sur coussin de chlorure de césium (Chirgwin *et al*, 1979). Les ARN totaux d'*A. thaliana* sont extraits à l'aide du kit RNeasy (Qiagen) selon les instructions du fabricant.

L'ADN génomique de *C. glauca* est extrait selon la méthode au MATAB (Ky *et al*, 2000). L'ADN génomique d'*A. thaliana* est extrait à l'aide du kit Dneasy (Qiagen).

L'ADN plasmidique est extrait des cultures bactériennes à l'aide du kit MiniPrep (Qiagen).

b) Traitement DNase

Pour utilisation en RT-PCR, les ARN sont soumis à un traitement DNase à l'aide du kit DNA-free (Ambion) afin de supprimer toute trace d'ADN génomique.

c) Purification des ARN polyA

Les ARN poly-adenylés sont purifiés à l'aide du kit *mRNA purification* (Amersham Biosciences) à partir des ARN totaux (environ 40 µg).

d) Northern blot

Les ARN totaux sont soumis à un Northern blot à l'aide du kit NorthernMax-Gly (Ambion). Après électrophorèse, les ARN sont transférés sur membrane en nylon (solution de transfert SSC 10X) par capillarité.

e) Southern blot

L'ADN génomique de *C. glauca* (environ 15 µg) est digéré par des enzymes de restriction (15 unités.µg⁻¹ ADN_g à 37°C toute la nuit). L'ADN digéré est placé sous électrophorèse (1V.cm⁻¹) dans un gel d'agarose 1% (m/v dans tampon TBE 1X) dans du tampon TBE 1X. Après électrophorèse, l'ADN est visualisé par coloration au bromure d'éthidium et éclairage aux rayons ultraviolets. Le gel est traité pour dénaturer l'ADN (NaCl 1,5 M ; NaOH 0,5 M) pendant une heure sous agitation légère à température ambiante. Puis le gel est placé dans une solution de neutralisation (NaCl 1,5 M ; Tris-HCl 1M pH 7,4) pendant une heure. L'ADN est ensuite transféré sur une membrane en nylon (solution de transfert SSC 10X) par capillarité.

f) Hybridation des membranes

La membrane de Northern ou Southern blot est séchée et les acides nucléiques sont fixés par exposition aux rayons ultraviolets (120 mJ.cm⁻²). La membrane est traitée en pré-hybridation au minimum 3 heures à 65°C (Denhardt's 5X, SSC 6X, SDS 0,5%, ADN de sperme de hareng dénaturé 0,1 mg.mL⁻¹). La sonde (environ 25 ng de produit PCR purifié) est radiomarquée au α³²P-dCTP (50 µCi) par la technique de l'amorçage aléatoire (*random priming*) à l'aide du kit *Megaprime™ DNA labelling systems* (Amersham Biosciences). La sonde est ajoutée pour hybridation toute la nuit. La solution d'hybridation est éliminée et la membrane est lavée à l'aide de solutions

de lavage de stringence croissante (SSC 2X, SDS 0,1%; SSC 1X, SDS 0,1%; SSC 0,5X, SDS 0,1%). La membrane est alors placée au contact d'un film autoradiographique (Kodak) pendant une nuit dans une cassette à -80°C . Le film est révélé (solution de révélation, Kodak) puis fixé (solution de fixation, Kodak).

g) *Transcription inverse*

Les ARN totaux (250 ng à 1 μg) sont rétro-transcrits à l'aide du kit Reverse Transcription System (Promega) ou du kit Superscript III Reverse Transcriptase (Invitrogen) selon les instructions du fabricant.

h) *RACE-PCR*

Les ADNc correspondant aux fragments de gènes clonés par PCR sont obtenus par amplification rapide des extrémités de l'ADNc (RACE-PCR) à l'aide du kit *Marathon™ cDNA amplification* (Clontech) selon les instructions du fabricant.

i) *Marche sur l'ADN génomique*

Les séquences promotrices des gènes sont obtenues par marche sur l'ADN génomique à l'aide du kit Universal GenomeWalker (Clontech).

j) *RT-PCR quantitative*

Trois réactions indépendantes de transcription inverse sont effectuées à partir de 200 à 400 ng d'ARN totaux. La réaction de RT-PCR quantitative est réalisée sur un appareil Mx3005P (Stratagene) en utilisant le mélange FullVelocity SYBR Green QPCR Master Mix (Stratagene). Pour l'amplification, les échantillons sont chauffés 5 minutes à 95°C , puis soumis à 40 cycles de dénaturation (95°C pendant 10 secondes) et hybridation-extension (60°C pendant 30 secondes). Une courbe de dissociation est réalisée en chauffant les échantillons de 60 à 95°C afin de déterminer la T_m des produits amplifiés.

k) *Séquençage de l'ADN*

Les séquençages d'ADN sont réalisés par la société MWG à partir de 1 μg d'ADN plasmidique.

l) *Analyse des séquences*

Les séquences sont soumises au BLAST (Altschul *et al*, 1990) pour comparaison. Les arbres phylogénétiques sont dessinés avec le logiciel Treecon v1.3b. Les alignements sont réalisés avec le programme ClustalW.

6) **Histologie**

a) *Coloration GUS*

Les tissus prélevés ou les coupes épaisses réalisées au vibratome sont plongés dans une solution de X-Glc (X-Glc 0,5g.L⁻¹, diméthylformamide 0,5% v/v, EDTA 1mM, Triton X-100 0,5% v/v, Na₂PO₄ 500mM pH 7). Pour Arabidopsis, l'ajout de K₃Fe(CN)₆ et K₄Fe(CN)₆ 0,5 mM permet de limiter la diffusion des cristaux bleus. L'incubation est réalisée pendant 2 à 16 heures à 37°C suivant l'expression du promoteur.

b) *Fixation*

Les tissus sont fixés dans de l'éthanol 70% (plusieurs bains pendant au moins un jour). Ils sont ensuite traités pour inclusion en résine ou progressivement transférés dans du glycérol 50% pour conservation (éthanol 50% glycérol 10% v/v pendant 2 heures, éthanol 30% glycérol 30% pendant 2 heures puis glycérol 50% pendant 2 heures).

c) *Inclusion en résine*

Les tissus sont inclus dans de l'agarose avant inclusion en résine afin de faciliter leur orientation. Les tissus sont progressivement amenés dans de l'eau (bains successifs de 15 minutes dans de l'éthanol 50%, 30% puis 10%). Les tissus sont ensuite inclus dans de l'agarose 1,2% (m/v) tiède et les blocs d'agarose sont façonnés au scalpel.

Les blocs d'agarose sont déshydratés par bains successifs de 15 minutes dans de l'éthanol 10%, 30%, 50%, 75%, 95% puis trois fois 100%. Les échantillons déshydratés sont inclus dans une résine Technovit 7100 (Heraeus Kulzer, Wehrheim, Allemagne) selon instructions du fabricant.

d) Coupes épaisses

Les coupes épaisses (40 à 60 μm) sont réalisées sur des tissus frais inclus dans de l'agarose 3% (m/v) à l'aide d'un vibratome VT1000E (Leica).

e) Coupes fines

Les coupes fines (3 à 6 μm) sont réalisées sur bloc de résine à l'aide d'un microtome MT355S (Leica).

f) Montage et observation

Les tissus non coupés (racine d'*Arabidopsis*) sont directement montés entre lame et lamelle dans une solution de glycérol 50%. Les coupes fines sont montées sur lame dans une solution de Clearium mountant (Surgipath) et les coupes épaisses sont montées dans de l'eau. Les lames sont observées avec un microscope Leitz DMRB. Les images sont prises avec une caméra numérique DFC300FX (Leica). Le traitement des images est réalisé avec le logiciel GraphicConverter (lemkesoft.com).

