

TRANSFORMATION CHEZ LES PLANTES FIXATRICES D'AZOTE

Emile DUHOUX, Didier BOGUSZ et Claudine FRANCHE
BSFT (ORSTOM-CTFT/CIRAD)
45 Bis Avenue de la Belle Gabrielle
94736 Nogent sur Marne, France

Résumé: Les techniques classiques d'amélioration végétale par hybridation sexuée, fusion somatique et mutagenèse artificielle, conduisent à l'introduction, en mélange et de manière aveugle, d'informations génétiques dans la descendance. Or, de plus en plus, on souhaite introduire seulement un ou quelques caractères nouveaux, parfaitement identifiés, sans bouleverser l'architecture génétique globale de la plante. Les transformations génétiques assurent cette opération. Il n'y a pas actuellement de méthode de transformation universelle et généralisable à toutes les plantes et les différentes approches de transformation sont exposées: méthodes de transformation utilisant un vecteur biologique (*Agrobacterium tumefaciens* et *A. rhizogenes*); méthodes de transfert direct (électroporation, et canon à particules). Cette dernière technique, encore peu utilisée chez les plantes fixatrices d'azote, devrait connaître un développement important au cours des prochaines années. En plus des cibles recherchées chez la plupart des plantes de grande culture (résistance aux pathogènes, tolérance aux stress), les Légumineuses offrent des cibles de transformation plus spécifiques (synthèse de protéines de réserves, comme l'albumine chez les légumineuses à graines, ou la biosynthèse d'acides aminés sulfurés chez les légumineuses fourragères). Les techniques de transformation génétique constituent également une voie obligatoire pour étudier l'expression et la régulation des gènes intervenant dans la symbiose *Leguminosae-Rhizobium* ou *Casuarinaceae-Frankia*, spécialement ceux qui sont exprimés de manière temporaire ou spécifique dans certains tissus. Une meilleure compréhension des mécanismes présidant à l'interaction plante-microorganisme symbiotique devrait fournir des éléments d'informations sur les possibilités d'étendre l'aptitude à fixer l'azote atmosphérique à d'autres groupes de plantes.

Abstract: Classical techniques of plant improvement by sexual hybridization, somatic fusion and artificial mutagenesis lead to the introduction of mixed, unplanned genetic materials in the progeny. However, there is a growing demand for the introduction of one or a few more perfectly identifiable new traits without disturbing the overall genetic architecture of the plant. Genetic transformation can be used for this operation. There is as yet no universal transformation method that can be used for all plants; this report presents various approaches to transformation work i.e., methods of transformation using a biological vector (*Agrobacterium tumefaciens* and *A. rhizogenes*), direct transfer methods by electroporation and by particle jets... a method that is not widely used on nitrogen-fixing plants but is expected to become increasingly important in the coming years. Besides the usual targets for major crops (disease resistance, stress tolerance), legumes may be targeted for more specific transformation (synthesis of reserve proteins, like albumin in seed legumes and biosynthesis of sulfated amino acids in the food legumes). Genetic transformation techniques are also essential in studying the expression and regulation of genes that play a role in the *Leguminosae-Rhizobium* or *Casuarinaceae-Frankia* symbiosis, especially the specific, or timebound ones in certain tissue. A better understanding of the mechanisms of interaction between symbiotic plants and microorganisms should provide information on the possibility of transferring the capacity to fix nitrogen from the atmosphere to the other plant communities.

La somme considérable des résultats accumulés ces dernières années en biologie moléculaire et en génie génétique a abouti à la naissance d'une nouvelle biotechnologie végétale, les transformations génétiques. L'intégration et l'expression d'un gène étranger dans une cellule végétale ont d'abord emprunté le système naturel de transfert d'information génétique entre les bactéries du sol *Agrobacterium tumefaciens* ou *A. rhizogenes*, et la plante. Puis des techniques de transfert direct d'ADN sont apparues, comme l'électroporation ou la biolistique par exemple.

Ces techniques ont permis une avancée majeure en amélioration végétale puisque désormais il est possible de faire intégrer un caractère agronomique nouveau, sans bouleversement génétique global de la plante. Les premiers résultats intéressants ont d'abord été obtenus avec des plantes modèles, ayant une bonne aptitude à régénérer *in vitro*, comme le tabac et la tomate (Horsch *et al.* 1985, McCormick *et al.* 1986). Puis les techniques ont été appliquées à des plantes d'intérêt agronomique.

Parmi ces dernières, les plantes fixatrices d'azote atmosphérique constituent un groupe important. Tout d'abord, l'amélioration des potentialités de fixation d'azote et le transfert de cette propriété à d'autres plantes constituent toujours un défi d'actualité. Ensuite, ces systèmes symbiotiques sont d'excellents modèles d'étude d'interaction plante-microorganisme.

Après avoir rappelé les principales techniques de transformation génétique, nous présenterons un bilan des résultats de transfert de gènes obtenus dans les systèmes symbiotiques fixateurs d'azote. Nous essaierons de montrer ensuite, comment l'utilisation d'un microorganisme, *Agrobacterium*, peut d'une part, contribuer à la connaissance de l'expression des gènes de la symbiose, d'autre part, constituer un outil d'amélioration de ces symbioses.

Les méthodes de transfert de gènes utilisées

On connaît actuellement deux types de méthodes, selon que le transfert fait appel à un vecteur biologique (*Agrobacterium*) ou peut être tenté directement (transfert direct).

Transfert par les Agrobacterium

Propriétés des Agrobacterium

Agrobacterium tumefaciens et *A. rhizogenes* sont les agents respectivement responsables de la galle du collet "crown-gall" et du "hairy-root" sur de nombreuses espèces végétales. On sait depuis 1974 que cette transformation des cellules végétales est en fait l'oeuvre de plasmides présents dans les souches virulentes d'*Agrobacterium* (Zaenen *et al.* 1974) et depuis 1977 que la transformation des cellules végétales résulte de l'intégration dans leur génome d'un fragment d'ADN (appelé T-DNA) issu de ces plasmides (Chilton *et al.* 1977). De nombreuses études approfondies ont été depuis lors menées sur l'analyse des mécanismes moléculaires du transfert des plasmides Ti, responsable des tumeurs d'*A. tumefaciens* et Ri, responsable du hairy-root d'*A. rhizogenes* (Zambryski *et al.* 1989 et Hooykaas 1989).

