

**Université de M'sila**

**Faculté des Sciences**

**Département de Biochimie et Microbiologie**

**1<sup>ière</sup> année Master Microbiologie**

**Module d' Interaction Microbienne**

**Responsable du module**

**Boubekeur. H**

**chapitre III**

**Les interactions entre les microorganismes du sol et la plante**

**3. 2. Symbiose nuisible Agrobacterium et la galle du collet**

**Introduction**

Certains micro-organismes développent des symbioses parasites avec les plantes. Le genre *Agrobacterium*, est l'exemple type d'organisme, provoquant la formation d'excroissances tumorales sur diverses plantes. Les deux espèces d'*Agrobacterium* les plus étudiées sont *Agrobacterium tumefaciens*, responsable de la galle du collet, et *rhizogenes* qui provoque la maladie des racines velues. Le processus de transgénése mise en place par *A. tumefaciens* grâce à la présence du plasmide Ti a permis la mise en évidence du lien entre la tumorigénèse induite par *A. tumefaciens* et l'intégration de son ADN-T dans le génome de la cellule végétale infectée.

Ce mécanisme de transgénése fait intervenir deux groupes de gènes localisés à des endroits différents et régulés de façon distincte. Plus schématiquement, le cycle d'infection d'*A. tumefaciens* se décompose en trois étapes :

- La reconnaissance bactérie / hôte,
- Le transfert de l'ADN-T,
- L'expression des gènes de l'ADN-T qui induisent le développement de la tumeur.

**3. 2.1. Reconnaissance bactérie / hôte**

**3. 2.1.1. Fixation aux cellules hôtes**

Lors d'une blessure, la plante libère des molécules chimio-attractantes telles que des sucres et des composés phénoliques attirant ainsi la bactérie qui se déplace vers la blessure à l'aide de ses flagelles en suivant le gradient de concentration. Pour établir un contact physique avec son hôte, *A. tumefaciens* reconnaît des protéines localisées sur la paroi végétale et apparentées à la vitronectine, protéine impliquée dans le maintien de la structure et dans la cohésion des cellules végétales.

Ces protéines sont reconnues par des polysaccharides acylés de type  $\beta$ -1-2 glucane, synthétisés et excrétés par les gènes du chromosome bactérien tels que *exoC*, *chvA* et *chvB*. L'interaction du polysaccharide avec la protéine de type vitronectine entraîne la synthèse de filaments de type cellulose stabilisant et renforçant ainsi l'attachement de la bactérie sur la cellule hôte.

### **3. 2.1.2. Activation des gènes de virulence**

L'activation des gènes de virulence *vir* est une étape indispensable pour le processus de transgénération. Les gènes *vir* présents sur la partie non transférable du plasmide Ti ont besoin d'être induits par l'exsudat des cellules blessées pour être exprimés. Les composés phénoliques synthétisés par la plante sont reconnus par la protéine *VirA* (récepteur présent dans la membrane interne de la bactérie). Après fixation des composés, la protéine *VirA* s'auto-phosphoryle puis phosphoryle la protéine régulatrice cytoplasmique *VirG* qui se fixe sur la boîte *vir* qui active la transcription des promoteurs des gènes *vir*. Cette dernière étape permet de stabiliser le contact avec l'hôte et permet d'engager le processus de transfert du T-DNA.

### **3. 2.2. Transfert T-DNA**

#### **3.2.2.1. Production du brin T**

L'expression des gènes *vir* conduit à la production d'un brin d'ADN-T. Pour cela, les endonucléases *VirD1* et *VirD2* vont agir spécifiquement pour couper un fragment de plasmide Ti. Grâce à son activité hélicase, la protéine *VirD1* sépare les deux brins d'ADN-T. La protéine *VirD2* quand à elle clive l'ADN-T au niveau des séquences répétées de 25 nucléotides, spécifiques des régions flanquantes de ce fragment. *VirD2* se fixe covalamment à l'extrémité 5' du brin d'ADN-T. Le complexe *VirD2*/ADN-T se sépare du reste du plasmide, et ainsi le brin T est formé et il va pouvoir s'orienter afin d'être transféré dans la cellule hôte

pendant que le plasmide Ti est régénéré à l'aide de la machinerie de réparation de l'ADN de la bactérie.

