

Biologie moléculaire des plantes

M. Joseph SCHELL, professeur

Les cours, ainsi que les séminaires en rapport avec les cours, ont porté sur l'étude des mécanismes moléculaires et cellulaires qui permettent aux plantes de résister à la plupart des pathogènes potentiels auxquels elles sont exposées. Il s'agit d'un domaine de recherche d'une importance cruciale pour l'agriculture, aussi bien dans le présent qu'à l'avenir, et qui, en plus connaît actuellement beaucoup de succès en recherche fondamentale. Il ne faut donc pas s'étonner du grand intérêt que portent à ce sujet tous les chercheurs aussi bien académiques qu'industriels, qui s'intéressent à la biotechnologie végétale et à l'agriculture.

Comme lors de l'année académique précédente 6 cours ainsi que 6 séminaires furent donnés dans l'amphithéâtre Jean Ribuchon de l'INRA à Versailles, tandis que deux cours et séminaires ont été donnés à l'Institut des Sciences Végétales (ISV) à Gif (Dir. Prof. A. Kondorosi) et un cours et séminaire à l'Institut de Biologie Moléculaire des Plantes (IBMP) de Strasbourg (Dir. Prof. J. Weil). En plus, le cours et le séminaire prévus pour l'année académique 95-96 à Toulouse, qui n'ont pas eu lieu par suite de grèves, ont été donnés en décembre 1996.

Cours d'Introduction

Séminaire du Dr Guido Jach

Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Cologne

Thème : L'amélioration Végétale par Génie Génétique (en langue anglaise)

Il est un fait que la grande majorité des plantes sont résistantes à la plupart des pathogènes. Les mécanismes responsables de cette résistance ont des points communs indépendamment du type de pathogène (viral, bactérien, fongique et pestes, p.e. nématodes). La spécificité de la réaction dite incompatible (quand le pathogène est avirulent, c'est-à-dire incapable d'induire la maladie, et la plante hôte est résistante) est apparemment due à la reconnaissance du type de pathogène par la plante et non aux étapes suivantes qui jouent un rôle dans la résistance. Ce qui est important est la rapidité avec laquelle ces mécanismes de résistance

sont déclenchés. Pour une réaction compatible (la plante est susceptible au pathogène), ce déclenchement est relativement lent tandis qu'il est rapide, voire très rapide, lors de réactions incompatibles et non-hôte.

Le mécanisme de résistance le plus connu est celui de la réaction hypersensible. La plante utilise pour cette réaction une stratégie de terre brûlée. Nous savons que la réaction hypersensible résulte d'un mécanisme de mort cellulaire programmée des cellules végétales directement infectées par le pathogène, ainsi que des cellules immédiatement avoisinantes tandis qu'à distance les cellules sont induites pour se défendre mais survivent. Donc cette réaction hypersensible donne lieu à des nécroses localisées par apoptose, ce qui empêche la progression du pathogène. On peut également observer des nécroses dans une réaction compatible. Mais ces nécroses ne restent pas localisées et se répandent dans les tissus végétaux infectés. Elles ne résultent pas d'une mort cellulaire programmée (suicide) mais plutôt d'une mort cellulaire causée par la progression du pathogène (meurtre de la cellule végétale par le pathogène).

Lors de la réaction hypersensible (HR) un gène de résistance reconnaît un produit chimique codé par le gène dit « d'avirulence » du pathogène et cette reconnaissance spécifique déclenche rapidement la mort cellulaire programmée localisée à l'endroit de l'attaque. Lors d'une réaction compatible la mort programmée n'est pas déclenchée soit déclenchée trop tard à cause d'un mécanisme de reconnaissance (surveillance) absent ou trop inefficace. La résistance du type spécifique est due à un système gène pour gène, c'est-à-dire un gène de résistance donné reconnaît spécifiquement le signal provenant d'un type donné de pathogène. Il est cependant bien connu qu'en pratique des plantes résistantes contiennent non seulement des gènes de résistance dominants (responsable de la réaction incompatible qui elle-même résulte de la réaction hypersensible) mais aussi d'autres gènes de résistance, souvent récessifs, qui jouent également un rôle important. Malheureusement, comme il est beaucoup plus difficile d'étudier le mécanisme d'action de ces gènes récessifs, nous ne connaissons pas encore leur mécanisme d'action. Un certain optimisme est pourtant permis. Récemment on a réussi à isoler par clonage certains de ces gènes (p.e. *Mlo*) (ref. Büschges et al. Cell Vol. 88, 695-705, 1997).

SÉMINAIRE

Yield losses caused by the infection of crop plants with phytopathogenic fungi limit productivity and food quality and can be very severe in case of a local epidemic. In order to control fungal diseases and other pests today's agriculture relies mostly on the concept of integrated pest management, i.e. the combinatorial use of agricultural methods, chemical compounds (e.g. fungicides) and resistant cultivars. The development of resistant cultivars is particularly important, since it is highly desirable to minimize the usage of synthetic fungicides or other chemicals in order to spare the environment. Unfortunately, the most important crop plants are still susceptible to a number of important fungal pathogens and classical

breeding programs have so far not succeeded in introducing suitable resistant traits into these cultivars. This task is often hampered by the fact that the number of genetically defined resistance traits available to conventional cross breeding is limited.

Genetic engineering of plants provides a possible means to overcome these problems and to create new resistant cultivars. Essentially, three different biotechnology based approaches or strategies are presently under investigation. The first two rely on the use of a strictly pathogen-inducible promoter to drive the expression of either an introduced avirulence-gene, which in turn activates the corresponding plant genes leading to a hypersensitive response reaction, or an introduced gene encoding a cytotoxic protein, resulting in an artificial hypersensitive response (cell death). Since both approaches suffer from the limited availability of suitable promoters (only being triggered by pathogen attack and not responding to any other stresses) and since we believe that these systems could be error prone, we adopted a third strategy.