Utilisation d'*Agrobacterium* comme vecteur de gènes pour les plantes

Pour obtenir des plantes transformées présentant un nouveau caractère, il est nécessaire de remplacer le T-DNA et ses caractères indésirables par le(s) gène(s) à introduire dans l'espèce considérée.

On a l'habitude de distinguer deux types de vecteurs selon que les fonctions de virulence sont portées en *cis* sur le même replicon ou en *trans* sur un autre plasmide (Klee *et al.* 1987). Dans le cas des vecteurs binaires, la région *vir* est portée sur un plasmide Ti ou Ri débarrassé de son T-DNA. Le gène à transférer est encadré par les séquences de bordure d'un autre plasmide, à large spectre d'hôte, compatible avec Ri ou Ti (voir Figure 1). Dans le cas des vecteurs intermédiaires, le gène à introduire est manipulé dans *Escherichia coli* à l'aide d'un vecteur de clonage standard, puis introduit dans *Agrobacterium*; grâce à une cassette d'homologie, on force la cointégration de ce vecteur dans le plasmide Ri ou Ti désarmé entre les séquences de bordures. Dans les deux cas, le T-DNA artificiel est mobilisé par les fonctions de virulence pour être transféré dans le génome de la plante (Figure 1).

Les tumeurs obtenues à la suite d'une infection par *A. tumefaciens* sont des chimères (mélange de cellules transformées et cellules normales). Pour obtenir des plantes transformées, les oncogènes devront être remplacés par un gène conférant un caractère de résistance à un antibiotique par exemple, qui permette de sélectionner les seules cellules transformées. On devra ensuite à partir des cals sélectionnés, procéder à la régénération de la plante et éventuellement à sa micropropagation. Au contraire, les racines obtenues à la suite d'une infection par *A. rhizogenes* sont constituées par des cellules qui sont toutes transformées. Les racines hairy-root devront elles aussi régénérer des bourgeons pour que l'on puisse obtenir des plantes transgéniques. Les plantes régénérées possèdent un phénotype hairy-root indésirable dont on peut se débarrasser, par criblage des descendants obtenus par voie sexuée.

Pour être exprimée dans la plante, la séquence codante du gène étranger doit être sous la dépendance de séquences régulatrices (promoteur, signal de terminaison de type eucaryote). Les gènes de synthèse d'opines (nos: gène de la nopaline synthèse) des T-DNA possèdent de telles séquences. Ces dernières sont souvent utilisées dans la construction des gènes chimères. L'expression des gènes étrangers dans les plantes transgéniques est jusqu'à présent essentiellement sous le contrôle de promoteurs et séquences régulatrices exprimés constitutivement dans la plante. Dans le cas des recherches à caractère appliqué, on note cependant un intérêt croissant pour l'utilisation de promoteurs exprimés spécifiquement dans certains tissus ou en réponse à des stress particuliers.

L'isolement de gènes dits "reporteur" a permis ces dernières années des progrès considérables tant dans la détection visuelle au niveau cellulaire des processus de transformation, que dans l'étude des mécanismes d'expression des gènes végétaux. Le gène le plus fréquemment utilisé, *uidA*, a été isolé de la bactérie *Escherichia coli*; il détermine la synthèse de la β -glucuronidase (GUS) dont l'activité se traduit par la conversion d'un substrat incolore (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -glucuronide) en un précipité bleu indigo dans le cytoplasme des cellules transformées. Des dosages fluorométriques extrêmement sensibles de l'activité β -glucuronidase permettent également des études quantitatives fines (Jefferson 1987).

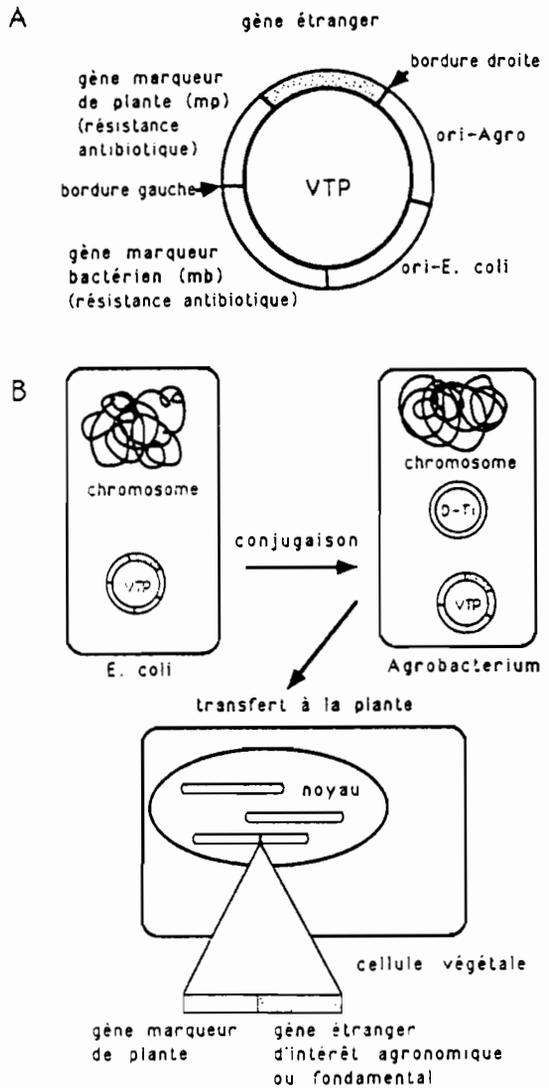
Figure 1. Transformation d'une cellule végétale par *Agrobacterium*

A: Vecteur de transformation de plante (VTP)

Le plasmide contient une origine de réplication qui permet sa multiplication chez *Agrobacterium* (Ori-Agro) et chez *E. coli* (Ori-E. coli). Deux gènes marqueurs de résistance sont présents sur le plasmide; l'un, "mb", permet une sélection des bactéries transformées par ce plasmide; l'autre, "mp", est exprimé dans les plantes et assure la sélection des cellules végétales transformées. Ce vecteur contient également des sites multiples de clonage dans lesquels sont insérés les gènes étrangers que l'on souhaite exprimer dans la plante, et les bordures droite et gauche du T-DNA; ces bordures sont reconnues par les fonctions de transfert d'*Agrobacterium* et délimitent la région transférée dans la plante.