7) Analyses phénotypiques

a) Gravitropisme

Le phénotype gravitropique des plants d'*Arabidopsis* est testé sur boîte verticale. Les plantes sont mises à germer sur boîtes pendant une semaine puis les boîtes sont tournées à 90°C, l'angle de réorientation des apex racinaires est estimé visuellement 24 heures après stimulus gravitropique.

b) Résistance au 2,4D

La résistance au 2,4D est testée sur boîte verticale. Les plantes sont mises à

germer sur milieu avec ou sans auxine et la longueur de la racine primaire est mesurée 5 jours après germination avec l'aide du logiciel ImageJ 1.37v. Les longueurs de racines sont exprimées relativement à la longueur des racines témoin (milieu sans 2,4D).

8) Dosages

a) Dosage des ARN

Pour un dosage approximatif, l'ADN et l'ARN sont dosés par spectrophotométrie à 260 nm. Pour un dosage plus précis, les ARN sont dosés avec du Ribogreen Reagent (Stratagene) à l'aide de l'appareil Mx3005P (Stratagene) par comparaison avec une gamme étalon d'ARN.

b) Dosage des protéines totales

Les protéines totales de *Frankia* sont dosées par la coloration de Bradford (Bradford, 1976) sur milieu de culture soumis à une sonication rapide (trois impulsions à 50% d'intensité). La densité optique à 595 nm (vérifier) est mesurée 5 minutes après mélange avec le réactif de Bradford (1/1, v/v). La quantité de protéines est déterminée par comparaison avec une gamme étalon de sérum albumine bovine.

c) Dosage des auxines

La quantité d'auxine (IAA et PAA) dans les racines et nodules de *C. glauca* et dans le surnageant de culture de *Frankia* est déterminée par HPLC couplée à la spectrométrie de masse (Kowalczyk et Sandberg, 2001). Les dosages sont effectués par le D. Helena Fernandez (Université d'Oviedo, Espagne).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW et Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 215: 403–410.
- Ané JM, Kiss GB, Riely BK, Penmetsa RV, Oldroyd GE, Ayax C, Lévy J, Debellé F, Baek JM, Kalo P, Rosenberg C, Roe BA, Long SR, Dénarié J et Cook DR (2004) *Medicago truncatula* DMI1 required for bacterial and fungal symbioses in legumes. *Science.* 303: 1364–1367.
- Angulo Carmona AF (1974) La formation des nodules fixateurs d'azote chez *Alnus glutinosa* (L.). *Acta Bot Neerl.* 23: 257–303.
- Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature.* 408: 796–815.
- Arp DJ (2000) The nitrogen cycle. In *Prokaryotic nitrogen fixation : a model system for the analysis of a biological process*. Triplett, EW (ed) Horizon Scientific Press, Wymondham, UK.
- Badescu GO et Napier RM (2006) Receptors for auxin: will it all end in TIRs? *Trends Plant Sci.* 11: 217–223.
- Baier R, Schiene K, Kohring B, Flaschel E et Niehaus K (1999) Alfalfa and tobacco cells react differently to chitin oligosaccharides and sinorhizobium meliloti nodulation factors. *Planta.* 210: 157–164.
- Barker DG, Bianchi S, Blondon F, Dattée Y, Duc G, Essad P, Flament P, Galuxy P, Génier G, Muel X, Toureur J, Dénarié J et Huguet T (1990) *Medicago truncatula*, a model plant for studying the molecular genetics of Rhizobium–legume symbiosis. *Plant Mol Biol Rep.* 8: 40–49.
- Barker SJ et Tagu D (2000) The Roles of Auxins and Cytokinins in Mycorrhizal Symbioses. *JOURNAL OF PLANT GROWTH REGULATION.* 19: 144–154.
- Bartel B, LeClere S, Magidin M et Zolman BK (2001) Inputs to the active indole-3-acetic acid pool : de novo synthesis, conjugate hydrolysis, and indole-3-butyric acid beta-oxidation. *Journal Plant Growth Regulation.* 20: 198–216.
- Beeckman T, Burssens S et Inzé D (2001) The peri-cell-cycle in *Arabidopsis*. *J Exp Bot.* 52: 403–411.
- Beemster GT, Fiorani F et Inzé D (2003) Cell cycle: the key to plant growth control? *Trends Plant Sci.* 8: 154–158.
- Benfey PN et Scheres B (2000) Root development. *Curr Biol.* 10: R813–R815.
- Benková E, Michniewicz M, Sauer M, Teichmann T, Seifertová D, Jürgens G et Friml J (2003) Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell.* 115: 591–602.
- Bennett MJ, Marchant A, Green HG, May ST, Ward SP, Millner PA, Walker AR, Schulz B et Feldmann KA (1996) *Arabidopsis* AUX1 gene: a permease-like regulator of root gravitropism. *Science.* 273: 948–950.
- Benoit LF et Berry AM (1997) Flavonoid-like compounds from red alder (*Alnus rubra*) influence nodulation by *Frankia* (Actinomycetales). *Physiol Plant.* 99: 588–593.
- Benson DR et Silvester WB (1993) Biology of *Frankia* strains, actinomycete symbionts of actinorhizal plants. *Microbiol Rev.* 57: 293–319.
- Benson DR, et Clawson ML (2000) Evolution of the actinorhizal plant symbiosis. In *Prokaryotic nitrogen fixation : a model system for the analysis of a biological process*. Triplett, EW (ed) Horizon Scientific Press, Wymondham, UK.
- Berg RH (1999a) *Frankia* forms infection threads. *Can J Bot.* 77: 1327–1333.
- Berg RH (1999b) Cytoplasmic bridge formation in the nodule apex of actinorhizal root nodules. *Can J Bot.* 77: 1351–1357.
- Berry AM, et Sunnel LA (1990) The infection process and nodule development. In *The biology of Frankia and Actinorhizal plants*. pp 61–81. Schwintzer, CR and Tjepkema JD (ed) Academic Press, New York.
- Berry AM, McIntyre L et McCully M (1986) Fine structure of root hair infection leading to nodulation in the *Frankia*–*Alnus* symbiosis. *Can J Bot.* 64: 292–305.
- Bhalerao RP, Eklöf J, Ljung K, Marchant A, Bennett MJ et Sandberg G (2002) Shoot-derived auxin is essential for early lateral root emergence in *Arabidopsis* seedlings. *Plant J.* 29: 325–332.
- Blakeslee JJ, Peer WA et Murphy AS (2005) Auxin transport. *Curr Opin Plant Biol.* 8: 494–500.
- Bohlool BB, Ladha JK, Garrity DP et George T (1992) Biological nitrogen fixation for sustainable agriculture. A perspective. *Plant Soil.* 141: 1–11.
- Boot KJM, van Brussel AAN, Tak T, Spaik HP et Kijne JW (1999) Lipochitin oligosaccharides from *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* reduce auxin transport capacity in *Vicia sativa* subsp. *nigra*. *Mol Plant Microbe Interact.* 12: 839–844.
- Boutté Y, Crosnier MT, Carraro N, Traas J et Satiat-Jeunemaitre B (2006) The plasma membrane recycling pathway and cell polarity in plants: studies on PIN proteins. *J Cell Sci.* 119: 1255–1265.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248–254.
- Brewin NJ (2004) Plant cell wall remodelling in the *Rhizobium*–*Legume* symbiosis. *Critical Reviews in Plant Sciences.* 23: 293–316.
- Broughton WJ et Dilworth MJ (1971) Control of leghaemoglobin synthesis in snake beans. *Biochem J.* 125: 1075–1080.
- Brown DE, Rashotte AM, Murphy AS, Normanly J, Tague BW, Peer WA, Taiz L et Muday GK (2001) Flavonoids act as negative regulators of auxin transport in vivo in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 126: 524–535.
- Callaham D et Torrey JG (1977) Prenodule formation and primary nodule development in roots of *Comptonia* (Myricaceae). *Can J Bot.* 51: 2306–2318.