We are working with five different plant genes : three antifungal genes for barley coding for a class-II chitinase (CHI), a class-II β -1,3-glucanase (GLU) and a type I ribosome-inactivating protein (RIP), as well as a bacterial chitinase gene (ChiA) from the soil bacterium *Serratia marscescens* and a antifungal gene from the mold *Aspergillus giganteus* encoding the protein AgAFP.

We have created transgenic tobacco plants constitutively expressing different barley antifungal genes (encoding CHI, GLU and RIP) and the gene encoding AgAFP under the control of the CaMV 35S promoter. RIP, naturally a cytosolic protein, was expressed either in its original form or as an engineered protein containing a secretion signal at its N-terminus (spRIP). Infection assays with the fungal pathogens *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea* and *Alternaria alternata* revealed that the expression of these genes in each case led to an increased protection of transgenic plants. The spRIP was somewhat more effective than the cytosolic RIP form.

A number of *in vitro* studies demonstrated that cell wall degrading enzymes such as chitinase and β -1,3-glucanase can act together synergistically leading to a more effective inhibition of fungal growth. For the barley proteins CHI, GLU and RIP we have demonstrated synergistic effects *in vitro* not only for the CHI/GLU combination but also for various combinations of CHI and/or GLU with the RIP protein. In order to investigate whether this also holds true *in vivo* we created transgenic tobacco plants expressing GLU- and CHI-protein or RIP- and CHI-protein in combination. Fungal infection assays using these GLU/CHI and RIP/CHI coexpressing transgenic lines indeed clearly demonstrated synergistic protective interaction of the barley antifungal proteins *in vivo*. It is important to stress that by taking advantage of synergisms to enhance the level of resistance the requirements for a durable resistance are fulfilled, since a resistance based on combinations of different genes and proteins with different modes of action should dramatically reduce the probability of "resistance breaking" by pathogenic strains.

PUBLICATIONS

1. JACH *et al.* (1995) *Plant Journal*, **8** (1), 97-109.
2. MAAS *et al.* (1996) Submitted to *Planta*.

Cours (2) sur Les Infections Bactériennes**Séminaire du Dr Christian Boucher**

CNRS-INRA, Toulouse

Thème : Les Gènes *hrp* de *Pseudomonas solanaceum* et leurs Effets sur les Plantes Hôtes

Séminaire du Dr Ulla Bonas

L'Institut des Sciences Végétales (ISV), Gif-sur-Yvette

Thème : Rôle des Gènes d'Avirulence Bactériens dans le Déclenchement de la Réaction de Défense chez les Plantes Résistantes

Les deux cours suivants furent consacrés aux infections bactériennes. Ils ont porté sur les gènes *hrp* et *avr* et leurs effets sur les plantes hôtes ainsi que sur une analyse des mécanismes d'activation des gènes de défense. En effet, des pathogènes bactériens contiennent non seulement des gènes d'avirulence (*avr*) mais en plus des gènes du type *hrp* (host response and pathogenicity). Pour qu'une souche bactérienne soit avirulente, et donc capable d'induire une réaction hypersensible, il faut non seulement qu'elle contienne un gène *avr* spécifique (c.a.d. correspondant à un gène R dans la plante hôte) mais en plus des gènes du type *hrp*. Ces deux types de gènes bactériens nécessaires à l'avirulence sont voisins sur le chromosome. Une partie des gènes *hrp* sont conservés et homologues à des gènes importants pour la virulence de bactéries responsables de maladies humaines telles que *Yersinia*, *Shigella* et *Salmonella*. Pour ce qui est des gènes chez l'homme, on a pu démontrer qu'il s'agit d'un système de sécrétion du type III.

SÉMINAIRE (Dr Ch. Boucher)

Avec pour objectif d'entreprendre l'analyse moléculaire des déterminants du pouvoir pathogène de *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum*, nous avons étudié une classe de mutants affectés simultanément dans leur aptitude à induire la maladie sur plantes sensibles et la HR sur plantes résistantes. L'analyse de 9 de ces mutants, obtenus de façon indépendante, a montré qu'ils étaient affectés à un même locus dénommé *hrp*. Ce locus est organisé en un minimum de 7 opérons dont 5 ont été caractérisés au niveau moléculaire (1). Un des 20 gènes identifiés dans cette région code pour un activateur transcriptionnel (HrpB) indispensable à la transcription de 5 des unités de transcription *hrp* (2). Neuf autres gènes *hrp* codent pour des protéines qui ont un homologue chez des bactéries pathogènes

de mammifères et chez des représentants de tous les grands groupes de bactéries phytopathogènes Gram négatif, hormis *Agrobacterium* (3).

Chez plusieurs de ces bactéries il a été démontré que ces protéines sont impliquées dans la biogenèse d'un système de sécrétion de protéines, dit de type III, qui n'a ce jour été décrit que chez ces organismes. Ce système de sécrétion intervient dans le transit de protéines directement impliquées dans le contrôle des interactions avec la cellule hôte (4). Une protéine, dénommée PopA1 et qui transite par la voie de sécrétion Hrp, a été identifiée dans le surnageant de culture de la souche GMI1000 de *R. solanacearum* (5). Cette protéine agit en éliciteur de la HR après infiltration dans le parenchyme foliaire du tabac mais non après infiltration dans la tomate. Elle provoque donc des réponses qui sont très similaires à celles observées après inoculation de la bactérie vivante. Ceci associé à des expériences complémentaires effectuées sur *Petunia* suggère que la protéine PopA1 pourrait être un déterminant de la spécificité parasitaire qui agirait pour restreindre la gamme d'hôtes de la bactérie et se comporterait donc comme produit d'un gène d'avirulence.