B: Représentation schématique d'une expérience de transformation avec un vecteur binaire

Le vecteur VTP manipulé génétiquement chez *E. coli* est transféré à *Agrobacterium* par une technique de conjugaison (ou encore d'électroporation). La souche réceptrice d'*Agrobacterium* contient un plasmide Ti désarmé (D-Ti), c'est-à-dire délété des gènes oncogènes. Les fonctions de virulence présentes sur le D-Ti agissent en trans sur les bordures du "VTP" et initient la mobilisation et le transfert des gènes contenus entre les bordures. Le phénotype conféré par le gène marqueur (mp) permet la sélection des cellules végétales transformées.



Le transfert direct

La transformation directe fait appel à des techniques qui permettent, à l'aide de moyens chimiques ou physiques de transférer de l'ADN dans des cellules sans intermédiaire biologique. Parmi les techniques mises au point chez les végétaux on peut citer la transformation par le polyéthylène glycol (Davey *et al.* 1980), la fusion de protoplastes avec des liposomes (Caboche 1984) et l'électroporation (Guerche 1990).

Depuis 1987, on a vu apparaître une technique nouvelle, la biolistique, où l'introduction de matériel génétique est réalisée par l'intermédiaire de microprojectiles accélérés à grande vitesse dans un canon à particules (Klein *et al.* 1987). Cette technique se perfectionne d'année en année et on peut prévoir que d'ici peu, des espèces insensibles aux techniques précédentes, seront génétiquement transformables (Franche 1991).

Les espèces fixatrices d'azote transformées

Une compilation des travaux effectués sur les plantes fixatrices d'azote est donnée dans le Tableau 1. Ce tableau présente le nom des espèces de légumineuses et non-légumineuses et celui des gènes qui ont été transférés. Il ne dresse pas nécessairement tous les tests de sensibilité qui ont été réalisés sur diverses espèces (Tepfer 1990 et Porter 1991) qui ne font apparaître que les premiers stades de la transformation (hairy-root lors de l'inoculation avec *A. rhizogenes*).

Les résultats du Tableau 1 montrent que de nombreuses espèces sont sensibles à l'infection par les *Agrobacterium*, ce qui justifie l'importance du nombre de résultats obtenus par cette voie. On compte huit espèces différentes de plantes transgéniques avec seulement une espèce arborescente (*Allocasuarina*), et pas de luzerne diploïde.

Les gènes transférés: résultats et intérêts

Les transformations génétiques constituent d'abord un outil de connaissance et de contrôle des mécanismes physiologiques et biochimiques impliqués dans les interactions plante-microorganismes et nous présenterons un exemple avec le rôle des lectines dans la nodulation des légumineuses. Ensuite, les transformations génétiques constituent une technique d'étude des mécanismes d'expression de ces gènes dans le génome de la plante-hôte et de leur régulation au cours du développement de la plante.

La première moisson de résultats obtenus chez les plantes fixatrices d'azote concerne les phénomènes de régulation qui existent à la fois entre les séquences qui constituent les différentes régions du gène (cis-acting factors) et entre l'ensemble de ces séquences et les protéines non encore identifiées, agissant en *trans* sur l'ADN (trans-acting factors). Enfin, les premiers résultats de ces connaissances fondamentales commencent à être mis à profit dans des programmes d'application agronomique et nous l'évoquerons.

Tableau 1. Transformations génétiques chez les plantes fixatrices d'azote

On a indiqué dans le tableau les espèces chez lesquelles on a régénéré des plantes transgéniques (+), ou obtenu seulement les premières réponses à l'infection par les *Agrobacterium*. Les références font état des principaux travaux sur une espèce donnée; voir dans le texte (*) par exemple d'autres cas de gènes introduits.