- Callaham D, Newcomb W, Torrey JG et Peterson RL (1979) Root hair infection in actinomycete-induced root nodule initiation in Casuarina, Myrica and Comptonia. *Bot Gaz*. **140**: S1–S9.
- Cannon SB, Sterck L, Rombauts S, Sato S, Cheung F, Gouzy J, Wang X, Mudge J, Vasdevani J, Scheix T, Spannagl M, Monaghan E, Nicholson C, Humphray SJ, Schoof H, Mayer KF, Rogers J, Quétier F, Oldroyd GE, Debellé F, Cook DR, Retzel EF, Roe BA, Town CD, Tabata S, Van de Peer Y et Young ND (2006) Legume genome evolution viewed through the Medicago truncatula and Lotus japonicus genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **103**: 14959–14964.
- Capoen W, Goormachtig S, De Rycke R, Schroyers K et Holsters M (2005) SrSymRK, a plant receptor essential for symbiosome formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **102**: 10369–10374.
- Casimiro I, Beeckman T, Graham N, Bhalerao R, Zhang H, Casero P, Sandberg G et Bennett MJ (2003) Dissecting Arabidopsis lateral root development. *Trends Plant Sci*. **8**: 165–171.
- Casimiro I, Marchant A, Bhalerao RP, Beeckman T, Dhooge S, Swarup R, Graham N, Inzé D, Sandberg G, Casero PJ et Bennett M (2001) Auxin transport promotes Arabidopsis lateral root initiation. *Plant Cell*. **13**: 843–852.
- Cassab GI (1998) PLANT CELL WALL PROTEINS. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. **49**: 281–309.
- Cérémonie H, Cournoyer B, Maillet F, Normand P et Fernandez MP (1998) Genetic complementation of rhizobial nod mutants with Frankia DNA: artifact or reality? *Mol Gen Genet*. **260**: 115–119.
- Cérémonie H, Debellé F et Fernandez MP (1999) Structural and functional comparison of Frankia root hair deforming factor and rhizobia Nod factor. *Can J Bot*. **77**: 1293–1301.
- Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ et Rutter WJ (1979) Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochem*. **18**: 5294–5299.
- Clough SJ et Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *Plant J*. **16**: 735–743.
- Cohen JD, Slovin JP et Hendrickson AM (2003) Two genetically discrete pathways convert tryptophan to auxin: more redundancy in auxin biosynthesis. *Trends Plant Sci*. **8**: 197–199.
- Coronado C, Zuanazzi J, Sallaud C, Quirion JC, Esnault R, Husson HP, Kondorosi A et Ratet P (1995) Alfalfa Root Flavonoid Production Is Nitrogen Regulated. *Plant Physiol*. **108**: 533–542.
- Cosgrove DJ (2000) Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature*. **407**: 321–326.
- Cullimore JV, Ranjeva R et Bono JJ (2001) Perception of lipo-chitoooligosaccharidic Nod factors in legumes. *Trends Plant Sci*. **6**: 24–30.
- D'Agostino IB, Deruère J et Kieber JJ (2000) Characterization of the response of the Arabidopsis response regulator gene family to cytokinin. *Plant Physiol*. **124**: 1706–1717.
- Dawson JO (1990) Interactions among actinorhizal and associated plant species. In *The biology of Frankia and actinorhizal plants*. pp 299–316. Schwintzer, CR and Tjepkema JD (ed) Academic Press, New York.
- de Billy F, Grosjean C, May S, Bennett M et Cullimore JV (2001) Expression studies on AUX1-like genes in Medicago truncatula suggest that auxin is required at two steps in early nodule development. *Mol Plant Microbe Interact*. **14**: 267–277.
- de Faria SM, Lewis GP, Sprent JI et Sutherland JM (1989) Occurrence of nodulation in the leguminosae. *New Phytol*. **111**: 607–619.
- De Smet I, Tetsumura T, De Rybel B, Frei Dit Frey N, Laplaze L, Casimiro I, Swarup R, Naudts M, Vanneste S, Audenaert D, Inzé D, Bennett MJ et Beeckman T (2007) Auxin-dependent regulation of lateral root positioning in the basal meristem of Arabidopsis. *Development*. **134**: 681–690.
- De Smet I, Vanneste S, Inzé D et Beeckman T (2006) Lateral root initiation or the birth of a new meristem. *Plant Mol Biol*. **60**: 871–887.
- Dharmasiri N, Dharmasiri S et Estelle M (2005a) The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature*. **435**: 441–445.
- Dharmasiri N, Dharmasiri S, Weijers D, Lechner E, Yamada M, Hobbie L, Ehrismann JS, Jürgens G et Estelle M (2005b) Plant development is regulated by a family of auxin receptor F box proteins. *Dev Cell*. **9**: 109–119.
- Dharmasiri S, Swarup R, Mockaitis K, Dharmasiri N, Singh SK, Kowalchuk M, Marchant A, Mills S, Sandberg G, Bennett MJ et Estelle M (2006) AXR4 Is Required for Localization of the Auxin Influx Facilitator AUX1. *Science*. **312**: 1218–1220.
- Dolan L et Scheres B (1998) Root pattern: shooting in the dark? *Semin Cell Dev Biol*. **9**: 201–206.
- Dolan L, Janmaat K, Willemsen V, Linstead P, Poethig S, Roberts K et Scheres B (1993) Cellular organisation of the Arabidopsis thaliana root. *Development*. **119**: 71–84.
- Dommergues Y, Duhoux E et Diem HG (1999) *Les arbres fixateurs d'azote*. Espace 34 (ed) Montpellier.
- Dubrovsky JG, Doerner PW, Colón-Carmona A et Rost TL (2000) Pericycle cell proliferation and lateral root initiation in Arabidopsis. *Plant Physiol*. **124**: 1648–1657.
- Dubrovsky JG, Rost TL, Colón-Carmona A et Doerner P (2001) Early primordium morphogenesis during lateral root initiation in Arabidopsis thaliana. *Planta*. **214**: 30–36.
- Duponnois R, Diédhiou S, Chotte JL et Sy MO (2003) Relative importance of the endomycorrhizal and (or) ectomycorrhizal associations in Allocasuarina and Casuarina genera. *Can J Microbiol*. **49**: 281–287.
- Eckardt NA (2006) Medicago truncatula CRE1 Cytokinin Receptor Regulates Nodulation and Lateral Root Development. *Plant Cell*. **18**: 2419.
- Endre G, Kereszt A, Kevei Z, Mihacea S, Kaló P et Kiss GB (2002) A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature*. **417**: 962–966.
- Fang Y et Hirsch AM (1998) Studying early nodulin gene ENOD40 expression and induction by nodulation factor and cytokinin in transgenic alfalfa. *Plant Physiol*. **116**: 53–68.