Le gène de structure de la protéine PopA1 a été localisé dans la région adjacente à une extrémité du locus *hrp* et son expression transcriptionnelle est coréglulée avec celle des gènes *hrp*. Deux gènes dont la fonction demeure inconnue ont été caractérisés entre le gène *popA* et l'extrémité du locus *hrp*. Ces gènes codent pour des protéines qui sont de bons candidats pour une translocation par la voie Hrp et seraient, de ce fait, des médiateurs impliqués dans le contrôle des interactions plantes bactéries.

PUBLICATIONS

1. ARLAT *et al.* (1992) *Molecular Plant-Microbe Interactions* **5** : 187-193.
2. GENIN *et al.* (1992) *Mol. Microbiol.* **6** : 3065-3076.
3. VAN GISEGEM *et al.* (1995) *Mol. Microbiol.* **15**, 1095-1114.
4. SORY *et al.* (1995) *Proc. Nat. Acad.Sci. USA* **92**, 11998-12002.
5. ARLAT *et al.* (1994) *EMBO J.* **13** : 543-553.

SÉMINAIRE (Dr U. Bonas)

Pour étudier les deux organismes qui interagissent, le pathogène et la plante, nous avons choisi comme modèle l'interaction entre *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*) d'une part, et les plantes hôtes, le piment et la tomate, d'autre part. *Xcv* est une bactérie pathogène à Gram-négatif qui provoque la gale bactérienne, maladie non systémique dont les conséquences économiques sont importantes dans les régions où ces plantes sont cultivées (Floride, Guadeloupe, La Réunion). Des analyses génétiques ont montré que la résistance des plantes à certaines souches de pathogènes est déterminée par deux gènes qui correspondent : un gène de résistance dans la plante (par exemple *Bs3*) et un gène dit d'avirulence

(dans ce cas : *avrBs3*) dans le pathogène (théorie « gène-pour-gène » de Flor). La reconnaissance d'une bactérie avirulente déclenche une réaction d'hypersensibilité (HR) chez le poivron résistant. L'hypothèse « gène-pour-gène » a été validée dans de nombreux systèmes, par l'isolement de gènes *avr* chez des pathogènes et plus récemment des gènes de résistance spécifiques chez *Arabidopsis*, la tomate, le tabac, le riz, et le lin. Bien que des progrès considérables aient été obtenus dans les dix dernières années dans ce domaine, les bases moléculaires de la résistance et la spécificité de la reconnaissance du pathogène sont encore peu connues. Nous avons récemment montré que dans le cas du poivron résistant du génotype *Bs3*, la protéine d'avirulence, AvrBs3, est reconnue à l'intérieur des cellules de la plante où elle provoque la mort cellulaire (HR). En plus, la protéine AvrBs3 porte des signaux de localisation nucléaire qui sont essentiels pour son activité. La découverte que la reconnaissance de la protéine AvrBs3 a lieu à l'intérieur de la cellule végétale suggère que les bactéries phytopathogènes « injectent » des protéines dans la cellule végétale à l'aide d'un appareil de sécrétion de type III, codé par les gènes *hrp*.

Cours sur « Systemic Acquired Resistance »

Séminaire du Dr J.P. Métraux

Université de Fribourg, Suisse

Thème : « Systemic Acquired Resistance »

Lors de ce cours nous avons parlé de la résistance acquise systématiquement (SAR = Systemic Acquired Resistance). Il s'agit de la capacité de bon nombre de plantes de résister à distance à une infection primaire, p.e. dans des feuilles n'ayant pas été infectées au départ. Cette SAR n'est pas caractérisée par des lésions localisées, mais bien par l'induction de gènes de résistance, dits PR (Pathogenesis Related) dans des organes végétaux non infectés primordialement.

Il est certain que l'acide salicylique (SA) est nécessaire à cette induction, mais l'acide salicylique n'est apparemment pas le signal chimique transporté dans la plante à partir de la lésion primaire. Il s'agirait plutôt d'un radical actif (ROS = Reactive Oxygen Species) capable non seulement d'empêcher la progression du pathogène mais en plus d'être transporté dans la plante et d'induire à distance la réaction SAR.

Dans son séminaire le Dr Métraux a souligné les travaux dans lesquels il a joué un rôle important, et qui nous permettent les conclusions proposées dans le cours (rôle de SA et de ROS).

Cours sur Gènes de Résistance Clonés**Séminaire du Dr Laurence Godiard***CNRS-INRA, Toulouse**Thème : Gènes de Résistance Clonés*

L'insertion d'un fragment d'ADN dans un gène risque fort d'inactiver celui-ci (« loss of function ») parce que son message est modifié. C'est ainsi que l'on a pu obtenir au départ de plantes résistantes (gène R actif) un mutant susceptible. L'insertion peut ensuite servir de sonde pour isoler le gène de résistance inactivé et à partir de celui-ci le gène de résistance fonctionnel. C'est ainsi qu'en 1988 Jahal et Briggs ont réussi à isoler le gène HM_1 du maïs, responsable de la résistance au champignon *Chochliobolus carbonum*. Malheureusement il ne s'agissait pas d'un gène de résistance typique du type « gène pour gène », mais par contre d'un gène dont le produit est capable de détoxifier une toxine puissante et essentielle pour la virulence du pathogène. Le premier gène de résistance isolé du type « gène pour gène », isolé aussi par Jahal et Briggs (1993) fut le gène Pto, qui code pour une sérine-threonine kinase. Plus tard d'autres gènes de ce type furent isolés, tels que Fen, Pt, et $X_a 21$.