| Espèces | Technique | Gène | Plante transgénique | Références |
|---------------------------------------|-----------------------|-----------------|---------------------|---------------------------------|
| Leguminosae | | | | |
| <i>Abrus precatorius</i> | <i>A. rhizogenes</i> | | | Tepfer <i>et al.</i> (1989) |
| <i>Arachis hypogaea</i> | <i>A. rhizogenes</i> | | | Mugnier (1988) |
| <i>Acacia drummondii</i> | <i>A. rhizogenes</i> | | | Porter (1991) |
| <i>Cassia torosa</i> | <i>A. rhizogenes</i> | | | in Tepfer (1990) |
| <i>Cassia obtusifolia</i> | <i>A. rhizogenes</i> | | | |
| <i>Cassia occidentalis</i> | <i>A. rhizogenes</i> | | | |
| <i>Glycine canescens</i> | <i>A. rhizogenes</i> | | + | Rech <i>et al.</i> (1988) |
| <i>Glycine clandestina</i> | <i>A. rhizogenes</i> | | | Rech <i>et al.</i> (1988) |
| <i>Glycine max</i> | <i>A. rhizogenes</i> | | | in Tepfer (1990) |
| | <i>A. tumefaciens</i> | | | Pedersen <i>et al.</i> (1983) |
| | <i>A. tumefaciens</i> | Rubisco-nptII | | Facciotti <i>et al.</i> (1985) |
| | <i>A. tumefaciens</i> | Gus,nptII,EPSP | + | Hinchee <i>et al.</i> (1988) |
| | microprojectiles | Gus,nptII | + | McCabe <i>et al.</i> (1988) |
| <i>Lotus corniculatus</i> (*) | <i>A. tumefaciens</i> | | + | Petit <i>et al.</i> (1987) |
| | <i>A. rhizogenes</i> | Legh-cat (soja) | + | Jensen <i>et al.</i> (1986) |
| | <i>A. rhizogenes</i> | GS (soja) | + | Miao <i>et al.</i> (1991) |
| <i>Lupinus albus</i> | <i>A. rhizogenes</i> | | | Mugnier 1988 |
| <i>Lupinus polyphyllus</i> | <i>A. rhizogenes</i> | | | Mugnier 1988 |
| <i>Macroptilium atropurpureum</i> | <i>A. rhizogenes</i> | | | Beach <i>et al.</i> (1988) |
| <i>Medicago arborea</i> (1991) | <i>A. rhizogenes</i> | HPT | + | Damiani and Arcioni |
| <i>Medicago sativa</i> | <i>A. rhizogenes</i> | | + | Sukhapinda <i>et al.</i> (1987) |
| | <i>A. rhizogenes</i> | | + | Spano <i>et al.</i> (1987) |
| | <i>A. tumefaciens</i> | nos-nptII | + | Shahin <i>et al.</i> (1986) |
| | <i>A. tumefaciens</i> | pea-albumin | + | Ford (1988) |
| <i>Onobrychis vicifolia</i> | <i>A. tumefaciens</i> | | | Webb (1986) |
| <i>Psophocarpus tetragonolobus</i> | <i>A. rhizogenes</i> | | + | in Tepfer (1990) |
| <i>Sesbania rostrata</i> | <i>A. tumefaciens</i> | | | Vlachova <i>et al.</i> (1987) |
| | <i>A. rhizogenes</i> | | | " " " |
| <i>Stylosanthes</i> spp. | <i>A. tumefaciens</i> | | | Manners (1987) |
| <i>Trifolium repens</i> (*) (1987) | <i>A. tumefaciens</i> | nos-nptII | Tiges | White and Greenwood |
| <i>Trifolium pratense</i> | <i>A. rhizogenes</i> | | | Beach <i>et al.</i> (1988) |
| <i>Vicia faba</i> | <i>A. rhizogenes</i> | | | Ramsay and Kumar (1990) |
| <i>Vigna aconitifolia</i> | <i>A. rhizogenes</i> | | + | in Tepfer (1990) |
| <i>Vigna aconitifolia</i> | Protoplast-PEG | nptII | + | Köhler <i>et al.</i> (1987) |
| Plantes actinorhiziennes | | | | |
| <i>Alnus glutinosa</i> | <i>A. tumefaciens</i> | | | Mackay <i>et al.</i> (1988) |
| <i>Alnus incana</i> | <i>A. tumefaciens</i> | | | |
| <i>Betula papyrifera</i> | <i>A. tumefaciens</i> | | | |
| <i>Allocauarina verticillata</i> | <i>A. rhizogenes</i> | | + | Phelep <i>et al.</i> (1991) |

Modification du spectre d'hôte

L'induction de nodules fixateurs d'azote chez une légumineuse est un phénomène contrôlé par une régulation hôte-spécifique de l'expression des gènes de nodulation de la bactérie. Une espèce donnée de *Rhizobium* ne nodule que les espèces qui appartiennent à un même groupe de plantes (groupe d'inoculation croisée). Par exemple, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* nodule les plantes du groupe d'inoculation croisée du pois, de la vesce et de la lentille, alors que le trèfle est nodulé par *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. Cette spécificité est exprimée à un stade précoce du processus d'infection et résulte d'interactions multiples entre les signaux émis par la plante et ceux de la bactérie. Parmi les substances précoces impliquées dans les déterminants de la spécificité d'hôte, les lectines ont été souvent évoquées (Kijne 1975, Priem and Wijffelman 1985). L'hypothèse repose sur le fait que les légumineuses qui appartiennent à des groupes d'inoculation différents produisent des lectines qui possèdent des sites de reconnaissance glucidique spécifiques (Kijne 1975). L'introduction d'un gène de lectine de pois, dans des racines de *Trifolium repens* transformé par *A. rhizogenes* (Diaz *et al.* 1989) a permis de vérifier cette hypothèse. En effet les racines de trèfle de type "hairy root" ont pu être nodulées par la souche de *Rhizobium leguminosarum* d'un autre groupe d'inoculation croisée.

La nodulation est cependant retardée et beaucoup de nodules sont anormaux. La spécificité d'hôte, en partie contrôlée par les interactions lectines des poils absorbants-*Rhizobium* a donc pu être modifiée. On peut cependant noter que les déterminants majeurs de la spécificité d'hôte sont situés chez la bactérie. Chez *Rhizobium meliloti* par exemple, les gènes *nod H* et *nod PQ* sont responsables de la spécificité d'hôte (Cervantes *et al.* 1989, Faucher *et al.* 1989).

Etude de la régulation des gènes impliqués dans les interactions plante-microorganisme

Dans la symbiose légumineuse-*Rhizobium*, un échange de signaux moléculaires assure la régulation des gènes essentiels pour l'installation de la symbiose et de son fonctionnement. On connaît, selon les espèces de 9 à 30 nodulines (Egli *et al.* 1991), protéines spécifiques qui s'accumulent dans les nodules. Selon le moment de leur induction dans le nodule on les classe en nodulines précoces et tardives. La noduline tardive la plus abondante et la mieux connue est la leghémoglobine. Elle représente 20 à 30% des protéines cytoplasmiques solubles et son rôle est celui d'un transporteur d'O₂, approvisionnant le bactéroïde dans un environnement où la maintenance d'une faible pression en O₂ est nécessaire pour éviter l'inactivation nitrogénase.