- Foucher F et Kondorosi E** (2000) Cell cycle regulation in the course of nodule organogenesis in *Medicago*. *Plant Mol Biol.* **43**: 773–786.
- Franche C, Laplaze L, Duhoux E et Bogusz D** (1998) Actinorhizal symbioses : recent advances in plant molecular and genetic transformation studies. *Crit. Rev. Plant Sci.* **17**: 1–28.
- Friml J** (2003) Auxin transport – shaping the plant. *Curr Opin Plant Biol.* **6**: 7–12.
- Friml J et Palme K** (2002) Polar auxin transport—old questions and new concepts? *Plant Mol Biol.* **49**: 273–284.
- Fukaki H, Nakao Y, Okushima Y, Theologis A et Tasaka M** (2005) Tissue-specific expression of stabilized SOLITARY-ROOT/IAA14 alters lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant J.* **44**: 382–395.
- Fukaki H, Tameda S, Masuda H et Tasaka M** (2002) Lateral root formation is blocked by a gain-of-function mutation in the SOLITARY-ROOT/IAA14 gene of *Arabidopsis*. *Plant J.* **29**: 153–168.
- Gage DJ** (2004) Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol Mol Biol Rev.* **68**: 280–300.
- Gage DJ et Margolin W** (2000) Hanging by a thread: invasion of legume plants by rhizobia. *Curr Opin Microbiol.* **3**: 613–617.
- Gay G, Normand L, Marmeisse R, Sotta B et Debaud JC** (1994) Auxin overproducer mutants of *Hebeloma cylindrosporum* Tomagnési have increased mycorrhizal activity. *New Phytol.* **128**: 645–657.
- Gälweiler L, Guan C, Müller A, Wisman E, Mendgen K, Yephremov A et Palme K** (1998) Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in *Arabidopsis* vascular tissue. *Science.* **282**: 2226–2230.
- Geisler M, Blakeslee JJ, Bouchard R, Lee OR, Vincenzetti V, Bandyopadhyay A, Titapiwatanakun B, Peer WA, Bailly A, Richards EL, Ejendal KF, Smith AP, Baroux C, Grossniklaus U, Müller A, Hrycyna CA, Dudler R, Murphy AS et Martinoia E** (2005) Cellular efflux of auxin catalyzed by the *Arabidopsis* MDR/PGP transporter AtPGP1. *Plant J.* **44**: 179–194.
- Geldner N, Anders N, Wolters H, Keicher J, Kornberger W, Muller P, Delbarre A, Ueda T, Nakano A et Jürgens G** (2003) The *Arabidopsis* GNOM ARF-GEF mediates endosomal recycling, auxin transport, and auxin-dependent plant growth. *Cell.* **112**: 219–230.
- Geldner N, Richter S, Vieten A, Marquardt S, Torres-Ruiz RA, Mayer U et Jürgens G** (2004) Partial loss-of-function alleles reveal a role for GNOM in auxin transport-related, post-embryonic development of *Arabidopsis*. *Development.* **131**: 389–400.
- Geurts R, Fedorova E et Bisseling T** (2005) Nod factor signaling genes and their function in the early stages of *Rhizobium* infection. *Curr Opin Plant Biol.* **8**: 346–352.
- Gonzalez-Rizzo S, Crespi M et 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.
- Gordons A, Stevens JR et Berry AM** (1988) Cytokinin secretion by *Frankia* sp. HFPAr13 in defined medium. *Plant Physiol.* **87**: 15–16.
- Graham PH et Vance CP** (2003) Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiol.* **131**: 872–877.
- Halleib CM et Ludden PW** (2000) Regulation of biological nitrogen fixation. *J Nutr.* **130**: 1081–1084.
- Hammad Y, Nalin R, Marechal J, Fiasson K, Pepin R, Berry AM, Normand P et Domenach AM** (2003) A possible role for phenyl acetic acid (PAA) on *Alnus glutinosa* nodulation by *Frankia*. *Plant Soil.* **254**: 193–205.
- Hanahan D** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.* **166**: 557–580.
- Handberg K et Stougaard J** (1992) *Lotus japonicus*, an autogamous, diploid legume species for classical and molecular genetics. *Plant J.* **2**: 487–496.
- Hardy RWF, et Knight E** (1968) The biochemistry and postulated mechanism of N₂ fixation. In *Progress in phytochemistry*. pp 387–469. L. Reinhold (ed).
- Heidstra R, Yang WC, Yalcin Y, Peck S, Emons AM, van Kammen A et Bisseling T** (1997) Ethylene provides positional information on cortical cell division but is not involved in Nod factor-induced root hair tip growth in *Rhizobium*-legume interaction. *Development.* **124**: 1781–1787.
- Heinekamp T, Kuhlmann M, Lenk A, Strathmann A et Dröge-Laser W** (2002) The tobacco bZIP transcription factor BZI-1 binds to G-box elements in the promoters of phenylpropanoid pathway genes in vitro, but it is not involved in their regulation in vivo. *Mol Genet Genomics.* **267**: 16–26.
- Heinekamp T, Strathmann A, Kuhlmann M, Froissard M, Müller A, Perrot-Rechenmann C et Dröge-Laser W** (2004) The tobacco bZIP transcription factor BZI-1 binds the GH3 promoter in vivo and modulates auxin-induced transcription. *Plant J.* **38**: 298–309.
- Helariutta Y, Fukaki H, Wysłocka-Diller J, Nakajima K, Jung J, Sena G, Hauser MT et Benfey PN** (2000) The SHORT-ROOT gene controls radial patterning of the *Arabidopsis* root through radial signaling. *Cell.* **101**: 555–567.
- Henrissat B et Davies GJ** (1997) Structural and sequence based classification of glycosyl hydrolases. *Curr Opin Struct Biol.* **7**: 637–644.
- Himananen K, Boucheron E, Vanneste S, de Almeida Engler J, Inzé D et Beeckman T** (2002) Auxin-mediated cell cycle activation during early lateral root initiation. *Plant Cell.* **14**: 2339–2351.
- Hirsch AM, Lum MR et Downie JA** (2001) What makes the rhizobia-legume symbiosis so special? *Plant Physiol.* **127**: 1484–1492.
- Hoagland DR et Arnon DI** (1938) Synthetic media for hydroponic culture. *Calif Agr Expt Public.* **347**: 35–37.
- Hobbie LJ** (2006) Auxin and cell polarity: the emergence of AXR4. *Trends Plant Sci.* **11**: 517–518.
- Hocher V, Auguy F, Argout X, Laplaze L, Franche C et Bogusz D** (2006) Expressed sequence-tag analysis in *Casuarina glauca* actinorhizal nodule and root. *New Phytol.* **169**: 681–688.
- Howard JB, et Rees DC** (2000) Structure of the nitrogenase protein components. In *Prokaryotic nitrogen fixation : a model system for the analysis of a biological process*. Triplett, EW (ed) Horizon Scientific Press, Wymondham, UK.