On connaît aujourd'hui une série de gènes de résistance dont les produits contiennent des répétitions de séquences riches en leucine (LRR pour Leucine Rich Repeat). Comme d'autres protéines à LRR stimulent des interactions du type protéine à protéine chez la levure, la drosophile et chez l'homme, il est possible que les LRR végétaux font partie de la structure de récepteurs capables de lier le produit du gène avr des pathogènes. Ceci rappelle d'ailleurs que les récepteurs d'hormones peptidiques chez l'homme (p.e. le récepteur pour la gonadotropine) contiennent également des protéines à LRR. Quand on modifie ne fut-ce qu'un acide aminé dans la séquence LRR, des gènes de résistances tels que RPM_1 et RPS_2 perdent leur fonction. L'hypothèse selon laquelle ces récepteurs joueraient un rôle dans une cascade de signalisation et déclencheraient ainsi une réaction hypersensible, est en accord avec l'observation que ces protéines de résistance comportent dans leurs « P loops » des sites capables de lier des nucléotides tels que l'ATP et GTP (sites NBS). Certains sous-groupes de gènes de résistance clonés du type LRR-NBS contiennent en plus des séquences « Leucine Zippers » qui peuvent jouer en rôle dans l'homo- ou l'hétérodimerisation de facteurs de transcription.

Le gène N responsable de la résistance par réaction hypersensible au virus de la mosaïque du tabac, ainsi que le gène de résistance L6, sont des orthologues de récepteurs connus chez la drosophile et l'homme qui reconnaissent l'interleucine et sont capables d'activer des facteurs de transcriptions (en passant par une cascade de signalisation). Il est intéressant de noter que l'on a pu démontrer que l'activité de $NF-\kappa B$, le facteur de transcription activé quand une cytokine se lie au récepteur IL-1R, est modulée par l'aspirine (dérivé de l'acide salicylique) et que $NF-\kappa B$ et Deli de la drosophile sont également impliqués dans des mécanismes de défense vis-à-vis de divers microbes pathogènes.

SÉMINAIRE

L'analyse des structures protéiques déduites des séquences nucléiques des gènes de résistance permet de les classer en 3 groupes, qui sont :

1) Les protéines kinases (Pto)

Le produit du gène *Pto* correspond à une protéine kinase à sérine et thréonine. Le gène *Xa21* code pour une protéine possédant un domaine kinase très similaire à celui de *Pto*. La protéine Pto a une localisation cytoplasmique et pourrait être ancrée à la membrane par un site de myristoylation présent à l'extrémité N-terminale. Il a été montré que la fonction kinase de Pto est nécessaire à la résistance, et que Pto phosphoryle des protéines appelées Pti qui interagissent avec elle. Récemment, la technique double hybride a permis de montrer l'interaction directe entre Pto et le produit du gène d'avorulence correspondant AvrPto de la bactérie *Pseudomonas syringae* pathovar *tomato*, suggérant que Pto jouerait le rôle de récepteur spécifique du signal bactérien AvrPto (1). Hormis Pto, les produits de tous les gènes de résistance caractérisés à ce jour possèdent un motif conservé de type « répétitions riches en leucine » (LRR), qui sont des répétitions d'environ 24 acides aminés, au consensus assez lâche, riche en leucine. Les LRR sont retrouvées chez des protéines variées, où elles sont responsables d'interactions avec d'autres protéines, et leur confèrent des fonctions diverses telles que celles d'inhibiteurs d'enzymes, de composants de voies de transduction de signaux, ou de récepteurs hormonaux.

Parmi les produits de gènes R possédant des LRR, on distingue :

2) Les protéines à LRR extracellulaires (*Xa21*, *Cf9*, *Cf2* et *Hs1*)

Le nombre de LRR varie de 7 unités pour *Hs1* à 38 pour *Cf2*, et ce motif constitue l'essentiel des protéines *Cf9*, *Cf2* et *Hs1*. Dans les protéines de ce groupe, le domaine LRR est précédé d'une séquence signal, et suivi d'un domaine trans-membranaire ; ces protéines auraient donc une région LRR extracellulaire et seraient ancrées à la membrane plasmique par le domaine trans-membranaire. Seul *Xa21* présente un domaine cytoplasmique conséquent qui code pour un motif kinase, réalisant vraisemblablement un récepteur kinase transmembranaire.

Chez ces protéines, la région LRR pourrait jouer le rôle de récepteur d'un éliciteur externe codé par l'agent pathogène (produit direct ou indirect du gène d'avorulence). Par exemple, la région LRR de la protéine *Cf9* pourrait jouer le rôle de récepteur de l'éliciteur codé par le gène d'avorulence correspondant du champignon pathogène, *Avr9*, qui est sécrété. Cette étape de reconnaissance transduirait un signal à l'intérieur de la cellule végétale, potentiellement relayé par une protéine kinase de type Pto.

3) Les protéines à LRR et NBS (*Rps2*, *Rpm1*, *N*, *L6* et *Prf*)

Les gènes de ce groupe codent pour des protéines possédant des LRR (de 14 à 24 unités de répétition) et des régions de liaison à des nucléotides triphosphates

(NBS). Les NBS sont retrouvés chez des protéines liant l'ATP ou le GTP et suggèrent la participation de mécanismes de phosphorylation dans le fonctionnement des protéines de résistance.

Les protéines Rps2, Rpm1, L6 et Prf possèdent en outre des structures de type « fermetures-éclair à leucines » qui pourraient permettre leur interaction avec d'autres protéines, et un domaine hydrophobe d'association potentielle à la membrane plasmique. La région N-terminale du produit du gène *N* présente de l'homologie avec le domaine cytoplasmique des récepteurs de l'interleukine 1 des Mammifères, et avec la protéine Toll de la *Drosophile*, suggérant que cette région pourrait être impliquée dans l'activation d'un facteur de transcription de la famille Rel (2).

Les produits des gènes de résistance de ce groupe semblent avoir une localisation cytoplasmique mais pourraient être ancrés à la membrane plasmique par l'intermédiaire de régions hydrophobes. Récemment, il a été montré que la reconnaissance entre les protéines de résistance Rps2, Rpm1 et les produits des gènes d'avirulence bactériens correspondants est cytoplasmique (3).