Recherche du rôle des différentes régions du promoteur d'un gène de leghémoglobine

Nous prendrons comme exemple l'étude du promoteur du gène *glb3* de la leghémoglobine de la légumineuse tropicale à nodule caulinaire *Sesbania rostrata*. Une fusion transcriptionnelle a été réalisée entre un gène reporteur (gène *uid A* d'*E. coli*) et le promoteur du gène *glb3* (Szabados *et al.* 1990). Ce gène rapporteur code pour la β -glucuronidase qui est une enzyme très stable et facilement dosable (Jefferson 1987). L'absence d'un système de

transformation/régénération pour *S. rostrata* a conduit à étudier la régulation de l'expression du promoteur du gène *glb3* dans la légumineuse *Lotus corniculatus* (lotier) (Szabados *et al.* 1990). Les constructions géniques ont été introduites dans le lotier en utilisant *Agrobacterium rhizogenes*, les plantes régénérées à partir des racines transformées (hairy roots) ont été ensuite nodulées par *Rhizobium loti*. Une analyse fonctionnelle par délétions du promoteur de *glb3* a ainsi été réalisée. En résumé, il apparaît que la région du promoteur située entre les nucléotides -429 et -48 est indispensable à la spécificité d'expression dans les nodules; la région plus en amont localisée entre -1601 et -670 contient des éléments qui interviennent dans l'activation de la transcription.

Transfert d'un gène de leghémoglobine chez un hôte hétérologue

Pour étudier la régulation de l'expression des gènes de plante il est important de connaître le comportement des séquences régulatrices d'un gène d'une espèce donnée après leur introduction dans des plantes d'espèces ou même de familles différentes.

Chez les légumineuses les promoteurs des gènes *lbc3* de la leghémoglobine de soja et *glb3* de la leghémoglobine de *S. rostrata* (voir ci-dessus) ont été introduits d'une part, dans la légumineuse *Lotus corniculatus* et d'autre part, dans la Solanacée, *Nicotiana tabacum* (Stougaard *et al.* 1987). Ces études ont montré que le mécanisme qui gouverne la transcription de manière spécifique dans les nodules est conservé chez les légumineuses. Il apparaît également que les promoteurs des gènes d'hémoglobines des légumineuses sont faiblement fonctionnels dans les racines de tabac (Szabados *et al.* 1990). Chez les non légumineuses les promoteurs des gènes d'hémoglobines de *Parasponia* et de *Trema* ont été introduits dans le lotier et le tabac (Bogusz *et al.* 1990). Il apparaît que la régulation de l'expression de ce promoteur de non légumineuse est conservée chez le lotier et le tabac.

Ces différentes expérimentations permettent, en fonction du niveau et de la spécificité d'expression du gène, d'apprécier le degré de conservation des signaux de régulation chez les plantes hétérologues et d'aborder progressivement chez les végétaux, l'étude de la régulation par les facteurs agissant en *trans* (trans-acting factors).

Origine de la nodulation chez les plantes fixatrices d'azote: considérations évolutives

L'analyse du niveau et de la localisation de l'expression d'un gène d'hémoglobine (Hb) fusionné au gène reporter GUS a permis à Bogusz *et al.*, (1990) de proposer une hypothèse sur l'origine de la nodulation chez les plantes supérieures. L'hémoglobine est présente dans les nodules fixateurs d'azote des légumineuses et des non-légumineuses. La non-légumineuse *Parasponia andersonni* possède un seul gène d'Hb (Landsmann *et al.* 1986) qui est fortement exprimé dans les nodules induits par le *Rhizobium* spécifique, et également à un faible niveau dans les racines de la plante non nodulée (Bogusz *et al.* 1988). Une espèce voisine sur le plan taxonomique, *Trema tomentosa*, mais non fixatrice d'azote, contient également un gène d'Hb qui est exprimé uniquement dans les racines (Bogusz *et al.* 1988).

Après avoir introduit les promoteurs du gène d'Hb de ces deux non-légumineuses chez un tabac et chez *Lotus corniculatus*, Bogusz *et al.*, (1990) ont montré qu'ils étaient fonctionnels chez les deux plantes. Lorsque les plantes transgéniques de lotier sont nodulées, les deux promoteurs assurent une expression élevée dans les nodules, expression localisée dans la région où se situe la leghémoglobine endogène. Enfin, le promoteur du *Trema* assure une expression réduite dans le tissu vasculaire des racines du lotier. Ces faits suggèrent à Bogusz *et al.*, (1990) qu'un système de régulation de l'expression racine-spécifique de l'Hb devait préexister chez les végétaux et qu'il a pu ensuite évoluer, sous une pression de sélection, en expression nodule-spécifique chez les plantes qui tiraient un avantage de la symbiose. Chez les plantes symbiotiques, cette évolution aurait conduit à une différenciation plus grande (plusieurs gènes d'Hb) et une spécialisation plus grande (contrôle d'une expression spatiale et temporelle). Au cours de l'acquisition de l'aptitude à noduler, le gène d'Hb chez les légumineuses se serait multiplié, et les copies se seraient spécialisées dans l'expression nodule-spécifique, sans maintenir la fonction initiale d'expression racine-spécifique.

Applications agronomiques

Résistance aux insectes

La principale application du transfert de gènes chez les végétaux concerne la résistance aux insectes. Cette application s'est développée d'une part, pour réduire les énormes pertes de production causées par les ravageurs et d'autre part, pour diminuer les coûts occasionnés par les traitements préventifs. La stratégie de lutte la plus utilisée repose sur l'insertion du gène *bt* d'une souche de *Bacillus thuringiensis* codant pour une δ -endotoxine dans la plante transgénique (Vaeck *et al.* 1987). Jusqu'à présent les travaux réalisés dans ce domaine portent essentiellement sur le tabac, la pomme de terre, la tomate, le peuplier...

La principale limite de cette stratégie est de contourner la haute spécificité de la protéine *bt* qui peut favoriser l'apparition de phénomènes de résistance chez les prédateurs. Il existe dans la nature, des processus de défense des plantes contre les ravageurs qui font appel à des mécanismes plus généraux que ceux du *Bacillus thuringiensis*. Ainsi en est-il des légumineuses qui disposent d'un mécanisme de défense naturelle en réponse à des blessures ou à des attaques par des insectes. A la suite de cette agression, ces plantes, comme certaines Solanacées, synthétisent des inhibiteurs de protéases. Ces protéines bloquent le site actif des protéases du tube digestif, perturbant ainsi la digestion des aliments et pouvant même entraîner la mort des insectes herbivores. On a pu identifier une corrélation entre la teneur des protéases de *Vigna* et leur résistance à leur pathogène principal, *Callosobruchus maculatus* (Comai *et al.* 1985). De plus, ces inhibiteurs purifiés possèdent des activités insecticides contre d'autres prédateurs importants comme *Heliothis*, *Spodoptera*, *Diabrotica* et *Tribolium* (Gatehouse and Boulter 1983).