- Hughes M, Donnelly C, Crozier A et Wheeler CT** (1999) Effects of the exposure of roots of *Alnus glutinosa* to light on flavonoids and nodulation. *Can J Bot.* **77**: 1311–1315.
- Huss-Danel K** (1997) Actinorhizal symbiosis and their N₂ fixation. *New Phytol.* **136**: 375–405.
- Hutcheson SW et Kosuge T** (1985) Regulation of 3-indoleacetic acid production in *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*. Purification and properties of tryptophan 2-monooxygenase. *J Biol Chem.* **260**: 6281–6287.
- Jasinski M, Ducos E, Martinoia E et Boutry M** (2003) The ATP-binding cassette transporters: structure, function, and gene family comparison between rice and Arabidopsis. *Plant Physiol.* **131**: 1169–1177.
- Jentschel K, Thiel D, Rehn F et Ludwig-Müller J** (2006) Arbuscular mycorrhiza enhances auxin levels and alters auxin biosynthesis in *Tropaeolum majus* during early stage of colonization. *Physiol Plant.* **129**: 320–333.
- Kaló P, Gleason C, Edwards A, Marsh J, Mitra RM, Hirsch S, Jakab J, Sims S, Long SR, Rogers J, Kiss GB, Downie JA et Oldroyd GE** (2005) Nodulation signaling in legumes requires NSP2, a member of the GRAS family of transcriptional regulators. *Science.* **308**: 1786–1789.
- Kaneshiro T et Kwolek WF** (1985) Stimulated nodulation of soybeans by *Rhizobium japonicum* mutant (B-14075) that catalyzes the conversion of tryptophan to indole-3yl-acetic acid. *Plant Science.* **42**: 141–146.
- Kape R, Parniske M et Werner D** (1991) Chemotaxis and nod Gene Activity of Bradyrhizobium japonicum in Response to Hydroxycinnamic Acids and Isoflavonoids. *Appl Environ Microbiol.* **57**: 316–319.
- Kepinski S et Leyser O** (2005a) Plant development: auxin in loops. *Curr Biol.* **15**: R208–R210.
- Kepinski S et Leyser O** (2005b) The Arabidopsis F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature.* **435**: 446–451.
- Kerr ID et Bennett MJ** (2007) New insight into the biochemical mechanisms regulating auxin transport in plants. *Biochem J.* **401**: 613–622.
- Kim HB, Lee H, Oh CJ, Lee NH et An CS** (2007) Expression of *EuNOD-ARP1* Encoding Auxin-repressed Protein Homolog Is Upregulated by Auxin and Localized to the Fixation Zone in Root Nodules of *Elaeagnus umbellata*. *Mol Cells.* **23**: 115–121.
- Kondorosi E, et Kondorosi A** (2000) Control of root nodule organogenesis. In *Prokaryotic nitrogen fixation : a model system for the analysis of a biological process*. Triplett, EW (ed) Horizon Scientific Press, Wymondham, UK.
- Kowalczyk M et Sandberg G** (2001) Quantitative analysis of indole-3-acetic acid metabolites in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **127**: 1845–1853.
- Kramer EM et Bennett MJ** (2006) Auxin transport: a field in flux. *Trends Plant Sci.* **11**: 382–386.
- Ky CL, Barre P, Lorieux M, Trouslot P, Akaffou S, Louarn J, Charrier A, Hamon S et Noirot M** (2000) Interspecific genetic linkage map, segregation distortion and genetic conversion in coffee (*Coffea* sp.). *Theor Appl Genet.* **101**: 669–676.
- Lambers H, Shane MW, Cramer MD, Pearse SJ et Veneklaas EJ** (2006) Root structure and functioning for efficient acquisition of phosphorus: Matching morphological and physiological traits. *Ann Bot (Lond).* **98**: 693–713.
- Lambrecht M, Okon Y, Vande Broek A et Vanderleyden J** (2000) Indole-3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria-plant interactions. *Trends Microbiol.* **8**: 298–300.
- Laplaze L** (1999) Approche moléculaire de la mise en place de la symbiose actinorhizienne. *Thèse*.
- Laplaze L, Duhoux E, Franche C, Frutz T, Svistoonoff S, Bisseling T, Bogusz D et Pawlowski K** (2000a) *Casuarina glauca* prenodule cells display the same differentiation as the corresponding nodule cells. *Mol Plant Microbe Interact.* **13**: 107–112.
- Laplaze L, Parizot B, Baker A, Ricaud L, Martinière A, Auguy F, Franche C, Nussaume L, Bogusz D et Haseloff J** (2005) GAL4-GFP enhancer trap lines for genetic manipulation of lateral root development in Arabidopsis thaliana. *J Exp Bot.* **56**: 2433–2442.
- Laplaze L, Ribeiro A, Franche C, Duhoux E, Auguy F, Bogusz D et 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**: 113–117.
- Laskowski M, Biller S, Stanley K, Kajstura T et Prusty R** (2006) Expression Profiling of Auxin-Treated Arabidopsis Roots: Toward a Molecular Analysis of Lateral Root Emergence. *Plant Cell Physiol.* **47**: 788–792.
- Lee KH et Larue TA** (1992) Exogenous Ethylene Inhibits Nodulation of *Pisum sativum* L. cv Sparkle. *Plant Physiol.* **100**: 1759–1763.
- Leyser O** (2006) Dynamic integration of auxin transport and signalling. *Curr Biol.* **16**: R424–R433.
- Limpens E, Franken C, Smit P, Willemse J, Bisseling T et Geurts R** (2003) LysM domain receptor kinases regulating rhizobial Nod factor-induced infection. *Science.* **302**: 630–633.
- Ljung K, Bhalerao RP et Sandberg G** (2001) Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in Arabidopsis during vegetative growth. *Plant J.* **28**: 465–474.
- Ljung K, Hull AK, Celenza J, Yamada M, Estelle M, Normanly J et Sandberg G** (2005) Sites and regulation of auxin biosynthesis in Arabidopsis roots. *Plant Cell.* **17**: 1090–1104.
- Ljung K, Hull AK, Kowalczyk M, Marchant A, Celenza J, Cohen JD et Sandberg G** (2002) Biosynthesis, conjugation, catabolism and homeostasis of indole-3-acetic acid in Arabidopsis thaliana. *Plant Mol Biol.* **49**: 249–272.
- Lohar DP, Schaff JE, Laskey JG, Kieber JJ, Bilyeu KD et Bird DM** (2004) Cytokinins play opposite roles in lateral root formation, and nematode and Rhizobial symbioses. *Plant J.* **38**: 203–214.
- Madsen EB, Madsen LH, Radutoiu S, Olbryt M, Rakwalska M, Szczylowski K, Sato S, Kaneko T, Tabata S, Sandal N et Stougaard J** (2003) A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. *Nature.* **425**: 637–640.
- Malamy JE et Benfey PN** (1997) Organization and cell differentiation in lateral roots of Arabidopsis thaliana. *Development.* **124**: 33–44.