En ce qui concerne le mode d'action, si le produit Avr est injecté dans le cytoplasme végétal, l'interaction avec la protéine de résistance peut être directe, le produit du gène R jouant le rôle de récepteur. Toutefois, la réception du signal pathogène pourrait se faire par une autre molécule à spécificité plus ou moins large, qui interagirait avec le produit du gène de résistance. Ce pourrait être le cas, par exemple, pour la protéine Rqm1 qui présente l'originalité de reconnaître deux spécificités d'avirulence distinctes chez la bactérie pathogène *Pseudomonas syringae*. Dans ce cas, le gène de résistance pourrait coder pour un composant essentiel d'une éventuelle chaîne de transduction de signal conduisant à la résistance.

Suite à une étape initiale, il y aurait une étape de transduction du signal, qui conduirait *in fine* à un programme d'activation de gènes nécessaire à la résistance, incluant le mort cellulaire par hypersensibilité des cellules infectées, et l'induction des gènes de défense autour de la région infectée. La transduction du signal pourrait mettre en jeu, par exemple, une cascade de phosphorylations cytoplasmiques (rôle de protéines de type Pto, et des NBS) conduisant à l'activation d'un facteur de transcription nucléaire.

PUBLICATIONS

1. TANG *et al.* (1996) *Science* **274**, 2060-2063.
2. CAI *et al.* (1997) *Science* **275**, 832-834.
3. LEISTER *et al.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 15497-15502.
4. VAN GIJSEGEN *et al.* (1993) *Trends in Microbiology* **1**, 175-180.

Cours sur La Réaction Hypersensible et Apoptose chez les Végétaux
Séminaire du Dr Murray Grant

University of Leicester, UK

Thème : Hypersensitivity and Programmed Cell Death in Plants (en langue anglaise)

Le dernier cours à l'INRA-Versailles fut dédié à une discussion du concept que la réaction hypersensible est le résultat d'une mort cellulaire programmée et localisée et donc une forme d'apoptose végétale. Ce cours fut suivi d'un séminaire par le Dr M. Grant, un des collaborateurs de Dr J. Dangl. Ce groupe est largement responsable de l'intérêt nouveau porté à la relation : réaction hypersensible et apoptose végétale.

SÉMINAIRE

Gene-for-gene resistance depends upon the direct or indirect interaction of the pathogen avirulence (*avr*) gene product with the product of the corresponding plant resistance gene (*R*). This interaction generally activates the hypersensitive response (HR). The HR represents a precise temporal and spatial coordination of defense responses requiring cross-talk between the pathogen and host. It elicits rapid physiological and biochemical changes in the host including programmed cell death (PCD) in the immediate vicinity of the pathogen.

Positional cloning and heterologous gene tagging techniques have recently been utilised to clone a number of *R* genes (2). The isolation of *R* genes is merely the first step towards elucidating the signalling pathways involved in defense responses. Machinery involved in the HR includes both preformed and induced components. Isolation of downstream elements activated by *R* gene products will command biochemical, genetic and molecular approaches. Mutational analyses have already uncovered a number of additional loci required for resistance and the molecular characterization of these genes will significantly further our understanding of signalling mechanisms involved in the HR. Additionally interaction cloning has also begun to uncover prospective candidates of the defense response pathway.

Although the HR involves genetically programmed cell death mediated through the *R* gene product, HR cell death is not always necessary to prevent pathogen growth (3). Thus resistance can be functionally separated from cell death. PCD plays an integral part in plant ontogenesis and whether HR cell death and other forms of PCD share common pathways is as yet unknown. Cell death mutants have been isolated including mutants which map to known *R* loci (*RPI1* and *mlo*). A number of "lesion mimics", belonging to initiation or propagation classes which express histochemical and molecular markers associated with resistance responses have been characterised. Additionally, suppressor mutants of these lesion mimics have been identified which suppress multiple cell death phenotypes,

thus defining key steps in PCD pathways (4). Molecular characterisation of these mutants will prove useful in further defining the HR cell death pathway and its relationship to other developmental forms of PCD.

PUBLICATIONS

1. FLOR (1947) *Phytopathology* **45**, 680-685.
2. BENT, A.F. (1996) *Plant Cell* **8**, 1757-1771.
3. CENTURY *et al.* (1995) *PNAS* **92**, 6597-6601.
4. DANGL *et al.* (1996) *Plant Cell* **8**, 1793-1807.
5. ZHOU *et al.* (1995) *PNAS* **83**, 925-935.

Quatre cours et séminaires ont été donnés en dehors de l'INRA-Versailles en 1996-1997.

Cours sur les Lipo-oligosaccharides comme Régulateurs de Croissance du Tabac **Séminaire du Dr J. Dénarié**

INSA, Toulouse

Thème : Les Facteurs Nod de Rhizobium : (Biosynthèse et Activité)

Nous avons fait part de nos travaux récents qui démontrent que les lipo-chitoooligosaccharides (LCOs) produits par *Rhizobium* en tant que facteurs de nodulation sont, en fait, des facteurs de croissance, et ceci probablement pour tous les végétaux, non seulement les plantes légumineuses. Ils sont capables de remplacer, pour le tabac, des phytohormones traditionnels (auxines et cytokinines) à des concentrations extrêmement faibles (10^{-15} M). Le mécanisme d'action des LCOs doit pourtant comporter plusieurs étapes différentes puisqu'un inhibiteur de l'action des LCO n'empêche pas l'auxine de stimuler la division de protoplastes du tabac et un inhibiteur de l'action des auxines (ZNA) n'empêche pas les LCO's de stimuler cette division.