Des gènes (CpTI) de *Vigna unguiculata* codant pour des inhibiteurs de protéases ont été clonés. Les CpTI codent en fait, pour des petits polypeptides d'environ 80 acides aminés, inhibant naturellement la trypsine (enzyme digestive) des insectes. Comme la cible d'activité est constituée par le site catalytique de l'enzyme des insectes, enzyme qui leur est vraisemblablement indispensable, la possibilité pour les insectes de développer un mécanisme

de résistance, par mutation de ce site, est extrêmement faible (Hilder *et al.* 1987). Les gènes CpTI ont été introduits dans des plasmides Ti (Hilder *et al.* 1987) et la transformation réalisée chez les tabacs a permis de rendre les plantes transgéniques beaucoup plus résistantes à *Heliothis virescens* (Agricultural Genetics Company 1988). La transformation de légumineuses ou d'autres plantes, codant pour les CpTI semble donc tout à fait envisageable. Il faut cependant noter que les plantes obtenues sont tolérantes plutôt que résistantes, 50% au plus des insectes sont tués après ingestion des feuilles. La stratégie consistera donc à faire tomber la pression de sélection du ravageur en dessous de la valeur d'un certain seuil, pour que ce prédateur ne soit plus un problème agronomique. Compte-tenu des imperfections de chacune des stratégies, on peut faire remarquer que l'obtention de plantes hors d'atteinte de tout insecte nuisible sera probablement le résultat d'une stratégie combinant transformation avec des gènes codant pour des CpTI et/ou bt.

Contrôle des mauvaises herbes

Une seconde application des transformations génétiques est le transfert de gènes de résistance aux herbicides. Le but de ces recherches est non pas une utilisation accrue de ces substances, dont l'impact sur l'environnement serait néfaste, mais l'introduction dans les plantes de gènes de résistance à des herbicides choisis; ces derniers doivent répondre à des critères précis: être actifs à de faibles concentrations, dégradés rapidement, peu toxiques pour l'environnement et posséder un large spectre d'hôte. L'obtention de plantes résistantes à de tels herbicides permettra la réduction des substances conventionnelles et leur substitution progressive par des produits écologiquement plus adaptés.

Deux stratégies sont utilisées pour conférer la résistance aux herbicides chez les végétaux: soit l'altération de l'enzyme cible de l'herbicide, soit l'incorporation dans la plante d'une enzyme de détoxification. Une illustration de la première approche est fournie par le soja transgénique (*Glycine max*) résistant au glyphosate. Le glyphosate inhibe la 5-enolpyruvate shikimate 3-phosphate synthase (EPSP), une enzyme impliquée dans la voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques: la résistance est obtenue par expression dans la plante d'un gène EPSP de *Petunia*, présentant une mutation qui confère la tolérance à l'herbicide (Hinchee *et al.* 1988). La seconde stratégie, qui n'a pas encore été utilisée à notre connaissance avec une plante fixatrice d'azote, consiste à isoler à partir de bactéries des gènes codant pour des enzymes qui détoxifient ou dégradent les herbicides (Gasser et Fraley 1989).

Résistance aux virus

En raison des difficultés à caractériser et à isoler les gènes de plante qui confèrent de façon naturelle la résistance à certains virus, le génie génétique a mis au point plusieurs stratégies pour protéger les végétaux des infections virales. La technique la plus largement utilisée consiste à introduire dans le génome de la plante le gène de la protéine de capsid du virus. Cette stratégie "protéine de capsid" mise au point en 1986 avec le tabac et le virus de la mosaïque du tabac (ou VMT) (Powell Abel *et al.* 1986) a été utilisée avec succès avec 18 virus appartenant à 10 groupes différents. Des études sont en cours pour protéger le soja du virus de la mosaïque du soja (SMV) en utilisant cette approche. On ne connaît pas encore

les mécanismes moléculaires de cette protection qui peut aboutir soit à un délai dans l'apparition des symptômes, soit à une atténuation des symptômes, soit parfois à une immunité totale des plantes à l'infection virale.

D'autres approches ont également été utilisées avec succès (Clark *et al.* 1990). L'introduction dans les plantes d'ARN antisens de la protéine de capsid ou de la réplicase des virus confère une protection partielle contre l'infection virale. Il est probable que l'ARN antisens et l'ARN viral interagissent pour former une molécule double brin qui est, soit dégradée rapidement, soit, incapable d'être traduite. Dans le cas des virus possédant un ARN satellite, l'introduction dans les plantes d'une séquence d'ADN correspondant à l'ARN satellite permet également une atténuation des symptômes vis-à-vis du virus. De telles stratégies n'ont pas encore été employées avec des plantes fixatrices d'azote.

Amélioration des qualités nutritionnelles des plantes

Les légumineuses sont connues pour jouer un rôle majeur, immédiatement après les céréales, dans l'alimentation humaine et animale. Sur le plan nutritionnel, elles sont deux à trois fois plus riches en protéines que les céréales. Cependant elles ne possèdent pas toujours une proportion équilibrée entre les différents acides aminés et la plupart sont carencées en acides soufrés (Mantell *et al.* 1987). Des tentatives d'amélioration, par voie classique, des principales espèces cultivées n'ont pas conduit à des progrès spectaculaires des qualités nutritionnelles des cultivars obtenus. Est-ce que les transformations génétiques peuvent apporter des solutions à ces problèmes? Les gènes codant pour de nombreuses protéines de réserve ont déjà été clonés et caractérisés (Mantell *et al.* 1987). Des travaux sont maintenant nécessaires pour comprendre les mécanismes de leur expression aussi bien chez les légumineuses que pour les plantes d'autres familles. Un projet concernant l'amélioration des qualités nutritionnelles d'une légumineuse fourragère est en cours de développement en Australie.