### **3. 2.2.2. Translocation du brin T dans la cellule végétale**

Le complexe brin T/ VirD2 ainsi que quatre autres protéines effectrices bactériennes (VirE2, VirE3, VirF et VirD5) sont transférés dans la cellule végétale. Ce transfert requiert une machinerie protéique particulière qui forme un canal entre la bactérie et la cellule hôte. Cette structure est un système de sécrétion de type IV composé d'un assemblage de 12 protéines : 11 protéines VirB et de la protéine VirD4 .

La protéine VirB1 hydrolyse localement le peptidoglycane de la membrane bactérienne, puis les autres protéines s'assemblent autour de VirD4 pour former le transporteur T. Le complexe multiprotéique formé est composé en trois sous groupe. Le pilus T composé principalement de VirB2 et des ATPases VirB4, VirB11 et VirD4 fournissent l'énergie nécessaire à l'assemblage du transporteur T et au transfert du brin T. Les protéines VirB6 à VirB10 constituent le canal de translocation traversant les membranes bactériennes. Enfin les protéines VirB2, VirB5 et VirB7 sont impliquées dans le contact bactérie/ cellule végétale.

### **3. 2.2.3. Intégration dans le génome de l'hôte**

A son entrée dans cellule végétale, le brin T est recouvert de protéines VirE2 afin de le protéger des nucléases végétales et de lui conférer la structure nécessaire pour son transport jusqu'au noyau de la cellule hôte. On le nomme complexe T. Pour le moment, les données expérimentales présents dans la littérature ne permettent pas de déterminer précisément où se forme le complexe T mais la possibilité que le complexe se forme avant ou lors du passage dans le canal de translocation est l'hypothèse la plus récente.

### **3.2.2.4. Importation du complexe T dans le noyau**

Dans le cytoplasme de la cellule végétale, le complexe T est dirigé vers le noyau de la cellule à l'aide de protéines cargos telles que la dynéine. De plus, il a été démontré que des protéines de la cellule hôte de la famille des importines se fixent sur les séquences NLS (Nuclear Localisation Signal) de VirD2 et VirE2, facilitant ainsi l'entrée du complexe T dans le noyau. La protéine VirE2 interagit avec la protéine de plante VIP1 (VirE2-Interacting Protein 1). En réponse au stress induit par l'entrée de protéines dans la cellule de plante, VIP1 est activé par

phosphorylation par la protéine MPK3. Dans de telles conditions, VIP1 est recrutée dans le noyau où elle y co-transporte VirE2 et donc l'ADN-T.

### **3.2.2.5. Intégration de l'ADN-T dans le génome végétal**

L'intégration de l'ADN-T dans le génome de la plante se fait de façon aléatoire, avec une préférence pour les régions transcriptionnellement actives de la chromatine. Actuellement, deux modèles sont proposés.

Le premier se base sur le principe d'une recombinaison entre l'ADN-T simple brin T et la séquence d'ADN de la plante dans des régions où il y aurait une « micro-homologie ». La présence de VirD2 sur la partie 5' du brin T permettrait la coupure de l'ADN végétal et ainsi l'intégration du brin d'ADN-T. Au moment de l'intégration du brin d'ADN-T, VirD2 et VirE2 sont décrochés permettant ainsi la synthèse du brin complémentaire de l'ADN-T et l'incorporation d'une copie double brin dans le génome de la plante.

Le deuxième modèle se base sur une recombinaison non homologue (NHEJ : non homologous endjoining) suite à des cassures de l'ADN végétal. Ceci suppose que le brin d'ADN-T est répliqué pour former un double brin T qui s'intègre au niveau d'une cassure dans le génome de la cellule végétale. Cette réplication non homologue explique plus facilement la présence de copies répétées d'ADN-T et la présence fréquente de plusieurs ADN-T d'*Agrobacterium* de souches différentes dans un même génome de cellule végétale.

### **3.2.3. Tumorigenèse**

#### **3.2.3.1. Expression des gènes d'ADN-T associés au développement de la tumeur**

Les gènes portés par l'ADN-T sont transcrits et traduits grâce à la machinerie cellulaire de la plante et leur régulation se fait via leurs propres promoteurs, car les promoteurs bactériens ressemblent aux promoteurs eucaryotes.