Cours (2) sur Les Gènes de Résistance Dominants comme Source de Gènes pour l'Amélioration Variétale des Plantes **Séminaire du Dr Michel Dron**

IBP, Orsay et CIRAD, Paris

Thème : L'Anthracnose du Haricot, un Modèle pour Aborder la Complexité du Déterminisme Génétique de la Résistance

Séminaire du Dr Guido Van den Ackerveken

Institut des Sciences Végétales, Gif-sur-Yvette

Thème : Bacterial Genes Involved in the Interaction with the Plant (en langue anglaise)

Séminaire du Dr Yves Dessaux

Institut des Sciences Végétales, Gif-sur-Yvette

Thème : Stratégies Ecologiques d'Ingénierie Génétique des Végétaux

Dans un premier cours nous avons parlé de maladies végétales virales et fongiques et des mécanismes de résistance spécifique. Lors du deuxième cours à l'ISV nous avons parlé surtout de maladies bactériennes (en particulier de la maladie galle du collet) et de pestes telles que les nématodes.

SÉMINAIRE (Dr M. Dron)

Dans ce séminaire le Dr Dron a décrit aussi l'étude épidémiologique de la résistance du haricot à l'antracnose.

SÉMINAIRE (Dr G. Van den Ackerveken)

Lors de ce séminaire le Dr Van den Ackerveken a décrit plus en détail les observations ayant conduit à la conclusion que le produit du gène *avr* (*avr Bs3*) est transporté dans le noyau (voir aussi le séminaire à Versailles du Dr U. Bonas). Il n'est cependant pas connu si l'interaction *avrBs3* et *Bs3* a lieu avant ou après le transport vers le noyau.

SÉMINAIRE (Dr Y. Dessaux)

L'originalité du travail conduit au laboratoire, et dans d'autres groupes de recherche dans différents pays, est de prendre en compte le fait qu'une plante ne vit pas « naturellement en boîte de Petri », mais au champ, dans un environnement sceptique. Les populations microbiennes associées aux plantes, sur leurs feuilles ou dans la terre adhérente aux racines (la rhizosphère) sont importantes, autant par les concentrations élevées détectées (10^9 bactéries cultivables/g de racine) que par les activités métaboliques qu'elles possèdent (production de régulateurs de croissance végétaux, d'antibiotiques, d'antifongiques, de chélateurs de fer, etc). D'autres micro-organismes sont encore plus étroitement associés aux plantes : il s'agit des bactéries endophytes (qui vivent à l'intérieur du végétal).

Les stratégies écologiques d'ingénierie des végétaux que nous examinons reposent sur la modification de la microflore associée aux plantes. La plupart des endophytes étudiés l'ont été parce qu'ils sont phytopathogènes. Parmi des endophytes facultatifs, *Clavibacter xyli* présente la capacité de coloniser diverses espèces végétales. L'introduction du gène déterminant la synthèse de la protéine du cristal de *Bacillus thuringiensis* dans *Clavibacter xyli*, suivie de l'infection de

plants de maïs (espèce végétale peu accessible à la transformation et à la régénération) par la souche de *C. xyli* modifiée a été réalisée. Dans les cultivars de maïs où la bactérie endophyte se multiplie efficacement, elle apporte une protection notable en inhibitant le développement de larves d'insectes phytopathogènes sensibles à la protéine du cristal.

Les stratégies de modification de flore bactérienne associée aux racines peuvent impliquer deux approches différentes. La première vise à faire produire en grande quantité par la plante, un composé utilisable par un petit nombre de bactéries d'intérêt agronomique que l'on souhaite installer au voisinage de ces plantes. Certaines flavonoïdes produites par la luzerne présentent une telle caractéristique. Ainsi, *in vitro*, la lutéoline et la quercétine apportées dans le milieu de culture de la bactérie symbiotique fixatrice d'azote *Rhizobium meliloti*, permettent une diminution du temps de génération de la bactérie et donc une accélération de sa vitesse de croissance. Cet effet est observé chez d'autres bactéries de la rhizosphère, mais pas chez toutes. Ces composés représentent donc les prototypes des molécules dignes d'attention, dont la présence en concentration faible (de l'ordre de 100 nM) exerce un effet biologique notable conduisant potentiellement à des modifications de composition de la microflore microbienne.

La deuxième approche implique la surproduction par le végétal de composés spécifiquement métabolisables par la bactérie que l'on souhaite installer dans la rhizosphère. Nous utilisons au laboratoire les opines, produites habituellement dans les tumeurs de crown gall (galle du collet) induite sous l'action d'*Agrobacterium tumefaciens*. Cette approche ne s'applique qu'à des variétés végétales accessibles à la transformation et à la régénération. Nous avons, dans un premier temps, vérifié dans un système gnotobiotique (dont tous les paramètres sont connus) la validité de l'approche. Nous avons ainsi démontré que des plantes transgéniques productrices d'opines cultivées en système hydroponique favorisaient de façon spécifique la croissance de bactéries utilisatrices d'opines. Une expérience similaire a été réalisée en conditions plus proches des conditions de culture réelles des végétaux. Des plantes productrices d'opines ont donc été installées en microcosmes sur un substrat composé de terre, de sable et de terreau non stériles. Dans ces conditions, et par comparaison avec des plantes quasi-isogéniques non productrices d'opines, nous avons observé que les populations bactériennes utilisatrices d'opines (à l'origine naturellement présentes dans le sol expérimental) étaient notablement plus importantes au voisinage des plantes transgéniques productrices. Il s'agit là de la première mise en évidence d'un impact de la culture de plantes transgéniques sur leur environnement biologique. Une étude plus fine a montré que les changements observés n'affectaient pas les grands équilibres bactériens du sol, une observation qui permet d'envisager l'utilisation de telles plantes pour favoriser spécifiquement la croissance d'organismes microbiens bénéfiques aux plantes dans le cadre du développement de procédures agronomiques plus respectueuses de l'environnement.