- Manulis S, Haviv-Chesner A, Brandl MT, Lindow SE et Barash I** (1998) Differential involvement of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in pathogenicity and epiphytic fitness of *Erwinia herbicola* pv. *gypsophilae*. *Mol Plant Microbe Interact.* **11**: 634–642.
- Marchant A, Bhalerao R, Casimiro I, Eklöf J, Casero PJ, Bennett M et Sandberg G** (2002) AUX1 promotes lateral root formation by facilitating indole-3-acetic acid distribution between sink and source tissues in the *Arabidopsis* seedling. *Plant Cell.* **14**: 589–597.
- Marchant A, Kargul J, May ST, Muller P, Delbarre A, Perrot-Rechenmann C et Bennett MJ** (1999) AUX1 regulates root gravitropism in *Arabidopsis* by facilitating auxin uptake within root apical tissues. *EMBO J.* **18**: 2066–2073.
- Marín-Rodríguez MC, Orchard J et Seymour GB** (2002) Pectate lyases, cell wall degradation and fruit softening. *J Exp Bot.* **53**: 2115–2119.
- Martinoia E, Klein M, Geisler M, Bovet L, Forestier C, Kolukisaoglu U, Müller-Röber B et Schulz B** (2002) Multifunctionality of plant ABC transporters—more than just detoxifiers. *Planta.* **214**: 345–355.
- Mateos PF, Baker DL, Petersen M, Velázquez E, Jiménez-Zurdo JI, Martínez-Molina E, Squartini A, Orgambide G, Hubbell DH et Dazzo FB** (2001) Erosion of root epidermal cell walls by *Rhizobium* polysaccharide-degrading enzymes as related to primary host infection in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Can J Microbiol.* **47**: 475–487.
- Mathesius U** (2001) Flavonoids induced in cells undergoing nodule organogenesis in white clover are regulators of auxin breakdown by peroxidase. *J Exp Bot.* **52**: 419–426.
- Mathesius U, Charon C, Rolfe BG, Kondorosi A et Crespi M** (2000a) Temporal and spatial order of events during the induction of cortical cell divisions in white clover by *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* inoculation or localized cytokinin addition. *Mol Plant Microbe Interact.* **13**: 617–628.
- Mathesius U, Schlaman HR, Spaink HP, Of Sautter C, Rolfe BG et Djordjevic MA** (1998) Auxin transport inhibition precedes root nodule formation in white clover roots and is regulated by flavonoids and derivatives of chitin oligosaccharides. *Plant J.* **14**: 23–34.
- Mathesius U, Weinman JJ, Rolfe BG et Djordjevic MA** (2000b) *Rhizobia* can induce nodules in white clover by "hijacking" mature cortical cells activated during lateral root development. *Mol Plant Microbe Interact.* **13**: 170–182.
- Miller IM et Baker DD** (1985) The initiation, development and structure of root nodules in *Elaeagnus angustifolia* L. (Elaeagnaceae). *Protoplasma.* **128**: 107–119.
- Mitra RM, Gleason CA, Edwards A, Hadfield J, Downie JA, Oldroyd GE et Long SR** (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.
- Miwa H, Sun J, Oldroyd GE et Downie JA** (2006) Analysis of Nod-factor-induced calcium signaling in root hairs of symbiotically defective mutants of *Lotus japonicus*. *Mol Plant Microbe Interact.* **19**: 914–923.
- Moiroud A** (1996) Diversité et écologie des plantes actinorhiziennes. *Acta Bot Gall.* **143**: 651–661.
- Moulin L, Munive A, Dreyfus B et Boivin-Masson C** (2001) Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteobacteria. *Nature.* **411**: 948–950.
- Möller S, Croning MD et Apweiler R** (2001) Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions. *Bioinformatics.* **17**: 646–653.
- Mulder L, Hogg BV, Bersoult A et Cullimore JV** (2005) Integration of signalling pathways in the establishment of the legume-rhizobia symbiosis. *Physiologia Plantarum.* **123**: 207–218.
- Mullin BC et Dobritsa SV** (1996) Molecular analysis of actinorhizal symbiotic systems : progress to date. *Plant Soil.* **186**: 9–20.
- Murashige T et Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.* **15**: 473–497.
- Navarro L, Dunoyer P, Jay F, Arnold B, Dharmasiri N, Estelle M, Voinnet O et Jones JD** (2006) A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science.* **312**: 436–439.
- Neumann G et Martinoia E** (2002) Cluster roots—an underground adaptation for survival in extreme environments. *Trends Plant Sci.* **7**: 162–167.
- Neuteboom LW, Ng JM, Kuyper M, Clijdesdale OR, Hooykaas PJ et van der Zaal BJ** (1999a) Isolation and characterization of cDNA clones corresponding with mRNAs that accumulate during auxin-induced lateral root formation. *Plant Mol Biol.* **39**: 273–287.
- Neuteboom LW, Veth-Tello LM, Clijdesdale OR, Hooykaas PJ et van der Zaal BJ** (1999b) A novel subtilisin-like protease gene from *Arabidopsis thaliana* is expressed at sites of lateral root emergence. *DNA Res.* **6**: 13–19.
- Noh B, Murphy AS et Spalding EP** (2001) Multidrug resistance-like genes of *Arabidopsis* required for auxin transport and auxin-mediated development. *Plant Cell.* **13**: 2441–2454.
- Normand P, Lapierre P, Tisa LS, Gogarten JP, Alloisio N, Bagnarol E, Bassi CA, Berry AM, Bickhart DM, Choisine N, Couloux A, Cournoyer B, Cruveiller S, Daubin V, Demange N, Francino MP, Goltsman E, Huang Y, Kopp OR, Labarre L, Lapidus A, Lavire C, Marechal J, Martinez M, Mastrorunzio JE, Mullin BC, Niemann J, Pujic P, Rawnsley T, Rouy Z, Schenowitz C, Sellstedt A, Tavares F, Tomkins JP, Vallenet D, Valverde C, Wall LG, Wang Y, Medigue C et Benson DR** (2006) Genome characteristics of facultatively symbiotic *Frankia* sp. strains reflect host range and host plant biogeography. *Genome Res.* **17**: 7–15.
- Nukui N, Ezura H, Yuhashi K, Yasuta T et Minamisawa K** (2000) Effects of ethylene precursor and inhibitors for ethylene biosynthesis and perception on nodulation in *Lotus japonicus* and *Macroptilium atropurpureum*. *Plant Cell Physiol.* **41**: 893–897.
- Obertello M, Santi C, Sy MO, Laplaze L, Auguy F, Bogusz D et Franche C** (2005) Comparison of four constitutive promoters for the expression of transgenes in the tropical nitrogen-fixing tree *Allocasuarina verticillata*. *Plant Cell Rep.* **24**: 540–548.
- Obertello M, Sy MO, Laplaze L, Santi C, Svistoonoff S, Auguy F, Bogusz D et Franche C** (2003) Actinorhizal nitrogen fixing nodules : infection

- process, molecular biology and genomics. *Afr J Biotechnol.* 2: 528–538.
- Okushima Y, Fukaki H, Onoda M, Theologis A et Tasaka M** (2007) ARF7 and ARF19 Regulate Lateral Root Formation via Direct Activation of LBD/ASL Genes in Arabidopsis. *Plant Cell.* 19: 118–130.
- Oldroyd GE et Downie JA** (2006) Nuclear calcium changes at the core of symbiosis signalling. *Curr Opin Plant Biol.* 9: 351–357.
- Ovtsyna AO, Dolgikh EA, Kilanova AS, Tsyganov VE, Borisov AY, Tikhonovich IA et Staehelin C** (2005) Nod factors induce nod factor cleaving enzymes in pea roots. Genetic and pharmacological approaches indicate different activation mechanisms. *Plant Physiol.* 139: 1051–1064.
- Paciorek T et Friml J** (2006) Auxin signaling. *J Cell Sci.* 119: 1199–1202.
- Pacios-Bras C, Schlaman HR, Boot K, Admiraal P, Langerak JM, Stougaard J et Spaik HP** (2003) Auxin distribution in Lotus japonicus during root nodule development. *Plant Mol Biol.* 52: 1169–1180.
- Paponov IA, Teale WD, Trebar M, Blilou I et Palme K** (2005) The PIN auxin efflux facilitators: evolutionary and functional perspectives. *Trends Plant Sci.* 10: 170–177.
- Parry G, Delbarre A, Marchant A, Swarup R, Napier R, Perrot-Rechenmann C et Bennett MJ** (2001a) Novel auxin transport inhibitors phenocopy the auxin influx carrier mutation aux1. *Plant J.* 25: 399–406.
- Parry G, Marchant A, May S, Swarup R, Swarup K, James N, Graham N, Allen T, Martucci T, Yemm A, Napier R, Manning K, King G et Bennett M** (2001b) Quick on the uptake : Characterization of a family of plant auxin influx carriers. *J Plant Growth Reg.* 20: 217–225.
- Patriarca EJ, Tatè R, Ferraioli S et Iaccarino M** (2004) Organogenesis of legume root nodules. *Int Rev Cytol.* 234: 201–262.
- Pawlowski K et Bisseling T** (1996) Rhizobial and Actinorhizal Symbioses: What Are the Shared Features? *Plant Cell.* 8: 1899–1913.
- Pawlowski K et Sirrenberg A** (2003) Symbiosis between Frankia and actinorhizal plants: root nodules of non-legumes. *Indian J Exp Biol.* 41: 1165–1183.
- Perret X, Staehelin C et Broughton WJ** (2000) Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol Mol Biol Rev.* 64: 180–201.
- Petrasek J, Mravec J, Bouchard R, Blakeslee JJ, Abas M, Seifertová D, Wisniewska J, Tadele Z, Kubes M, Covanová M, Dhonukshe P, Skupa P, Benková E, Perry L, Krecek P, Lee OR, Fink GR, Geisler M, Murphy AS, Luschnig C, Zazimalova E et Friml J** (2006) PIN Proteins Perform a Rate-Limiting Function in Cellular Auxin Efflux. *Science.* 312: 914–918.
- Prayitno J, Rolfe BG et Mathesius U** (2006) The Ethylene Insensitive sickle Mutant of Medicago truncatula Shows Altered Auxin Transport Regulation during Nodulation. *Plant Physiol.* 142: 168–180.
- Quint M et Gray WM** (2006) Auxin signaling. *Curr Opin Plant Biol.* 8: 448–453.
- Radutoiu S, Madsen LH, Madsen EB, Felle HH, Umehara Y, Grønlund M, Sato S, Nakamura Y, Tabata S, Sandal N et Stougaard J** (2003) Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature.* 425: 585–592.
- Rangaraj P, Rüttimann-Johnson C, Shah VK, et Ludden PW** (2000) Biosynthesis of the iron-molybdenum and iron-vanadium cofactors of the nif- and vnf-encoded nitrogenases. In *Prokaryotic nitrogen fixation : a model system for the analysis of a biological process*. Triplett, EW (ed) Horizon Scientific Press, Wymondham, UK.
- Rashotte AM, Brady SR, Reed RC, Ante SJ et Muday GK** (2000) Basipetal auxin transport is required for gravitropism in roots of Arabidopsis. *Plant Physiol.* 122: 481–490.
- Reed RC, Brady SR et Muday GK** (1998) Inhibition of auxin movement from the shoot into the root inhibits lateral root development in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 118: 1369–1378.
- Rees DC et Howard JB** (2000) Nitrogenase: standing at the crossroads. *Curr Opin Chem Biol.* 4: 559–566.
- Rubio LM et Ludden PW** (2005) Maturation of nitrogenase: a biochemical puzzle. *J Bacteriol.* 187: 405–414.
- Sauer M, Balla J, Luschnig C, Wisniewska J, Reinöhl V, Friml J et Benková E** (2006) Canalization of auxin flow by Aux/IAA-ARF-dependent feedback regulation of PIN polarity. *Genes Dev.* 20: 2902–2911.
- Savka MA, Dessaux Y, Oger P et Rossbach S** (2002) Engineering bacterial competitiveness and persistence in the phytosphere. *Mol Plant Microbe Interact.* 15: 866–874.
- Schmidt JS, Harper JE, Hoffman TK et Bent AF** (1999) Regulation of soybean nodulation independent of ethylene signaling. *Plant Physiol.* 119: 951–960.
- Schnabel EL et Frugoli J** (2004) The PIN and LAX families of auxin transport genes in Medicago truncatula. *Mol Genet Genomics.* 272: 420–432.
- Schwencke J, Bureau JM, Crosnier MT et Brown S** (1998) Cytometric determination of genome size and base composition of tree species of three genera of Casuarinaceae. *Plant Cell Rep.* 18: 346–349.
- Smit P, Raedts J, Portyanko V, Debellé F, Gough C, Bisseling T et Geurts R** (2005) NSP1 of the GRAS protein family is essential for rhizobial Nod factor-induced transcription. *Science.* 308: 1789–1791.
- Soltis DE, Soltis PS, Morgan DR, Swensen SM, Mullin BC, Dowd JM et Martin PG** (1995) Chloroplast gene sequence data suggest a single origin of the predisposition for symbiotic nitrogen fixation in angiosperms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92: 2647–2651.
- Stacey G, Libault M, Brechenmacher L, Wan J et May GD** (2006) Genetics and functional genomics of legume nodulation. *Curr Opin Plant Biol.* 9: 110–121.
- Supanjani S, Habib A, Mabood F, Lee KD, Donnelly D et Smith DL** (2006) Nod factor enhances calcium uptake by soybean. *Plant Physiol Biochem.* 44: 866–872.
- Svistoonoff S** (2003) Implication d'une subtilase dans les étapes précoces des symbioses actinorhiziennes. *Thèse.*
- Svistoonoff S, Laplaze L, Auguy F, Runions J, Duponnois R, Haseloff J, Franche C et Bogusz D** (2003) cg12 expression is specifically linked to infection of root hairs and cortical cells during Casuarina glauca and