Des chercheurs australiens du CSIRO ont utilisé les techniques du génie génétique pour introduire au champ une luzerne enrichie en protéine soufrée permettant aux moutons qui la consomment de produire davantage de laine (Ford 1988). En effet, le facteur limitant de la production de laine de mouton est le faible apport de protéine soufrée dans leur alimentation. Un gène codant pour la synthèse d'acides aminés riches en soufre a été transféré d'abord chez une plante modèle qui régénère facilement en culture *in vitro* (tabacs transgéniques). Ils souhaitent ensuite introduire ce gène chez le trèfle subterranéen qui constitue la nourriture de base spontanée des moutons en Australie. Ce type d'application génétique prévoit la possibilité d'augmenter de 6 % la production de laine et d'en retirer un bénéfice de plus de 300 millions de dollars australiens par an.

CONCLUSIONS

Voilà moins de 10 ans que les premières plantes transgéniques exprimant un gène étranger (résistance à un antibiotique) sont apparues. Depuis lors, les tentatives de transformation se sont développées et les techniques se sont diversifiées. Chez les plantes fixatrices d'azote on

ne compte seulement en 1991 que huit espèces transgéniques. La faible susceptibilité de certains genres (*Acacia*) ou d'espèces de *Medicago* diploïdes montrent que les techniques de transformation/régénération doivent être poursuivies et optimisées (utilisation de souches d'*Agrobacterium* plus virulentes, de la biolistique et amélioration de la caulogénèse et de l'embryogénèse somatique).

Ces résultats encore peu nombreux, ajoutés à l'énorme masse de connaissance acquise en biologie moléculaire sur les interactions légumineuse-Rhizobium expliquent pourquoi les études de transfert des gènes ont été réalisées principalement dans le sens légumineuse vers non-légumineuse (tabac, très souvent). Les résultats obtenus ont permis d'effectuer de réels progrès dans l'analyse de l'expression des gènes de ces plantes. Cependant, l'obtention d'un plus grand nombre de plantes fixatrices d'azote transgéniques devrait permettre une analyse plus complète de l'expression des gènes de ces plantes et une étude des conséquences qui en résultent par exemple, sur l'activité de l'assimilation de l'azote du sol et des paramètres de croissance de la plante.

REFERENCES

- Agricultural Genetics Company Ltd. (1988). Brevet Européen, Cambridge. pp. 2-27.
- Beach K.H. and Gresshoff P.M. (1988). *Plant Sci.* 57: 73-81.
- Bogusz D., Appleby C.A., Landsmann J., Dennis E.S., Trinick M.J., and Peacock W.J. (1988). *Nature* 331: 178-180.
- Bogusz D., Llewellyn D.J., Craig S., Dennis E.S., Appleby C.A. and Peacock W.J. (1990). *The Plant Cell* 2: 633-41.
- Caboche M. et Deshayes A. (1984). C.R. Acad. Sc. Paris III, 299. pp. 663-666.
- Casse-Delbart F. (1990). In: *les Colloques de l'INRA*. No. 51: 219-230.
- Cervantes E., Sharma S., Maillet F., Vasse J., Truchet G. and Rosenberg C. (1989). *Mol. Microbiol* 3: 745-755.
- Chilton M.D., Drummond M.H., Merlo D.J., Sciaky D., Montoya A.L., Gordon M.P. and Nester E.W. (1977). *Cell* 11: 263-71.
- Clark W.G., Register III, J.C. and Beachy R.N. (1990). *Plant Biology* Vol. II. A.J. Wiley and Sons Inc. Publication. pp. 273-283.
- Comai L., Facciotti D., Hiatt W.R., Thompson G., Rose R.E., Stalker D.M. (1985). *Nature* 317: 741-744.
- Damiani F. and Arcioni S. (1991). *Plant Cell Rep.* 10: 300-303.
- Davey M.R., Cocking E.C., Freeman J., Pearce N. and Tudor I. (1980). *Plant Sci. Lett.* 18: 307-313.
- Diaz C.L., Melchers L.S., Hooykaas P.J., Lugtenberg B.J. and Kijne J.W. (1989). *Nature* 338: 579-581.
- Egli M.A., Larson P.J., Hruschka W.R. and Vance C.P. (1991). *J. Exp. Bot.* 42: 969-977.
- Facciotti D., O'Neal J.K., Lee S., Shewmaker C.K. (1985). *Bio/technology* 3: 241-246.
- Faucher C., Camut S., Dénarié J. and Truchet G. (1989). *Mol. Plant Microbe Interact.* 2: 291-300.
- Ford J. (1988). *New Scientist*. 10 March, 24.
- Franché C. (1991). *La Recherche* 22: 238-240.
- Gasser C.S. and Fraley R.T. (1989). *Science* 244: 1293-1299.
- Gatehouse A.M.R.G. and Boulter D. (1983). *J. Sci. Fd. Agric.* 34: 345-350.
- Guerche P. (1990). In *Les Colloques de l'INRA*. No. 51: 211-214.
- Hilder V.A., Gatehouse A.M.R., Sheerman S.E., Barker R.F. and Boulter D. (1987). *Nature* 300: 160-163.
- Hinchee M.A.W., Connor-Ward D.V., Newell C.A., McDonnell R.E., Sato S.J., Gasser C.S., Fischhoff D.A., Re B.D., Fraley R.T. and Horsch R.B. (1988). *Biotechnology* 6: 915-922.