Cours sur Fonctions des Gènes de Résistance des Plantes**Séminaire du Dr Michel Legrand***IBMP, Strasbourg**Thème : Modifications de la Biosynthèse des Lignines et Conséquences sur les Réponses de Défense des Plantes aux Agents Pathogènes*

Ce cours résumait nos connaissances en ce domaine.

SÉMINAIRE

Le métabolisme des phénylpropanoïdes est spécifique au règne végétal et conduit, à partir de la phénylalanine, à la synthèse de nombreux composés aromatiques. En particulier, cette voie métabolique assure la biosynthèse des monomères de la lignine, un polymère aromatique complexe et important pour la plante puisqu'il assure la rigidité de la paroi et l'imperméabilité des vaisseaux conducteurs. Lors de l'infection par un pathogène, ce métabolisme est fortement stimulé et participe à l'épaississement des parois souvent observé chez les plantes développant des réactions de défense.

Nous avons modifié l'activité de la voie de synthèse des phénylpropanoïdes dans des tabacs transgéniques. Nos cibles ont été les O-méthyltransférases (OMT) qui avaient été caractérisées, isolées et clonées au laboratoire. Le tabac possède deux classes d'OMT : la classe I, exprimée de manière constitutive dans la plante saine et associée à la lignification et la classe II, difficilement détectable dans la plante saine et impliquée dans les réactions de défense.

Par l'expression sens (par un phénomène de cosuppression) et antisens des séquences d'OMT I nous avons modifié le degré de méthylation de la lignine de tabacs transgéniques. D'autre part nous avons démontré que la modulation à la baisse de l'expression des gènes de classe II affectait le niveau de résistance de la plante transgénique vis-à-vis de l'infection par un virus. Enfin, l'analyse des plantes inhibées a démontré l'implication d'une nouvelle OMT, la caféoyl-Co-AOMT, dans la biosynthèse de l'unité monométhoxylée de la lignine.

L'ensemble de ces résultats illustre l'intérêt des approches biotechnologiques, non seulement pour améliorer l'exploitation de la biomasse, mais aussi pour des études plus fondamentales visant à mieux comprendre le rôle de certaines voies métaboliques dans de grandes fonctions telle que la résistance des végétaux aux agents pathogènes.

LISTE DES PUBLICATIONS

1996 — 1997

GREVELDING, C., SUTER-CRAZZOLARA, C., VON MENGES, A., KEMPER, E., MASTERSON, R., SCHELL, J., and REISS, B. Characterisation of a new allele of *pale*

cress and its role in greening in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* 251, 532-541 (1996).

KELLER, M., SNEH, B., STRIZHOV, N., PRUDOVSKY, E., REGEV, A., KONCZ, C., SCHELL, J., and ZILBERSTEIN, A. Digestion of δ -endotoxin by gut proteases may explain reduced sensitivity of advanced instar larvae of *Spodoptera littoralis* to CryIC. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 26, 365-373 (1996).

MIKLASHEVICH, E., CZAJA, I., RÖHRIG, H., SCHMIDT, J., JOHN, M., SCHELL, J., and WALDEN, R. Do peptides control plant growth and development? *Trends Plant Sci.* 1, 411 (1996).

REGEV, A., KELLER, M., STRIZHOV, N., SNEH, B., PRUDOVSKY, E., CHET, I., GINZBERG, I., KONCZ-KALMAN, Z., KONCZ, C., SCHELL, J., and ZILBERSTEIN, A. Synergistic activity of a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin and a bacterial endochitinase against *Spodoptera littoralis* larvae. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 3581-3586 (1996).

REICHEL, C., MATHUR, J., ECKES, P., LANGENKEMPER, K., KONCZ, C., SCHELL, J., REISS, B., and MAAS, C. Enhanced green fluorescence by the expression of an *Aequorea victoria* green fluorescent protein mutant in mono- and dicotyledonous plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 5888-5893 (1996).

RÖHRIG, H., SCHMIDT, J., WALDEN, R., CZAJA, I., LUBENOW, H., WIENEKE, U., SCHELL, J., and JOHN, M. Convergent pathways for lipochitoooligosaccharide and auxin signaling in tobacco cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 13389-13392 (1996).

SCHELL, J. Biotechnologies et agriculture : les nouveaux défis. Cahiers de la Fondation des Treilles, N°7/Année 1995, 167-186 (1996).

STRIZHOV, N., KELLER, M., KONCZ-KALMAN, Z., REGEV, A., SNEH, B., SCHELL, J., KONCZ, C., and ZILBERSTEIN, A. Mapping of the entomocidal fragment of *Spodoptera*-specific *Bacillus thuringiensis* toxin CryIC. *Mol. Gen. Genet.* 253, 11-19 (1996).

STRIZHOV, N., KELLER, M., MATHUR, J., KONCZ-KALMAN, Z., BOSCH, D., PRUDOVSKY, E., SCHELL, J., SNEH, B., KONCZ, C., and ZILBERSTEIN, A. A synthetic cryIC gene, encoding a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin, confers *Spodoptera* resistance in alfalfa and tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 15012-15017 (1996).

VAN DE SANDE, K., PAWLOWSKI, K., CZAJA, I., WIENEKE, U., SCHELL, J., SCHMIDT, J., WALDEN, R., MATVIENKO, M., WELLINK, J., VAN KAMMEN, A., FRANSSSEN, H., and BISSELING, T. Modification of phytohormone response by a peptide encoded by *ENOD40* of legumes and a nonlegume. *Science* 273, 370-373 (1996).

WALDEN, R., MAAS, C., MARTINI, N., and SCHELL, J. Transgenic plants. *European Review* 4, 393-414 (1996).