- Allocasuarina verticillata actinorhizal nodule development. *Mol Plant Microbe Interact.* **16**: 600–607.
- Swarup R et Bennett MJ** (2003) Auxin transport: the fountain of life in plants? *Dev Cell.* **5**: 824–826.
- Swarup R, Friml J, Marchant A, Ljung K, Sandberg G, Palme K et Bennett MJ** (2001) Localization of the auxin permease AUX1 suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in the Arabidopsis root apex. *Genes Dev.* **15**: 2648–2653.
- Swarup R, Kargul J, Marchant A, Zadik D, Rahman A, Mills R, Yemm A, May S, Williams L, Millner P, Tsurumi S, Moore I, Napier R, Kerr ID et Bennett MJ** (2004) Structure–function analysis of the presumptive Arabidopsis auxin permease AUX1. *Plant Cell.* **16**: 3069–3083.
- Swarup R, Kramer EM, Perry P, Knox K, Leyser HM, Haseloff J, Beemster GT, Bhalerao R et Bennett MJ** (2005) Root gravitropism requires lateral root cap and epidermal cells for transport and response to a mobile auxin signal. *Nat Cell Biol.* **7**: 1057–1065.
- Swensen SM** (1996) The evolution of actinorhizal symbiosis: evidence for multiple origins of the symbiotic association. *Am J Bot.* **83**: 1503–1512.
- Teale WD, Paponov IA et Palme K** (2006) Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **7**: 847–859.
- Terasaka K, Blakeslee JJ, Titapiwatanakun B, Peer WA, Bandyopadhyay A, Makam SN, Lee OR, Richards EL, Murphy AS, Sato F et Yazaki K** (2005) PGP4, an ATP binding cassette P-glycoprotein, catalyzes auxin transport in Arabidopsis thaliana roots. *Plant Cell.* **17**: 2922–2939.
- Tian Q, Uhlir NJ et Reed JW** (2002) Arabidopsis SHY2/IAA3 inhibits auxin-regulated gene expression. *Plant Cell.* **14**: 301–319.
- Timmers AC, Auriac MC et Truchet G** (1999) Refined analysis of early symbiotic steps of the Rhizobium–Medicago interaction in relationship with microtubular cytoskeleton rearrangements. *Development.* **126**: 3617–3628.
- Timmers AC, Vallotton P, Heym C et Menzel D** (2007) Microtubule dynamics in root hairs of Medicago truncatula. *Eur J Cell Biol.* **86**: 69–83.
- Tirichine L, Sandal N, Madsen LH, Radutoiu S, Albrechtsen AS, Sato S, Asamizu E, Tabata S et Stougaard J** (2007) A gain-of-function mutation in a cytokinin receptor triggers spontaneous root nodule organogenesis. *Science.* **315**: 104–107.
- Torrey JG** (1976) Initiation and development of root nodules of Casuarina (Casuarinaceae). *Am J Bot.* **63**: 335–345.
- Tyagi AK, Khurana JP, Khurana P, Raghuvanshi S, Gaur A, Kapur A, Gupta V, Kumar D, Ravi V, Vij S, Khurana P et Sharma S** (2004) Structural and functional analysis of rice genome. *J Genet.* **83**: 79–99.
- Udvardi MK, Tabata S, Parniske M et Stougaard J** (2005) Lotus japonicus: legume research in the fast lane. *Trends Plant Sci.* **10**: 222–228.
- van Brussel AA, Bakhuizen R, Van Sprosen PC, Spaik HP, Tak T et Lugtenberg BJJ** (1992) Induction of preinfection thread structures in the leguminous host plant by mitogenic lipo-oligosaccharides of Rhizobium. *Science.* **257**: 70–71.
- van Brussel AA, Recourt K, Pees E, Spaik HP, Tak T, Wijffelman CA, Kijne JW et Lugtenberg BJJ** (1990) A biovar-specific signal of Rhizobium leguminosarum bv. viciae induces increased nodulation gene-inducing activity in root exudate of Vicia sativa subsp. nigra. *J Bacteriol.* **172**: 5394–5401.
- van Ghelue M, Lovaas E, Ringo E et Solheim B** (1997) Production and specificity of root hair deformation factor(s). *Physiol Plant.* **99**: 579–587.
- Vanneste S, De Rybel B, Beemster GT, Ljung K, De Smet I, Van Isterdael G, Naudts M, Iida R, Gruissem W, Tasaka M, Inzé D, Fukaki H et Beeckman T** (2005a) Cell cycle progression in the pericycle is not sufficient for SOLITARY ROOT/IAA14-mediated lateral root initiation in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell.* **17**: 3035–3050.
- Vanneste S, Maes L, De Smet I, Himanen K, Naudts M, Inzé D et Beeckman T** (2005b) Auxin regulation of cell cycle and its role during lateral root initiation. *Physiol Plant.* **123**: 139–146.
- Vieten A, Vanneste S, Wisniewska J, Benková E, Benjamins R, Beeckman T, Luschnig C et Friml J** (2005) Functional redundancy of PIN proteins is accompanied by auxin-dependent cross-regulation of PIN expression. *Development.* **132**: 4521–4531.
- Vissenberg K, Fry SC, Pauly M, Höfte H et Verbelen JP** (2005) XTH acts at the microfibril–matrix interface during cell elongation. *J Exp Bot.* **56**: 673–683.
- Wais RJ, Keating DH et Long SR** (2002) Structure–function analysis of nod factor-induced root hair calcium spiking in Rhizobium–legume symbiosis. *Plant Physiol.* **129**: 211–224.
- Wasson AP, Pellerone FI et Mathesius U** (2006) Silencing the Flavonoid Pathway in Medicago truncatula Inhibits Root Nodule Formation and Prevents Auxin Transport Regulation by Rhizobia. *Plant Cell.* **18**: 1617–1629.
- Wen F, Laskowski M et Hawes M** (2006) Cell separation in roots. *Ann Plant Reviews.* **25**: 91–105.
- Wheeler CT, Crozier A et Sandberg G** (1984) The biosynthesis of indole-3-acetic acid by Frankia. *Plant Soil.* **78**: 99–104.
- Wheeler CT, Henson IE et MacLaughlin ME** (1979) Hormones in plants bearing actinomycete nodules. *Bot Gaz.* **140**: 52–57.
- Wisniewska J, Xu J, Seifertová D, Brewer PB, Ruzicka K, Blilou I, Roquie D, Benková E, Scheres B et Friml J** (2006) Polar PIN Localization Directs Auxin Flow in Plants. *Science.* **312**: 883.
- Wood SM et Newcomb W** (1989) Nodule morphogenesis: the early infection of Alfalfa (Medicago sativa) root hairs by Rhizobium meliloti. *Can J Bot.* **67**: 3108–3122.
- Woodward AW et Bartel B** (2005) Auxin: regulation, action, and interaction. *Ann Bot (Lond).* **95**: 707–735.
- Yang WC, Canter Cremers HC, Hogendijk P, Katinakis P, Wijffelman CA, Franssen H, van Kammen A et Bisseling T** (1992) In-situ localization of chalcone synthase mRNA in pea root nodule development. *Plant J.* **2**: 143–151.
- Yang Y, Hammes UZ, Taylor CG, Schachtman DP et Nielsen E** (2006) High-Affinity Auxin Transport by the AUX1 Influx Carrier Protein. *Curr Biol.* **160**: 1123–1127.