- Hooykaas P.J.J. (1989). *Plant Mol. Biol.* 13: 327-336.
- Horsch R.B., Fry J.E. Hoffman N.L., Eichholz D., Rogers S.G. and Fraley R.T. (1985). *Science* 227: 1229-1231.
- Jefferson R.A. (1987). *Plant Mol. Biol. Rep.* 5: 387-405.
- Jensen J.S., Marcker K.A., Otten L. and Schell J. (1986). *Nature* 321: 669-674.
- Kijne J.W. (1975). *Physiol. Pl. Path.* 5: 75-79.
- Klee H., Horsch R., and Roger S. (1987). *Annu. Rev. Plant Physiol.* 38: 467-486.
- Klein T.M., Wolf E.D., Wu R., Sanford J.C. (1987). *Nature* 327: 70-73.
- Köhler F., Golz C., Eapen S., Kohn H. and Schieder O. (1987). *Plant Cell Rep.* 6: 313-317.
- Landsmann J., Dennis E.S., Higgins T.J.V., Appleby C.A., Kortt A.A. and Peacock W.J. (1986). *Nature* 324: 166-168.
- Mackay J., Seguin A. and Lalonde M. (1988). *Plant Cell Rep.* 7: 220-232.
- Manners J.M. (1987). *Plant Cell. Rep.* 6: 204-207.
- Mantell S.H., Matthews J.A. and McKee R.A. (1987). *Principles of Plant Biotechnology*, Blackwell Scientific Publication. 269 pp.
- McCabe D.E., Swain W.F., Martinell B.J. and Christou P. (1988). *Biotechnology* 6: 923-926.
- McCormick S., Niedermeyer J., Fry J., Barnasson A., Horsch R. and Fraley R.T. (1986). *Plant Cell Rep.* 5: 81-84.
- Miao G.H., Hirel B., Marsolier M.C., Ridge R.W. and Verma D.P.S. (1991). *The Plant Cell* 3: 11-22.
- Mugnier J. (1988). *Plant Cell Rep.* 7: 9-12.
- Pedersen H.C., Christiansen J., Wyndaele R. (1983). *Plant Cell Rep.* 2: 201-204.
- Petit A., Stougaard J., Kuhle A., Marker K., and Tempé J. (1987). *Mol. Gen. Genet.* 207: 245-250.
- Phelep M., Petit A., Martin L., Duhoux E. and Tempé J. (1991). *Bio/technol.* 9: 461-466.
- Porter J.R. (1991). *Critical Reviews in Plant Science* 10: 387-421.
- Powell Abel P., Nelson R.S., De B., Hoffman N., Rogers S.G., Fraley R.T. and Beachy R.N. (1986). *Science* 232: 738-743.
- Priem W.J.E. and Wijffelman C.A. (1985). *FEBS lett.* 25: 247-251.
- Ramsey G. and Kumar A. (1990). *J. Exp. Bot.* 41: 841-847.
- Rech E.L., Golds T.J., Hammatt N., Mulligan B.J. and Davey M.R. (1988). *J. Exp. Bot.* 39: 1275.
- Shahin E.A., Sukhapinda K., Simpson R. and Spivey R. (1986). *Theor. Appl. Genet.* 72: 720-777.
- Spano L., Mariotti D., Pezzoti M., Damiani F. and Arcioni S. (1987). *Theor. Appl. Genet.* 73: 523-530.
- Stougaard J., Petersen T.E., Marcker K.A. (1987). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 5754-5757.
- Sukhapinda K., Spivey R., Shahin E.A. (1987). *Plant Mol. Biol.* 8: 209-216.
- Szabados L., Ratet P., Grunenberg B. and de Bruijn F.J. (1990). *The Plant Cell* 2: 973-986.
- Tepfer D. (1990). *Physiol. Plant.* 79: 140-146.
- Tepfer D., Metzger L. and Prost R. (1989). *Plant Mol. Biol.* 13: 295-302.
- Vaeck M., Reynaerts A., Höfte H., Jansens S., De Beuckeleer M., Dean C., Zabeau M., Van Montagu M., Leemans J. (1987). *Nature* 328: 12-13.
- Vlachova M., Metz B.A., Schell J., de Bruijn F.J. (1987). *Plant Science* 50: 213-223.
- Webb K.J. (1986). *Theor. Appl. Genet.* 72: 53-58.
- White D.W.R. and Greenwood D. (1987). *Plant Mol. Biol.* 8: 461-469.
- Zaenen I., Van Lanbeke N., Tenchy H., Van Montagu M. and Schell J. (1974). *J. Mol. Biol.* 86: 109-127.
- Zambryski P., Tempé J. and Schelle J. (1989). *Cell* 56:193-201.

**INTERACTIONS PLANTES
MICROORGANISMES**

**SENEGAL
FEBRUARY 1992**

ifs

Fondation Internationale pour la Science

INTERACTIONS PLANTES MICROORGANISMES

INTERACTIONS BETWEEN PLANTS AND MICROORGANISMS

**Compte rendu du séminaire régional organisé par
la Fondation Internationale pour la Science (IFS)
et l'Institut Français de Recherche Scientifique
pour le Développement en Coopération (ORSTOM)**

**Dakar, Sénégal
17-22 février 1992**

Organisateurs:

Fondation Internationale pour la Science (IFS)
Institut Français de Recherche Scientifique
pour le Développement en Coopération (ORSTOM)

Co-financé par:

Institut Français de Recherche Scientifique
pour le Développement en Coopération (ORSTOM)
Islamic Educational, Scientific and Cultural Organization (ISESCO)
Centre Technique de Coopération Agricole et Rurale (CTA)

Publié par:

Fondation Internationale pour la Science (IFS)
Grev Turegatan 19, 114 38 Stockholm, Sweden

Rédaction:

Judith N. Wolf

Les communications qui figurent dans cette publication ont été reproduites telles que soumises et n'ont pas été revues par des pairs, ni révisées du point de vue scientifique par la Fondation Internationale pour la Science (IFS). Les opinions exprimées n'engagent que les auteurs et pas la Fondation Internationale pour la Science (IFS).

La loi du 11 mars 1957 n'autorisant, aux termes des alinéas 2 et 3 de l'article 41, d'une part, que les "copies ou reproductions strictement réservées à l'usage privé du copiste et non destinées à une utilisation collective" et, d'autre part, que les analyses et les courtes citations dans un but d'exemple et d'illustration, "toute représentation ou reproduction intégrale, ou partielle, faite sans le consentement de l'auteur ou de ses ayants droits ou ayants cause, est illicite" (alinéa 1er de l'article 40). Cette représentation ou reproduction, par quelque procédé que ce soit, constituerait donc une contrefaçon sanctionnée par les articles 425 et suivants du Code Pénal.

ISBN: 91 85798 31 2