GADELLA Jr., T.W.J., VEREB Jr., G., HADRI, A.-E., RÖHRIG, H., SCHMIDT, J., JOHN, M., SCHELL, J., and BISSELING, T. Microspectroscopic imaging of nodulation factor-binding sites on living *Vicia sativa* roots using a novel bioactive fluorescent nodulation factor. *Biophys. J.* 72, 1986-1996 (1997).

JACH, G., PINSORF, E., and SCHELL, J. Direct isolation of poly A⁺ RNA from transgenic tobacco leaves with Oligotex. *Qiagen News* 1, 20-21 (1997).

JOHN, M., RÖHRIG, H., SCHMIDT, J., WALDEN, R., and SCHELL, J. Cell signalling by oligosaccharides. *Trends Plant Sci.* 2, 111-115 (1997).

MAAS, C., SIMPSON, C.G., ECKES, P., SCHICKLER, H., BROWN, J.W.S., REISS, B., SALCHERT, K., CHET, I., SCHELL, J., and REICHEL, C. Expression of intron modified NPT II genes in monocotyledonous and dicotyledonous plant cells. *Molecular Breeding* 3, 15-28 (1997).

MOORE, I., DIEFENTHAL, T., ZARSKY, V., SCHELL, J., and PALME, K. A homolog of the mammalian GTPase Rab2 is present in *Arabidopsis* and is expressed predominantly in pollen grains and seedlings. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 762-767 (1997).

REISS, B., KOSAK, H., KLEMM, M., and SCHELL, J. Targeting of a functional *Escherichia coli* RecA protein in the nucleus of plant cells. *Mol. Gen. Genet.* 253, 695-702 (1997).

RÖHRIG, H., SCHMIDT, J., WIENEKE, U., WALDEN, R., SCHELL, J., and JOHN, M. N-Acyl galactosamine inhibition of lipo-chitooligosaccharide action. In : « *Biological Fixation of Nitrogen for Ecology and Sustainable Agriculture* » (NATO ASI Series, Vol. G 39), A. Legocki, H. Bothe, A. Pühler (Eds.), Springer Verlag, Berlin, pp. 59-62 (1997).

SCHELL, J. Cotton carrying the recombinant insect poison Bt toxin : no case to doubt the benefits of plant biotechnology. (Commentary) *Current Opinion Biotech.* 8, 235-236 (1997).

SCHULTE, W., TÖPFER, R., STRACKE, R., SCHELL, J., and MARTINI, N. Multi-functional acetyl-CoA carboxylase from *Brassica napus* is encoded by a multi-gene family : indication for plastidic localization of at least one isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 3465-3470 (1997).

SLABAUGH, M.B., HUESTIS, G.M., LEONARD, J., HOLLOWAY, J.L., ROSATO, C., HONGTRAKUL, V., MARTINI, N., TOEPFER, R., VOETZ, M., SCHELL, J., and KNAPP, S.J. Sequence-based genetic markers for genes and gene families : single-strand conformational polymorphisms for the fatty acid synthesis genes of *Cuphea*. *Theor. Appl. Genet.* 94, 400-408 (1997).

CONGRÈS

7-12/7/96 : 24th Meeting of the Federation of European Biochemical Societies (FEBS 96). Sir Hans Krebs Lecture « Probing the mechanism of action of old and new phytohormones ». Barcelona (Spain).

19-20/8/1996 : The 3rd Korean-German Joint Symposium in Plant Biotechnology. « Brassinosteroids and lipo-chitooligosaccharides as growth regulating factors in plants ». Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung. Köln (Germany).

9-13/9/1996 : 10th FESPP Congress on From Molecular Mechanisms to the Plant : an Integrated Approach. « Progress in understanding the mechanism of action in auxins » Firenze (Italy).

16-18/11/1996 : Ceres Forum on Food Products from Plant Biotechnology. « State-of-the art biotechnology ». Westfields, VA (USA).

28-29/11/1996 : Symposium on La recherche agronomique européenne dans le monde du XXI^e siècle. « Les avancées de la biologie végétale ». Strasbourg (France).

6-9/12/1996 : International Symposium on « Feeding a World Population of More than Eight Billion People : a Challenge to Science ». The Rank Prize Funds. Ferndown, Dorset (UK).

13/1/1997 : The Green Alliance. « How can Biotechnology benefit the environment ? » London (UK).

18-25/1/1997 : Winter Seminar on « Molecular biology and biophysical chemistry of the cell » Klosters (Switzerland).

30/1/1997 : Academia Europaea London. « Academia statement on biotechnology patenting ». Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung. Köln (Germany).

16-18/2/1997 : International Symposium on « Plant oils as fuels — present state of science and future developments ». Schloßhotel Cecilienhof Potsdam (Germany).

4/3/1997 : Forum de travail « La recherche française : Atouts et perspectives pour le XXI^e siècle ». Palais du Luxembourg. Paris (France).

13-14/3/1997 : JSPS/Alexander von Humboldt-Symposium « Basic Research in Japan and Germany ». Universitätsclub Bonn (Germany).

6-7/4/1997 : German-American Academic Council Foundation. DAAK-Leopoldina-Symposium « Naturwissenschaftliche Forschung in Hochschulen, Akademien und außeruniversitären Institutionen mittelosteuropäischer Länder, Deutschlands und der USA — Ansätze, Erfahrungen, Perspektiven ». Halle (Germany).

16-17/4/1997 : 6th Symposium of The Otto Warburg Center for Agricultural Biotechnology « Developmental pathways in plants : biotechnological implications ». Rehovot (Israel).

6/5/1997 : Vortrag bei der Carl Friedrich von Siemens Stiftung. « Pflanzliche Gentechnologie — Grundlagenforschung und Anwendung ». München (Germany).

19/5/1997 : Inauguration Lecture of the Gitter-Smolarz Library of Life Sciences and Medicine « The progress in biological sciences and technologies : exciting possibilities — difficult ethical choices ». Tel Aviv University (Israel).