Certains gènes codés par l'ADN-T d'*Agrobacterium* permettent la synthèse dans la cellule de plante d'hormones végétales. Parmi ces gènes, *iaaM*, *iaaH* et *ipt* participent à la synthèse des hormones végétales de la famille des auxines ou cytokinine (le 3-indole-acétamide (IAM), le 3-indole-acétate (AIA), l'isopentényladénosine 5'-monophosphate), connues pour réguler la prolifération, l'élongation et la différenciation des cellules végétales. L'expression de ces oncogènes de l'ADN-T aboutit à une accumulation des phytohormones, provoquant une

dérégulation hormonale qui induit la prolifération anarchique des cellules et la formation de tumeurs.

### **3.2.3.1. 1.Synthèse des opines**

Les opines sont des petites molécules dont la synthèse est réalisée dans la cellule tumorale en réponse à un stimulus de la bactérie.

Dans la nature, il existe une vingtaine d'opines résultant de la condensation d'un acide aminé et d'un sucre ou d'un acide  $\alpha$ -cétonique. Elles sont séparées en deux classes, les opines qui proviennent de la condensation d'un acide aminé et d'un sucre comme l'agropine, et celles qui sont dérivées de la condensation d'un acide aminé et d'un acide comme nos deux opines d'intérêt, l'octopine et la nopaline, qui résultent respectivement de la condensation d'une arginine avec un pyruvate ou un  $\alpha$ -kétooglutarate. Les protéines nécessaires à leur biosynthèse sont codées sur la partie non transférable du plasmide Ti. Les bactéries utilisent les métabolites présents dans la cellule hôte pour générer les opines. Les gènes de dégradation des opines sont portés par les plasmides Ti, et seul *Agrobacterium* est capable de métaboliser ces molécules. Ainsi pour produire les opines, les agrobactéries détournent l'activité métabolique de la plante à son profit.

Toutes les *Agrobacterium* ne catabolisent pas les mêmes opines. En effet, chaque opine est spécifique et utilisable seulement par la souche portant les gènes de synthèse correspondant sur le plasmide Ti. Par exemple, la souche d'*A. tumefaciens* B6 contenant le plasmide Ti B6 est une souche spécifique de l'octopine (produit du gène *occ* : octopine synthase) et de la mannopine (produit du gène *mas* : mannopine synthase) et celle contenant le plasmide Ti C58 une souche à nopaline (produit du gène *noc* : nopaline synthase) et agrocinopine A et B (produits du gène *acs* : agrocinopine synthase). Cette caractéristique a été utilisée pour le classement des souches d'*Agrobacterium*.

### **3.2.3.1.2. Rôles des opines**

Le premier rôle des opines est de servir de source de carbone et d'azote aux bactéries capables de les cataboliser. Le fait qu'*Agrobacterium* ne puisse utiliser que les opines dont il a le gène sur le plasmide Ti, lui confère une spécificité de substrat par rapport aux autres bactéries présentes dans la tumeur, et favorise sa propagation. En plus du rôle de nutriment, certaines opines comme l'agrocinopine et l'octopine peuvent induire de façon indirecte le transfert conjugatif du plasmide Ti en stimulant l'induction des gènes *vir*. Ce phénomène est appelé le

« concept d'opine ». Ainsi les opines, jouent un rôle majeur dans la propagation et la dissémination d'*Agrobacterium tumefaciens* et créent un environnement écologique favorable à la croissance et au développement du pouvoir pathogène d'*Agrobacterium tumefaciens* (riche en métabolites et opine).

### **3.2.3.2. Structure de la tumeur**

Le développement des tumeurs végétales induites par *A. tumefaciens* est associé à la néovascularisation des tissus. Le réseau vasculaire des tumeurs est connecté au système circulatoire de la plante, permettant ainsi l'apport d'eau et de nutriments nécessaires à la multiplication des bactéries et donc à la prolifération des cellules tumorales. La mise en place du réseau vasculaire et la prolifération des cellules tumorales sont liés à une concentration élevée en auxine et à un déficit en oxygène dans la tumeur. Ces deux phénomènes favorisent la stimulation de l'activité de l'acide 1-aminocyclopropane-1 carboxilique (ACC) qui joue un rôle important dans la synthèse de l'éthylène, hormone de plante. Cette hormone participe à la vascularisation par la restructuration du xylème et stimule la synthèse de l'acide abscissique (ABA), la phytohormone ABA ayant un rôle dans la protection de la tumeur contre la déshydratation.