Young GB, Jack DL, Smith DW et Saier MH (1999) The amino acid/auxin:proton symport permease family. *Biochim Biophys Acta.* **1415**: 306–322.

Zhang B, Wang Q et Pan X (2007) MicroRNAs and their regulatory roles in animals and plants. *J Cell Physiol.* **210**: 279–289.

RÉSUMÉ

Les plantes actinorhiziennes appartiennent à 8 familles d'angiosperme et forment une symbiose fixatrice d'azote avec l'actinomycète du sol *Frankia* qui aboutit à la formation de nodules au niveau du système racinaire de la plante. Le nodule actinorhizien est considéré comme une racine latérale modifiée car i) il provient de divisions des cellules du péricycle situées en face du pôle de xylème, ii) il possède un méristème apical et un système vasculaire central et iii) chez certaines espèces comme *Casuarina glauca* une racine nodulaire est produite à l'apex de chaque lobe nodulaire. L'auxine, et notamment le transport d'influx, est impliquée dans la mise en place de la racine latérale. Nous avons donc identifié des gènes de transporteurs d'influx d'auxine chez la plante actinorhizienne *C. glauca* et étudié le rôle du transport d'influx au cours de la mise en place du nodule actinorhizien.

Deux gènes de la famille *AUX-LAX* codant des transporteurs d'influx d'auxine ont été identifiés *C. glauca*. Les profils d'expression des gènes *CgAUX1* et *CgLAX3* sont très conservés entre *C. glauca* et *Arabidopsis thaliana*. De plus, des analyses fonctionnelles par complémentation de mutants d'*A. thaliana* ont mis en évidence une équivalence entre *CgAUX1* et *AtAUX1*. Nos études suggèrent également qu'il existe une divergence fonctionnelle au sein de la famille *AUX-LAX*.

Nous avons analysé le rôle de ces gènes au cours de la mise en place de la symbiose. Notre étude montre que le gène *CgAUX1* est exprimé dans les cellules infectées tout au long de l'infection. De plus, le rôle du transport d'influx d'auxine dans le mécanisme d'infection a été confirmé par l'utilisation d'un inhibiteur du transport d'influx. Par ailleurs, le gène *CgAUX1* est exprimé dans le primordium de racine latérale mais pas dans le primordium nodulaire. Cela suggère que ces deux organes présentent des différences dans leur programme de développement.

Afin d'identifier les mécanismes agissant en aval du transport d'influx d'auxine, nous avons étudié le rôle d'*AtLAX3* chez *Arabidopsis*. Nous avons montré qu'un certain nombre de gènes de remodelage de la paroi sont induits par l'auxine de façon dépendante d'*AtLAX3* au cours de l'émergence de la racine latérale. Nous avons cherché à identifier des gènes de remodelage de la paroi qui pourraient être impliqués dans l'infection par la bactérie *Frankia* de façon dépendante de *CgAUX1*. *Cg12* qui code une protéase de type subtilisine spécifiquement exprimée dans les cellules infectées pourrait être une cible de la signalisation auxinique dépendante de *CgAUX1*.

Nos résultats suggèrent que le transport d'influx d'auxine est impliqué dans la mise en place du nodule actinorhizien chez *C. glauca*.

ABSTRACT

Actinorhizal plants belonging to 8 families of angiosperms can enter symbiosis with a soil actinomycete called *Frankia*. This interaction leads to the formation of nitrogen fixing nodules on the plant root system. The actinorhizal nodule is considered as a modified lateral root because i) it originates from divisions of pericycle cells situated in front of xylem poles, ii) its vasculature is central and its growth is indeterminate due to the presence of an apical meristem and iii) in some species such as *Casuarina glauca* a so-called "nodular root" is formed at the apex of each nodule lobe. Auxin, and more particularly auxin influx, is involved in lateral root formation. We identified auxin influx transporter genes in the actinorhizal plant *C. glauca* and studied the role of auxin influx transport during actinorhizal nodule formation.

Two *AUX-LAX* genes encoding for auxin influx carriers have been identified in *C. glauca*. The expression patterns of *CgAUX1* and *CgLAX3* are highly conserved between *C. glauca* and *Arabidopsis thaliana*. Functional complementation of the *Arabidopsis aux1* mutant revealed that *CgAUX1* and *AtAUX1* share equivalent functions. Our data suggest that functional divergence exists in the *AUX-LAX* family.

We analysed the role of these genes during the actinorhizal symbiosis. Expression studies showed that *CgAUX1* is expressed in all infected cells. Moreover, we confirmed that auxin influx transport is involved in the symbiotic process by taking advantage of an auxin influx transport inhibitor. We also observed that *CgAUX1* is expressed in lateral root primordium but not in nodule primordium thus pinpointing some differences in the developmental program of these two organs.

We then tried to identify the mechanisms acting downstream of auxin influx transport by studying the role of *AtLAX3* in *Arabidopsis*. We showed that a set of cell wall remodeling genes are induced by auxin in a *AtLAX3* dependent way during lateral root emergence. We next tried to identify cell wall remodeling genes that could be involved in the infection process in a *CgAUX1* dependent way. *Cg12* encodes for a subtilisin-like protease that is specifically expressed in *Frankia* infected cells and could be a target of *CgAUX1* dependent auxin signaling.

Our results suggest that auxin influx transport is involved in the infection process during actinorhizal nodule formation in *C. glauca*.